

**T.C**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

***LEISHMANIA DONOVANI* YÜZEY GP63 GENİNİN**  
**KLONLANMASI VE IL-12 İLE FORMÜLASYONU**

**Hazırlayan**  
**Arzu CHARYYEVA**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Süleyman YAZAR**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Ocak 2016**  
**KAYSERİ**

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

***LEISHMANIA DONOVANI* YÜZEY GP63 GENİNİN  
KLONLANMASI VE IL-12 İLE FORMÜLASYONU**

**Hazırlayan  
Arzu CHARYYEVA**

**Danışman  
Prof. Dr. Süleyman YAZAR**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2015-6249 kodlu kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Ocak 2016  
KAYSERİ**

## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK**

Bu çalışmadaki tüm bilgileri, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

**Adı-Soyadı: Arzuv CHARYYEVA**

**İmza:**

**YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI**

**“*Leishmania donovani* Yüzey Gp63 Geninin Klonlanması ve IL-12 ile Formülasyonu” Adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne Uygun Olarak Hazırlanmıştır.**


**Hazırlayan****Arzu CHARYYEVA****Danışman****Prof. Dr. Süleyman YAZAR****Anabilim Dalı Başkanı****Prof. Dr. Süleyman YAZAR**

**Prof. Dr. Süleyman YAZAR** danışmanlığında Arzuv CHARYYEVA tarafından hazırlanan “*Leishmania donovani* Yüzey Gp63 Geninin Klonlanması ve IL-12 ile Formülasyonu” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

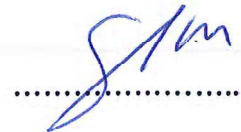
19/01/2016

**JÜRİ****İmza**

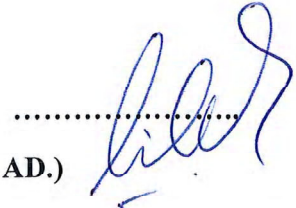
**Danışman : Prof. Dr. Süleyman YAZAR**  
(Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı)



**Üye : Prof. Dr. Salih KUK**  
(Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı)



**Üye : Prof. Dr. Çiler AKISÜ**  
(Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak. Parazitoloji AD.)

**ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

**Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR**  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Erciyes Üniversitesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalında lisansüstü eğitimim boyunca, her konuda desteğini hissettiğim çalışmalarımın her aşamasında büyük bir özveri ile katkıda ve yardımda bulunan tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Süleyman YAZAR'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca akademik bilgi ve tecrübeleriyle gerek tez çalışmalarımda gerekse diğer bilimsel çalışmalarımda bilimsel desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve birikimlerinden yararlandığım saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Salih KUK ve Prof. Dr. İzzet ŞAHİN'e,

Tezimin laboratuvar çalışmalarında beni yalnız bırakmayan, yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Eda SİVCAN, Serkan KARACA, Şirin Sahra CEYLAN, ve diğer lisansüstü öğrencilerine,

Çalışma süresince TYL-2015-6249 kodlu proje ile maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi'ne,

Tez yazımı çalışmalarımda resim ve çizimler konusunda bulunduğu tavsiyeler ve yardımlarından dolayı değerli arkadaşım Orsolya VASS'a

Tüm eğitim hayatımda olduğu gibi lisansüstü eğitimim boyunca da bana duydukları güven, her konuda sağladıkları destekleri ve fedakarlıklarından dolayı değerli aileme teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

**Arzu CHARYYEVA**  
**KAYSERİ, Ocak 2016**

# **LEISHMANIA DONOVANI YÜZEY GP63 GENİNİN KLONLANMASI VE IL-12 İLE FORMÜLASYONU**

**Arzu CHARYYEVA**

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Parazitoloji Anabilim Dalı**

**Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2016**

**Danışman: Prof. Dr. Süleyman YAZAR**

## **ÖZET**

Leishmaniasis, *Leishmania* cinsine ait zorunlu hücre içi protozoon parazitin sebep olduğu vektör kaynaklı bir hastalıktır. Özellikle tropikal ve subtropikal bölgeler olmak üzere dünyada 98 ülkede 35 milyondan fazla kişi risk altındadır. Hastalık tedavi edilmediği takdirde ölümcül olabilmektedir ve henüz insan kullanımı için etkili bir aşı mevcut değildir. Leishmaniasise karşı immun yanıtı uyaraabilen birçok antijen bulunmakta olup Gp63 parazitin virulansında önemli fonksiyonlara sahip olmasıyla birlikte en umut verici immunojenlerden biridir. Gp63'ün tek başına ya da diğer antijenler ve adjuvanlarla kombine edildiğinde hayvanlarda leishmaniasise karşı koruyucu olduğunu gösteren birçok çalışma mevcut olmasına rağmen adjuvan olarak IL-12 ile kombine edildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada hastalığın en ağır formu olan visceral leishmaniasise (VL) sebep olan *L.donovani* türüne ait promastigotlar kullanılmıştır. Kültürde üretilen promastigotlardan saflaştırılan total genomik DNA templeyt olarak kullanılmış ve Gp63 geni PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. PCR ürünü pcDNA3.1 vektörüne klonlanarak kompetan hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Antibiyotik içeren LB pleytinde üreyen hücreler PCR tarama yöntemi ile pozitif olarak tespit edildikten sonra kültürü yapılan hücrelerden rekombinant plazmit saflaştırılması yapılmıştır. Gp63 genini içeren saflaştırılmış plazmitler miniprep PCR tarama, restriksiyon enzim reaksiyonları ve DNA dizi analizi gibi çeşitli yöntemlerle doğrulanmıştır. Doğrulanmış ilgili geni kodlayan rekombinant plazmit endotoksinsiz olarak üretilmiş ve IL-12 ile aşılama işlemi uygulanana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada elde edilen ürün sadece IL-12 ile formüle edilmiş DNA aşısı şeklinde değil, aynı zamanda leishmaniasise karşı umut verici başka antijenlerle de kombinasyon halinde kullanılabilir. Ayrıca Gp63 genini kodlayan plazmit aşı çalışmalarında ve ELISA gibi tanı testlerinde yararlanılabilecek rekombinant protein sentezinde de kullanılma potansiyeli vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Leishmaniasis, *Leishmania donovani*, Gp63, IL-12.

**CLONING OF THE *LEISHMANIA DONOVANI* SURFACE GP63 GENE AND FORMULATION WITH IL-12**

**Arzu CHARYYEVA**

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences**

**Department of Parasitology**

**Master Thesis, January 2016**

**Supervisor: Prof. Dr. Suleyman YAZAR**

**ABSTRACT**

Leishmaniasis is a vector born disease caused by obligate intracellular protozoan parasite of the genus *Leishmania*. More than 35 million individuals are at risk in 98 countries worldwide, especially in tropical and subtropical regions. Disease can be fatal if left untreated and there is no effective vaccine available for human use. There are many antigens can induce immune response against leishmaniasis and Gp63 is one of the most promising immunogens with its important functions in parasite virulence. There are a lot of studies indicate that Gp63 alone or combined with other antigens or adjuvants can protect animals from leishmaniasis, but there is no study until today carried out on Gp63 combined with IL-12 as an adjuvant. In this study promastigotes of *L.donovani* species which causes visceral leishmaniasis (VL) the most severe form of the disease was used. Total genomic DNA purified from the cultured promastigotes used as template and Gp63 gene was amplified by PCR. PCR product cloned into pcDNA3.1 vector and transformed into competent cell. After detection growing cells on the LB plate containing antibiotic as positive by PCR screening, recombinant plasmid purification was performed from the cultured cells. Purified plasmids containing Gp63 gene confirmed by various methods such as miniprep PCR screening, restriction enzyme reactions and DNA sequencing. Confirmed recombinant plasmid encoding the gene of interest produced as endotoxin-free and stored at -20°C before vaccination with IL-12. The product obtained in this study can be used for immunization not only as DNA vaccine formulated with IL-12, but also combined with another promising antigens against leishmaniasis. Furthermore plasmid encoding Gp63 gene has the potential to be used for synthesis of recombinant protein, which can be used for vaccination studies and for diagnostic tests such as ELISA.

**Key Words:** Leishmaniasis, *Leishmania donovani*, Gp63, IL-12.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇ KAPAK .....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
(Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak. Parazitoloji AD.) .....	iv
ONAY .....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT .....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMALAR.....	x
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. TARİHÇE VE SINIFLANDIRMA .....	3
2.2. MORFOLOJİ.....	4
2.3. HAYAT DÖNGÜSÜ .....	5
2.4. EPİDEMİYOLOJİ .....	7
2.5. KLİNİK ÖZELLİKLER VE PATOGENEZ.....	8
2.6. TANI VE TEDAVİ.....	10
2.7. KORUNMA VE KONTROL.....	11
2.8. AŞI ÇALIŞMALARI.....	11
2.8.1. Sinek salgısı bazlı aşılar.....	12
2.8.2. Birinci nesil aşılar.....	12
2.8.3. İkinci nesil aşılar. ....	12
2.8.4. Üçüncü nesil aşılar .....	13
2.9. <i>LEISHMANIA DONOVANI</i> YÜZEY GLİKOPROTEİN 63 (LdGP63).....	14

2.10. ADJUVANLAR VE İNTERLÖKİN-12 .....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	16
3.1. GEREÇ.....	16
3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler .....	16
3.2. YÖNTEM.....	19
3.2.1. <i>Leishmania donovani</i> Promastigot Kültürü .....	19
3.2.2. Kültürden Genomik DNA İzolasyonu .....	19
3.2.3. Primerler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	21
3.2.4. PCR Ürününün Saflaştırılması .....	21
3.2.5. LdGp63 Geninin pCDNA3.1 Plazmitine Yerleştirilmesi.....	22
3.2.6.Rekombinant Plazmitin Kompetan Hücrelerine Transformasyonu	23
3.2.7. Klonlamanın Doğrulanması .....	24
3.2.7.1. PCR Tarama ile Doğrulama.....	24
3.2.7.2. Miniprep ve PCR ile Doğrulama .....	24
3.2.7.3. DNA Dizi Analizi ile Doğrulama .....	25
3.2.7.4. Restriksiyon Enzim Reaksiyonları ile Doğrulama.....	26
3.2.8. Endotoksinsiz Rekombinant Plazmit Elde Edilmesi. ....	27
3.2.9. Rekombinant pCDNA3.1 LdGp63 Plazmit ile IL-12 Formülasyonu .....	29
4.BULGULAR .....	30
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	39
6.KAYNAKLAR .....	43
ÖZGEÇMİŞ	

## KISALTMALAR

<b><i>L. donovani:</i></b>	<i>Leishmania donovani</i>
<b><i>L. major:</i></b>	<i>Leishmania major</i>
<b><i>L. tropica:</i></b>	<i>Leishmania tropica</i>
<b><i>L. braziliensis:</i></b>	<i>Leishmania braziliensis</i>
<b><i>L. infantum:</i></b>	<i>Leishmania infantum</i>
<b><i>L. amazonensis:</i></b>	<i>Leishmania amazonensis</i>
<b><i>L. guyanensis:</i></b>	<i>Leishmania guyanensis</i>
<b><i>L. tarentolae:</i></b>	<i>Leishmani tarentolae</i>
<b><i>L. panamensis:</i></b>	<i>Leishmania panamensis</i>
<b><i>L. chagasi:</i></b>	<i>Leishmania chagasi</i>
<b>VL:</b>	Visceral Leishmaniasis
<b>KL:</b>	Kutanöz Leishmaniasis
<b>MKL:</b>	Mukokutanöz Leishmaniasis
<b>PKADL:</b>	Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis
<b>IL-12:</b>	İnterlökin-12
<b>ELISA:</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>Th1:</b>	T helper 1
<b>NK:</b>	Natural Killer
<b>HIV:</b>	Human Immunodeficiency Virus
<b>KKKA:</b>	Kırım Kongo Kanamalı Ateşi
<b>LPG:</b>	Lipophosphoglycan
<b>Gp63:</b>	Glycoprotein 63
<b>LACK:</b>	Leishmania Activated C Kinase
<b>A2:</b>	Amastigote stage specific Antigen 2

<b>KMP-11:</b>	Kinetoplastid Membrane Protein-11
<b>CPA:</b>	Cysteine Protease A
<b>CPB:</b>	Cysteine Protease B
<b>SLA:</b>	Soluble <i>Leishmania</i> Antigen
<b>µl:</b>	Mikrolitre
<b>mg:</b>	Miligram
<b>rpm:</b>	Rotation Per Minute
<b>bç:</b>	Baz çifti
<b>g:</b>	Gram
<b>ml:</b>	Mililitre
<b>M:</b>	Molar
<b>pmol:</b>	Pikomol
<b>PCR:</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>DSÖ:</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>GAP:</b>	Güneydoğu Anadolu Projesi
<b>TLR-4:</b>	Toll Like Receptor-4
<b>TLR-9:</b>	Toll Like Receptor-9
<b>BCG:</b>	Bacillus Calmette-Guerin
<b>MVA:</b>	Modifiye Vaccinia Virus Ankara
<b>FPV:</b>	Fowlpoxvirus
<b>DSPC:</b>	Distearoyl fosfatidilkolin
<b>FML:</b>	Fukoz Mannoiz Ligant
<b>HASP:</b>	Hydrolytic Acetylated Surface Protein
<b>rLdPDI:</b>	recombinant <i>L.donovani</i> Protein Disulfide Isomerase
<b>HSP70:</b>	Heat Shock Protein 70
<b>HSP83:</b>	Heat Shock Protein 83

## TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
<b>Tablo 3.1.</b> Çalışmada kullanılan cihazlar.....	17
<b>Tablo 3.2.</b> Çalışmada kullanılan malzemeler.....	17
<b>Tablo 3.3.</b> Real-Time PCR reaksiyonu için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	21
<b>Tablo 4.1.</b> DNA sekans analizi sonucu elde edilen <i>L.donovani</i> Gp63 genine ait DNA dizisi.....	35
<b>Şekil 2.1.</b> <i>Leishmania</i> sp. ince yapısı.....	5
<b>Şekil 2.2.</b> <i>Leishmania</i> sp. hayat döngüsü. ....	7
<b>Şekil-2.3.</b> Giemsa ile boyanmış preparatta makrofaj hücreleri içerisindeki amastigotların ışık mikroskobunda görünümü. ....	10
<b>Şekil-3.1.</b> pcDNA3.1 vektörünün haritası.....	26
<b>Şekil-4.1.</b> RPMI-1640 besiyerinde üreyen <i>L.donovani</i> promastigotlarının kümeleşmiş görüntüsü.....	29
<b>Şekil-4.2.</b> <i>L.donovani</i> Gp63 genine ait PCR ürününün Jel elektroforezi görüntüsü.....	30
<b>Şekil-4.3.</b> Clean-Up ürünü elektroforez sonrası agaroz jel görüntüsü.....	31
<b>Şekil-4.4.</b> pcDNA3.1 + Gp63 geninin kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası oluşan koloninin LB pleytindeki görüntüsü. ....	32
<b>Şekil 4.5.</b> <i>L.donovani</i> Gp63 gen spesifik primerleriyle gerçekleştirilen PCR tarama sonucunun agaroz jel görüntüsü.....	32
<b>Şekil-4.6.</b> Miniprep ürününün templeyt olarak kullanıldığı ve Gp63 gen spesifik primerlerle uygulanan PCR ürününün agaroz jel görüntüsü.....	33
<b>Şekil-4.7.</b> <i>L.donovani</i> yüzey Gp63 proteininin üç boyutlu yapısı.....	36
<b>Şekil-4.8.</b> Rekombinant plazmidin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu elde edilen ürünün agaroz jel görüntüsü... ..	37

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafında yoksulluğa bağlı, ihmal edilmiş enfeksiyon hastalıkları arasında yer almakta olup, vektör kaynaklı bir hastalıktır. *Leishmania* cinsine ait türlerin neden olduğu bu hastalık özellikle Afrika, Latin Amerika, Güney ve Orta Asya, Akdeniz Havzası ve Ortadoğu'da yaygın bir şekilde görülmektedir (1). Zorunlu hücre içi protozoon parazit olan *Leishmania* türleri memeli konağına kum sineklerinin kan emmesi sırasında bulaşmaktadır. Hastalığın klinik belirtileri *Leishmania* türlerine bağlı olarak oldukça değişkenlik göstermektedir (2).

