

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı**

***LEISHMANIA INFANTUM* AŞI ADAYI LACK VE KMP-11
GENLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU,
FÜZYON PROTEİNİN EKSPRESYONU
VE ANTİJENİK YAPISI**

**Hazırlayan
Serkan KARACA**

**Danışman
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

Doktora Tezi

**Ocak 2018
KAYSERİ**

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

***LEISHMANIA INFANTUM* AŞI ADAYI LACK VE KMP-11
GENLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU,
FÜZYON PROTEİNİN EKSPRESYONU
VE ANTİJENİK YAPISI**

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Serkan KARACA**

**Danışman
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

**Ocak 2018
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, 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 : Serkan KARACA

İmza



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"*Leishmania infantum* aşı adayı LACK ve KMP-11 genlerinin moleküler karakterizasyonu, füzyon proteinin ekspresyonu ve antijenik yapısı" adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.



Tezi Hazırlayan
Serkan KARACA



Danışman
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM



Tıbbi Parazitoloji AD. Başkan Vekili
Prof. Dr. M. Hakan POYRAZOĞLU

KABUL ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM danışmanlığında **Serkan KARACA** tarafından hazırlanan "***Leishmania infantum* aşı adayı LACK ve KMP-11 genlerinin moleküler karakterizasyonu, füzyon proteinin ekspresyonu ve antijenik yapısı**" adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

30 / 01 / 2018

JURİ :

İmza

Danışman : Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM (Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri)

Üye : Prof. Dr. M. Hakan POYRAZOĞLU (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri)

Üye : Prof. Dr. Mehmet DOĞANAY (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hast.ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri)

Üye : Doç. Dr. Gökmen Zafer PEKMEZCİ (Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hast. Anabilim Dalı, Samsun)

Üye : Prof. Dr. Yusuf ÖZBEL (Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir)

ONAY:

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

31 Ocak 2018

828



31 Ocak 2018 2018

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENELİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini aktararak desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Alparslan Yıldırım'a ve katkılarıyla tezimin şekillenmesinde yardımlarını gördüğüm hocalarım Sayın Prof. Dr. Abdullah İnci'ye ve Sayın Doç. Dr. Önder Düzlü'ye teşekkür ederim. Diğer yandan çalışmalarına her daim çok yakından tam destek veren ERÜ Tıp Fakültesi Dekanı ve Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Başkan Vekili Sayın Prof. Dr. M. Hakan Poyrazoğlu'na şükranlarımı sunarım. Çalışmalarımın her aşamasında desteklerini aldığım ERÜ Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı personeline teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullandığım *Leishmania infantum* promastigotlarının temininde çok yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı yetkililerine ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yusuf Özbel'e teşekkür ederim.

Son olarak akademik çalışmalarım süresince sevgi ve fedakârlıklarıyla sürekli yanımda olan aileme, eşime ve sevgili kızıma teşekkür ederim.

**LEISHMANIA INFANTUM AŞI ADAYI LACK VE KMP-11 GENLERİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU, FÜZYON PROTEİNİN
EKSPRESYONU VE ANTİJENİK YAPISI**

Serkan KARACA

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Ocak 2018
Danışman: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

ÖZET

Leishmania cinsi zorunlu hücre içi protozoonların neden olduğu leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü'nün önemli tropikal hastalıklar listesinde yer almaktadır. Leishmaniasis tedavisinde rutin olarak kullanılan bileşiklerin yüksek maliyetleri, toksisite ve yan etkilerinin fazla olması nedeniyle alternatif tedavi ve aşı araştırmaları devam etmektedir. Faz aşamaları devam etmekle birlikte leishmaniasise karşı insanlarda etkili bir aşı henüz geliştirilememiştir. *Leishmania infantum*, Türkiye'de ve dünyada leishmaniasis formlarından en tehlikelisi olan visseral leishmaniasis (VL) etkenleri arasındadır. *Leishmania infantum* homolog aktive edilmiş C kinaz reseptörü (LACK) ve Kinetoplastid membran proteini-11 (KMP-11) genleri üçüncü nesil aşılarda kabul edilen DNA aşı adayları arasındadır.

Bu çalışmada *L. infantum*'un neden olduğu VL'e karşı aşı geliştirme çalışmalarında umut verici adaylardan olan *L. infantum* LACK ve KMP-11 genlerinin klonlanması, moleküler karakterizasyonu, insanlarda DNA aşısı olarak kullanıma uygun özellikte bir plazmide multi-antijenik olarak yerleştirilmesi, LACK ve KMP-11 proteinlerinden oluşan füzyon proteininin ekspresyonu ve antijenik yapısının analizi amaçlanmıştır.

Çalışmada öncelikle *L. infantum* promastigot kültüründen genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Sonra LACK geni pJET1.2 plazmidine, KMP-11 geni ise pcDNA 3.1 plazmidine klonlama reaksiyonu ile yerleştirilmiştir. Takiben LACK geni restriksiyon enzimleri ile pcDNA3.1+KMP-11 plazmidine eklenmiş ve multi-antijenik rekombinant DNA elde edilmiştir. Rekombinant plazmid varlığı tüm basamaklarda PCR tarama ile araştırılmıştır. Pozitif kolonilerden plazmid izolasyonu yapılmış ve klonlanan genlerin varlığı PCR ve DNA dizi analiz yöntemleri ile doğrulanmıştır. LACK+KMP-11 genleri

ekspresyon vektörüne sub-klonlanarak elde edilen plazmidler kompetan *E. coli* BL21 hücrelerine transforme edilmiş ve füzyon proteininin ekspresyonu sağlanmıştır. 47 kDa büyüklüğündeki füzyon proteininin varlığı SDS-PAGE ve western blot analizleri ile doğrulanmıştır. Kültüre edilen *L. infantum* nesillerinin LACK ve KMP-11 gen bölgelerine göre nükleotid ve aminoasit tabanlı moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. *Leishmania* izolatlarının LACK ve KMP-11 gen bölgesi sekans analizleri, bu gen bölgelerindeki intraspesifik nükleotid farklılıklarının interspesifik nükleotid farklılıklarla çakıştığını ve dolayısıyla filogenetik bazda tür ayırımına olanak vermediğini ortaya koymuştur. LACK proteininde 13, KMP-11 proteininde ise 3 antijenik bölgenin mevcut olduğu tespit edilmiş ve proteinlerin 3 boyutlu yapıları elde edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile *L. infantum* kaynaklı VL'e karşı umut verici DNA aşı adaylarından olan LACK ve KMP-11 genlerinin moleküler karakterizasyonu ve filogenetik analizleri yapılmıştır. Bu iki geni birlikte taşıyan multi-antijenik plazmid ve LACK+KMP-11 füzyon proteini ilk kez elde edilmiş ve antijenik yapıları incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Leishmaniasis, *Leishmania infantum*, DNA aşısı, LACK geni, KMP-11 geni, Multi-antijenik plazmid, Füzyon proteini

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *LEISHMANIA INFANTUM* LACK
AND KMP-11 VACCINE CANDIDATE GENES, EXPRESSION AND
ANTIGENIC STRUCTURE OF FUSION PROTEIN**

Serkan KARACA

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Parasitology
PhD. Thesis, January 2018
Supervisor: Prof. Alparslan YILDIRIM**

ABSTRACT

Leishmaniasis is caused by an obligate intracellular protozoa *Leishmania* genus and listed in the major tropical diseases by World Health Organization. Because of the high costs, toxicity and adverse effects of the compounds which are routinely used in the treatment of leishmaniasis, alternative treatment and vaccine studies are currently underway. As well as the phase studies are ongoing an effective vaccine has not been developed yet. Visceral leishmaniasis (VL) is the most dangerous form of leishmaniasis and *Leishmania infantum* is one of VL agents in Turkey and in the world.

Leishmania infantum homolog activated C kinase receptor (LACK) and Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) genes are among the DNA vaccine candidates considered as third generation vaccines.

This study aims to clone *L. infantum* LACK and KMP-11 genes, analyze their molecular and phylogenetic characteristics and ligate them into plasmid can be used as multi-antigenic DNA vaccine candidate in human. Additionally, to express fusion protein and analyze its antigenic structure.

In the study, primarily genomic DNA isolated from *L. infantum* promastigote culture. Then, LACK and KMP-11 genes were cloned into pJET1.2 and pcDNA 3.1 plasmids respectively. Subsequently, LACK gene sub-cloned into pcDNA3.1+KMP-11 recombinant plasmid by restriction cloning and multi-antigenic recombinant DNA was obtained. The presence of the recombinant plasmid was investigated by PCR scanning at all steps. Plasmid isolation was performed from positive colonies and the presence of cloned genes was confirmed by PCR and DNA sequencing methods.

For expression of the LACK+KMP-11 fusion protein, genes were sub-cloned into pET100 expression vector and plasmids were transformed into competent *E. coli* BL21 cells. The presence of 47 kDa fusion protein was confirmed by SDS-PAGE and western blot analysis. Nucleotide and amino acid-based molecular characterization of *L. infantum* genera was performed according to LACK and KMP-11 gene regions. Sequence analysis of LACK and KMP-11 regions of *Leishmania* isolates revealed that intraspecific nucleotide differences in these gene regions coincided with interspecific nucleotide differences. Thus, these genes did not allow species discrimination on phylogenetic basis. 13 and 3 antigenic regions were determined in LACK and KMP-11 proteins respectively. 3-dimensional structures of the LACK and KMP-11 proteins was obtained.

As a result, molecular characterization and phylogenetic analysis *L. infantum* LACK and KMP-11 genes were performed and LACK + KMP-11 based multi-antigenic plasmid and fusion protein were obtained for the first time with this study.

Key Words: Leishmaniasis, *Leishmania infantum*, DNA vaccine, LACK gene, KMP-11 gene, Multi-antigenic plasmid, Fusion protein

İÇİNDEKİLER

LEISHMANIA INFANTUM AŞI ADAYI LACK VE KMP-11 GENLERİNİN MOLEKÜLER KARATERİZASYONU, FÜZYON PROTEİNİN EKSPRESYONU VE ANTİJENİK YAPISI

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	iii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	x
KISALTMALAR	xiv
TABLO LİSTESİ	xvi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Leishmaniasis ve <i>Leishmania Infantum</i>	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Sınıflandırma	4
2.1.3. Morfoloji.....	6
2.1.4. Hayat Döngüsü	9
2.1.5. Epidemiyoloji	13
2.1.6. Klinik Çeşitlilik ve İmmünoloji.....	15
2.1.7. Tanı	17
2.1.8. Tedavi	18
2.1.9. Korunma	19