Visceral leishmaniasis (VL), yüksek mortalite oranı ile leishmaniasisin en ağır formu olup tedavi edilmediği takdirde 2 yıl içerisinde ölüme neden olabilmektedir (2). Kala azar olarak da bilinen visceral leishmaniasis, tedaviden sonra Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis (PKADL) olarak da bilinen kutanöz forma dönüşebilmektedir (2). *L.donovani*, *L.infantum* ve *L.chagasi* türlerinin sebep olduğu VL olgularının %90'ı Brezilya, Hindistan, Sudan ve Bangladeş'te bildirilmiştir ve en çok etkilenen hasta grubu 15 yaş altı çocuklardır (3, 4).

*Leishmania braziliensis*'in sebep olduğu Mukokutanöz leishmaniasise (MKL) ise parazitin burun, ağız, oro ve nazo-farinks, gözkapağı gibi mukokutanöz dokulara yerleştiği ve korkunç şekil bozukluklarına sebep olduğu bir diğer formudur (5).

Kutanöz leishmaniasis (KL) ise deride kum sineklerine maruz kalan bölgelerde ülseratif veya nodüler lezyonların oluştuğu en hafif formudur ve *L.mexicana*, *L.tropica*, *L.amazonensis*, *L.guyanensis*, *L.braziliensis* ve *L.panamensis* gibi birçok *Leishmania* türü sebep olabilmektedir (5).

Leishmaniasise karşı etkili bir aşı henüz geliştirilememiştir ve korunma/kontrol amaçlı çeşitli çalışmalar halen devam etmektedir. Glikoprotein-63 (Gp63) tüm *Leishmania* türlerinin promastigot döneminde ifade edilmektedir ve proteinaz aktivitesine sahip olup en umut verici aşı adaylarından biridir (6). Parazitin bu evrede kamçısı da dahil olmak üzere tüm yüzeyinde bulunan membran proteinidir (7).

Bu çalışmada *Leishmania donovani* Gp63 geni izole edilerek, klonlanıp IL-12 ile formülasyonu yapılmıştır. Çalışma sonrasında klonlanan ürün ile daha ileriki çalışmalarda gerek rekombinant protein + IL-12, gerekse DNA aşısı + IL-12 olarak aşı etkinliğinin araştırılmasında kullanılabilecek ürünün elde edilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. TARİHÇE VE SINIFLANDIRMA

*Leishmania* parazitlerinin neden olduğu hastalık tabloları çok eski uygarlıklardan beri bilinmekte olup, günümüze kadar “Halep yarası”, “Doğu yarası”, “Delhi çıbanı”, “Jericho çiçeği”, “Bağdat yarası”, “Chiclero ülseri”, “Espundia” (mukokutanöz form), “Dumdum ateşi” (visceral form), “Kala-Azar” ve “Kara ateş” gibi çok farklı şekillerde isimlendirilmiştir (8).

*Leishmania* paraziti ilk defa 1900 yılında William B. Leishman tarafından hasta bir askerin dalağından aldığı örnekleri incelemesi sonucu tespit edilmiştir. Örnekleri boyayarak incelediği zaman hücreler içerisinde çok sayıda, koyu boyanmış, oval cisimcikleri fark etmiş fakat yoğun bir literatür taraması yapmasına rağmen kendi bulguları ile karşılaştırılabileceği hiçbir veriye ulaşamamıştır (9). Bunun üzerine aylarca trypanosomiasisten ölen ratlardan kan, dalak ve karaciğer örnekleri toplayarak incelediğinde büyüklük, şekil ve boyanma özellikleri açısından leishmaniasisli hastadan elde ettiği bulgular ile aynı özellik gösterdiğini tespit etmiş ve 1903 yılında “British Medical Journal” da kısa bir rapor yayınlamıştır (9). Gözlemleri sonucunda bu paraziti *Trypanosoma* formu olarak tanımlamıştır, ancak aynı yıl Kaptan Charles Donovan tarafından bu parazitin *Trypanosoma*’lardan farklı olduğu tespit edilmiştir (10). Yine aynı yıl Sir Ronald Ross bu hücre içi cisimcikleri “Leishman-Donovan” cisimcikleri olarak adlandırmayı önermesiyle parazit “*Leishmania donovani*” ismi ile dünyaca kabul edilmiştir (9).

*L.donovani* için güncel taksonomik sınıflandırma aşağıda gösterilmiştir (11).

<b>Bölüm</b>	: <i>Eukarya</i>
<b>Alem</b>	: <i>Protozoa</i>
<b>Şube</b>	: <i>Sarcomastigophora</i>
<b>Altşube</b>	: <i>Mastigophora</i>
<b>Sınıf</b>	: <i>Zoomastigophora</i>
<b>Takım</b>	: <i>Kinetoplastida</i>
<b>Aile</b>	: <i>Trypanosomatidae</i>
<b>Cins</b>	: <i>Leishmania</i>
<b>Tür</b>	: <i>donovani</i>

## 2.2. MORFOLOJİ

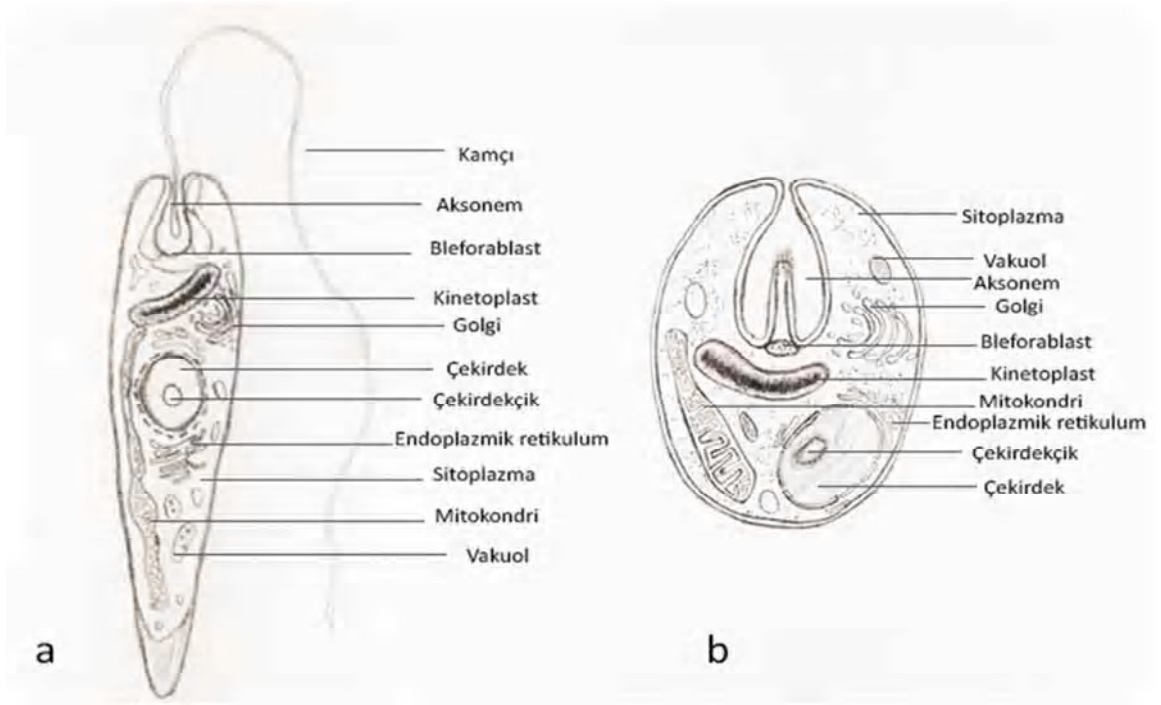
*Leishmania* cinsinin hayat döngüsünde iki ana morfolojik form görülmektedir; memeli konakta görülen, hücre içi “amastigot” formu ve vektör sineklerde görülen, kamçılı “promastigot” formudur (**Şekil 2.1**).

Amastigotlar hareketsiz, oval, 2-4 µm büyüklüğünde olup, çekirdek yuvarlak veya ovaldır. Promastigotlar ise 10 – 20 µm uzunlukta 1.5 – 2.5 µm genişlikte, uzamış mekik şeklinde, hareketli ve hücre dışı evredir (12). Her iki form da Giemsa ile boyandıkları zaman ortaya yakın bir yerde koyu mora boyanmış nükleus ve mor çubuk şeklinde kinetoplast kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (13).

Memeli konakta lökositler, monositler veya endotel hücreleri içerisinde, ayrı ayrı veya gruplar halinde görülebilen parazitin amastigot formu eski kaynaklarda “Leishman-Donovan Cisimciği” olarak anılmaktadır (9). Sitoplazmada arka kısma yakın büyük bir çekirdek ve çekirdeğe yakın kinetoplast taşırırlar. Aynı zamanda hem düz hem de granüllü ER, bir adet mitokondri, golgi, lizozom, vakuol, “bleforablast” olarak adlandırılan kamçı kökü bulunmaktadır. Bunun dışında bleforablasttan çıkıp ön kısımda sonlanan aksonem (kamçının sitoplazma içerisindeki kısmı) bulunur, ancak hücre dışına serbest olarak çıkan kamçı bulunmamaktadır (12).

Promastigot form, amastigotların şekil değiştirmesi, uzaması ve kamçının sitoplazma dışına çıkması sonucu aktif hareket özelliği kazanmış formdur. Vektör kum sineklerinin

(sand fly) bağırsağında ve uygun kültür ortamında 27°C’de uzunlamasına ikiye bölünerek çoğalmaktadırlar. Kamçı, ön tarafta yer almaktadır ve uzunluğu yaklaşık 15-28  $\mu\text{m}$ ’dir. Kamçının bağlantı noktaları ise “Kamçı paketi” olarak adlandırılmaktadır. Yine ön tarafta, kamçının dip kısmında bleforablast bulunur. Merkezde nukleus, bleforablast ve nukleus arasında ise yuvarlak veya bazen at nalı şeklinde görülebilen kinetoplast bulunmaktadır. Yine amastigot formunda da olduğu gibi sitoplazma içerisinde endoplazmik retikulum ve golgi bulunmaktadır (12).



Şekil 2.1. *Leishmania* sp. ince yapısı: a) promastigot, b) amastigot.

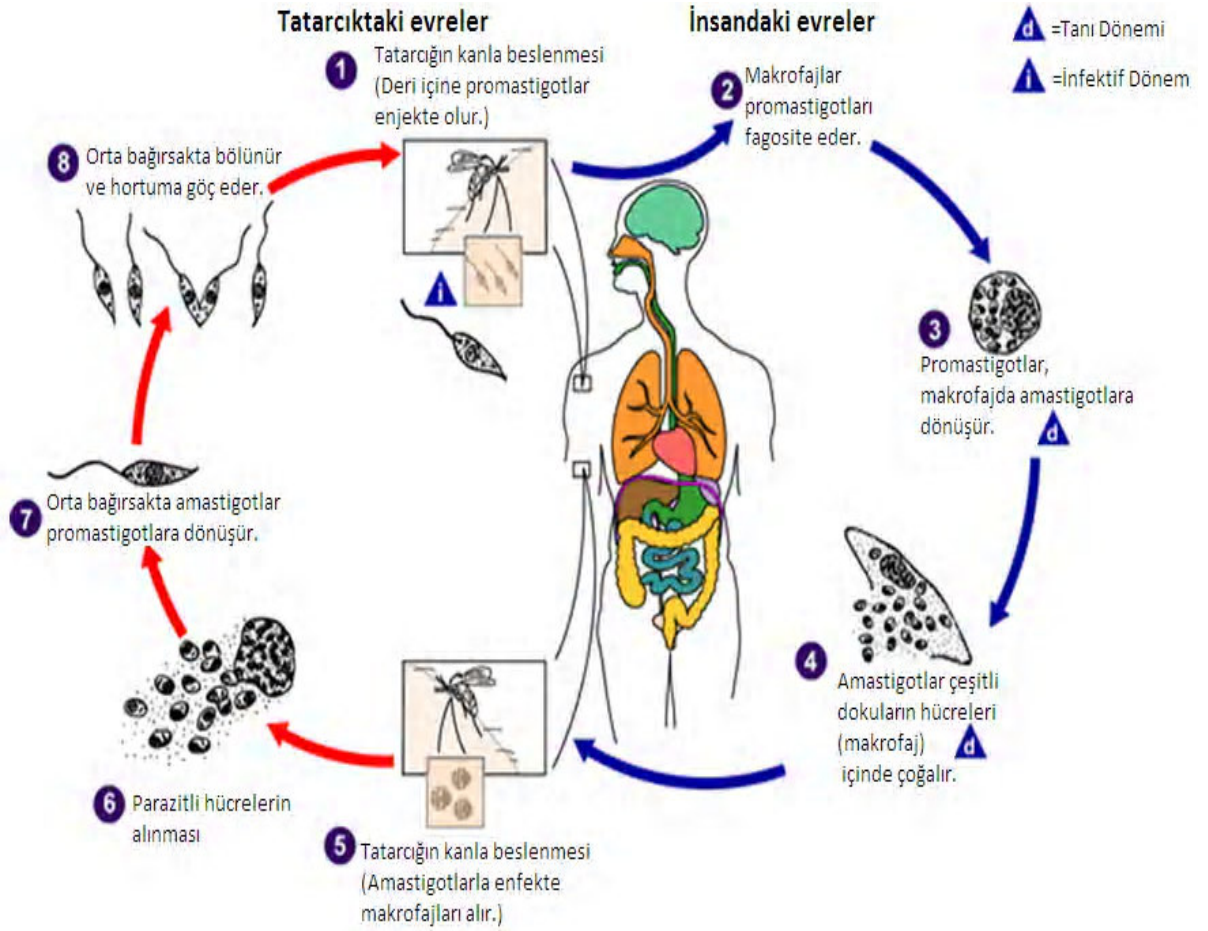
### 2.3. HAYAT DÖNGÜSÜ

Zorunlu hücre içi paraziti olan *Leishmania* türlerinin hayat döngüsü kum sinekleri (*Phlebotomus* veya *Lutzomyia* cinsi) ile omurgalı canlılar arasında geçen, birbirini takip eden döngüdür (Şekil 2.2). Birbirinden oldukça farklı iki ortamda yaşamını ve çoğalmasını devam edebilmesi için parazitin büyük bir morfolojik ve biyokimyasal adaptasyona ihtiyacı vardır (14). Vektör sinekler enfekte omurgalı konaktan kan emerek beslenmesi sırasında içerisinde amastigotları bulunduran, enfekte makrofajları da kan ile birlikte alırlar (15). Parazitin, vektörün sindirim kanalındaki gelişimi memeli konaktaki

amastigot döneme nazaran daha kompleks olup bu dönemde birkaç farklı morfolojik şekilde görülebilmektedir (16). Vektör tarafından alınan enfekte hücrelerin liziz olması sonucu amastigotlar serbest hale geçip bir kısmı burada sindirilirken diğer bir kısmı vertebralı konak için enfektif olmayan, hızlıca bölünerek çoğalan bir form olan prosiklik promastigotlara dönüşürler (14, 15). Prosiklik promastigotlar yüzeyinde bol miktarda lipofosfoglikan (LPG) ve metalloproteaz eksprese ederler ki bu glukokonjigatlar promastigotların sinek midesindeki hidrolitik enzimlerin etkisinden korunması için önemlidir (14). Ayrıca LPG'nin promastigotların sineğin mide epiteline tutunmasını da kolaylaştırdığı bilinmektedir (14). Bu nonenfektif, bölünen prosiklik promastigotlar bölünmeyen, enfektif metasiklik promastigotlara dönüşmekte ve bununla birlikte LPG yapısında, Gp63 ekspresyonunun düzenlenmesinde ve enzim içeriğinde birtakım değişiklikler gerçekleşmektedir (18, 19, 20). Bu gibi değişiklikler ve diğer çeşitli mekanizmaları sayesinde parazit konağın savunma sisteminden kaçabilmekte, kompleman sistemine karşı koyabilmekte ve bu etkileri kendi lehine kullanarak konak immun sistem hücrelerini işgal edebilmektedir (14, 15). Morfolojik olarak daha geniş ve kısa olan bu metasiklik promastigotlar bağırsağın ön kısmına doğru göç ederek özofagus ve farinkteki kıvrımlara tutunurlar. Bu enfektif formların sinek hortumunda görülmeye başlaması enfekte kan ile beslenmeden 3-7 gün sonrasındadır (12, 15).

Vektör sineğin memeli konaktan kan emmesi sırasında hortumda bulunan enfektif metasiklik promastigotlar sineğin tükürük salgıları ile birlikte konağa geçmektedir. Memeli konak vücuduna girdikten sonra parazit makrofaj hücreleri içerisine girer ve fagolizozom içerisinde bulunurlar. Bu düşük PH'lı hidrolitik ortamda kamçısını kaybeder ve oval, hareketsiz forma dönüşerek yaşamaya ve çoğalmaya başlar (21). Parazitin bundan sonraki seyrinde deride sınırlı kalması ya da iç organlara göç etmesi *Leishmania* türüne göre değişecektir. Ancak bazı durumlarda parazit türüne uygun olmayan yerlere de göç edip farklı bölgelere yerleşebilmektedir (22, 23, 24).

Enfekte hücre, parazitin sayıca çoğalması sonucu parçalanmakta ve amastigotlar serbest kalmaktadır. Serbest amastigotlar da diğer fagositik hücreleri işgal edebilmektedir (13). Vektör sineklerin enfekte konaktan kan emmesi ve amastigotları alması ile bu döngü devam etmektedir.



Şekil 2.2. *Leishmania* sp. hayat döngüsü.

## 2.4. EPİDEMİYOLOJİ

*Leishmaniasis* dünyada 98 ülkede endemik olup, VL olgularının % 90'ı Hindistan, Bangladeş, Etiyopya, Sudan, Güney Sudan ve Brezilya'da bildirilmiştir (25, 27). KL ise daha geniş bölgede yayılım göstermekte olup, olguların üçte biri Akdeniz havzası, Amerika ve Orta Doğudan Orta Asya'ya kadar uzanan bölgelerde ortaya çıkmaktadır (2, 25). *Leishmaniasis*'in yayılımı 1993 yılından beri oldukça genişlemiş ve bildirilen olgu sayısında önemli derecede artış görülmüştür (25). Bununla birlikte hastalıktan etkilenen ülkelerin yalnızca birkaçında kayıt ve rapor zorunlu olduğu için gerçek vaka sayısı net olarak bilinmemektedir (2).

Hastalığa bağlı mortalite oranı çok yüksek değildir, çünkü veriler sadece hastanede bulunan ölüm vakalarına dayanmaktadır (25). Hastaneye başvurmadığı için kayıtlara geçmeyen ölüm vakaları da mevcuttur (25).

Son yıllarda HIV enfeksiyonundaki artış sonucu insanlar leishmaniasise daha duyarlı hale gelmekte ve bu durum hastalığın epidemiyolojisini de etkilemektedir (2, 8, 26). Diğer immun yetmezlik durumlarının giderek artması, savaşlar, tanıdaki güçlükler, seyahatler, kentleşme, yeni tarımsal ve elektrik barajlarının inşa edilmesi gibi su havzalarındaki değişimler de hastalığın yayılmasında önemli rol oynamaktadır (12, 26). Giderek artmakta olan ve bazıları çok önceden bilinen, bazıları ise yeni ortaya çıkan bu risk faktörleri leishmaniasisi dünyadaki birçok ülke için büyüyen bir sağlık problemi haline getirmektedir (26).

Dünya genelinde olduğu gibi Türkiye’de de hastalığın kutanöz formu daha yaygın olup, Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz bölgesinde endemiktir ve olguların %98’den fazlası bu iki bölgeden bildirilmiştir (27, 28). *L.infantum*’un sebep olduğu insan VL ve köpek (kanin) leishmaniasis olguları ise Marmara, Ege, Karadeniz ve Akdeniz bölgelerinde endemik olup diğer bölgelerde sporadik olarak görülmektedir (29, 30). Daha önceki yıllarda Türkiye’de KL’e yalnızca *L.tropica*’nın sebep olduğu düşünülüyordu, ancak son yıllarda izoenzim ve moleküler biyolojik çalışmalar sonucu az da olsa *L.infantum* ve *L.major*’un sebep olduğu KL olguları da bulunmuştur (27, 29). Türkiye’de KL insidansı 1950’lerden önce başlatılmış sıtma savaşı kapsamındaki sivrisineklerle mücadelenin sonucunda vektör kum sinekleri popülasyonunun etkilenmesi ile azalmıştır (27). Ancak daha sonraki yıllarda vektör mücadelesinin yetersizliği, vektör sineklerin insektisitlere karşı direnç geliştirmesi, köyden kente göçlerin artması, GAP (Güneydoğu Anadolu Projesi) kapsamında barajların inşa edilmesi, yeni sulama sistemlerinin geliştirilmesi gibi birçok etkiden dolayı olgu sayısında artış görülmüştür (27). Özellikle son yıllarda Suriye ve Irak’tan Türkiye’ye sığınan mülteci sayısındaki artış olgu sayısını önemli derecede arttırmıştır (27, 31).

## **2.5. KLİNİK ÖZELLİKLER VE PATOGENEZ**

Leishmaniasisin klinik belirtileri, hem konağın immun cevabına hem de *Leishmania* türüne bağlı olup, enfeksiyonların çoğu uzun süre asemptomatik kalabilmektedir (32). Hindistan ve Afrika’da VL’ye sebep olan başlıca tür *L.donovani*’dir. Akdeniz bölgesinde *L.infantum*, Latin Amerika’da ise *L.chagasi* VL’ye sebep olan esas türlerdir (32). Fakat ara sıra ağırlıklı olarak KL ile ilişkili olan *L.major*, *L.mexicana* gibi bazı türlerin de klasik VL’li hastalardan izole edildiği bildirilmiştir (32). VL’nin inkübasyon süresi genelde 2-6 aydır, ancak bazen hastalık parazitin alınmasından yıllar sonra da

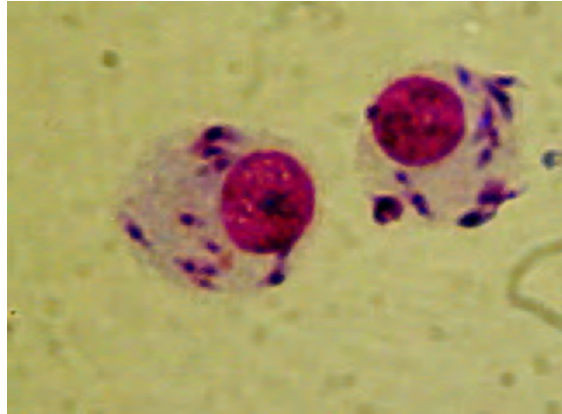
ortaya çıkabilmektedir (33). Başlangıçta deride sineğin ısırıldığı bölgede içerisinde amastigotların bulunduğu histiositleri içeren küçük bir granuloma gelişir ve ardından parazit lokal lenf nodlarına yayılır (33). Daha sonra parazit makrofajlar içerisinde kan dolaşımı aracılığıyla karaciğer, dalak ve kemik iliğine kadar ulaşır (33). Burada granulomatöz hücresel immun cevabı uyarıp, çoğalarak VL kliniğine sebep olurlar (33). Hastalık başlangıçta duyarlı bireylerde akut olup çoğunlukla sıtma ile karıştırılan yüksek ateş, titreme ve huzursuzluk ortaya çıkarken, endemik bölgelerde yaşayan bireylerde aralıklı ateş, dalak ve karaciğerin git gide büyümesi ve huzursuzluk ortaya çıkmaktadır (33). Hastalığın diğer yaygın belirtileri ise; iştah kaybı, kilo kaybı, diare, epistaksis, kuru öksürük ve anemidir (12, 32, 33). Hastalar genellikle zayıftırlar ve hepatosplenomegali sonucu abdomen belirgin bir şekilde şişmiş durumdadır (33).

Hastalığın en yaygın görülen tipi Kutanöz Leishmaniasis (KL) olup, bu form enfeksiyonun en hafif formudur. KL lezyonları eritemli bir papül olarak başlar ve yavaş yavaş üzeri krutlu nodüle dönüşür (32, 34). Nodüller genellikle volkan tarzında ülserleşirler. Nodül veya papüller bazen ülserleşmeden de iyileşirler. Yara üzerindeki sert krut kaldırıldığında krutun alt yüzeyinde çiviye benzer çıkıntılar görülür, bu görünüm “Hulusi Behçet’in Çivi Belirtisi” (Signe de clou) olarak adlandırılır (34). KL tedavi edilmese bile genellikle 1-1.5 yıl içerisinde bölgesel stigma ve skatris dokusu ile iyileşebilmektedir (32, 34). KL lezyonları 2 yıl içerisinde tedavi ile veya spontan olarak iyileşmezse kronik KL olarak adlandırılır ve %5-10 oranında görülür (34).

Enfeksiyonun bir diğer tipi olan Mukozal Leishmaniasis (ML) ya da Mukokutanöz Leishmaniasise (MKL) ise başlıca *L.braziliensis* sebep olmaktadır ve kutanöz lezyon iyileştikten aylar veya yıllar sonra burun, ağız, larinks, farinks, dudaklar, yanaklar, damak ve hatta bazen genital bölgelerde ortaya çıkmaktadır (32, 35). Nazal septum, oronazal ve faringeal boşluklarda başlayan doku tahribatı, perforasyon, tıkanıklık, süperenfeksiyon ve korkunç şekil bozuklukları ortaya çıkar (36, 37). Leishmaniasisli hastaların ancak %5'i kadarında MKL geliştiği görülse de hastalığın bu formunun mortalite oranı yutma zorluğu ve kaşeksi gibi nedenlerden dolayı oldukça yüksektir (36).

## 2.6. TANI VE TEDAVİ

VL retiküloendotelyal sistemi tutan, daha çok çocuklarda görülen, kuluçka dönemi 10 yıla kadar uzayabilen enfeksiyon olup, başlangıç bulgularının spesifik olmaması nedeniyle tanı koymak güçtür ve çoğunlukla gecikir (38, 39). Hastalığın tanısı biyopsi örneklerinin ve kemik iliği, dalak, lenf nodu aspiratlarının Giemsa, Wright gibi boyalar ile boyanarak amastigotların gösterilmesine dayanmaktadır (**Şekil 2.3**) (32, 38). Ancak, direkt bakı deneyimli personel tarafından yapılsa bile duyarlılığı çok yüksek olmadığından dolayı hastalığın tanısında kültür, immunolojik testler ve PCR gibi diğer moleküler yöntemlerden de yararlanır (30, 40, 41). Ayrıca endemik bölgede yaşamak veya endemik olmayan bölgelerden endemik bölgelere seyahat öyküsü de tanıda hatırlanması gereken önemli kriterler arasındadır (41, 42, 43).



**Şekil-2.3.** Giemsa ile boyanmış preparatta makrofaj hücreleri içerisindeki amastigotların ışık mikroskopunda görünümü.

Leishmaniasis tedavisinde ilk seçenek meglumin antimoniat (Glucantime) ve sodyum stiboglukonat (Pentostam) olup klinik tabloya göre parenteral ya da intralezyonel enjeksiyon şeklinde uygulanır (15, 44). Doku ve makrofajlarda biriktiğinden dolayı uygulama sona erdikten sonra hala antiparaziter etki devam etmektedir (44). Antimon bileşiklerine dirençli olgularda pentamidin kullanılabilir, ancak toksik etkisinin yüksek olması nedeniyle fazla tercih edilmemektedir (44). Son yıllarda pentamidin ve antimon bileşiklerine karşı direnç nedeniyle mantarlara karşı kullanılan ve hücre ölümüne neden olan Amfoterisin B ve liposomal Amfoterisin B önem kazanmıştır (15, 44, 45). Liposomal Amfoterisin B retiküloendotelyal sistem tarafından daha iyi alınmaktadır ve

bu formda yan etki daha azdır (44, 46, 47). Paromomisin, miltefosin, bazı antifungaller ve çeşitli bitki ekstralarının de *Leishmania* parazitleri üzerindeki etkileri özellikle son yıllarda yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (44, 48, 49, 50). Bunlara ek olarak *Lucilia sericata* larvalarının kullanıldığı daha ucuz ve daha hızlı iyileşmenin sağlandığını gösteren maggot terapi üzerine de çalışmalar mevcuttur (51, 52).

## 2.7. KORUNMA VE KONTROL

Etkin bir aşının bulunmaması, yoksulluğa bağlı bir hastalık olması ve tedavisinin maliyetli olması gibi birçok nedenden dolayı hastalığı önlemek için rezervuar ve vektörü kapsayan, bulaşmayı önlemeye yönelik kontrol çalışmaları hep önemini korumuştur (53). Gerek rezervuar olabilecek hayvanların, gerekse de hastaların doğru ve zamanında tanı konularak tedavi edilebilmesi de hastalığın prevalansını oldukça etkilemektedir. Dolayısıyla hekimlerin ve veteriner hekimlerin bu hastalık hakkındaki farkındalıkları da önem kazanmaktadır. Çünkü leishmaniasisin tanı ve tedavisi özellikle endemik olmayan ülkelerde genellikle gecikir.

Daha ekonomik ve pratik olmalarından dolayı vektör sineklerle savaşta; ergin olmayan safhalarına karşı savaş, habitatlarının değiştirilmesi veya yok edilmesi yoluyla savaş, kalıcı insektisit emdirilmiş cibinliklerin kullanımı, bariyer spreyleme yöntemi, hayvan barınakları gibi yerlere kalıcı insektisit uygulayarak savaş, rezervuar hayvanların kontrolü ve köpeklere deltamethrin emdirilmiş tasmaların takılması gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (54).

Türkiye’de son yıllarda vektör kaynaklı hastalıklardan biri olan sıtma ile savaşta oldukça büyük başarıya ulaşılmış olsa da Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) ve KL hala önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Özellikle son yıllarda artan göçler yanında turistik seyahatlerin de artması bu hastalıktan korunma için daha etkili yöntemlerin geliştirilerek uygulanmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır (55).

## 2.8. AŞI ÇALIŞMALARI

Tedavi edilmiş ve iyileşmiş bireylerde, uzun süreli bir savunmanın geliştiği yıllardır bilinmekteydi. Bundan dolayı çok eski zamanlarda aktif lezyondan alınan cerahatın, sağlıklı bireylere enjekte edilmesi şeklindeki “Leishmanizasyon” yöntemi kullanılmıştır (56). Leishmaniasise karşı aşı geliştirme çalışmaları, birçok hastalıkta yapılan

çalışmalarda olduğu gibi, ilk önce canlı aşı ile başlayıp, sonra ölü aşılar ve daha sonra da diğer aşı çalışmalarının izlemesi şeklinde gelişmiştir (56).

**2.8.1. Sinek salgısı bazlı aşılar.** Kum sinekleri kan emerken metasiklik promastigotlar ile birlikte tükürük salgısını da konak vücuduna enjekte etmektedirler. Bu salgı bileşiminin promastigotların enfektivitesi üzerine olumlu etkilerinin olduğu bazı araştırmalar sonucunda gözlenmiştir (57). En önemlisi de *Phlebotomus papatasi* ya da *Lutzomyia longipalpis*'e ait tüm salgı içeriği veya saflaştırılmış bazı bileşenleri *Leishmania* enfeksiyonuna karşı savunmayı indüklediğinin görülmesidir (57, 58).

**2.8.2. Birinci nesil aşılar.** Ölü parazit veya çeşitli yollarla zayıflatılmış ve virülansları azaltılmış canlı parazit aşılardır. Ölü *Leishmania* aşı denemeleri 1920'lerde başlamıştır (56). En erken dönemlerde aşı olarak bakteriyel aşılarda olduğu gibi kültür ortamında üretilmiş parazitler kullanılmıştır. Canlı atenué aşılarda geliştirilmesinde parazitin gelişim ve virülansından sorumlu genlerin susturulması veya *Leishmania tarentolae* gibi virülen olmayan suşlar immun yanıtı uyarmak için kullanılması tekniklerinden yararlanılmıştır (57). Fakat araştırmalarda gözlenen korumanın yetersiz olması ve farklı çalışmalardan elde edilen sonuçlarının çok tutarsız olması gibi sebeplerden dolayı ölü parazit aşılar henüz kabul edilebilir standartlara ulaşamamıştır (56, 60). Ayrıca canlı aşılarda henüz klinik gelişme aşamasına ulaşamamasındaki en büyük engellerden biri de *Leishmaniaların* sıvı azot içerisinde canlı olarak saklanması gerektiği ve dolayısıyla risk altındaki bölgelere ulaştırılması, uygulanması çok ileri derecede bir altyapı gerektiriyor olmasıdır (56).