2.2. Aşı ve Aşı Çalışmaları.....	20
2.2.1. Birinci Nesil Aşılar	21
2.2.1.1. Canlı Atenüe Parazit Aşıları	21
2.2.1.2. Ölü Parazit Aşıları.....	21
2.2.2. İkinci Nesil Aşılar	22
2.2.2.1. Gen Ekleme veya Uzaklaştırma ile Elde Edilen Canlı Aşılar.....	22
2.2.2.2. Saflaştırılmış Antijen Aşıları	22
2.2.2.3. Rekombinant Antijenler.....	23
2.2.3. Üçüncü Nesil Aşılar.....	24
2.2.3.1. DNA Aşıları	24
2.2.3.2. Multi-antijenik DNA aşıları	25
2.3. Adjuvanlar	27
2.4. Lack Geni	27
2.5. KMP-11 Geni	28
2.6. Klonlama	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. <i>L. Infantum</i> Promastigot Kültürünün Yapılması	32
3.2. Kültürden Genomik DNA İzolasyonu.....	34
3.2.1. Kültürden Metasiklik Promastigotların İzolasyonu.....	34
3.2.2. Total Genomik DNA İzolasyonu.....	35
3.3. Restriksiyon Reaksiyonlarında Kullanılacak Enzimlerin Belirlenmesi	36
3.4. LACK Geninin PJET1.2 Plazmitine Klonlanması	37
3.4.1. LACK Geni Primerleri ve PCR	37
3.4.2. LACK Geni PCR Ürününün Saflaştırılması.....	38
3.4.3. LACK Geninin pJET1/2 Plazmidine Klonlanması.....	39
3.4.4. Rekombinant Plazmidin Kompetan Hücrelere Transformasyonu.....	40
3.4.5. Klonlamanın Doğrulanması.....	40
3.4.5.1. PCR Tarama ile Doğrulama.....	41
3.4.5.2. Plazmid DNA PCR Analizi ile Doğrulama	41

3.4.5.3. DNA Dizi Analizi ile Doğrulama	43
3.5. KMP-11 Geninin PCDNA3.1 Plazmitine Klonlanması	44
3.5.1. KMP-11 Geni Primerleri ve PCR	44
3.5.2. KMP-11 Geni PCR Ürününün Saflaştırılması.....	44
3.5.3. KMP-11 Geninin pcDNA3.1/V5-his TOPO Plazmidine Klonlanması	45
3.5.4. Rekombinant Plazmidin Kompetan Hücelere Transformasyonu	46
3.5.5. Klonlamanın Doğrulanması.....	47
3.5.5.1. PCR Tarama ile Doğrulama.....	47
3.5.5.2. Plazmid DNA PCR Analizi ile Doğrulama	48
3.5.5.3. DNA Dizi Analizi ile Doğrulama	49
3.6. LACK Geninin PCDNA3.1+KMP-11 Rekombinant Plazmidine SUB- Klonlanması.....	50
3.6.1. LACK Geninin Rekombinant Plazmiden Restriksiyon Enzimleri ile Çıkarılması.....	50
3.6.2. pcDNA3.1+KMP-11 Rekombinant Plazmidinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi	51
3.6.3. pcDNA3.1+KMP-11 ve LACK DNA Parçalarının Ligasyonu	52
3.6.4. Multi-antijenik Rekombinant Plazmidin Kompetan Hücelere Transformasyonu	53
3.6.5. Klonlamanın Doğrulanması.....	53
3.6.5.1. PCR Tarama ile Doğrulama.....	54
3.6.5.2. Miniprep ve PCR ile Doğrulama	54
3.6.5.3. DNA Dizi Analizi ile Doğrulama	56
3.7. Rekombinant Protein Ekspresyonu	57
3.7.1. LACK+KMP-11 Genlerinin pET100 Vektörüne Yerleştirilmesi	57
3.7.2. Multi-antijenik Rekombinant Plazmidin One Shot TOP10 Kompetan Hücelere Transformasyonu	58
3.7.3. Klonlamanın Doğrulanması.....	59
3.7.4. Rekombinant pET100 Plazmid DNA İzolasyonu.....	59

3.7.5. Multi-antijenik Rekombinant Plazmidin One Shot BL21 Star (DE3) Kompetan Hücrelerine Transformasyonu.....	60
3.7.6. LACK+KMP-11 Füzyon Proteininin Ekspresyonu.....	61
3.7.7. LACK+KMP-11 Füzyon Proteininin Analizi.....	61
3.8. LACK ve KMP-11 Genlerinin Sekans ve Filogenetik Analizi	64
3.9. LACK ve KMP-11 Proteinlerinin Moleküler Karakterizasyonu	64
4. BULGULAR	66
4.1. <i>L. Infantum</i> Kültür Sonuçları.....	66
4.2. <i>L. Infantum</i> LACK Geni Ampklifikasyon, Klonlama, Sekans ve Filogenetik Analizleri	68
4.2.1. Amplifikasyon Sonuçları	68
4.2.2. Klonlama Sonuçları	69
4.2.3. Sekans ve Filogenetik Analiz Sonuçları	72
4.2.4. Protein Analiz Sonuçları.....	79
4.3. <i>L. Infantum</i> KMP-11 Geni Ampklifikasyon, Klonlama, Sekans ve Filogenetik Analizleri	82
4.3.1. Amplifikasyon Sonuçları	82
4.3.2. Klonlama Sonuçları	83
4.3.3. Sekans ve Filogenetik Analiz Sonuçları	86
4.3.4. Protein Analiz Sonuçları.....	94
4.4. LACK ve KMP-11 Genlerinin Füzyonu	96
4.4.1. Restriksiyon Analizleri	96
4.4.2. Füzyon Genlerin Klonlama Sonuçları	98
4.5. Füzyon Protein Ekspresyon Analiz Sonuçları.....	100
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	107
6. KAYNAKLAR	118
ÖZGEÇMİŞ.....	129

KISALTMALAR

μ l	: Mikrolitre
μ m	: Mikrometre
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
ALM	: Otoklavlanmış <i>Leishmania</i> Major
BCG	: Bacillus Calmette-Guérin- Verem aşısı
CPs	: Sistein Proteinazlar
CVL	: Canin Visseral Leishmaniasis
DAT	: Direkt Aglütinasyon Testi
dk	: Dakika
DKL	: Diffüz Kutanöz Leishmaniasis
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	: Enzim Bağlı İmmunosorban Yöntem
FDA	: U.S. Food and Drug Administration
FML	: Fukoz Mannoiz Ligand
GP	: Glikoprotein
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
IFAT	: İndirekt Floresan Antikor Testi
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
IPTG	: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
KL	: Kutanöz Leishmaniasis
KMP	: Kinetoplastid Membran Proteini
KMP	: Kinetoplastid Membran Proteini
LACK	: <i>Leishmania</i> Homolog Aktive Edilmiş C Kinaz Reseptörü
LPG	: Lipofosfoglikan
LPS	: Lipopolisakkarit
M.Ö.	: Milattan önce
M199	: Besiyer 199
MHC	: Major Histokompatibilite Kompleksi

MKL	: Mukotanöz Leishmaniasis
ml	: Mililitre
MPL	: Monofosforil Lipid
NNN	: Novy, MacNeal ve Nicolle Besiyeri – 3N Besiyeri
PBMC	: Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
PBSS	: Prolin ile Tamponlanmış Tuz Solüsyonu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PKDL	: Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis
PSA	: Promastigot Yüzey Antijeni
RNA	: Ribo Nükleik Asit
rVV	: Rekombinant Vaccinia Virüsü
sa	: Saat
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SLA	: Çözünabilir <i>Leishmania</i> Antijeni
SSG	: Sodyum Stiboglukonat
TH	: Yardımcı T Hücresi
TLR	: Tool Benzeri Reseptörler
TSA	: Tiol-Özgü-Antioksidan
VL	: Visseral Leishmaniasis

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Visseral leishmaniasise karşı test edilen bazı rekombinant proteinler ve poliproteinler	24
Tablo 2.2. Leishmaniasis'e karşı DNA aşısı adayları olarak seçilen bazı genler.....	25
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar.	30
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan malzemeler.	31
Tablo 4.1. <i>L. infantum</i> LACK gen dizisinin (KT184317) GenBank'a kayıtlı dizilerle karşılaştırma sonuçları	73
Tablo 4.2. GenBank'a kayıtlı LACK sekanslarının ikili hizalama farklılıkları	74
Tablo 4.3. <i>L. infantum</i> LACK proteininde tespit edilen antijenik bölgeler.....	80
Tablo 4.4. <i>L. infantum</i> KMP-11 gen dizisinin (KU379565) GenBank'a kayıtlı dizilerle karşılaştırma sonuçları	87
Tablo 4.5. GenBank'a kayıtlı KMP-11 sekanslarının ikili hizalama farklılıkları	89
Tablo 4.6. <i>L. infantum</i> KMP-11 proteininde yer alan antijenik bölgeler	95

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1.	<i>Leishmania</i> türlerinin modern taksonomisi.....	6
Şekil 2.2.	<i>Leishmania</i> sp. promastigot formu.....	7
Şekil 2.3.	Kan ve doku kamçılılarının genel hayat dönemleri	8
Şekil 2.4.	<i>Leishmania</i> spp hayat döngüsü	12
Şekil 2.5.	Epidemiyolojik durum, KL	14
Şekil 2.6.	Epidemiyolojik durum, VL	14
Şekil 2.7.	Klinik araştırma aşamasındaki anti-leishmanial aşı adayları	26
Şekil 3.1.	pJET1.2/blunt (Thermo Scientific, ABD) vektör haritası.	39
Şekil 3.2.	pcDNA3.1/V5-his TOPO® (Invitrogen, ABD) vektör haritası	46
Şekil 3.3.	Champion pET100 Drectional TOPO (Thermo Scientific, ABD) vektör haritası.....	58
Şekil 4.1.	Modifiye <i>Leishmania</i> besiyerinde üreyen <i>L. infantum</i> promastigotları	66
Şekil 4.2.	Ficoll gradyanı uygulaması sonucu oluşan katmanlar.	67
Şekil 4.3.	PCR ürününün agaroz jel elektroforezde görünümü.....	68
Şekil 4.4.	<i>L. infantum</i> LACK PCR ürününün <i>E. coli</i> kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası üretilen koloniler	69
Şekil 4.5.	Kolonilerde rekombinant plazmid varlığının PCR tarama ile doğrulanması	70
Şekil 4.6.	Miniprep sonrası elde edilen rekombinant plazmidin PCR sonuçları.....	71
Şekil 4.7.	<i>L. infantum</i> LACK DNA dizisi ve kodladığı aminosistler.....	72
Şekil 4.8.	LACK nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları	77
Şekil 4.9.	<i>L. infantum</i> LACK gen dizisinin (KT184317) GenBank'a kayıtlı dizilerle karşılaştırma sonuçları	78
Şekil 4.10.	<i>L. infantum</i> LACK proteininin 3 boyutlu görünümü ve aminoasit dizisi	79
Şekil 4.11.	<i>L. infantum</i> LACK proteininde yer alan antijenik bölgeler	81
Şekil 4.12.	KMP-11 PCR ürününün agaroz jel elektroforezde görünümü.....	82
Şekil 4.13.	<i>L. infantum</i> KMP-11 PCR ürününün <i>E. coli</i> kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası üretilen koloniler	83