**2.8.3. İkinci nesil aşılar.** *Leishmania* türlerinden elde edilen proteinleri ve rekombinant proteinleri içerir. Bunlardan en popüler olan Gp63, *E.coli*'de eksprese edilmiş rekombinant protein olarak uygulandığı zaman maymunlarda kısmen koruyuculuk sağlamıştır (58). Çok fazla ilgi çeken bir diğer antijen ise parazitin promastigot ve amastigot olmak üzere her iki evresinde de korunmuş olan *Leishmania* Activated C Kinaz'dır (LACK) (58). Parazitin sadece amastigot dönemine özgü Antijen2 (A2) ise rekombinant formda alum, IL-12, saponin ile formüle edildiği zaman veya adenovirus tarafından eksprese edildiği zaman hayvanlar üzerinde etkili olmuştur (61). **Leish-111f** ya da **LEISH-F1** olarak da bilinen *Leishmania* ilişkili toplam üç farklı proteinin füzyonu şeklindeki poliprotein bileşimi ise birçok araştırma neticesinde faz II çalışması seviyesine kadar ulaşmıştır (60, 62). Leishmune® içerik olarak Fukoz Mannoza Ligant

(FML)+saponin'den oluşmakta olup, köpeklerde VL'e karşı umut verici sonuçlar göstermektedir ve Brezilya'da lisanslı ikinci nesil veteriner aşısıdır (61, 63, 64). *Leishmania* parazitlerinin evriminde önemli rollere sahip olan sistein proteazlar CPA ve CPB bir diğer rekombinant aşı adaylarıdır (65, 66, 67). Kinetoplastid Membran Protein-11 (KMP-11), rekombinant Sterol 24-c-Metiltransferaz (rSMT), Hidrofilik Asetillenmiş Yüzey Protein (HASP), Histon H1, *L.donovani* amastigor-spesifik protein p27, *L.braziliensis* antijenleri + saponin, asidik ribozomal protein P0, rekombinant *L.donovani* Protein Disülfid İzomeraz (rLdPDI) ve Heat-Shock Proteinler (HSP70, HSP83) ikinci nesil aşılar arasındadır (60, 61). Parazitin virülansında önemli fonksiyonlara sahip bazı genlerin çıkarılması “knok-out” veya bazı önemli genlerin eklenmesi “knok-in” yoluyla canlı *Leishmania* türlerinden elde edilen aşılar da yine bu aşı grubuna dahildir (68). Enfeksiyon gelişimden sorumlu bazı genleri “knok-out” edilmiş *Leishmania* türleri hastalık oluşturamamakta olup, immun cevap oluşturabilmektedir (68). “Knok-in” aşılar ise bazı virüs veya bakteriden elde edilmiş ilaç duyarlılık genlerinin *Leishmania* genomuna eklenmesi ile elde edilmiş “suicidal cassettes” aşılardır (68).

**2.8.4. Üçüncü nesil aşılar.** Yabancı proteinleri kodlayan plazmidin direkt enjeksiyonunun endojen protein biyosentezine yol açabileceğinin ve o proteine karşı spesifik immun yanıtı uyurabileceğinin keşfedilmesi aşı geliştirme çalışmalarında yeni bir bakış açısı ortaya çıkarmıştır (67, 69). Protein bazlı aşılarda geliştirilmesiyle fare ve köpeklerde belli bir dereceye kadar korumanın elde edilmesine rağmen birçok karmaşık problemlerle de karşılaşmaktadır ve adjuvan uygulaması gerekmektedir (60). DNA aşıları üretimi son derece basit, herhangi patojenik organizma içermediğinden dolayı oldukça güvenli ve genellikle çok immunojeniktirler (67). En çok çalışılan DNA aşıları daha önce rekombinant protein olarak araştırılan aşı adaylarıdır (67). Bu aşılar hem humoral hem de hücrel yanıtı uyarsalar da bu yanıt yeterince uzun süreli olmadığından dolayı özellikle hücre içi patojenlere karşı sitotoksik T hücrelerin büyük rol oynadığı T hücre yanıtını arttırmak için yeni aşılama stratejileri geliştirme gereksinimi ortaya çıkmaktadır (69). Günümüzde en yeni yaklaşım, DNA aşısı ile ilk önce immun yanıtı başlatmak, ardından ise ilgili antijeni eksprese edebilen Modifiye Vaccinia Virus Ankara (MVA), Fowlpoxvirus (FPV) gibi memeli hücresi içerisinde çoğalamayan suşlar kullanılarak immun yanıtın arttırılması prensipine dayanan **Prime-**

**Boost** stratejisidir (70). Bunun yanında yine lipid bazlı antijen uygulama sistemleri ve nanopartiküllerin kullanıldığı yeni aşı uygulama metodları da hızlıca gelişmektedir.

### **2.9. LEISHMANIA DONOVANI YÜZEY GLİKOPROTEİN 63 (LdGP63)**

*Leishmania* parazitlerinin bazı yüzey proteinleri makrofaj fonksiyonlarını, sitokin üretimini, antijen sunumunu ve konak hücre sinyal yollarını manipüle etme gibi, hem enfeksiyonun gelişmesi için hem de parazitin hayatta kalabilmesi için önemli işlevlere sahiptir (71). Fagositozdan sonra *Leishmania*'nın salgıladığı çeşitli moleküller ve olağanüstü adaptasyon kabiliyeti sayesinde antijen sunumu ve mikrobisidal işlevlerden sorumlu olan immun sistem hücreleri parazit için güvenli bir yaşam ortamı haline dönüşmektedir. *Leishmania*'nın yüzeyinde salgılanan moleküllerden en çok araştırılanlar; lipofosfoglikan (LPG), sistein peptidazlar, asit fosfatazlar, proteofosfoglikanlar ve glikoprotein 63 olarak da adlandırılan promastigot yüzey proteaz gibi bazı moleküllerdir (71). Gp63 ilk defa 1980'lerde *Leishmania* parazitlerinin çeşitli türlerinin promastigot döneminde eksprese edilen yüzey proteini olarak tanımlanmıştır (72). Literatürde Ana Yüzey Glikoprotein (Major Surface Protein (MSP)) dışında birçok isimlendirmeler kullanılmıştır. Molekülün farklı ağırlık ve farklı izoformlarının da bulunmasına rağmen 63 kDa Glikoproteinden türetilmiş Gp63 ismi en yaygın kullanılanıdır (72). "Leishmanolizin" olarak da adlandırılan bu glikoprotein aşı olarak koruyucu etkisi farklı *Leishmania* türlerinde ve farklı adjuvanlarla yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. *L.donovani* promastigotlarından elde edilen Gp63 adjuvansız kullanıldığında BALB/c farelerde kısmi bir koruma sağlarken, adjuvan olarak katyonik distearoyl fosfatidilkolin (DSPC) lipozomları ile birlikte uygulandığı zaman VL karşı koruyuculuğunun belirgin bir şekilde arttığı görülmüştür (73). *L.donovani* türü kullanılarak fareler üzerinde gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise Gp63 ve HsP70 olmak üzere iki antijenin kombinasyonunun daha etkili bir koruma sağladığı gözlenmiştir (6). Gp63, adjuvan olarak toll-benzeri reseptör-9 (TLR-9) agonisti olan CpG-ODN (CpG oligodeoksinukleotid) kullanıldığında ve en yeni yaklaşımlardan biri olan DNA-prime/ptotein-boost halinde uygulandığı zaman daha uzun vadeli bağışıklık sağlamıştır (74).

### **2.10. ADJUVANLAR VE İNTERLÖKİN-12**

Adjuvanlar, herhangi bir aşının veya antijenin immunojenitesini arttırmasında veya etkisini değiştirmesinde kullanılan çeşitli katkı maddelerdir. Aşılarla adjuvanların

eklenmesi ile immun yanıtın arttırılabileceği keşfedildikten sonra ilk defa güvenilirliği ispatlanarak insan uygulaması gerçekleştirilen adjuvan madde alüminyum tuzları olmuştur (75). Alüminyumdan sonra en çok kullanılan adjuvan ise skualendir (75). Doğal immun sistem hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlerin hedef molekülleri olarak da bilinen birçok maddeler de adjuvan olarak kullanılmaktadır. Bunlardan TLR-4 agonisti olan monofosforil lipid (MPL) toksisitesi oldukça düşük olup günümüzde Hepatit B aşısında kullanılmaktadır (75). Diğer birçok aşı çalışmalarında olduğu gibi leishmaniasise karşı aşı geliştirme çalışmalarında da farklı adjuvanlar denenmektedir. Alum, saponin, QuilA, Bacillus Calmette-Guerin (BCG), IL-12, MPL, imiquimod, CpG-ODN gibi bazı TLR agonistleri çeşitli aşılarla kombine edilerek leishmaniasise karşı koruyuculuğu araştırılan bazı adjuvanlardır (58, 68). IL-12'nin ilk kez 1994 yılında farelerde *L.major* enfeksiyonu kontrolünde aşı adjuvantı olarak kullanılması önerilmiştir (76). Daha sonra IL-12 biyolojisi hakkında bilinenlerin de artmasıyla insan çalışmalarında da kemoterapik ajan olarak oldukça geniş çaplı araştırılmaktadır. Ayrıca *Leishmania* ile enfekte farelerin rekombinant IL-12 ile tedavi edildiğinde %89'a kadar iyileşmenin gözlemlendiği çalışmalar da mevcuttur (77). Ayrıca LACK tabanlı DNA ve protein aşıları adjuvan olarak IL-12 ile birlikte uygulandığında daha uzun süreli koruma sağlanmıştır (68). Bazı araştırmalar *L.donovani* enfeksiyonunun hemen ardından konak makrofaj hücrelerinin IL-12 üretmediği sonucunu gösterirken, bazı çalışmalar immunizasyonun etkinliğinin arttırılması için IL-12'e gereksinim duyulduğunu göstermektedir (78, 79). Gp63 bazlı aşıların etkinliği araştırılırken bu antijenin NK hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği bazı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (7). Diğer yandan immun sistem işlevinde IL-12'nin T hücre ve NK hücre proliferasyonunu uyaran önemli bir molekül olduğu bilinmektedir (80, 81).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. GEREÇ**

Çalışma öncesi geniş çaplı literatür taraması yapılarak kullanılacak malzemeler belirlenmiştir. Çalışma, tez projesinin desteklenmesi amacıyla Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (ERÜ/BAP) projenin verilmesi ve desteklenmesi sonrasında başlanmıştır. Malzemeler ve cihazlar temin edilerek deneyler için uygun alt yapı oluşturulması sağlanmıştır.

##### **3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler**

Çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Moleküler Parazitoloji, İmmunoparazitoloji Laboratuvarları ve ERÜ Aşı Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezinde yürütülmüştür. Çalışmada Tablo 3.1’de gösterilen cihazlar ve Tablo 3.2’de gösterilen malzemeler kullanılmıştır.

**Tablo 3.1.** Çalışmada kullanılan cihazlar.

<b>Tanımı/Adı</b>
Santrifüj (Avanti <sup>®</sup> J-E, ABD)
Santrifüj (Thermo Scientific, Çin)
27 °C inkübatör (NÜVE, Türkiye)
37 °C inkübatör (NÜVE, Türkiye)
Hassas terazi (RADWAG, Polonya)
NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific Inc, ABD)
Thermal cycler (SENSEQUEST, Almanya)
Vortex (Benchmark, Taiwan)
-20 °C dondurucu (Panasonic, Japonya)
-80 °C dondurucu (Panasonic, Japonya)
Kuru ısı blokları (Benchmark, Taiwan)
Elektroforez (Bio-RAD, ABD)
Su banyosu (JEIO TECH, Kore)
Jel görüntüleme cihazı (BİO-RAD ChemiDoc Mp Imaging System, ABD)
Sıcaklığı ayarlanabilir sallayıcı (JEIO TECH, Kore)
İnvert Mikroskop (Leica, ABD)

**Tablo 3.2.** Çalışmada kullanılan malzemeler.

<b>Tanımı/Adı</b>
<i>Leishmania donovani</i> promastigotları
Fetal Bovin Serum (BIOCHROME, Almanya)
RPMI-1640 Medium (BIOCHROME, Almanya)
Penicillin-Streptomycin100X Solution (5000 units) (Invitrogen, ABD)
25 cm <sup>3</sup> culture flaskları
QIAamp Tissue Kit (QIAGEN, ABD)
SOC sıvı besi yeri
Ampisilinli LB katı besiyeri
Ampisilinli LB sıvı besiyeri
LdGp63 F Primeri (5'- GTGATGTCCGTCGACAGCAG-3')
LdGp63 R Primeri (5'- CGTTGGGAGCCCCCAAAT-3')
2x PCR Master mix (Biomatik, ABD)
Agaroz jel
1 kb Marker (Pomega, ABD)
Wizard <sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ABD)
100 bp Marker (Biomatik, ABD)
pcDNA <sup>™</sup> 3.1/V5-His TOPO <sup>®</sup> TA Expression Kit (Invitrogen, ABD)
OneShot TOP10 ChemicallyCompetent <i>E.coli</i> hücreleri (Invitrogen, ABD)

High PurePlazmid Isolation Kit (Roche AppliedScience, Almanya)

IDPURE™ Spin Column Endotoxin-Free Plasmid DNA Miniprep Kit (Empire Genom)

Xba I Restriksiyon enzimi (TAKARA, Japonya)

BamH I Restriksiyon enzimi (TAKARA, Japonya)ics, ABD)

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. *Leishmania donovani* Promastigotların Kültüre Edilmesi

%10 inaktive edilmiş Fetal Bovin Serum, 100 µg/ml streptomycin-100 IU/ml penicillin ve L-Glutamin ilave edilerek RPMI-1640 besi yeri hazırlanmıştır. -80 °C’de muhafaza edilen *Leishmania donovani* promastigotları 37 °C’de hızlıca çözdürülerek besiyeri ortamına ekim yapılmıştır (28, 51). Promastigotlar yeterli yoğunluğa ulaşana kadar 27 °C’de inkübasyon sağlanmıştır. Her gün inverted mikroskopta görüntülenerek kontrol edilmiş ve her 3-4 günde bir pasaj yapılmıştır. Pasaj için promastigot kültürü 15 ml’lik santrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra 900 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılarak pellet üzerine taze besiyeri eklenip resüspanse edilmiştir. Taze besiyeri içeren kültür flasklarına dağıtılarak 27 °C’de inkübasyon sağlanmıştır.

### 3.2.2. Kültürden Genomik DNA İzolasyonu

Devam etmekte olan *L.donovani* promastigot kültüründen 1.5 ml’lik mikrosantrifüj (ependorf) tüplerine alınmıştır. 12.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılarak sediment üzerine promastigot kültüründen tekrar eklenerek, aynı işlem 10 defa tekrarlanmıştır. Elde ettiğimiz pellet, -20 °C’de ve 37 °C’de 5’er dakika bekletilerek 5 defa soğuk sıcak şok uygulanmıştır. Böylece promastigotların lizis olması sağlanmıştır. Total genomik DNA izolasyonu, QIAamp Tissue Kit (QIAGEN, ABD) kullanılarak üretici firmanın prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir:

1. Promastigotlardan oluşan pellet üzerine 180 µl ATL buffer eklenerek homojenize edildikten sonra santrifüj edilmiştir.

2. Üzerine 20 µl proteinaz k eklenerek 15 saniye vortekslendikten sonra önceden 56 °C'ye ayarlanmış su banyosunda bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
3. Tüp kısa süre santrifüj edildikten sonra üzerine 200 µl AL Buffer eklenerek 15 saniye vortekslendikten sonra 70 °C'de 10 dk. inkübasyona bırakılmıştır.
4. Tüp 15 saniye vortekslenerek 200 µl %100 etanol eklendikten sonra 15 saniye boyunca tekrar vortekslenmiştir.
5. Kısa süre santrifüj edildikten sonra tüp içeriği filtrasyon kolonuna aktarılmıştır.
6. Filtrasyon kolonu 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisinde 8.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
7. Filtrasyon kolonu 2 ml'lik yeni bir tüpe alınmış ve alt süzüntü atılmıştır. Filtrasyon kolonu üzerine 500 µl AW1 buffer eklenerek 8.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
8. Filtrasyon kolonu tekrar 2 ml'lik yeni bir tüpe alındıktan sonra süzüntü atılmıştır. Filtrasyon kolonu üzerine 500 µl AW2 buffer eklenerek 14.000 rpm'de 3 dk. santrifüj edilmiştir.
9. Filtrasyon kolonu 2 ml'lik yeni bir tüpe alınarak süzüntü kısmı atılmıştır. Filtrasyon kolonu tekrar 14.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilerek kalan AW2 buffer elimine edilmiştir.
10. Filtrasyon kolonu 1.5 ml'lik tüpe alınarak üzerine 100 µl AE buffer eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dk. inkübe edildikten sonra 8.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.