Şekil 4.14. Kolonilerde rekombinant plazmid varlığının PCR tarama ile doğrulanması	84
Şekil 4.15. Miniprep sonrası elde edilen rekombinant plazmidin PCR sonuçları.....	85
Şekil 4.16. <i>L. infantum</i> KMP-11 DNA dizisi ve kodladığı aminosistler.....	86
Şekil 4.17. KMP- 11 nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları	91
Şekil 4.18. <i>L. infantum</i> KMP-11 gen dizisinin (KU379565) GenBank'a kayıtlı dizilerle karşılaştırma sonuçları	93
Şekil 4.19. <i>L. infantum</i> KMP-11 proteininin 3 boyutlu görünümü ve aminoasit dizisi	94
Şekil 4.20. <i>L. infantum</i> KMP-11 proteininde yer alan antijenik bölgeler.	95
Şekil 4.21. <i>HINDIII</i> ve <i>BamHI</i> yapışkan bölgesi taşıyan LACK genini içeren restriksiyon ürünü.....	96
Şekil 4.22. <i>HINDIII</i> ve <i>BamHI</i> yapışkan bölgesi taşıyan lineer pcDNA3.1+KMP-11 plazmidini içeren restriksiyon ürünü.....	97
Şekil 4.23. Multi-antijenik rekombinant pcDNA3.1+LACK+KMP-11 plazmidinin <i>E. coli</i> kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası üretilen koloniler.	98
Şekil 4.24. Kolonilerde rekombinant plazmid varlığının PCR tarama ile doğrulanması	99
Şekil 4.25. LACK+KMP-11 PCR ürününün agaroz jel elektroforezde görünümü.....	100
Şekil 4.26. <i>L. infantum</i> KMP-11 PCR ürününün One Shot Top10 <i>E. coli</i> kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası üretilen koloniler	101
Şekil 4.27. Kolonilerde rekombinant plazmid varlığının PCR tarama ile doğrulanması	102
Şekil 4.28. <i>L. infantum</i> KMP-11 PCR ürününün One Shot BL21 Star (DE3) <i>E. coli</i> kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası üretilen koloniler. ...	103
Şekil 4.29. Kolonilerde rekombinant plazmid varlığının PCR tarama ile doğrulanması	104
Şekil 4.30. 0.5 mM IPTG konsantrasyonu ile indükleme sonucu elde edilen bantlar.....	105
Şekil 4.31. 1 mM IPTG konsantrasyonu ile indükleme sonucu elde edilen bantlar ...	106

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Leishmania cinsi protozoonların neden olduğu leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün dünyada yoksulluğa bağlı bulaşıcı hastalıklar ve ihmal edilmiş tropikal hastalıklar listelerinde üst sıralarda yer alan zoonotik karakterli ve vektör-kaynaklı bir hastalıktır (1). DSÖ verilerine göre leishmaniasis'in dünya genelinde 98 ülkede, yaklaşık 350 milyon insanı tehdit ettiği ve yaklaşık 12 milyon insanın enfekte olduğu tahmin edilmektedir (2). Leishmaniasis'in morbiditesinin 900 bin-1,3 milyon aralığında, mortalitesinin ise 20-50 bin aralığında olduğu tahmin edilmektedir (3). Bu rakamlara göre leishmaniasis tropikal hastalıklar içerisinde morbiditede dördüncü, mortalitede ise ikinci sırada yer almaktadır (4). İnsanlarda paraziter hastalıklar morbidite ve mortalite açısından değerlendirildiğinde leishmaniasis, morbidite bakımından sıtma ve şistosomiyasisten sonra üçüncü sırada yer alırken mortalite bakımından ise sıtmadan sonra ikinci sırada gelmektedir (5).

Günümüze kadar *Leishmania* cinsinde belirlenen 53 türden 31'inin memelilerde, bunlardan da 20'den fazlasının insanlarda leishmaniasise neden olduğu bilinmektedir (6-8). Bu türlerin morfolojik olarak ayrımı yapılamamaktadır. Geliştirilen moleküler metotlar, izoenzim analizleri veya monoklonal antikorlar vb. modern yöntemler sayesinde tür ayrımı mümkün olabilmektedir (9).

Leishmaniasis vektör kaynaklı bir paraziter hastalıktır. Eski Dünya *Leishmania* türlerinin vektörlüğünü *Phlebotomus* cinsi dişi kum sinekleri, Yeni Dünya *Leishmania* türlerinin vektörlüğünü ise *Lutzomyia* cinsi dişi kum sinekleri yapmaktadır. Parazit için birçok memeli ve insan rezervuar olarak görev almaktadır.

Leishmaniasis'in visseral leishmaniasis (VL), kutanöz leishmaniasis (KL) ve mukokutanöz leishmaniasis (MKL) olmak üzere 3 ana tipi vardır. Bunlara sonradan

diffüz kutanöz leishmaniasis (DKL) ve post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) eklenmiştir. Hastalığın tipi *Leishmania* türüne ve o türün izoenzim yapısına bağlıdır (9, 10).

Yaygın *Leishmania* türlerinden biri olan *L. infantum* Akdeniz havzasında, Ortadoğu ve Asya ülkelerine kadar uzanan bölgede VL'e neden olmaktadır (11).

Leishmaniasisin kontrolü amacıyla yapılan aşı çalışmaları halen devam etmektedir. Bununla birlikte, leishmaniasise karşı etkin bir aşı henüz geliştirilememiştir. *L. infantum* aktive edilmiş protein kinaz C reseptörü (LACK) geni ve kinetoplastid membran proteini-11 (KMP-11) geni üçüncü nesil aşılarda kabul edilen DNA aşı adayları arasında yer almaktadır. Leishmaniasise karşı LACK ve KMP-11 gen bölgelerini ayrı ayrı baz alan DNA aşısı çalışmaları bulunmaktadır (12, 13).

Bu çalışmada, *in vitro* *L. infantum* kültüründen genomik DNA izolasyonu sonrası LACK ve KMP-11 genlerinin amplifikasyonu, pürifiye amplikonların memelilerde protein ekspresyonuna uygun ve DNA aşısı olarak kullanılabilen bir plazmide klonlanması, *Escherichia coli* kompetan hücrelerinde LACK ve KMP-11 sub-proteinlerini içeren füzyon proteininin ekspresyonu, LACK ve KMP-11 genlerinin ve füzyon proteininin Dünyada GenBank veri tabanında mevcut sekanslarla karşılaştırılması ve antijenik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda *L. infantum* LACK ve KMP-11 genlerini içeren multi-antijenik plazmid ve *L. infantum* LACK+KMP-11 füzyon proteini elde edilmiştir. Çalışmada elde edilen ürünler sonraki çalışmalarda gerek DNA, gerek protein ve gerekse DNA-protein aşı adayları olarak kullanılabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Leishmaniasis ve *Leishmania Infantum*

2.1.1. Tarihçe

Leishmaniasis'e ait tespit edilebilen ilk kayıtlar genellikle Eski Dünya formlarına aittir. Leishmaniasis'in tarihsel gelişimi ile ilgili araştırmalarda M.Ö. 7. yüzyılda Kral Ashurbanipal'ın kütüphanesinde yer alan tabletler, ilk yazılı kayıtlar olarak dikkat çekmektedir. Bu tabletlerde kutanöz leishmaniasis (KL) lezyonlarına ait açıklamalar göze çarpmaktadır. M.S. 10. yüzyılda aralarında İbn-i Sina'nın da bulunduğu bazı hekimlere ait kayıtlarda da KL ile ilgili bilgiler yer almaktadır. Bu kayıtlarda "Belh yarası" olarak isimlendirilen KL'in özellikle Kuzey Afganistan'da yaygın olarak görüldüğü belirtilmektedir. Orta Doğu'nun çeşitli bölgelerinden elde edilen benzer kayıtlarda da KL olgularından bahsedilmektedir. Bu dönemlerde KL'in isimlendirilmesinde yerel adlar kullanılmıştır (14).

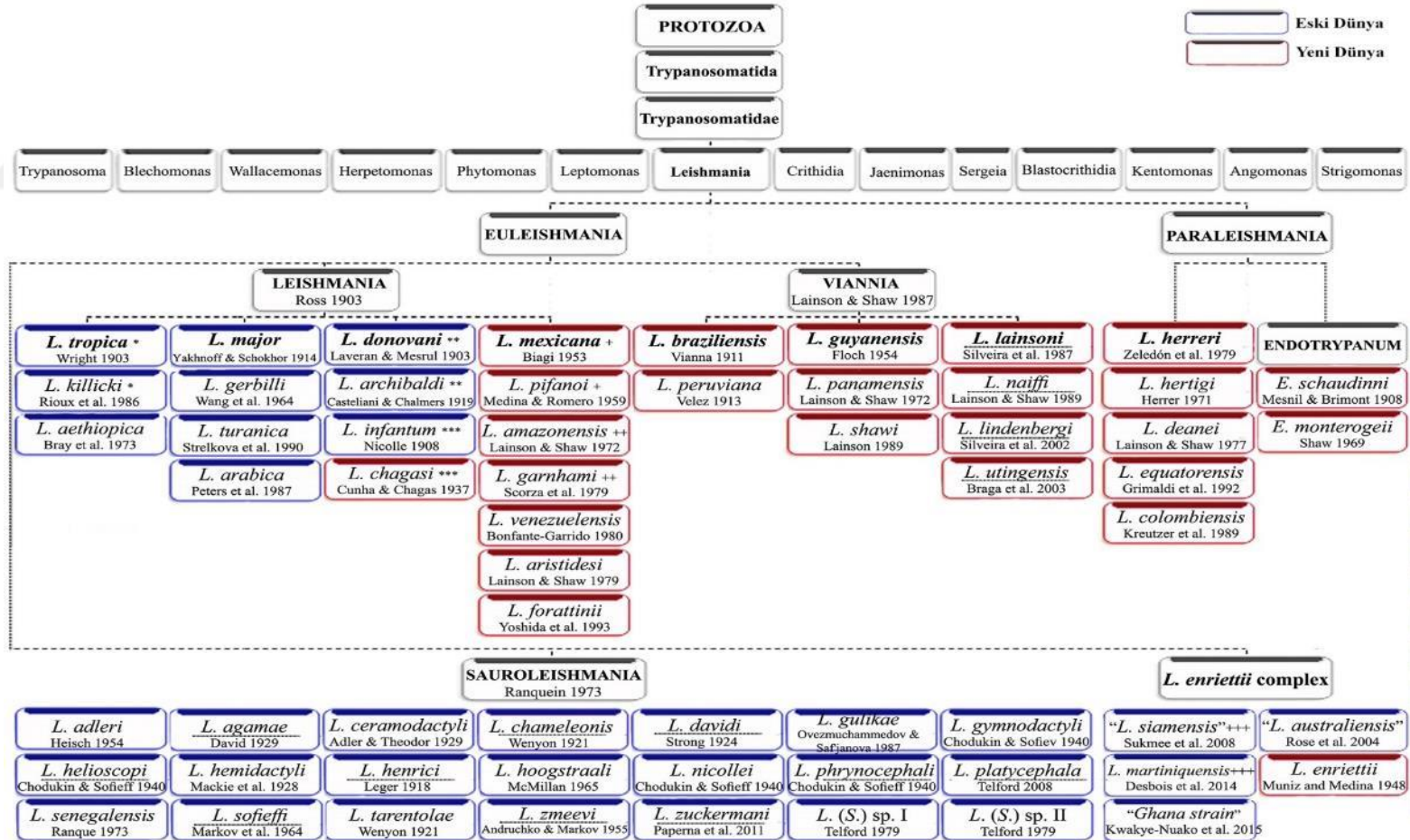
Visseral leishmaniasis (VL) veya kala-azar, tarihi gelişim içerisinde klinik benzerliği olan diğer hastalıklarla özellikle de sıtma ile karıştırılmıştır. VL tedavisinde, ilk olarak sıtma tedavisinde yaygın olarak kullanılan kinin kullanılmıştır. Kinin uygulamasının başarısız olması sonrasında, 1824'de Hindistan'da Jessore tarafından sıtmadan farklı bir ateşli hastalık olduğu fark edilmiştir. Hastalık 1862'de, Hindistan'ın Batı Bengal bölgesinde yer alan Burdwan'da salgın boyutlarına ulaşmıştır. Bu dönemde birçok klinisyen kala-azarın, sıtmanın öldürücü bir formu olduğunu düşünmüştür (15) .

Leishmaniasis'e neden olan parazit, ilk olarak 1901 yılında İskoçyalı patolog Sir William Boog Leishman tarafından bir *Trypanosoma* formu olarak tanımlanmıştır. Aynı yılda Sir Charles Donovan, leishmaniasis'e neden olan parazit türlerinin *Trypanosoma*'dan farklı olduğunu tespit etmiştir (16). Parazit, literatüre ilk olarak

Piroplasma donovani olarak kaydedilmiş ve takiben *Leishmania* cinsinin tanımlanmasıyla *L. donovani* adını almıştır. Önceleri bir sporozoan olduğu düşünülen parazitin, ilk olarak 1904 yılında Leonard Rogers tarafından bir kan kamçılısı (hemoflagellat) olduğu ortaya konmuştur. Akdeniz çevresinde çocuklarda yaygın görülen türün farklı olduğu düşünülerek *L. infantum* adı verilmiştir. Hastalığın vektörlüğünü *Phlebotomus* cinsi dişi kum sineklerinin (tatarcık) yaptığı ilk olarak 1941 yılında ortaya konmuştur (17).

2.1.2. Sınıflandırma

Başlangıçta *Leishmania* cinsinin sınıflandırılması, coğrafi dağılım, tropizm, antijenik özellikler ve klinik bulgular gibi eko-biyolojik kriterlere göre yapılmıştır. Biyokimyasal yöntemlerin ve moleküler analizlerin gelişmesi ile birlikte patolojik ve coğrafik kriterlerin genellikle yetersiz olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle, güncel sınıflandırmada kriter olarak kinetoplast DNA'sı (kDNA), protein, antijenler ve izoenzim analizleri kullanılmaya başlanmıştır (8, 9). *Leishmania* türlerinin modern sınıflandırması Tablo 2.1.'de verilmiştir (8).



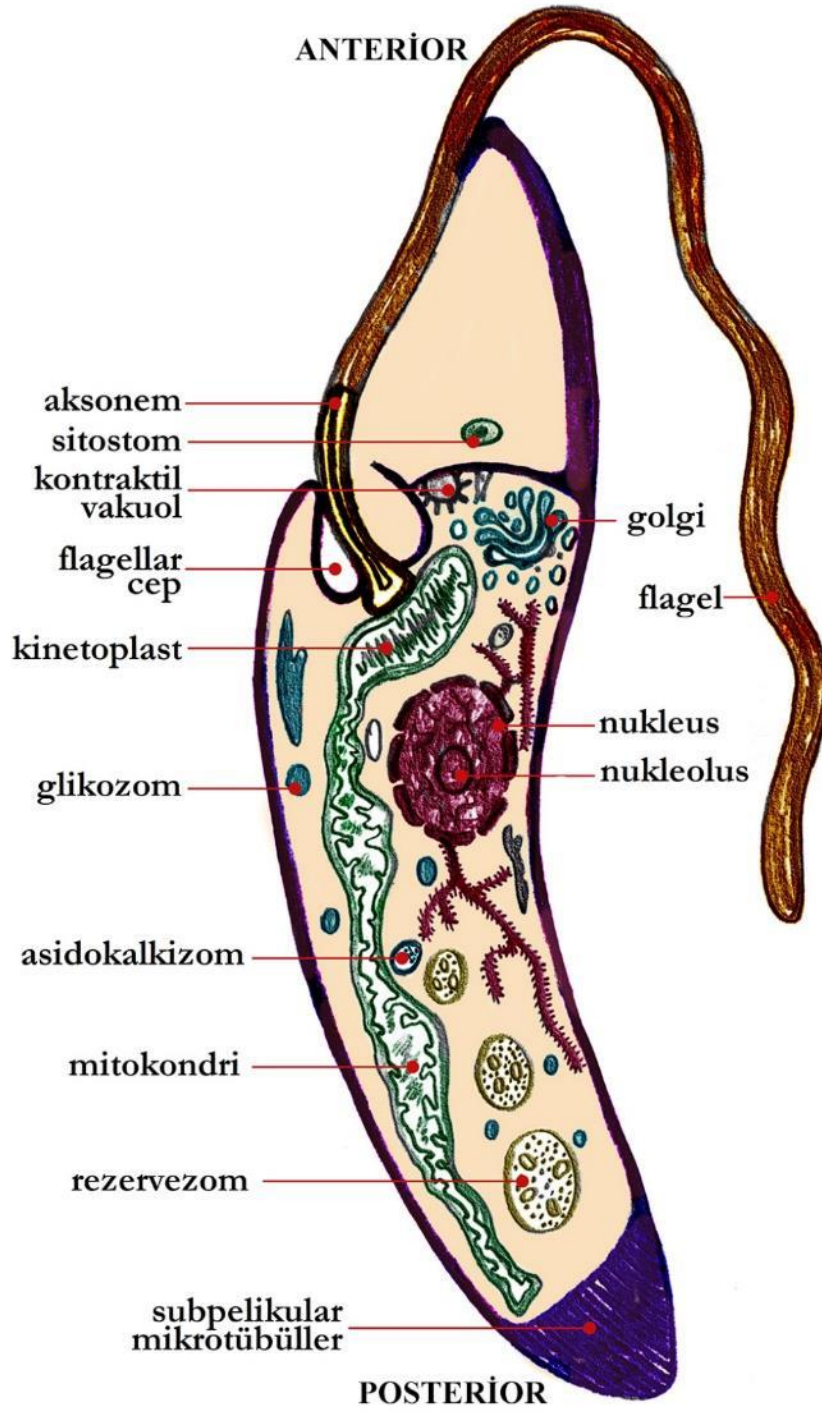
Şekil 2.1. *Leishmania* türlerinin modern taksonomisi (8).

Leishmania infantum'un güncel taksonomik sınıflandırması aşağıdaki gibidir.

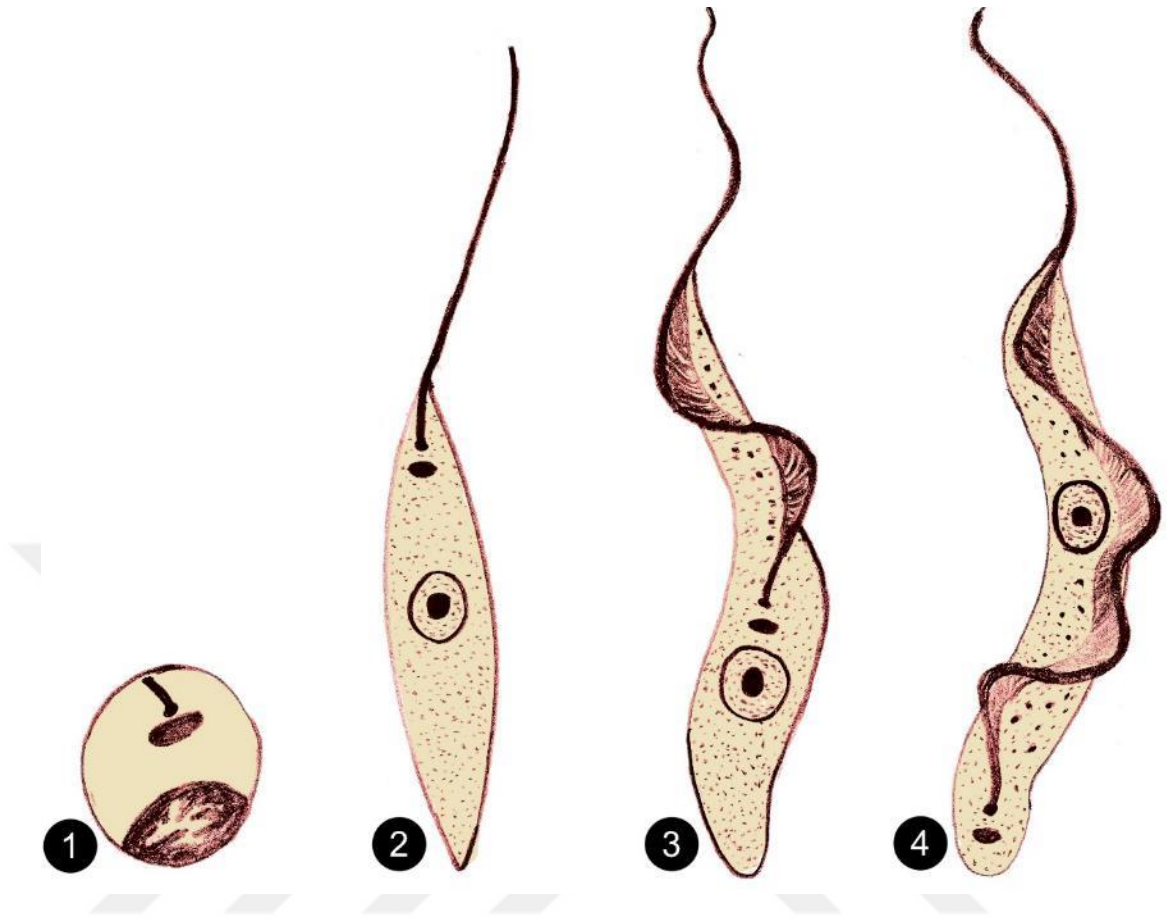
Domain	: Eukarya
Süpergrup	: Excavata
Şube	: Euglenozoa
Sınıf	: Kinetoplastida
Takım	: Trypanosomatida
Aile	: Trypanosomatidae
Altgrup	: Euleishmania
Cins	: <i>Leishmania</i>
Tür	: <i>Leishmania infantum</i> (Nicolle, 1908)

2.1.3. Morfoloji

Leishmania türlerinin yaşam devrelerinde iki ana morfolojik form görülmektedir. Bunlar vektörde görülen "promastigot" (Şekil 2.2.) ve memeli konakta görülen "amastigot" (Şekil 2.3.) formlarıdır.



Şekil 2.2. *Leishmania* sp. promastigot formu (18).



Şekil 2.3. Kan ve doku kamçıllarının genel hayat dönemleri (18).
1: Amastigot, 2: Promastigot, 3: Epimastigot, 4: Trypomastigot

Her iki evrede de çekirdek yuvarlak veya oval görünümlüdür. Kinetoplast ise yuvarlak, oval veya çubuk şeklinde görülebilmektedir.

Promastigot form; 10-20 μm uzunlukta 1,5-2,5 μm genişlikte, mekik şeklinde, aktif hareket etme yeteneğine sahip, hücre dışı formdur. Promastigotlar, amastigotların parazitin vektörü olan *Phlebotomus* veya *Lutzomyia* cinsi dişi kum sineklerinin bağırsaklarında veya uygun besiyerlerinde morfolojik olarak farklılaşması ile oluşurlar. Promastigotlar hücre dışına uzanan bir kamçıya sahiptirler. Hücrenin anterior bölgesinde yer alan bu kamçının uzunluğu yaklaşık 15-28 μm 'dir. Promastigotlarda görülen organeller amastigotlarla aynı olmakla beraber iki form arasında organel sayılarında değişiklikler olabilmektedir.