Elde edilen son süzüntü NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific Inc, ABD) cihazı kullanılarak örnek içerisindeki total genomik DNA konsantrasyonu 27 ng/µl olarak ölçülmüş ve ürün Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) için -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.3. Primerler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

*L.donovani* Gp63 geni için GenBANK: AJ495007.1 dizisine göre ilgili gen dizisinin uzunluğu 1926 baz çifti uzunluğunda olup, F ve R primerleri aşağıdaki şekilde dizayn edilmiştir.

LdGp63 F: (5'-GTGATGTCCGTCGACAGCAG-3')

LdGp63 R: (5'- CGTTGGGAGCCCCCAAAT-3')

PCR reaksiyonu için kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3.3'de gösterilmiştir. Reaksiyon için hazırlanan bileşimden her biri 25 µl olmak üzere toplam 4 tüp hazırlanmıştır. Reaksiyon Thermal cycler (SENSEQUEST, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir. 95 °C de 5 dk.'lık ön ısıtma ile başlayan sırasıyla 95 °C de 1 dk. denatürasyon, 65 °C de 1 dk. bağlanma, 72 °C de 1.5 dk. uzama basamağından oluşan 33 döngü sonrası 72 °C'de 15dk.'lık son uzama ile biten PCR programı oluşturulmuştur.

PCR ürünü, etidyum bromütle boyanmış %1.5'luk agaroz jele yüklenerek 120 volt'da 60 dakika boyunca elektroforezde yürütülmüştür. Ardından BİO-RAD ChemiDoc Mp Imaging System (ABD) cihazı kullanılarak görüntülenmiştir.

**Tablo 3.3.** Real-Time PCR reaksiyonu için kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşen	Miktar (µl)
2x Master mix	12.5
LdGp63 F primer (10 pmol)	1
LdGp63 R primer (10 pmol)	1
Genomik DNA	2
Distile su (Nükleaz içermeyen)	5.5
<b>Toplam</b>	<b>25</b>

### 3.2.4. PCR Ürününün Saflaştırılması

PCR ürününün jelden saflaştırılması için Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ABD) kullanılmıştır:

1. Elektroforez sonrası jeldeki bantlar kesilerek alınmış ve hassas terazide tartılarak 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiştir. Her 10 mg jele 10 µl olacak şekilde membran bağlama solüsyonu eklendi ve 55 °C de 15 dakika boyunca kuru ısı bloğunda jelin tamamen erimesi beklenmiştir.
2. Kit içerisinde bulunan filtrasyon kolonu toplama tüplerine yerleştirilmiş ve karışım bu filtrasyon sistemi içerisine aktarılmıştır. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 16.000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek filtrasyon sıvısı atılmıştır.
3. Filtrasyon kolonu ise yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek üzerine 700 µl membran yıkama solüsyonu (etanol ilave edilmiş) eklendi ve aynı şartlarda tekrar santrifüj edilerek filtrasyon sıvısı atılmıştır.
4. Filtrasyon kolonu tekrar yeni bir toplama tüpüne yerleştirildikten sonra bu basamak 500 µl membran yıkama solüsyonu ile 5 dakika santrifüj edilip yıkama işlemi tekrarlanmıştır.
5. Filtrasyon kolonu dikkatli bir şekilde 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne transfer edildikten sonra üzerine 40 µl nukleaz içermeyen distile su eklenerek 3 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu sağlanmıştır. Ardından 16.000 g de 1 dakika santrifüj edilip ürün tekrar agaroz jelde yürütülerek görüntülendikten sonra -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Elde edilen ürünün içerdiği DNA konsantrasyonu NanoDrop 2000c Spectrophotometer cihazında ölçülmüştür.

### **3.2.5. LdGp63 Geninin pcDNA3.1 Plazmitine Yerleştirilmesi**

PCR ürününün klonlanmasında pcDNA<sup>TM</sup>3.1/V5-His TOPO<sup>®</sup> TA Expression Kit (Invitrogen, ABD) kullanılmış olup üretici firmanın protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır. Klonlama reaksiyonu için:

1. PCR Clean-Up ürününden 3 µl, kit içerisinde bulunan salt solüsyondan 1 µl ve 1 µl steril su eklenerek toplam 5 µl'lik karışım hazırlanmıştır.
2. Üzerine 1 µl TOPO<sup>®</sup> vektör eklenerek nazikçe karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında (22-23°C) 30 dakika inkübasyonu sağlanmıştır.

Elde edilen ligasyon ürünü inkübasyondan sonra direkt olarak transformasyon için kullanılmıştır.

### **3.2.6.Rekombinant Plazmitin Kompetan Hücrelerine Transformasyonu**

Çalışmamızda kimyasal transformasyon yöntemi uygulanmıştır.

1. Bir önceki adımdaki ligasyon ürünü ve bir vial One Shot®TOP10 kompetan hücreleri buz üzerine yerleştirilmiştir.
2. 10 dakika beklendikten sonra 2 µl ligasyon ürününü kompetan hücreler üzerine ilave edilmiş ve pipetleme yapmaksızın hafifce karıştırılmıştır.
3. Buz üzerinde 30 dakika inkübasyon sağlanmıştır.
4. Hücrelere önceden 42 °C'ye ayarlanmış kuru ısı blokları üzerinde 1 dakika sıcak şok uygulanmıştır.
5. Hemen ardından direkt buz üzerine transfer edilmiştir.
6. Üzerine 250 µl oda sıcaklığındaki SOC medium eklenmiştir.
7. Tüpün kapağı kapatılarak yatık bir şekilde 37 °C'de, 200 rpm'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir.
8. Hücreler 100 µl ve 150 µl olacak şekilde ikiye bölünmüş ve üzerine ampicillin'li LB sıvı besiyeri eklenerek 200 µl'ye tamamlanmıştır.
9. Ampicillinli LB pleytlerine yayıldıktan sonra 37 °C'de bir gece boyunca inkübasyon sağlanmıştır.

Bir gecelik inkübasyondan sonra pleytler kontrol edildiğinde ampisilinli katı besiyeri üzerinde sadece bir koloni olduğu gözlenmiştir. Oluşan koloniden yeni bir pleyte nokta ekim yapılarak 12 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası oluşan bu kolonilerin rekombinant plazmiti içerip içermediği aşağıdaki yöntemlerle tespit edilmiştir.

### 3.2.7. Klonlamanın Doğrulanması

#### 3.2.7.1. PCR Tarama ile Doğrulama

Oluşan kolonilerin rekombinant plazmiti içerip içermediğini PCR Tarama yöntemi ile tespit etmek için her biri 10 µl 2x Master mix (Biomatik, ABD), 1 µl LdGp63 F ve 1 µl LdGp63 R primeri içeren 2 tüp hazırlanmıştır. Karışımlar distile su ile toplam 20 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpler numaralandırıldıktan sonra LB katı besiyerinde üreyen kolonilerden rastgele 2 tanesi seçilmiştir. Seçilen kolonilerden, steril ortamda kürdanla alınıp tüplerdeki karışımlara bulaştırılarak eklenmiştir. Bölüm 3.2.3 deki protokol kullanılarak, aynı şartlarda PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR ürünü, etidyum bromütle boyanmış %1.5'luk agaroz jelde yürütülerek yine aynı şekilde BİO-RAD ChemiDoc Mp görüntüleme cihazı kullanılarak görüntülenmiştir.

#### 3.2.7.2. Miniprep ve PCR ile Doğrulama

Kolonilerdeki rekombinant plazmitin varlığını doğrulamak için miniprep yapılmıştır. Miniprep işleminde High PurePlazmid Isolation Kit (Roche Applied Science, Almanya) kullanılmış olup, işlem basamakları aşağıdaki gibidir:

1. Miniprep yapılmak üzere LB katı besiyerindeki kolonilerden ampisilinli LB sıvı besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra 37 °C'de sallayıcı üzerinde bir gece inkübe edilmiştir.
2. Kültürler 8.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilerek üst sıvı atıldıktan sonra çökelti üzerine 250 µl suspension buffer/RNase ve 250 µl lysis buffer eklenmiştir. Dikkatlice karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dk. inkübasyona bırakılmıştır.
3. Üzerine 350 µl soğuk binding buffer eklenmiş ve buzlu su içerisinde 5 dk. inkübe edilmiştir.
4. 13.000 rpm.'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Üst sıvı kit içerisindeki filtrasyon kolonuna alınmış, çökelti ise atılmıştır.
5. Filtrasyon kolonu yeni bir tüpe alınarak 13.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
6. Filtrasyon kolonu tekrar yeni bir tüpe alınmış ve süzüntü atılmıştır.
7. Filtrasyon kolonu üzerine 500 µl wash buffer I eklenerek 13.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.

8. Filtrasyon kolonu yeni bir tüpe alınarak süzüntü kısmı atılmıştır.
9. Üzerine 700 µl wash buffer II eklenerek 13.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
10. Filtrasyon kolonu yeni bir tüpe alınarak süzüntü kısmı atılmıştır.
11. Üzerine 50 µl elution buffer eklendikten sonra 13.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilerek rekombinant plazmit elde edilmiştir.

Elde edilen rekombinant plazmitlerin ilgili geni içerip içermediğini doğrulamak amacıyla bölüm 3.2.3 deki protokol tekrar kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu oluşturulurken template olarak miniprep ile elde edilen rekombinant plazmit kullanılmıştır. PCR ürünü, etidyum bromütle boyanmış %1.5'lük agaroz jelde 120 v, 60 dakika yürütülerek daha önceki basamaklardaki aynı yöntemle görüntülenmiştir.

### **3.2.7.3. DNA Dizi Analizi ile Doğrulama**

Saflaştırılan rekombinant plazmitin klonlanan geni taşıyıp taşımadığı DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır. DNA dizi analizi için LdGp63 F ve LdGp63 R pimerleri kullanılarak Big dye Cycle Sequencing kit v3.1 (AppliedBiosystems, ABD) kullanılmıştır. Sonuçlar otomatik DNA dizi analiz cihazında (ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer, ABD) analiz edilmiştir. Elde edilen DNA dizi sonuçları Chromas v.1.45 (ConorMcCarty School of Science Griffith University, Australia) programı ile incelenmiştir. Daha sonra <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> internet adresinde yer alan web tabanlı BLAST (Basic LocalAlignmentSearchTool) programına girilmiş olup bu çalışmadan elde edilen DNA dizisi GenBANK veri tabanındaki mevcut *Leishmania* sp. DNA dizileri ile karşılaştırılmıştır.

DNA dizi analiz sonuçlarına göre *L.donovani* yüzey Gp63 proteinlerinin üç boyutlu yapıları <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> web adresinde bulunan Phyre2 Protein Homology/Analogy Recognition Engine V 2.0 programı ile elde edilmiş ve görüntülenmesi ise Jmol: An open-source Java viewer programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.7.4. Restriksiyon Enzim Reaksiyonları ile Doğrulama

Saflaştırılan rekombinant plazmitin hedef geni içerip içermediğini restriksiyon enzim kesimleriyle doğrulamak için vektör plazmidini iki yerden kesen, ancak klonlanan gen dizisini hiçbir şekilde kesmeyen iki enzim kullanılmıştır. Bu reaksiyon için pcDNA3.1 vektörünü klonlanan gen bölgesinin iki tarafından kesen *Xba I* (TAKARA, Japonya) ve *BamH I* (TAKARA, Japonya) enzimleri kullanılmıştır. pcDNA3.1 vektör plazmidinin haritası ve hangi enzimlerle kesilebileceği Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Gp63 gen bölgesinde ise bu iki enzimin keseceği diziler bulunmamaktadır. Reaksiyon üretici firmanın protokolü modifiye edilerek uygulanmış olup her enzim için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ilk önce *Xba I* enzimi için yapılmış olup reaksiyon bileşimi aşağıdaki gibidir:

<i>Xba I</i>	1 µl
10x M Buffer	2 µl
DNA (rekombinant plazmit)	5 µl
Steril distile su	12 µl

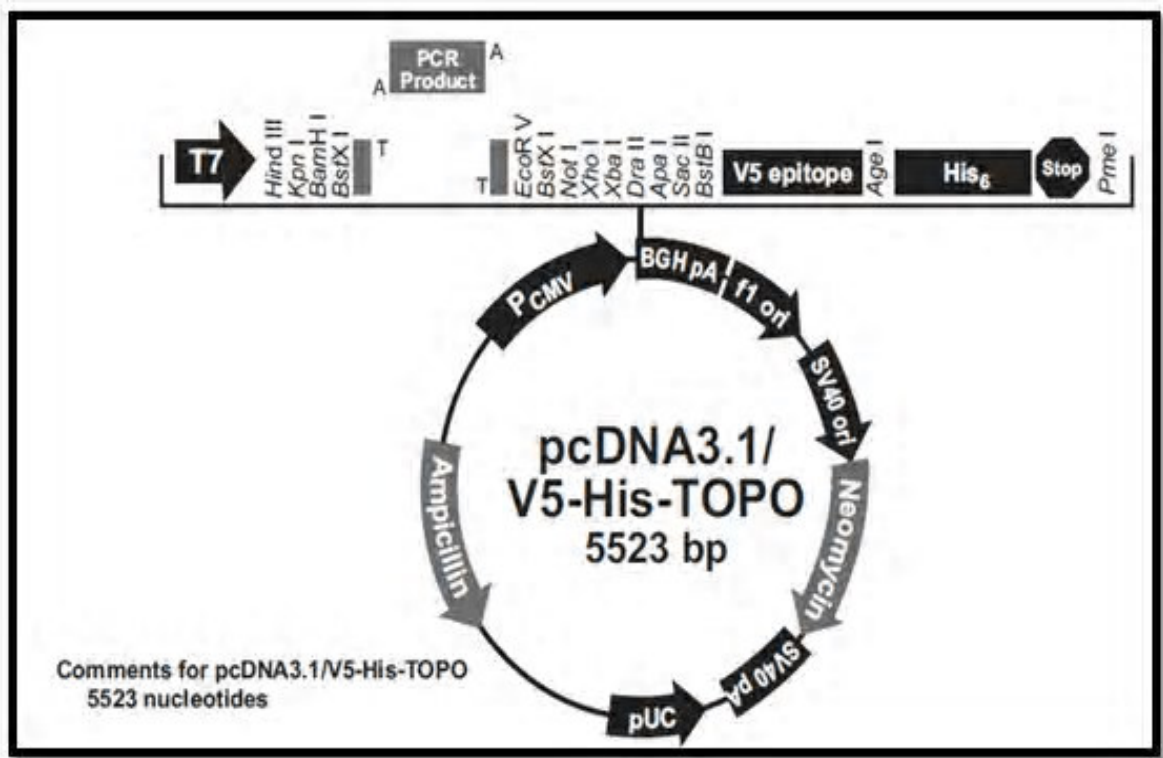
Üretici firmanın protokolüne göre reaksiyon sıcaklığı 37 °C’dir. Yukarıdaki bileşim hazırlandıktan sonra su banyosunda 37 °C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

İkinci enzim reaksiyonunda bir önceki reaksiyon ürününün tamamı kullanılmış olup bileşim aşağıdaki gibidir:

Bir önceki reaksiyon ürünü	20 µl
<i>BamH I</i>	1 µl
10x K Buffer	2 µl

Üretici firmanın protokolüne göre bu enzimin çalışma sıcaklığı ise 30 °C’dir. Yukarıda anlatılan reaksiyon bileşimi oluşturulduktan sonra karışım, önceden 30 °C’ye ayarlanmış su banyosunda 3 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübe edilen ürün, önceki basamaklarda olduğu gibi etidyum bromütle boyanmış %1.5’luk agaroz jele yüklenerek 120 v, 60 dakika elektroforez uygulanmıştır. Ardından jel aynı yöntemle görüntülenmiştir.



Şekil 3.1. pcDNA3.1 vektörünün haritası.

### 3.2.8. Endotoksinsiz Rekombinant Plazmit Elde Edilmesi.

Bölüm 3.2.6’da kullanılan materyaller ve metod kullanılarak rekombinant plazmidin kompetan hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Gelişen kolonilerin rekombinant plazmiti içerdiği tekrar PCR tarama yapılarak doğrulandıktan sonra önceki basamakta uygulanan yöntem kullanılarak koloni sıvı LB besiyerine ekilmiştir. Ampisilinli sıvı LB besiyerinde bir gece inkübasyon sağlandıktan sonra kültürden aşağıda anlatılan üretici firmanın protokolü uygulanarak endotoksinsiz rekombinant plazmit elde edilmiştir.