Amastigot form; oval şekilli, aktif hareket edemeyen, hücre içi formdur. Amastigotlar yaklaşık 2-4 μm büyüklüğündedirler. Amastigot form eski kaynaklarda "Leishman-

Donovan cismi” olarak tanımlanmaktadır. Amastigotlar memeli konakta ve insanda, lökositler, monositler veya endotel hücreleri içerisinde, ayrı ayrı veya gruplar halinde görülebirlirler. Bazı durumlarda amastigotlar hücre dışında da görülebilmektedir. Posteriora yakın büyük bir çekirdek ve çekirdeğin yanında da kinetoplast taşırlar. Sitoplazmalarında hem düz hem de granüllü endoplazmik reticulum (ER), golgi, vakuol, lizozom, blefaroblast (kamçı kökü), aksonem (kamçının sitoplazmada kalan kısmı) ve bir adet mitokondri bulunur. Ayrıca sitoplazmalarında Kinetoplastida sınıfına özgü olan ve glikolitik enzimler taşıyan glikozom organeli de yer almaktadır. Amastigotlarda kamçı hücre dışına çıkmamakta, bu nedenle de aktif hareket görülmemektedir.

Her iki form da kinetoplasttan başlayarak ikiye bölünme şeklinde çoğalmaktadır. Kinetoplast bölünmesini çekirdek ve sitoplazma bölünmeleri izler. Son olarak hücre zarının da ayrılmasıyla parazit formları bölünmesini ve çoğalmasını tamamlamış olur.

2.1.4. Hayat Döngüsü

Leishmania türlerinin hayat döngüsü *Phlebotomus* veya *Lutzomyia* cinsi vektörlerle, omurgalı konak arasında gerçekleşmektedir. Vektörler, enfekte omurgalı konaktan kan emerken kan ile birlikte makrofajların içinde bulunan amastigotları da alırlar. Emilen kan tatarcığın orta midesinde bir membran ile sarılmakta ve sineğin sindirim enzimleri bu membran içine salgılanmaktadır. Vektör tarafından alınan amastigotların bir kısmı burada sindirilirken diğer bir kısmı şekil değiştirmeden ikiye bölünerek çoğalır. Daha sonra amastigotların vücudu uzar ve kamçı gelişerek enfektif olmayan promastigot formu oluşur. Promastigotlar da ikiye bölünerek çoğalmaya başlarlar. Bu dönemdeki promastigotlara "prosiklik promastigot" adı verilmektedir. Prosiklik promastigotlar vektörün sindirim kanalında farklı bölgelere yerleşirler. Sindirim kanalında yerleşilen bölge, *Leishmania* türüne göre değişebilmektedir.

Parazit, vektörün sindirim kanalındaki gelişim süresince birkaç farklı morfolojik şekilde görülebilmektedir. Çoğalmalarını sürdüren parazitler salgıladıkları enzimlerle membranı eriterek torasik mideye geçerler. İlk duruma göre daha uzun ve ince olan bu promastigotlara "nektomonad" adı verilmektedir. Torasik midenin ön ucundaki kapağa geldiklerinde kamçı yardımı ile bağırsak epitelindeki mikrovilluslara tutunurlar. Burada gelişen promastigot formuna "haptomonad" adı verilmektedir. Haptomonad formundaki

promastigotlar vektörün midesinin ön kısımlarına göç ederek yine kamçıları aracılığıyla özofagus ve farinksdeki kıvrımlara tutunurlar ve sindirim kanalının tıkanmasına neden olabilirler. Promastigotlar bazen bağlandıkları yerlerden göç ederek daha uzun ve küçük formlar halinde vektörün ağız parçalarına girerler. Vektörün ağız parçalarında parazit bölünme geçirmemektedir. Enfektif olan bu promastigot formlarına ise "metasiklik promastigotlar" adı verilmektedir. Metasiklik promastigotlar, omurgalı konaktan enfekte kanın alınmasından 3-7 gün sonra vektörün ağız parçalarında görülebilmektedir.

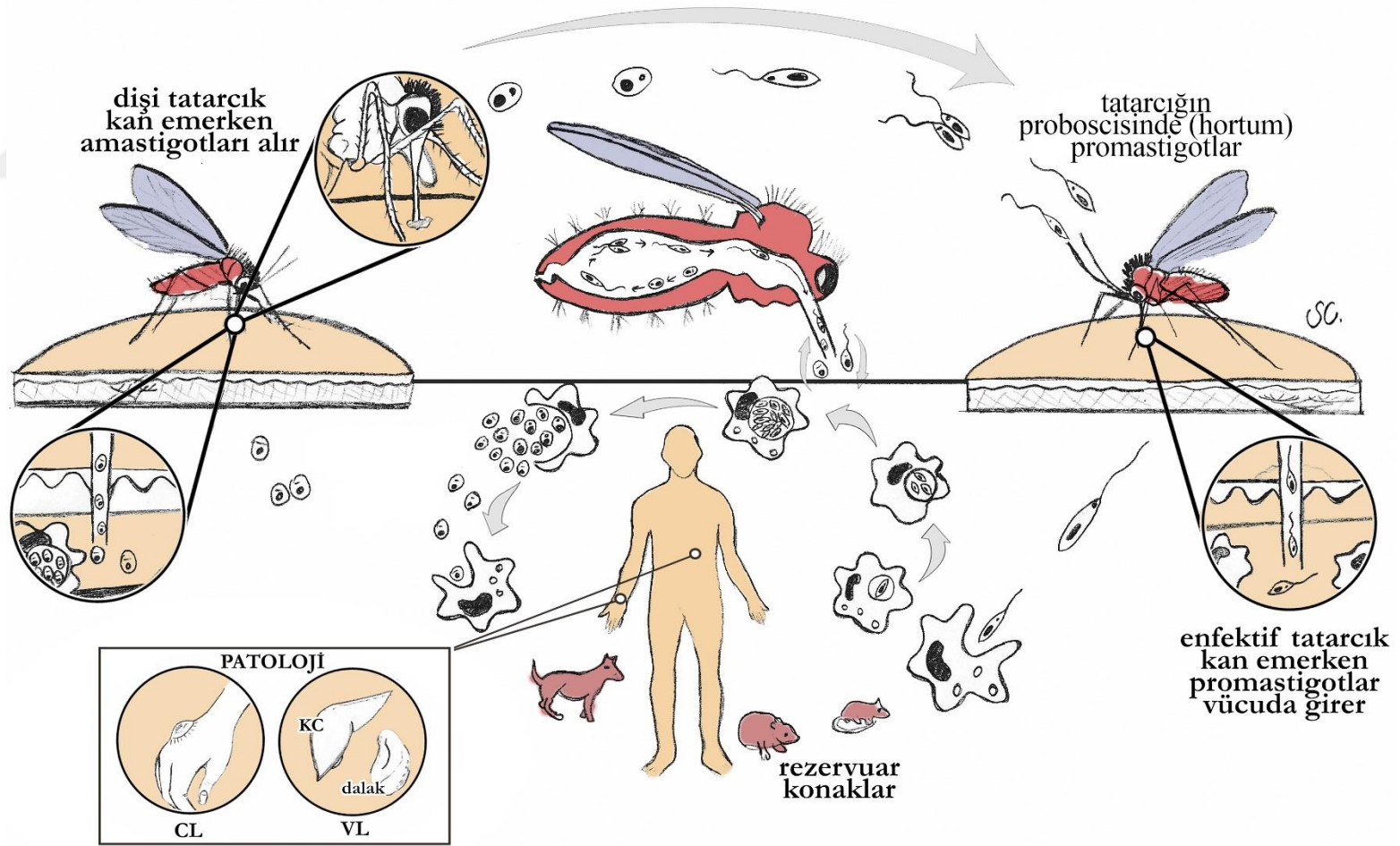
Promastigotların vektördeki ikiye bölünme süreci sırası ile büyüme, ikinci bazal cismin ortaya çıkması, ikinci bazal cisimden ikinci kamçı oluşması, kinetoplastın büyümesi, çekirdek büyümesi ve bölünmesi, kinetoplast bölünmesi olayları ile devam eder. Çekirdek ve kinetoplast bölünmesi tamamlandıktan sonra sitoplazma bölünmesi başlar. Promastigot iki kamçı arasından arkaya doğru ilerleyen bölünme eksenini ile iki promastigota ayrılır. Oluşan her yeni hücrede bir çekirdek ve bir kinetoplast yer alır. Bu iki yeni promastigot ana promastigotun yaklaşık yarısı büyüklüğündedir ve morfolojik olarak benzerdir. Tek morfolojik farklılık birinin kamçısının diğerinden daha kısa olmasıdır.

Enfektif promastigotlar (metasiklik promastigotlar), vektörün omurgalı konaktan kan emmesi sırasında sineğin proboscisinden (hortum) omurgalı konağın kanına geçerler. Omurgalı konağın çeşitli savunma mekanizmaları ile karşılaşılır. Deriden vücuda giren promastigotlar ilk saatlerde serumdaki kompleman sistem tarafından tespit edilmekte ve uygun hücreler tarafından fagosit edilmektedir. Fagosit edilen promastigotlar kamçısını kaybederek tekrar amastigot şekline dönüşmektedir. Fagositoz yapan hücreler, omurgalının makrofaj, monosit veya langerhans hücreleri olup derideki mononükleer fagositik hücrelerdir. Amastigotlar, fagositik vakuol (fagolizozom) içinde kalmakta ve orada ikiye bölünerek çoğalmaya devam etmektedir. Enfekte hücre, parazitin sayıca çoğalması sonucu parçalanmakta ve amastigotlar serbest kalmaktadır. Bu amastigotlar diğer makrofajları enfekte edebilmektedir.

Enfeksiyonun bundan sonraki seyrini *Leishmania* türü belirlemektedir. Enfeksiyon deride sınırlı kalabildiği gibi (*L. tropica*), iç organlara da göç edebilmektedir (*L. infantum*).

Enfekte makrofajlar kan dolaşımı yoluyla dalak, karaciğer ve kemik iliğı olmak üzere diğerk dokulara doğru hareket etmekte ve bu organlarda çeşitli patolojilere sebep olmaktadır. Ancak bu hareket konağın immün sisteminin durumuna göre değışiklikler gösterebilmektedir. Bazı durumlarda parazitler türüne uygun olmayan yerlere de göç edebilmektedir. *Leishmania* türlerinin hayat dönüsü genel olarak aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (şekil 2.4).





Şekil 2.4. *Leishmania* spp hayat döngüsü (18).