1. Kültürden 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne alınarak 12 000 rpm’de, 1 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım tamamen uzaklaştırılıp pellet üzerine kültürden biraz daha ekleyerek aynı şartlarda tekrar santrifüj edilmiştir. Bu şekilde kültürün tamamı pellet şeklinde elde edilmiştir.
2. Mikrosantrifüj tüpü içerisinde bulunan ve sıvı kısmı tamamen uzaklaştırılmış pellet üzerine 100 µl kit içerisinde bulunan Solüsyon I eklenerek yavaşça karışması sağlandıktan sonra 2 dakika bekletilmiştir.

3. Karışıma 200 µl Solüsyon II eklenerek 5-6 defa alt üst edilerek yavaşça karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 1 dakika bekletilmiştir.
4. 350 µl Solüsyon III eklenerek yavaşça karıştırılıp oda sıcaklığında 2 dakika bekletilmiştir.
5. 12.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj işlemi sonrasında üst sıvı kit içerisinde bulunan kolüme aktarılmıştır. Tekrar 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Alt süzütünün bulunduğu toplama tüpü atılarak yeni bir toplama tüpü kolüme yerleştirildikten sonra üzerine 500 µl Yıkama Solüsyonu eklenerek 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
8. Bir önceki yıkama basamağı tekrar uygulanmıştır.
9. Toplama tüpü içerisindeki alt süzüntü atıldıktan sonra Yıkama Solüsyonunun iyice uzaklaştırılması için 10.000 rpm'de 2 dakika boyunca tekrar santrifüj edilmiştir.
10. Kolum yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildikten sonra önceden sıcaklığı 55 °C'ye ayarlanmış Elüsyon Bufferdan 50 µl membranın orta kısmına gelecek şekilde eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 dakika bekletilmiştir. 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
11. Altta kalan süzüntü üzerine 200 µl TE Buffer eklenmiştir. pH 5.2 olan 3M asetat sodyum solusyonundan 25 µl eklenerek iyice karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 5 dakika bekletilmiştir.
12. Üzerine 25 µl kit içerisinde bulunan Endotoksin Eliminatör Solusyonu soğuk bir halde eklenmiştir. İyice karıştırılarak buz üzerinde 10 dakika bekletilmiştir.
13. Karışım önceden ayarlanmış 65 °C su banyosunda bulanık hale gelene kadar 5 dakika boyunca ısıtılmıştır.
14. 30 °C sıcaklıkta 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
15. Oluşan üst faz Endotoksin-Free mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. (Bu basamakta Endotoksin-Free pipet uçları kullanılmıştır.)
16. Endotoksin seviyesini düşürmek için 12-15 basamaklar 3 defa tekrarlanmıştır.

17. Elde edilen karışıma 3 hacimlik soğuk etanol eklenerek karıştırıldıktan sonra buz içerisinde 30 dakika bekletilmiştir.
18. 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır.
19. Pellet % 75 etanolla düşük sıcaklıkta yıkanmıştır. 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek üst sıvı atılmıştır.
20. Tüpün dibindeki rekombinant plazmit endotoksinsiz ultra saf su ile çözdürülmüştür ve kullanılabildiği kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

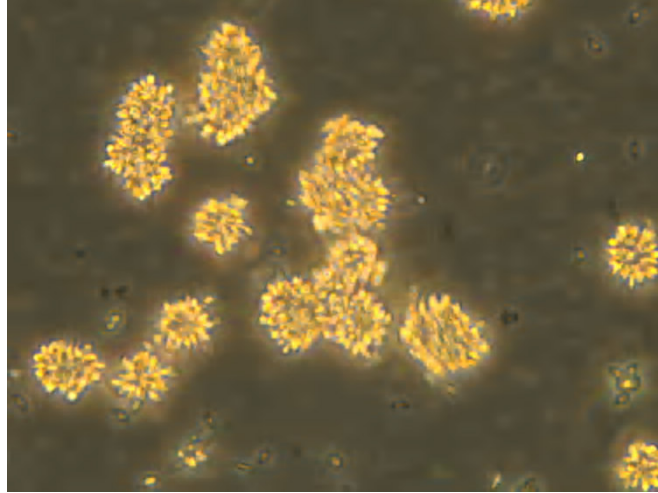
### **3.2.9. Rekombinant pCDNA3.1 LdGp63 Plazmit ile IL-12 Formülasyonu**

*L. donovani* Gp63 geninin pCDNA3.1 plazmitine yerleştirilmesiyle oluşturulan rekombinant plazmite pCDNA3.1 LdGp63 adı verilmiştir.

Rekombinant pCDNA3.1 LdGp63 plazmiti, farelerde IL-12 ekspresyonu yapan pORF-mIL-12 (Invivogen, ABD) plazmiti ile miktar olarak 1/1 oranında karıştırılarak farelerde uygulamaya hazır hale getirilmiştir ve  $-80^{\circ}\text{C}$  'de muhafaza edilmiştir.

#### 4.BULGULAR

RPMI-1640 besiyerinde üretilen promastigotlar yeterli yoğunluğa ulaşınca direkt olarak genomik DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Şekil 4.1'de RPMI-1640 besiyerinde üretilmiş *L.donovani* türüne ait promastigotların invert mikroskopta çekilmiş resmi görülmektedir.

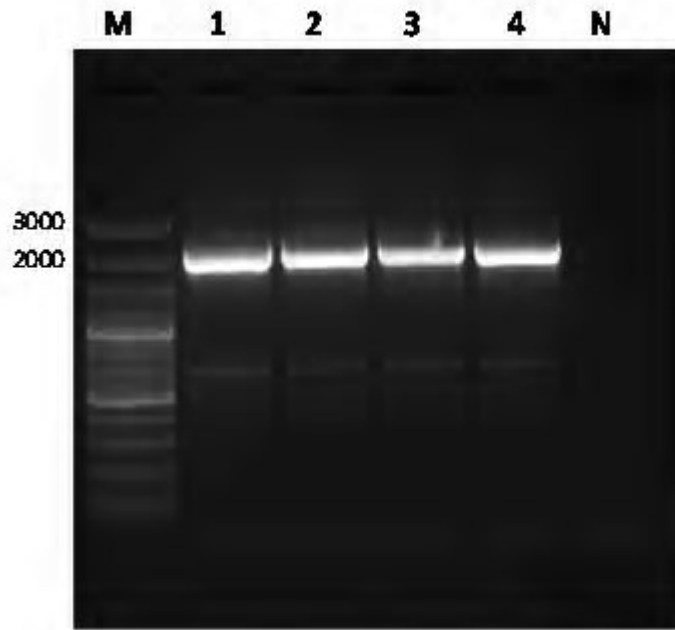


**Şekil 4.1.** RPMI-1640 besiyerinde üreyen *L.donovani* promastigotlarının kümeleşmiş görüntüsü.

Genomik DNA izolasyonu QIAamp tissue kit (QIAGEN, ABD) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. *L.donovani* Gp63 genine spesifik primerlerle gerçekleştirilmiş PCR reaksiyon ürününün agaroz jel görüntüsü ise **Şekil 4.2**'de verilmiştir. Gp63 gen bölgesinin uzunluğu 1926 bp büyüklüğündedir.

Jel görüntüledikten sonra ilgili geni gösteren bantlar kesilip alındıktan sonra Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ABD) kullanılarak saflaştırma yapılmıştır. Saflaştırılan ürün tekrar jel elektroforezi uygulanıp yukarıda anlatıldığı şekilde görüntülenmiştir. Şekil 4.3'de jel Clean-Up ürününün görüntüsü verilmiştir.

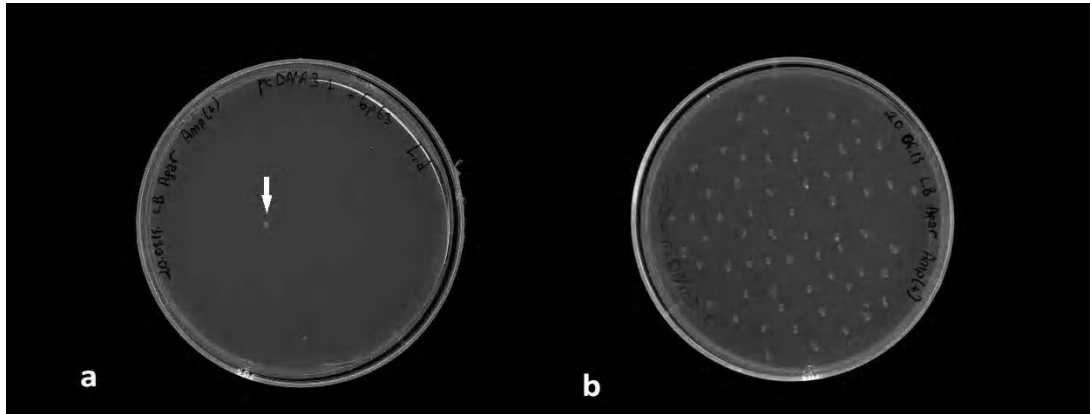
Clean-Up ürünü jel de görüntülenerek doğrulandıktan sonra direkt olarak ligasyon için kullanılmıştır. Ligasyon basamağında elde edilen ürün de direkt olarak kompetan *E.coli* hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon sonrası hücreler ampisilinli LB katı (agar) besiyerine ekilerek inkübe edilmiştir. Bir gece inkübasyondan sonra pleytler üzerinde yalnızca tek bir koloni geliştiği görülmüştür (Şekil 4.4.a). Oluşan tek koloni kürdan yardımıyla alınarak ampisilinli yeni bir LB besiyeri içeren pleyte tek nokta ekimi yapılmıştır. Tek nokta ekim sonrasında oluşan koloniler Şekil 4.4.b’de verilmiştir.



**Şekil-4.2.** *L.donovani* Gp63 genine ait PCR ürününün Jel Elektroforezi görüntüsü. M-marker, 1-4 kuyular PCR örnekleri, son kuyu ise negatif kontroldür.

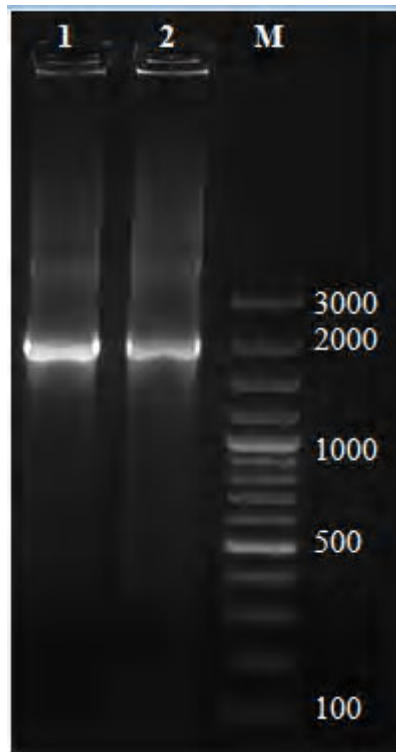


**Şekil 4.3.** Clean-Up ürünü elektroforez sonrası agaroz jel görüntüsü. Birinci kuyu, marker; ikinci kuyu, izole edilen 1926 baz çiftlik ürünün bant görüntüsü.



**Şekil 4.4.** a) pcDNA3.1 + Gp63 geninin One Shot®TOP10 kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası oluşan koloninin LB pleytindeki görüntüsü. (koloni ok ile gösterilmiştir). b) Ampisilinli LB pleytinde tek nokta ekim sonrasında gelişen koloniler.

İnkübasyon sonrası antibiyotikli LB pleytleri üzerinde oluşan kolonilerin klonlanmış geni içerip içermediğini tespit etmek için PCR tarama yapılmıştır. Koloniler, tek bir koloniden çoğalmış olmasına rağmen daha güvenilir bir sonuç elde etmek için rastgele iki koloni seçilerek PCR tüpleri içerisinde hazırlanmış karışıma eklenmiştir. Total genomik DNA'dan Gp63 geninin izolasyonu için uygulanan şartların aynısı kullanılarak PCR yapılmıştır. 1926 baz çifti büyüklüğündeki Gp63 PCR ürünü yine aynı şekilde etidyum bromütle boyanmış %1.5 agaroz jelde elektroforez uygulanarak görüntülenmiştir (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** *L.donovani* Gp63 gen spesifik primerleriyle gerçekleştirilen PCR tarama sonucunun agaroz jel görüntüsü (M-Marker, 1,2- PCR tarama ürünü).

Kompetan hücre kolonilerinin ilgili geni içerdiği PCR tarama ile doğrulandıktan sonra kolonilerden kürdan yardımıyla alınarak antibiyotikli LB sıvı besiyerine ekilmiştir. Toplam 10 ml LB sıvı besiyeri içerisine ekilen bu koloniler bir gece boyunca 37 °C'de sallayıcıda inkübe edilmiştir. Ertesi gün sıvı besiyeri çıplak gözle bile fark edilecek şekilde bulanıklaştığı, yani kolonilerin iyi ürediği gözlenmiştir. Kolonilerin ürediği sıvı besiyeri santrifüj edilerek hücreler pellet halinde elde edilmiştir ve üretici firmanın protokolüne göre rekombinant plazmit (miniprep) izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen rekombinant plazmidin klonlanan geni içerip içermediği miniprep-PCR tarama ile de doğrulanmıştır. Templeyt DNA olarak miniprep ürünü kullanıp Gp63 gen spesifik primerlerle önceki basamaklardaki PCR şartlarının aynısı uygulanarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR ürünü etidyüm bromüdü % 1.5'luk agaroz jeline yüklenmiş ve 120 volt, 60 dakika elektroforez uygulanmıştır. Ardından jel önceki basamaklarda olduğu gibi BİO-RAD ChemiDoc Mp görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiştir (Şekil 4.6).



**Şekil-4.6.** Miniprep ürününün templeyt olarak kullanıldığı ve Gp63 gen spesifik primerlerle uygulanan PCR ürününün agaroz jel görüntüsü. (M-marker, 1-PCR ürünü, N-negatif örnek).

Elde edilen miniprep ürünü, Gp63 gen spesifik primerler kullanılarak sekans analizi yapılmıştır. Sekanslanmış DNA dizisi sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir. Dizi analizi sonuçları Chromas v.1.45 (ConorMcCarty School of Science Griffith University, Australia) programı ile incelenmiştir. DNA dizisi GenBANK veri tabanındaki mevcut *Leishmania* sp. DNA dizileri ile karşılaştırılmıştır. Primer dizayn edilirken baz alınan

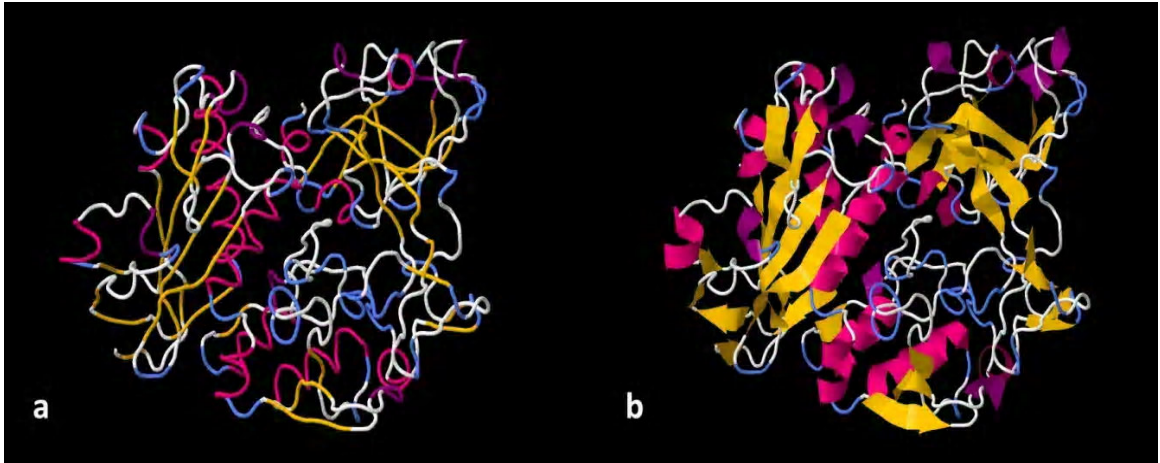
*L.donovani* türüne ait suşun Gp63 gen bölgesinin uzunluğu 1926 bp iken bu çalışmada elde edilen Gp63 gen dizisi “tga” stop kodonu çıkarılmış olduğundan dolayı 1923 bp olarak bulunmuştur. Sonuçlar <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> adresinde yer alan web tabanlı BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programına girilerek karşılaştırıldığı zaman %100 eşleştiği görülmüştür.