2.1.5. Epidemiyoloji

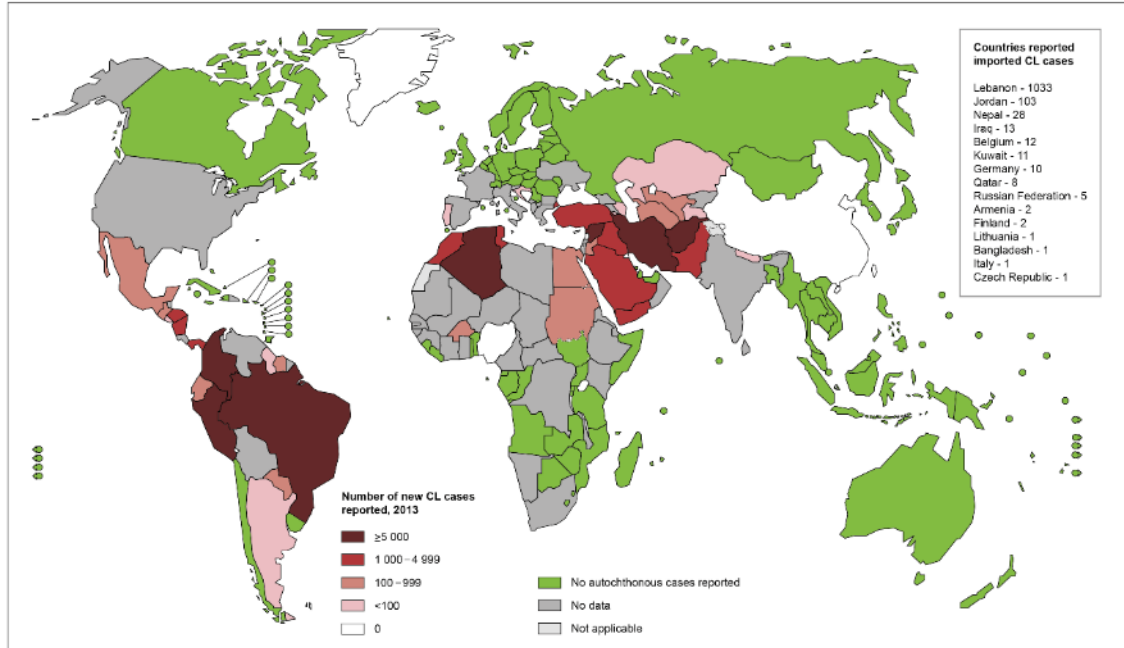
Konak, rezervuar ve vektörün çevre ve iklim şartları ile olan ilişkisi leishmaniasis epidemiyolojisinde çok önemlidir. Hastalık rakım, yağış, atmosferik sıcaklık ve nem gibi değişikliklerinden şiddetle etkilenen bir karakteristiğe sahiptir (19).

Leishmaniasis kırsal alanlarda daha fazla görülmekte olup dünya genelinde Güney Avrupa, Kuzey Afrika, Orta Doğu, Orta ve Güney Amerika ve Hindistan bölgelerinde 60'dan fazla ülke için endemiktir (20).

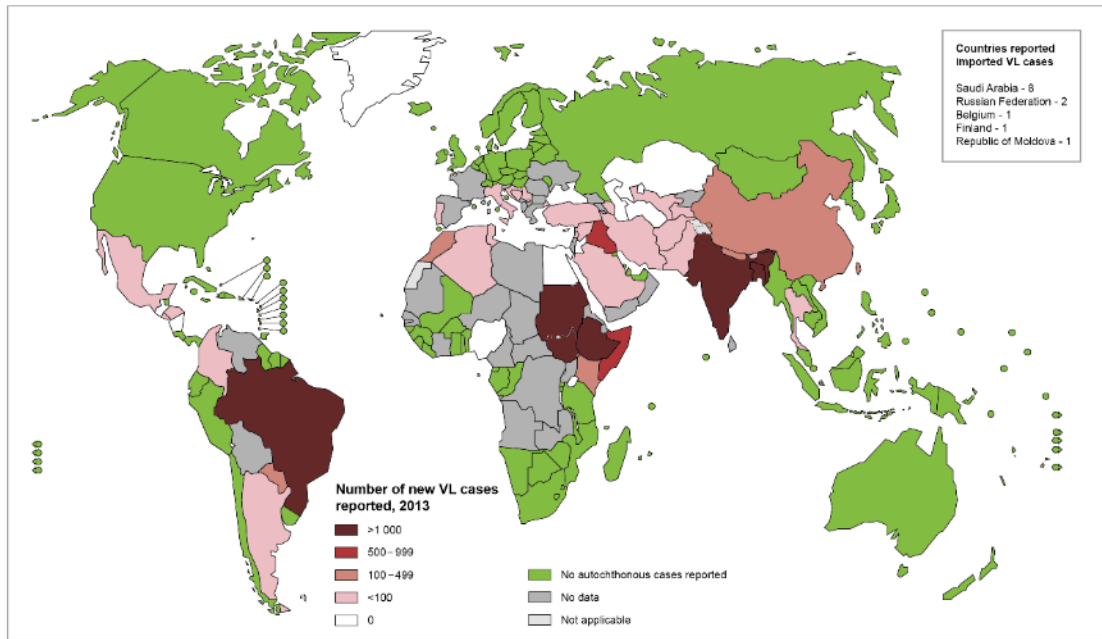
KL, 2008 yılı Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 82 ülkede görülmekte ve her yıl 1,5 milyon yeni olgu kaydedilmektedir. Dünya'daki olguların %90'ından fazlası Afganistan, Sudan, İran, Irak, Suriye, Suudi Arabistan, Cezayir, Peru, Kolombiya, Bolivya ve Brezilya'da görülmektedir. Türkiye'ye sınır Suriye'de 2003 ve 2004 yıllarında toplam 25.000 olgu/yıl ve sadece Halep şehrinde ise 10 binin üzerinde yeni olgu bildirimi yapılmıştır (21).

VL olgularının %90'ından fazlası Hindistan ve Sudan'dan rapor edilmiştir. Ayrıca tüm VL vakalarının neredeyse %90'ı Bihar Hint Devleti'nde görülmüştür. Sadece Bihar Hint Devleti'nden 1977'den bu yana resmi olarak yaklaşık 200.000 *L. donovani* enfeksiyonu bildirilmiştir. Açıklanan bu sayının hastalığın gerçek insidansının altında olduğu ileri sürülmüştür (22).

DSÖ'nün 2013 verilerine göre KL ve VL olgularının dünya genelinde dağılımı Şekil 2.5 ve Şekil 2.6'da gösterilmiştir (23).



Şekil 2.5. Epidemiyolojik durum, KL, 2013 (23).



Şekil 2.6. Epidemiyolojik durum, VL, 2013 (23).

Türkiye’de hemen hemen bütün bölgelerde olgular bildirilmiş olmakla birlikte VL daha çok Ege ve Akdeniz bölgelerinde görülmektedir. KL ise en yoğun olarak Güneydoğu Anadolu bölgesinde Şanlıurfa ilinde görülmektedir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1990-2010 yılları arasında Türkiye’de toplam 46.003 yeni olgu saptanmış, bu olguların %96’sı Şanlıurfa, Adana, Osmaniye, Hatay, Diyarbakır, Mersin ve Kahramanmaraş illerinden bildirilmiştir. Son 20 yıldaki toplam olguların ortalama %45’i Şanlıurfa’dan bildirilmekle birlikte bu oranın giderek azaldığı fakat diğer bölgelerin oranlarının arttığı görülmektedir. Endemik bölgelerden diğer yerleşim yerlerine yapılan seyahatler sonucunda, endemik olmayan bölgelerde de vakalar görülmeye başlanmıştır (21, 24). Ayrıca Suriye iç savaşı nedeniyle Türkiye’ye gerçekleşen göç yıllık olgu sayısının artmasına neden olmaktadır. Bu durum özellikle KL’in Türkiye’deki epidemiyolojisini etkilemektedir (25). HIV ve diğer immün yetmezliklerin giderek artması, seyahatler, savaşlar ve laboratuvar tanısındaki problemler de hastalığın yayılmasında önemli rol oynamaktadır (26).

2.1.6. Klinik Çeşitlilik ve İmmünoloji

Leishmaniasis klinik belirtileri, hem parazitin türüne hem de konağın immün yanıtına bağlı olarak değişmektedir (27). Epidemiyolojik verilere göre *Leishmania* türlerinin çoğu geniş bir konak çeşitliliğine sahip olup enfeksiyonların çoğu da asemptomatik olarak subklinik seyretmektedir. Öte yandan insana daha az adaptif olan *Leishmania* türleri, asemptomatik taşıyıcılardan KL’e ve daha malign olan VL’e kadar çeşitli enfeksiyonlar oluşturabilmektedir. İnsan enfektif bir kum sineği tarafından ısırıldığında gerçekleşen parazit inokülasyonu, leishmaniasisin gelişmesine sebep olabildiği gibi sağlık üzerinde herhangi bir etki de oluşturmayabilir. Asemptomatik taşıyıcı oranı tam olarak bilinmemekle birlikte yapılan çalışmalar bu oranın beklenenden daha yüksek olabileceğini düşündürmektedir. Örneğin, Balear Adaları’nda donörlerin %22’sinin kanından polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile *L. infantum*’un DNA’sı amplifiye edilmiştir. Ayrıca Brezilya, Güney Fransa ve Hindistan’dan da asemptomatik taşıyıcılar bildirilmiştir. Bu veriler, asemptomatik insan konakların, parazitin hayat döngüsünde ve neslinin devamında önemli bir rol oynadığını göstermektedir (28).

Leishmaniasis önemli derecede morbidite ve mortaliteye sahiptir. İnsanlarda hastalığın en az dört önemli formu görülmektedir. Bunlar: KL, DKL, MKL ve VL'dir. KL, Eski Dünya'da çoğunlukla tedavi gerektirmeksizin iyileşebilmektedir. KL lezyonları ömür boyu kalacak estetik lekeler oluşturabilmektedir. DKL ise hücre-aracılı bağışık yanıtı yetersiz olan kişilerde ortaya çıkmaktadır. DKL, lepramatöz lepraya benzeyen yaygın lezyonlar göstermesi, kendiliğinden iyileşme görülmemesi ve tedavi edildikten sonra relapsların görülebilmesinden dolayı daha tehlikeli bir form olarak karşımıza çıkmaktadır. DKL, hasta üzerindeki yıkıcı etkilerinin fazla olmasından dolayı daha özel olup aynı zamanda bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir. MKL, oro-nazal ve faringeal boşluklarda geniş tahribata ve ürkütücü boyutta şekil bozan lezyonlara yol açabilmektedir. Ayrıca yüzde yaralanmalara ve dolayısıyla da hasta için ömür boyu sürecek büyük sıkıntılara neden olmaktadır. Leishmaniasis'in en tehlikeli formu olan ve kala-azar olarak da bilinen VL, dalgalı ateş, kilo kaybı, splenomegali, hepatomegali, lenfadenopati ve anemi ile karakterize olmaktadır. VL tedavi edilmediğinde hemen hemen tüm vakalar ölümle sonlanmaktadır. Aynı zamanda yüksek ölüm oranına sahip büyük ölçekli salgınlara da neden olmaktadır. Hastalarda VL'nin tedavisinden sonra post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) adlı kronik deri formu gelişebilmektedir. Post-kala-azar dermal leishmaniasis uzun süreli ve maliyeti yüksek bir tedavi süreci gerektirmektedir. Hindistan'da VL tedavisi gören hastaların %5-15'inde tedaviden 1-2 yıl sonra PKDL görüldüğü bildirilmiştir (29). Leishmaniasis'te görülen farklı klinik formlar, konağın adaptif immün cevabı ile özellikle de hücresel ve humoral bağışıklık arasındaki denge ile yakından ilgilidir (30).

Çoğu bireyin asemptomatik kalması insanda leishmaniasis'e karşı doğal immün cevabın paraziti elimine ettiğini veya kontrol altına alabildiğini göstermektedir. *Leishmania* parazitleri, konak makrofajları içinde amastigot olarak bulunurlar ve böylece konak immün cevabından gizlenerek çoğalmaya devam ederler. *Leishmania* parazitleri ile ilk temas eden konak hücreleri makrofajlardır. Bu nedenle makrofajlar, konağın immün cevabında anahtar hücreler olarak kabul edilirler. Hem makrofajlar hem de dendritik hücreler MHC (Major Histocompatibility Complex) molekülleri ile T hücrelerine parazitin antijenlerini sunarlar. Bu kazanılmış bağışıklık tepkisidir. Bu adım sitokin ve sunulan *Leishmania* polipeptitlerine bağlı olarak verilecek immün cevabı belirleyeceği için temel basamak kabul edilmektedir. Buna bağlı olarak *Leishmania* parazitleri,

kısmen antijen sunum sürecinden ve kısmen de T hücre aracılı bağışıklıktan kaçabilmek amacıyla çeşitli stratejiler kazanmıştır (31).

KL'de parazitin türüne göre değişen farklı Th-1 cevabı gözlenmiştir. DKL'de ise Th-1 cevabı yoktur. Bunun yerine Th-2 cevabı gözlenmektedir. Th-1 cevabı görülmemesi tedavi edilmeden iyileşmemesinin sebebidir. MKL'de ise yüksek interferon- γ (IFN- γ) düzeyleri ile birlikte karışık Th-1/Th-2 cevabı görülmektedir. VL'de ise yine karışık Th-1/Th-2 cevabı ile birlikte IFN- γ ve interlökin-10 (IL-10) üretimi görülmektedir. Bununla birlikte asemptomatik bireylerde veya subklinik VL taşıyan bireylerde de periferik kan mononükleer hücrelerinin (PBMC) proliferasyonu ile birlikte IL-2, IFN- γ ve IL-12 üretimi görülmektedir. Ayrıca tedavi edilen hastalarda IFN- γ ve IL-4 üreten Th-1 ve Th-2 klonları izole edilmiştir (32).

2.1.7. Tanı

Konak, leishmaniasis'i kuluçka döneminde asemptomatik olarak taşıyor olabilir veya tedavisiz iyileşebilir. Klinik bulgular çoğunlukla spesifik olmayabilir ve diğer hastalıklar da kliniği maskeliyor olabilir. Dolayısıyla klinik belirtiler, leishmaniasis'te kesin tanı için yeterli değildir.

Leishmaniasis'in tanısı, genellikle doku aspiratlarında veya biyopsi örneklerinde amastigotların tespit edilmesine dayanmaktadır. Etkensel tanı olarak kemik iliği, lenf nodu ve dalak aspirasyonları, idrar örneği ve boyama teknikleri kullanılmaktadır. Ayrıca prolin ile tamponlanmış tuz solüsyonu (PBSS) ve Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) besiyerinde *Leishmania* kültürü yapılması da tanıda kullanılmaktadır. Test hızlı, ucuz ve yüksek bir spesifiteye sahiptir. Ancak duyarlılığı azdır. Kültür duyarlılığı, kullanılan yöntemin tipine (yarı kanlı iki fazlı yöntem en verimlisidir), kullanılan kültürlerin flakon sayısına (aspire edilip çeşitli şişelere konulan birkaç damla bize en iyi sonuçları verir) ve alınan numunelerin sayısına (çeşitli enfekte nodüllerin çoklu aspiratları duyarlılığı artırır) bağlıdır.

Serolojik tanı olarak Leishmanin (Montenegro) Deri Testi (LDT), Direkt Aglütinasyon Testi (DAT), IFAT, ELISA, Western-Blot, Formol-Jel testleri de kullanılmaktadır. KL

tanısında serolojik testler çok tercih edilmemekle birlikte Leishmanin Deri Testi (LDT) ön plana çıkmaktadır.

Moleküler tanı olarak PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile periferal kanda ve doku aspiratlarında *Leishmania* DNA tespiti yapılabilmektedir. Bazı serilerde tanı duyarlılığı %70-93'lere ulaşmaktadır (33).

2.1.8. Tedavi

VL tedavisinde yaygın olarak beş değerli (pentavalan) antimon bileşikleri kullanılmaktadır. Bu bileşiklerden meglumine antimoniate (Glucantime) ve sodium stibogluconate (Pentostam) tedavide oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Pentavalan antimon bileşiklerine karşı artan direnç en önemli problemdir. Bu durum, Hindistan Kuzey Bihar'da antimon tedavisinde başarı oranını %50'den fazla düşürmüştür (34). Pentavalan antimon bileşikleri, intravenöz veya intramuskuler olarak kullanılabilir. İntramuskuler yapılan uygulamalarında muskuler fibrozis ve abse oluşumu gibi yan etkileri olduğundan subkutan kullanımı tavsiye edilmektedir. Remisyonu indüklemek amacıyla, pentavalan antimon bileşiklerine IFN- γ 'nın eklenmesi ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir (35).

Pentavalan antimon bileşiklerine dirençli olgularda Amphotericin B tercih edilmektedir. Amphotericin B, *Streptomyces nodosus* aktinomisetlerinden elde edilen makrolid grubu bir preparattır. Özellikle anti-fungal olmasına karşın bazı protozoonlarda da etkinliği saptanmıştır. Bu ilaç nefrotoksik özelliği sebebiyle fazla tercih edilmemektedir (36). Gelir seviyesi yüksek ülkelerde liposomal Amphotericin B (L-AMB), VL tedavisinde öncelikli seçenek olmakla birlikte, yüksek maliyeti nedeniyle hastalığın endemik olduğu dar gelirli ülkelerde kullanım oranı düşüktür (37).

Miltefosin, leishmaniasis'e karşı ilk oral-aktif ilaç olarak tanımlanmıştır. Bu ilaçla yapılan çalışmalar 3-4 hafta içerisinde %95-100'lere ulaşan olumlu sonuçlar vermiştir (38). Miltefosinin tedavi potansiyelinin yüksek olduğu düşünülmeyle birlikte kullanımının uygunluğu ve miltefosine karşı olası direnç ile ilgili endişeler devam etmektedir (34).

Dirençli VL olgularında kullanılan diğer bir ilaç da pentamidin olmakla birlikte toksisitesi nedeni ile kullanımı sınırlandırılmıştır (38, 39).

Kuzey Bihar’da dirençli olgularda paramomisin (aminosidin) etkili bir şekilde kullanılmasına rağmen Sudan, Kenya ve Etiyopya’da paramomisin, sodium stibogluconate ve bu ikisini birlikte içeren ilaçlar tedavide etkisiz kalmıştır (40).

Hindistan’da yapılan faz III çalışmalarında miltefosin, paramomisin ve (L-AMB) kademeli olarak uygulanarak 6 aylık bir süreçte %97’lere ulaşan tedavi başarısı elde edilmiştir (41).

KL, Eski Dünya’da hastaların %90’dan fazlasında spontane olarak iyileşebilmektedir. KL lokal tedavisinde kriyoterapi uygulanmakta ve %77 den %100’e kadar başarı elde edilebilmektedir (42). Diğer taraftan lokal infrared lambalarla da olumlu sonuçlar alınmıştır (43). Ayrıca paramomisin-metilbenzetonium ve paramomisin-pentavalan antimon kombinasyonları da kullanılarak yaklaşık %75 oranında tedavi başarısı elde edilebilmiştir (34).

2.1.9. Korunma

Leishmaniasis’in vektör kaynaklı ve zoonotik bir hastalık olması nedeniyle hasta, rezervuar ve vektörü kapsayan korunma yöntemleri uygulanmaktadır. İnsektisit kullanımı ve tatarcıkların konaklara ulaşmasını engelleyecek tedbirler vektörlere yönelik yöntemlerdir. Rezervuar olabilecek köpeklerin serolojik testlerinin yapılması ve pozitif çıkanların ya tedavilerinin yapılması ya da ortamdaki uzaklaştırılması diğer bir korunma yoludur. Hastalarla ilgili olarak da doğru ve zamanında tanı ve tedavi önem taşımaktadır. Ayrıca henüz efektif bir aşı olmamakla birlikte aşı çalışmaları devam etmektedir.

2.1.10. *Leishmania infantum*

Leishmania infantum, Eski Dünya’nın Akdeniz bölgesinde bulunan ve infantil visseral leishmaniase (VL) neden olan *Leishmania* türüdür. Latin Amerika’da *L. chagasi* olarak adlandırılmıştır (44, 45). Ayrıca bazı olgularda KL nedeni olarak da bildirilmiştir (46). Vahşi kanidler ve evcil köpekler bu mikroorganizmanın doğal rezervuarlarıdır. Bazı

araştırmacılar *L. infantum* ile *L. donovani* türlerinin birbirine çok benzer olduklarını ve aslında birbirinin alt türü olması gerektiğini ileri sürmüşlerdir (47). Ancak yapılan filogenetik analizler bu iki türün benzer olmakla beraber ayrı türler olduklarını göstermiştir (48).

2.2. Aşı ve Aşı Çalışmaları

Aşılar; bir canlıya belli bir enfeksiyona karşı korunması amacıyla verilen, canlının bağışıklık sistemini uyarak hümmoral ve hüccresel yanıt oluşturabilen aktif immünojenik bileşikler olarak tanımlanmaktadır. 1796'da Cowpox virüsünden hazırlanan zayıflatılmış canlı virüs aşısı, modern aşılanmanın ilk örneğı olarak kabul edilmektedir. Bu başlangıcın ardından çeşitli bakteri ve virüslerin sebep olduğı birçok hastalığa karşı aşı geliştirilmesinde başarı sağlamıştır.

Parazitlerin biyolojik ve immünojenetik yapılarının bakteri ve virüslere göre daha kompleks olması, paraziter enfeksiyonlara karşı aşı geliştirilmesinde zorluklara neden olmaktadır. Paraziter enfeksiyonlara, özellikle de prevalansı yüksek olan sıtma ve leishmaniasis'e karşı aşı çalışmaları uzun yıllardan beri yoğun şekilde devam etmektedir. Ancak paraziter hastalıklara karşı efektif bir aşı henüz geliştirilememiştir (49). Sıtma ve leishmaniasis aşı adaylarından bazılarının faz III çalışmaları devam etmektedir (50, 51).

Diğer parazitlerde olduğı gibi leishmaniasis'e karşı da insanda henüz kullanıma sunulmuş bir aşı bulunmamaktadır. Leishmaniasis'e karşı aşı geliştirmede karşılaşılan bazı temel zorluklar vardır. Bunlar: parazitin lipofosfoglikan (LPG) yapısının çeşitliliğı, konağın immün sisteminden kaçma stratejilerinin farklılığı ve insan nüfusunun heterojen genetik yapısı en başta gelen güçlüklerdir. Ayrıca insan leishmaniasis'inin klinik özelliklerini yansıtan doğru bir *in-vivo* hayvan modelinin olmaması da aşı çalışmalarını sınırlamaktadır. Ancak, *Leishmania* genom çalışmaları ve güncel biyoteknolojik gelişmeler aşı çalışmaları için önemli bir itici güç oluşturmuştur. Birçok araştırma merkezinde anti-leishmanial aşı çalışmaları sürdürölmektedir. Son zamanlarda özellikle ölümcül VL ile ilgili aşı çalışmaları halk sağlığı açısından önemli bir hedef olarak düşünölmektedir (52).

Leishmaniasis'e karşı geliştirilen aday aşılarda; birinci, ikinci ve üçüncü nesil aşılarda olarak üç ana gruba ayrılmaktadır.

2.2.1. Birinci Nesil Aşılarda

Konak vücuduna parazitin canlı olarak veya öldürölmüş olarak verilmesi metodunun kullanıldığı aşılardır.