DNA dizi analiz sonuçlarına göre *L.donovani*'ye ait yüzey Gp63 proteinlerinin üç boyutlu yapılarının görüntülenmesi

<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> web adresinde bulunan Phyre2 Protein Homology/Analogy Recognition Engine V 2.0 programı ile Jmol: An open-source Java viewer programı kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 4.7).

**Tablo 4.1.** DNA sekans analizi sonucu elde edilen *L.donovani* Gp63 genine ait DNA dizisi.

1	atgtccgtcg	acagcagcag	cacgcaccgg	caccgcagcg	tcgccgcgcg	cctgggtgcg	60
61	ctcgcggctg	ccggcgccgc	agtcacgct	gctgtcggca	ccgcggccgc	gtgggcacac	120
121	gccggtgctg	tgcagcaccg	ctgcatccac	gacgcgatgc	accacgcgt	gcggcagtgc	180
181	gtggcgccgc	accacacggc	ccccggcgcc	gtgtccgctg	tgggcctgcc	gtacgttact	240
241	ctcgacaccg	cgcccgccgc	cgatcgccgg	ccgggcagcg	cgcccacagt	cgtgctgcgc	300
301	gcgaactggg	gcgcgctgcg	catcgccgtc	tccaccgagg	acctcaccga	ccccgcctac	360
361	cactgcgctc	gcgtcgggca	gcgtgtaaac	aaccacgcag	gcgccatcgc	cacctgtacc	420
421	gccgatgaca	tcctcaccga	cgagaagcgc	gacatcctgg	tcaaatacct	catcccgcag	480
481	gcgctgcagc	tgcacacgga	gcggctgaag	gtgcggcagg	tgcaggacaa	gtggaaggtg	540
541	acggacatgg	tcgacgagat	ctgtggcgac	ttcaaggtgc	cgccggcgca	catcaccgat	600
601	ggcctgagca	acaccgactt	cgtgatgtac	gtcgcctccg	tgccgagcga	ggaggggtgtg	660
661	ctggcgtggg	ccacgacctg	ccagggtgtc	tctgacggcc	atccagccgt	gggcgtcatc	720
721	aacatccccg	cgccgaacat	tgcgtcgcgg	taccgaccgc	tgggtgacacg	tgtcgtcacg	780
781	cacgagatgg	cgcacgcgct	cggttccagt	ggaacattct	tcacagaaat	tctcgttgta	840
841	acgcaaatga	tgaacattcg	tggaaaggac	tttaatgttt	ctgtgatcaa	cagcagcacg	900
901	gcggtggcga	aggcgcgcga	gcagtacggc	tgcggcacct	tggagtatct	ggagatcgag	960
961	gaccagggcg	gtgcgggctc	cgccgggtcg	cacatcaaga	tgcgcaacgc	caaggacgag	1020
1021	ctcatggcgc	ctgccgcagc	tgccgggtac	tacagcgccc	tgaccatggc	catcttccag	1080
1081	gacctcggct	tctaccaggc	ggacttcagc	aaggccgagg	agatgccctg	gggccggaac	1140
1141	gcgggctgcg	ccttcctcag	cgagaagtgc	atggagcaga	acatcacgaa	gtggccggcg	1200
1201	atgttttgca	atgtgagtgt	ggacgtcgtg	cgctgcccc	ccagtcgtct	gatgctcgga	1260
1261	acctgtggta	taagaggata	cagcactccg	ttttcgccct	actggcagta	cttcaccaat	1320
1321	atatcccttg	ggggctactc	tccatttctg	gattactgcc	cgtttgttat	cggtacgggt	1380
1381	gatggttcgt	gcaatcagga	cgcatcgctg	gcaacagggt	ttttcggctg	attcaacgtc	1440
1441	ttctccgacg	cggcgcgctg	catcgatggc	gccttcaggc	cgaagaatag	aaccgctgcc	1500
1501	gatggctact	acgccggact	gtgcgccaac	gtgcgggtcg	acacggccac	gcgcacgtac	1560
1561	agcgtgcagg	tgtgcggcag	tatggactac	gtgaactgca	cgccgggctc	cagagttgag	1620
1621	ctgagcaccg	tgagcagcgc	cttcgaggag	ggcggctaca	tcacgtgcc	gccgtacgtg	1680
1681	gaggtgtgcc	aggccaacgt	gaagggagcc	aaggacttcg	caggcgactc	cgacagctcc	1740
1741	agcagcgccc	gtgacgctgc	tgacagagcg	gcgatgcagc	gggtggaatga	caggatggcc	1800
1801	ggcttggtca	ctgcggcgat	ggtgctgcta	ggaatggctc	tctctctcat	ggcgtcgtg	1860
1861	gttgtgtggc	tactccttct	cacctgcccc	tgggtgtgtt	gcaaatttgg	ggggctccca	1920
1921	acg	1923					



**Şekil 4.7.** *L. donovani* yüzey Gp63 proteininin üç boyutlu yapısı (a ve b).

İzole edilen rekombinant plazmidin istenen geni taşıdığını doğrulanmak için kullanılan bir diğer yöntem ise restriksiyon enzimleri ile kesim deneyleridir. *Xba I* ve *BamH I* kesim enzimleri kullanılarak gerçekleştirilen deney sonucunda elde edilen ürün yine agaroz jel elektroforezi uygulanarak, önceki basamaklardaki yöntemlerle görüntülenmiştir. Sonuçta beklenildiği gibi klonlanmış genin ön tarafı *BamH I* arka tarafı *Xba I* enzimi ile kesilerek yaklaşık 2000 baz büyüklüğünde *L. donovani* Gp63 genini içeren parça ile 5523 bp uzunluğunda pCDNA3.1 plazmit vektörü agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.8).

Klonlanan geni içerdiği bahsedilen çeşitli yöntemlerle doğrulanan rekombinant plazmit kompetan hücrelerine transforme edilerek çoğaltılmıştır. IDPURE™ Spin Column Endotoxin-Free Plasmid DNA Miniprep Kit kullanılarak endotoksinsiz halde elde edilmiştir. Rekombinant pCDNA3.1 LdGp63 plazmit, IL-12 kombinasyonu karıştırılarak farelerde DNA aşısı için uygulamaya hazır hale getirilmiştir.



**Şekil 4.8.** Rekombinant plazmidin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu elde edilen ürünün agaroz jel görüntüsü. M-marker, 1-klonlanan genin her iki tarafından kesilmiş rekombinant plazmit. Yaklaşık 2000 bç uzunluğunda klonlanmış gen ve 5523 bç uzunluğunda plazmit vektörü olmak üzere iki ayrı dizinin bant görüntüsü.

## 5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Leishmaniasis, özellikle tropikal ve subtropikal iklim bölgelerinde yaygın olup, her yıl yaklaşık 20.000 insanın ölümüne sebep olmaktadır (36). *Leishmania* cinsine ait toplam 30 tür tanımlanmış olup bunlardan 21 türü insanda hastalık oluşturabilmektedir. Parazitin türlerinin coğrafik bölgelere göre yayılımı ise çok değişken olup epidemiyolojisi oldukça karmaşıktır (11, 36). Aynı şekilde farklı türlerin sebep olduğu klinik tablolar da birbirinden oldukça farklıdır (32). Bu klinik tablolar iyileştikten sonra skar bırakan lezyondan tedavi edilmediği takdirde ölümcül olabilen retiküloendotelial sistemin tutulduğu ve organ büyümesi gibi ağır tablolara kadar değişmektedir. Bu durum ise parazite karşı hem yeni tedavi edici ajanlar hem de uzun süreli, güvenli aşı geliştirilmesini daha da zorlaştırmaktadır.

Bazı hastalarda inkübasyon sürecinin çok uzun (yıllar sürebilmesi) olması ve başlangıç klinik belirtilerin özgül olmaması hastalığın tanısını zorlaştırmakta ve böylece tedavinin geciktirilmesine neden olabilmektedir. Hastalığın çeşitli formlarının tedavisi mevcuttur, ancak kullanılan ilaçların hem maliyeti çok yüksek hem de çok fazla yan etkisi bulunmaktadır (49, 52). Tedavide kullanılan ajanlara karşı direnç gelişme endişesi de devam etmektedir. Ayrıca bazı hastalar tamamen tedavi edildikten sonra bile belli bir zaman sonra relapslar görülebilmektedir (33, 42, 52). Diğer taraftan, son yıllarda leishmaniasis-HIV koenfeksiyonu olgularının artması da bu duruma karşı etkili bir korunma sağlanabilmesi için yapılan ve yapılacak çalışmaların önemini ortaya çıkarmaktadır. Bu gibi durumlar ise enfeksiyondan korunmanın ve etkili bir aşı uygulamasının aciliyetini daha da arttırmaktadır. Hastalıktan korunmak için çok sayıda geniş çaplı çalışmalar yürütülmekte olup bu çalışmalar özellikle vektöre karşı savaş

çalışmalarını içermektedir (53). Aynı zamanda rezervuar görevi gören enfekte hayvanların da tespit edilip tedavi edilmesi çalışmaları da özellikle son yıllarda önem kazanmıştır.

Diğer enfeksiyon hastalıklarında olduğu gibi korunmak için önemli olan bir diğer konu ise aşı uygulamalarıdır. Ancak günümüze kadar hiçbir paraziter enfeksiyona karşı geliştirilmiş insan kullanımı için onaylanmış etkili bir aşı mevcut değildir (12). Tedavi edilmiş leishmaniasis hastalarında uzun süreli immunitenin geliştiğinin yıllarca gözlenmiş olması koruyucu bir aşının mümkün olacağını göstermektedir. Leishmaniasise karşı köpeklerde kullanımı onaylanmış birkaç aşı bulunsa da (61) henüz insan uygulaması için onaylanmış bir aşı geliştirilememiştir. Parazite karşı immun yanıtın oluşturulmasında etkilerinin yoğun bir şekilde araştırıldığı birçok aşı adayları mevcut olup bunlardan bazıları faz çalışmalarını düzeyine kadar geliştirilebilmiştir (60, 82). Son yıllarda rekombinant aşı olarak kullanılan antijenlere ait DNA dizileri tekli veya kokteyl aşılarda halinde denenmiştir. DNA aşılarda, daha dayanıklı olmaları, üretim maliyetlerinin daha düşük olması, taşınmasında soğuk zincire ihtiyaç duyulmaması, birçok genin bir araya getirilebilmesi gibi özellikler sayesinde rekombinant protein aşılarda göre daha kullanışlıdır.

Doğal immun sistemde birincil bariyerleri oluşturan elemanlardan biri olan makrofaj hücreleri vücuda giren yabancı maddeleri ve patojenleri hem fagosite ederek, hem de diğer immun sistem elemanlarını uyararak hastalıklara karşı korunmada çok sayıda önemli fonksiyonlara sahiptir. Ancak *Leishmania* parazitleri makrofaj hücrelerinin bu sinyal yollarını değiştirerek veya inhibe ederek hayatta kalabilmek için stratejiler geliştirmektedir (83). Form değiştirerek makrofaj hücreleri içerisinde immun sistemin öldürücü mekanizmalarına karşı korunur, yaşama ve çoğalma imkanı bulur (83). *Leishmania*'nın yüzeyinde bulunan Gp63'ün ise parazitin makrofajlara tutunması, kompleman-aracılı lizisten kaçınması ve proteinaz etkisinden dolayı birçok protein yapılı molekülleri degrades edebilmesi gibi fonksiyonları sayesinde parazitin hayatta kalması için makrofajlar üzerinde derin etkilerinin olduğu bilinmektedir (71).

*Leishmania* gibi doğal immun sistem hücrelerini hedef alan patojenlere karşı yeterli immun yanıt geliştirmek için doğal immunoreseptörleri hedef alan adjuvanların kullanılması etkin bir stratejidir. Leishmaniasise karşı aşı araştırmalarında adjuvan olarak TLR9 agonisti CpG, TLR4 agonisti monofosforil lipid-A, TLR7/8 agonisti

imiquimod, adenoviral vektörler, interlökin-12 (IL-12), alüminyum tuzları (alum) ve bazı diğer immunostimülatör ajanlar kullanılmıştır (11, 58). Gp63 önemli bir virulans faktör olması ve konak immun sistem fonksiyonları üzerinde derin bir etki oluşturması gibi çeşitli özelliklerinden dolayı üzerinde en çok çalışılan ve ümit verici aşı adaylarından biridir (56, 61). Gp63 uzun yıllardır çeşitli adjuvanlarla ve diğer antijenlerle kombinasyonlar halinde *Leishmania* enfeksiyonlarının farklı formlarına karşı koruyuculuğu araştırılmıştır. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada; Gp63 antijeni aşı olarak uygulanmadan önce farelerin Hsp70 antijeni ile uyarılmasının *L.donovani* enfeksiyonuna karşı gelişen immun yanıtı arttırdığı belirlenmiştir (6). *L.mexicana* Gp63 aşısının gen tabancası yöntemiyle uygulanması ile çözünür antijen (Soluble Antijen-SLA) aşısının koruyucu etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmada ise Gp63'ün yüksek seviyede Th1 immun cevap ile birlikte *L.mexicana* enfeksiyonuna karşı koruma sağladığı, ancak SLA'nın koruyucu olmadığı görülmüştür (84). Gp63 aşısının son yılların en yeni stratejilerden biri olan prime-boost stratejisine göre farelerde hem DNA hem protein şeklinde uygulandığında etkinliğinin daha fazla olduğu bulunmuştur (74). Benzeri birçok çalışma göstermektedir ki; Gp63 aşısının sadece farklı formülasyonlarla değil, farklı uygulama metodlarıyla da etkinliğinin artırılabilmesi mümkündür. Çok kuvvetli bir immunojen olmasının yanı sıra bazı çalışmalar sonucunda Gp63'ün NK hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (7). IL-12'nin ise NK hücre ve T hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını uyaran önemli bir molekül olduğu bilinmektedir (80, 81). BALB/c farelerin leishmanial antijenler ve IL-12 ile aşılandıkları zaman leishmaniasise karşı savunmada gerekli *Leishmania*-spesifik CD4+ TH1 hücrelerinin çoğalmasının önemli derecede arttığı tespit edilmiştir (76). Bhaumik ve arkadaşları (79) tarafından *L.donovani* ve *L.major* türlerinin oluşturduğu enfeksiyona karşı KMP-11 DNA aşısının koruyuculuğunun araştırıldığı bir çalışmada; *L.donovani* enfeksiyonunda ekzojen IL-12 gerekliliği sonucuna varılmıştır. Yapılan bir diğer çalışmada ise *L.donovani* enfeksiyonundan hemen sonra konak makrofaj hücrelerinin patojenlere karşı savunmada NK ve T hücrelerin aktivasyonunu sağlayan IL-12 üretmediği gözlenmiştir (78). Bu ve benzeri çalışmalar sonucunda elde edilen bilgiler ise Gp63+IL-12 kombinasyonunun daha etkin ve uzun vadeli bir immun cevap oluşturacağı umudunu doğurmaktadır. Günümüze kadar Gp63 çeşitli aşı uygulama metodlarıyla ve adjuvanlarla birlikte enfeksiyona karşı koruyuculuğu araştırılmış olmasına rağmen henüz IL-12 ile formülasyonu halinde araştırılmamıştır.

Bu çalışma kapsamında; *L.donovani* promastigotları kültür ortamında üretilerek izole edilen total genomik DNA'dan Gp63 genine ait dizi çoğaltılmıştır. Saumyabrata ve arkadaşlarının (74) yapmış oldukları bir çalışmada, ilgili gen bölgesinin çoğaltılması için PCR şartları; 5 dakikalık 94 °C ile başlayan, 40 döngüden oluşan 1 dakika 94 °C, 1 dakika 20 saniye 59.5 °C, 2 dakika 72 °C ve son olarak 7 dakika süren 72 °C'lik uzama basamağını içermektedir. Bu şartları uygulayarak gerçekleştirdikleri reaksiyonda kullandıkları F primeri 38 bç, R primeri ise 33 bç uzunluğundadır. Bu çalışmamızda ise kullanılan F primeri 20 bç, R primeri ise 19 bç olarak dizayn edilmiştir. Dolayısıyla Gp63 geninin çoğaltılması için uygulanan PCR şartları da bir önceki söz edilen çalışmadan farklı olarak, 5 dakikalık ön ısıtma ile başlayan, 33 döngüden oluşan 95 °C'de 1 dakika denatürasyon, 65 °C'de 1 dakika bağlanma, 72 °C'de 1.5 dakika ve son olarak da 72 °C'de 15 dakika süren uzama basamağını kapsamaktadır. Gp63 gen bölgesi pcDNA™3.1/V5-His TOPO® vektörüne klonlanarak kompetan hücrelerine transformasyonu yapılarak çoğaltılmıştır. Rekombinant plazmidin ilgili geni taşıyıp taşımadığı PCR tarama, miniprep ile doğrulama, DNA dizi analizi ve restriksiyon enzim reaksiyonlarıyla doğrulanmıştır. Klonlanan geni taşıdığı doğrulanmış plazmit tekrar kompetan hücrelere transforme edilerek çoğaltılmış ve endotoksinsiz halde elde edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışma kapsamında Gp63 geni plazmite klonlanmış olup bu proje sonrasında yapılacak çalışmalarda hem rekombinant protein elde edilerek hem de DNA aşısı olarak IL-12 ile birlikte etkinliği araştırılabilecektir. Ayrıca klonlanan genin kodladığı protein rekombinant olara sentezlenebilecek, üretilen protein ELISA ve benzeri tanı testlerinde kullanılabileceği gibi protein aşısı olarak da kullanılabilecektir. Elde edilen Gp63 aşısı leishmaniasise karşı korunmada LPG, KMP-11, rA2, LACK, Histon H1, FML, CP I ve CP II gibi ümit verici diğer antijenlerle kombinasyonları halinde de koruyuculuğunun araştırılması için kullanılabilecektir. İlaveten bu kombinasyonlara Th1 yanıtı uyaran adjuvanlar eklenerek uzun süreli koruyucu, güçlü bir immun yanıt geliştirilmeye de çalışılabilir.

## 6.KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Global report for research on infectious diseases of poverty 2012. UNICEF/UNDP/World Bank/WHO. Geneva, 2012.
2. World Health Organization. "First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases", WHO 1, France, 2010, 1-184.
3. Selvapandiyani A, Duncan R, Mendez J, et al. A *Leishmania* minicircle DNA footprint assay for sensitive detection and rapid speciation of clinical isolates. *Transfusion* 2008; 48: 1787-1798.
4. Selvapandivan A, Dey R, Gannavaram S, et al. Immunity to visceral leishmaniasis using genetically defined live-attenuated parasites. *J Trop Med* 2012; 631460.
5. Mcgwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *Q J Med* 2014; 107: 7-14.
6. Kaur T, Sobti RC, Kaur S. Cocktail of gp63 and Hsp70 induces protection against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *Parasite Immunol* 2011; 33: 95-103.
7. Lieke T, Nylen S, Eidsmo L, et al. *Leishmania* surface protein Gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin Exp Immunol* 2008; 153: 221-230.
8. Choi CM, Lerner EA. Leishmaniasis as an emerging infection. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2001; 6: 175-182.

9. Bailey H, Bishop WJ, Leishman-Donovan bodies and donovaniasis. *Brit J Vener Dis* 1959; 35: 8-9.
10. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354: 1191–1199.
11. Özbel Y, Töz SÖ. Leishmaniosis. Özcel MA (ed), Özcelin Tibbi Parazit Hastalıkları. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 2007; ss197-244.
12. Karaca S. *Leishmania infantum* DNA Aşısı Adayı LACK Geninin Klonlanması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2013: 69.
13. İça A. Köpeklerde leishmaniasis. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2004; 1: 119-124.
14. Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: model of intracellular parasitism. *J Cell Sci* 1999; 122: 2993-3002.
15. Ateş F, Or E, Körpınar MA, ve ark. Leishmaniasisin tedavisinde antimon bileşiklerinin kullanımı. *YYU vet Fak Derg* 2011; 22: 53-57.
16. Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of *leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol* 2003; 33: 1027-1034.
17. Sacks DL, Perkins PV. Development of infective stage *Leishmania* promastigots within phlebotomine sandflies. *Am J of Trop Med Hyg* 1985; 34: 456-459.
18. Saraiva EMB, Pimenta PFP, Brodin TN, et al. Changes in Lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology* 1995; 111: 275-287.
19. Sacks DL, Pimenta PFP, McConville MJ, et al. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* 1995; 181: 685-697.
20. Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1: 455-460.

21. Wiese M. A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of *Leishmania mexicana* is essential for parasite survival in the infected host. *EMBO J* 1998; 17: 2619-1628.
22. Alborzi A, Rasouli M, Shamsizadeh A. *Leishmani tropica*-isolated patient with visceral leishmaniasis in Southern Iran. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 73: 306-307.
23. Mahmudzadeh-Niknam H, Kiaei SS, Irvani D. Viscerotropic growth pattern of *Leishmania tropica* in BELB/c mice is suggestive of a murine model for human viscerotropic leishmaniasis. *Korean J Parasitol* 2007; 45: 247-253.
24. Alborzi A, Pouladfar GR, Fakhar M, et al. Case Report: Isolation of *Leishmania tropica* from a Patient with Visceral Leishmaniasis and Disseminated Cutaneous Leishmaniasis, Southern Iran. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79: 435-437.
25. Alvar J, Velez ID, Bern C, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PlosOne* 2012; 7: e35671.
26. Desjeux P. Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol* 2001; 190: 77-79.
27. Öner S, Çetin H. Kutanöz leishmaniasis ve Antalya ilindeki durumu. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2013; 37: 84-91.
28. Zeyrek FY, Korkmaz M, Özbek Y. Serodiagnosis of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Sanliurfa Province, Turkey, Where ACL is highly endemic. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 1409-1415.
29. Ozensoy Toz S, Nasereddin A, Ozbel Y, et al. Leishmaniasis in Turkey: Molecular characterization of *Leishmania* from human and canine clinical samples. *Trop Med Int Health* 2009; 14: 1401-1406.
30. Yazar S, Kuk S, Cetinkaya U, et al. *Leishmania* sp. In Visceral Leishmaniasis suspected patients in Kayseri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2013; 60: 185-187.
31. Korkmaz S, Özgöztaş O, Kayıran N. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Leishmaniasis Tanı ve Tedavi Merkezine Başvuran Kutanöz Leishmaniasis Olgularının Değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2015; 39: 13-16.
32. Pearson RD, Sousa AQ. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 1-13.

33. Magill AJ, Meyers WM, et al. Visceral Leishmaniasis. UNIFORMED SERVICES UNIV OF HEALTH SCIENCES BETHESDA MD 2011.
34. Gürel MS, Yeşilova Y, ve ark. Türkiye’de Kütanöz Leishmaniasisin Durumu. Türkiye Parazitolojisi Dergisi 2012; 36: 121-129.
35. Amato VS, Tuon FF, Camargo RA, et al. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. J Eur Acad Dermatol Venereol 2009; 23: 1026-1034.
36. Von Stebud E. Leishmaniasis. J Dtsch Dermatol Ges 2015; 13: 191-200.
37. Elfaituri SS, Matoug I, Elsalheen H, et al. Mucocutaneous leishmaniasis in an 11-year-old girl with ataxia telangiectasia-case report. Libyan J Med 2015; 10: 26432.
38. Kuk S, Poyrazoglu G, Arslan FC, ve ark. Bir çocukta visceral leishmaniasis olgusu. Fırat Tıp Dergisi 2007; 12: 237-238.
39. Balcı YI, Türk M, Özgür A, ve ark. Dört çocuk hastada indirekt floresan antikor testi kullanımı ile visceral leishmaniasis değerlendirilmesi. Türkiye Parazitolojisi Dergisi 2011; 35: 114-116.
40. Atık E, Kuk S, İnandı T. Diagnostic approaches and significance of inducible nitric oxide positivity in human cutaneous leishmaniasis caused by leishmania tropica. Int J Dermatol 2007; 46: 273-277.
41. Zeyrek FY, Erdoğan DD, Uluca N, ve ark. Kütanöz Leishmaniasis tanısında serolojinin yeri. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2012; 18: 121-124.
42. Pavli A, Maltezou HC. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. Int J Infect Dis 2010; 14: e1032-1039.
43. Dilek N, Dilek AR, Yüksel D, ve ark. Endemik bölge dışında leishmaniasis. <http://www.dermatoz.org/2015/4/dermatoz15064o2> (10.11.2015).
44. Ergüven S. Kan ve doku protozoonlarına karşı kullanılan yeni ilaçlar. ANKEM Dergisi 2012; 26: 108-115.

45. Yeşilova Y, Turan E, Sürücü HA, ve ark. Sistemik Lipozomal Amfoterisin B Tedavisine Cevap Veren Kutanöz Leishmaniais Olgusu. Türkiye Parazitoloj Derg 2015; 39: 63-65.
46. Güneş AM, Sevinir B, Baytan B, ve ark. Kala-azar ve lipozomal amfoterisin B ile tedavi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2004; 47: 103-106.
47. Acıpayam C, Çulha G, Altunay A, ve ark. Kala-azarlı çocuk hastalarda lipozomal amfoterisin B ile tedavi deneyimi. Abant Med J 2015; 4: 222-229.
48. Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. J Infect Dev Ctries 2015; 9: 588-596.
49. Zeyrek FY. Barsak, kan ve doku parazitleri tedavisine yeni yaklaşımlar. ANKEM Derg 2009; 23: 221-227.
50. Khalid FA, Abdalla NM, Mohamed HEO, et al. In vitro assessment of anti-cutaneous leishmaniasis activity of some Sudanese plants. Türkiye Parazitoloj Derg 2005; 29: 3-6.
51. Polat E, Cakan H, Aslan M, et al. Detection of anti-leishmanial effect of the *Lucilia sericata* larval secretions in vitro and in vivo on *Leishmania tropica*: First work. Exp Parasitol 2012; 132: 129–134.
52. Polat E, Kutlubay Z. Mehlümin Antimoniat Tedavisine Dirençli Dört Kutanöz Leishmaniasis Olgusu. Türkiye Parazitoloj Derg 2014; 38: 177-80.
53. Dantas-Torres F, Ortanto D. Best practices for preventing vector-borne diseases in dogs and humans. Trends Parasitol 2015; 15: S1471-4922.
54. Yaman M. Tatarcıklarla mücadele ve bu alanda son gelişmeler. Türkiye Parazitoloj Derg 2008; 32: 280 – 287.
55. Kılıç M, Aslan D, Akın L. Vektör kaynaklı hastalıklar: Küresel resme Türkiye verileri ile bakmak. Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi 2015; 24: 152-160.
56. Alvar J, Croft SL, Kaye P, et al. Case study for a vaccine against leishmaniasis. Vaccine 2013; 31: B244– B249.

57. Selvapandiyan A, Dey R, Gannavaram S, et al. Generation of growth arrested *Leishmania* amastigotes: A tool to develop live attenuated vaccine candidates against visceral leishmaniasis. *Vaccine* 2014; 32: 3895–3901.
58. Okwor I, Uzonna J. Vaccines and vaccination strategies against human cutaneous leishmaniasis. *Human Vaccines* 2009; 5: 291-301.
59. Gomes R, Oliveira F. The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on *Leishmania* immunity. *Front Immunol* 2012; 3: 110.
60. Rezvan H, Moafi M. An overview on *Leishmania* vaccines: A narrative review article *Vet Res Forum* 2015; 6: 1 – 7.
61. Jain K, Jain NK. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *J Immunol Methods* 2015; 422: 1-12.
62. Coler RN, Reed SG. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2005; 21: 244-249.
63. Silva VO, Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, et al. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (Sao Gancalo do Amaranto, RN). *Vaccine* 2001; 19: 1082–1092.
64. Borja-Cabrera GP, Santos FN, Bauer FS, et al. Immunogenicity assay of the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine* 2008; 26: 4991–4997.
65. Vakili AZ, Taheri T, Taslimi Y, et al. Immunization with the hybrid protein vaccine, consisting of *Leishmania major* cystein proteinases Type I (CPB) and Type II (CPA), partially protects against leishmaniasis. *Vaccine* 2004; 22: 1930–1940.
66. Williams RA, Tetley L, Mottram JC, et al. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmanai mexicana*. *Mol Microbiol* 2006; 61: 655-674.
67. Nagill R, Kaur S. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. *Int Immunopharmacol* 2011; 11: 1464-1488.

68. Allahverdiyev A, Bağirova M, Çakır Koç R, ve ark. Leishmaniasise karşı aşı geliştirilmesinde yaklaşımlar ve problemler. *Türkiye Parazitol Derg* 2010; 34: 122-130.
69. Ivory C, Chadee K. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. *Genet Vaccines Ther* 2004; 2: 17.
70. Ramshaw IA, Ramsay AJ. Prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today* 2000; 21: 163-165.
71. Olivier M, Atayde VD, Isnard A, et al. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease Gp63. *Microbes and Infection* 2012; 14: 1377-1389.
72. Yao C, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or Gp63) of *Lishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 132: 1-16.
73. Bhowmick S, Ravindran R, Ali N. gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 2008; 76: 1003-1015.
74. Mazumder S, Maji M, Das A, Ali N. Potency, efficacy and durability of DNA/DNA, DNA/protein and protein/protein based vaccination using gp63 against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *PLoS One* 2011; 6: e14644.
75. Gregorio ED, Caproni E, Ulmer JB. Vaccine adjuvants: mode of action. *Front Immunol* 2013; 4: 214.
76. Afonso LC, Scharton TM, Vieira LQ, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* 1994; 263: 235-237.
77. Heinzl FP, Schoenhaut DS, Rerko RM, Rosser LE, Gately MK. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 1993; 177: 1505-1509.
78. Gorak P, Engwerda CR, Kaye PM. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* 1998; 28: 687-695.

79. Bhaumik S, Basu R, Sen S, Naskar K, Roy S. KMP-11 DNA immunization significantly protects against *L.donovani* infection but requires exogenous IL-12 as an adjuvant for comparable protection against *L.major*. *Vaccine* 2009; 27: 1306-1316.
80. Scott P. IL-12: Initiation Cytokine for Cell-Mediated Immunity. *Science* 1993; 260: 496-497.
81. Pearce EL, Shen H. Generation of CD8 T cell memory is regulated IL-12. *Am Assoc Immunol* 2007; 179: 2074-2081.
82. Kumar R, Engwerda C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin Transl Immunology* 2014; 3: 13.
83. Shio MT, Hassani K, Isnard A, et al. Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. *J Trop Med* 2012; 2012: 819512.
84. Rezvan H, Rees R, Ali SA. *Leishmania mexicana* Gp63 cDNA Using Gene Gun Induced Higher Immunity to *L. mexicana* Infection Compared to Soluble *Leishmania* Antigen in BALB/C. *Iranian J Parasitol* 2011; 6: 60-75.

## **5. EKLER**

**ERÜ Aşı Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğüne**

Yürürlüğüğümü yaptığım Anabilim Dalımız Yüksek Lisans öğrencilerinden Arzu ÇHARYYEVA'ya ait "LEISHMANIA DONOVANI YÜZEY GP63 GENİNİN KLONLANMASI VE IL-12 İLE FORMULASYONU" başlıklı tez projesinin kompetan hücreselinde elde edilmesi ve rekombinant plazmidin kompetan hücrelerine transformasyonu kısmının merkezimizde yapılması konusunda;

Gereğini bilgilerinize arz/rica ederim.

20.10.2015

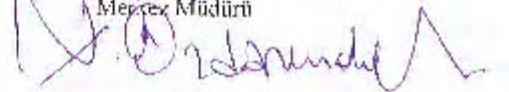
Prof. Dr. Süleyman YAZAR  
Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji AD. Bşk.

Sayın Prof. Dr. Süleyman Yazar;  
Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji AD.

Yukarıca bahsettiğiniz çalışmanın ilgili bölümünde merkezimizde çalışması uygun bulunmuştur.

20.10.2015

Prof. Dr. Aykut ÖZDARINDI  
Merkez Müdürü



## ÖZGEÇMİŞ

**Adı, Soyadı:** Arzuv Charyyeva  
**Uyruđu:** Türkmenistan  
**Doğum yeri:** Lebap/Türkmenistan  
**Doğum tarihi:** 25.03.1988  
**Medeni durumu:** Bekar  
**Tel:** +90 507 389 05 32  
**Email** [arzuvc@gmail.com](mailto:arzuvc@gmail.com)  
**Yazıma adresi:** Erciyes Üniversitesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı 38039  
Talas/KAYSERİ

## EĞİTİM

Derece Tarihi	Kurum	Mezuniyet
Yüksek Lisans	ERÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2016
Lisans	ERÜ Eğitim Fak. Fen Bilg. Öğr.	2014
Leise	Atamyrat Etr. No-27. Mek. Lebap	2004

**Yabancı dil** İngilizce, Rusça, Türkçe