2.2.1.1. Canlı Atenüe Parazit Aşılarda

Leishmania suşlarının farklı metotlarla virulanslarının azaltılması ile elde edilen aşılardır. Bu yöntemde parazitler virulanslarının azaltılması amacıyla uzun süreli kültürde tutma, radyasyona tabi tutma, gentamisinle veya bazı kimyasal ajanlarla muamele etme gibi metotlar kullanılmaktadır (51). Bu yöntemlerinden biri "Leishmanizasyon" olarak isimlendirilen yöntemdir. Bir aşılama yöntemi olarak kabul edilirliliği tartışmalı olan Leishmanizasyon metodunda aktif lezyonlu bölgeden alınan parazitlerin, bir bölgeye inoküle edilmesi ve lezyonun iyileşmesi sonucu korunmanın elde edilmesi planlanmıştır (53). Leishmanizasyon, Eski Sovyetler Birliğı, İsrail ve İran'da uzun süre insanlarda *L. major*' un neden olduğı KL'i önlemek için başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Leishmanizasyon halen Özbekistan gibi bazı Asya ölkelerinde benzer amaçlarla aşılama için kullanılmaktadır. Ancak yöntemin standardize edilememesi, kullanılan suşun virulansındaki değışiklikler, zaman zaman inoküle edilen bölgede inatçı ve devam eden lezyonların oluşması, yaygın kullanımını önleyen en önemli etkenler olmaktadır (54).

2.2.1.2. Ölü Parazit Aşılarda

Ölü parazit aşılarda, hem koruyucu hem de tedavi edici özelliğıne sahip olmaları ile karakterize olurlar. Parazitin ham total antijenlerini içeren ilk ölü parazit aşı çalışması 1940'larda Brezilya'da yapılmıştır. İlk ölü parazit aşı çalışmalarında çoğunlukla KL üzerinde yoğunlaşmıştır. Amerika'da, geniş bir grup üzerinde otoklavlanmış *L. amazonensis* lizatlarından elde edilen aşı kullanılmış ve aşının etkinliğı %54,38 olarak bildirilmiştir (55).

2.2.2. İkinci Nesil Aşılar

2.2.2.1. Gen Ekleme veya Uzaklaştırma ile Elde Edilen Canlı Aşılar

Bu gruba ait olan aşılar canlı parazitlerden belli bir genin uzaklaştırılması (knock-out) veya eklenmesi (knock in) yolu ile elde edilir. Bu tür canlı aşılar sadece immün cevap oluşturmada yeterli olup, hastalık oluşturmamaktadır. Knock-out *Leishmania* aşılarına dihidrofolat reduktaz, timidilat sentaz, sistein proteinaz veya biyoperitin transporter gibi önemli genleri uzaklaştırılması ile elde edilen aşılar örnek olarak verilebilir. Knock-in *Leishmania* aşılarına ise *Herpes-I* virüsünün ganciclovire duyarlı timidin kinaz genleri veya *Saccharomyces cerevisiae*'ye ait 5-florositozine duyarlı sitozin deaminaz geni gibi ilaç duyarlılık genlerinin *Leishmania* genomuna eklenmesi ile elde edilen aşılar örnek olarak verilebilir (56). Knock-out ve knock-in *Leishmania* aşıları ile immunize edilen farelerde leishmaniasise karşı değişen derecelere direnç elde edilmekle birlikte, insanlar için canlı parazitlerin aşı olarak kullanımının etik olarak uygun olmadığı düşünülmektedir (12).

2.2.2.2. Saflaştırılmış Antijen Aşıları

Bu gruba ait olan aşılar, parazitlerin hücre yüzeyinde bulunan en önemli yüzey molekülleri olan glikokonjugatların izolasyonu ve daha sonra çeşitli yöntemlerle saflaştırılması ile elde edilmektedir. Glikokonjugatlar parazitler tarafından kendilerini memeli konak çeşitli salgılarından korunma ve mevcut ortama adapte olma amacıyla kullanılmaktadır. Parazitlerin kamçısı da dahil olmak üzere bütün yüzeyinde bulunan Lipofosfoglikan (LPG), *Leishmania* promastigotlarının hücre yüzey glikokonjugatlarından elde edilmektedir. Parazitin makrofajlar tarafından reseptör aracılığıyla alınmasında bu antijenlerin önemli rolü bulunmaktadır. *Leishmania major* ve *Leishmania donovani*'den izole edilen LPG ile yapılan çalışmalarda, LPG'nin ümit verici bir aşı adayı olabileceği iddia edilmiştir.

Diğer geniş kapsamlı çalışmalardan biri de parazitin yüzeyinde bulunan glikoprotein-63 (GP63) veya leishmanolizindir. *L. major* türünden elde edilen saflaştırılmış GP63 ile, hem *L. mexicana* hem de *L. major*'a karşı koruma sağlanmıştır. Köpeklerde yapılan çalışmalarda *L. infantum*'dan hazırlanan yarı-saflaştırılmış liyofilize proteinler faz III

denemelerinde olumlu sonuçlar vermiştir. Farelerde yapılan bir çalışmada da *L. donovani* promastigotlarından izole edilen DP72 glikoproteininin *L. major*'a karşı koruma sağlayabildiği gözlenmiştir. Saflaştırılmış antijen aşıları elde etmek için bol miktarda parazit üretimi gerektiğinden bu konuda yapılan çalışmalar faz IIa veya faz III aşamalarına henüz ulaşamamıştır (56).

2.2.2.3. Rekombinant Antijenler

Rekombinant antijen aşılar, rekombinant bakterilerin, bazı parazitlerin veya virüslerin *Leishmania* türlerine ait antijenlerin taşıyıcısı ve adjuvan olarak kullanılmasıyla elde edilmektedir. Bu taşıyıcı canlılar *Leishmania* parazitlerine ait antijenleri ekspres edebilmektedir. Bakterilerin kullanıldığı aşılar örnek olarak *L. major* GP63 yüzey proteazı klonlanmış *Salmonella thypymurium*, *L. chagasi* antijeni klonlanmış BCG verilebilir. Parazitlerin kullanıldığı aşılar KMP-11 geni klonlanmış *Toxoplasma gondii* örnek verilebilir.

C kinaz aktivasyon reseptörü olan LACK proteini, *Leishmania* hayat döngüsünün tüm aşamalarında bulunan bir yapı olup, rekombinant LACK'ın IL-12 adjuvanı ile birlikte verilmesi ile aşılama, farede kısa süreli koruyucu cevabı tetiklemiş ancak uzun süreli immüniteyi sağlayamamıştır.

Memeli konaklarda immün cevabın oluşturulmasında parazitin amastigot formunda bulunan antijenler yaşamı, çoğalması ve hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasında rol oynadıkları için ilaç veya aşı hedefleri olarak incelenmektedir. Ayrıca tanımlanmış tek moleküllerden farklı olarak, deney hayvanlarında VL'e karşı koruma geliştirmek amacıyla multikomponent aşılar incelenmektedir. Köpeklerde yapılan bir çalışmada *L. infantum*'a ait sitoplazmik proteinler olan Lip2A, Lip2B, P0 ve Histon2A'nın kombinasyonu olan rekombinant-Q proteini, canlı BCG ile birlikte aşı olarak uygulanmış ve klinik düzeyde en az %90 korunma sağladığı saptanmıştır. Leishmaniasis rekombinant protein aşı adayları tek başına, kombine olarak veya poliprotein veya kimerazlarla birlikte kullanılarak etkinliği incelenmiştir (56).

Visseral leishmaniasise karşı test edilen bazı rekombinant proteinler ve poliproteinler, hedeflenen parazit türü, kullanılan hayvan modeli ve aşı etkinliği Tablo 2.1'de verilmiştir (57).

Tablo 2.1. Visseral leishmaniasise karşı test edilen bazı rekombinant proteinler ve poliproteinler (57).

Sıra	Protein	Hedef tür	Model	Aşı etkinliği
1	A2	<i>L. infantum</i>	Beagle köpeği	Kısmi koruma
2	Aldolase	<i>L. donovani</i>	Hamster	Kısmi koruma
3	Cysteine-peptidases	<i>L. infantum</i>	Beagle köpeği	Koruyucu değil
4	Cysteine-proteinase III	<i>L. infantum</i>	BALB/c fare	Kısmi koruma
5	Cyclophilin 1	<i>L. infantum</i>	BALB/c fare	Yüksek koruma
6	dp72	<i>L. infantum</i>	BALB/c fare	Kısmi koruma
7	eIF2	<i>L. donovani</i>	Hamster	65% koruma
8	HASPB1	<i>L. donovani</i>	BALB/c fare	70% – 90% koruma
9	LCR1	<i>L. infantum</i>	BALB/c fare	Kısmi koruma
10	LdSir2HP	<i>L. donovani</i>	Hamster	Yüksek koruma
11	LeishH1	<i>L. infantum</i>	BALB/c fare	Yüksek koruma
12	L3/L5	<i>L. infantum</i>	BALB/c fare	Yüksek koruma
13	NH36	<i>L. infantum</i>	BALB/c fare	80% koruma
14	ORFF	<i>L. donovani</i>	BALB/c fare	Kısmi koruma
15	78 kDa protein	<i>L. donovani</i>	BALB/c fare	Yüksek koruma
16	A2/CPA/CPB*	<i>L. infantum</i>	BALB/c fare	Yüksek koruma
17	KSAC*	<i>L. infantum</i>	C57BL/6 fare	Yüksek koruma
18	Leish-111f*	<i>L. infantum</i>	Beagle köpeği	Koruyucu değil
19	NS protein*	<i>L. donovani</i>	BALB/c fare	Yüksek koruma
20	Q protein*	<i>L. infantum</i>	Beagle köpeği	90% koruma
21	8E/p21/SMT*	<i>L. donovani</i>	C57BL/6 fare	Yüksek koruma

*Poliprotein veya kimerik aşı

2.2.3. Üçüncü Nesil Aşılar

2.2.3.1. DNA Aşıları

DNA aşıları, daha dayanıklı olmaları, üretim maliyetlerinin daha düşük olması, taşınmasında soğuk bir ortama ihtiyaç duymaması, birçok genin bir araya getirebilmesi gibi özellikler sayesinde rekombinant protein aşılarına göre daha kullanışlıdır. Genelde rekombinant aşı adayı olarak kullanılan antijenlere ait DNA dizileri aşı olarak da kullanılmaktadır. DNA aşıları, tekli aşı veya kombine aşı olarak denenmiştir. Bazı DNA aşıları rekombinant proteini eksprese eden bir virüs şeklinde de denenmiştir. Ayrıca aşıların etkinliğini arttırmak için bazı çalışmalarda adjuvanlar da kullanılmıştır.

DNA aşısı ile ilgili çalışmalar farelerde KL ve VL'ye, hamsterlar ve köpeklerdeki VL'ye karşı yapılmıştır. Bu çalışmaların bir kısmında kültür ortamında parazitin virulansı azaltılmış, diğer bir kısmında ise *Leishmania* ile enfekte olmuş farelerden izole edilmiş virulan parazitler kullanılmıştır.

Leishmaniasis'e karşı test edilen DNA aşılarında kullanılan bazı genler, çalışma yapılan hayvan modeli, hedeflenen leishmaniasis çeşidi ve hedeflenen parazit türleri Tablo 2.2'de verilmiştir (58).

Tablo 2.2. Leishmaniasis'e karşı DNA aşısı adayları olarak seçilen bazı genler (58).

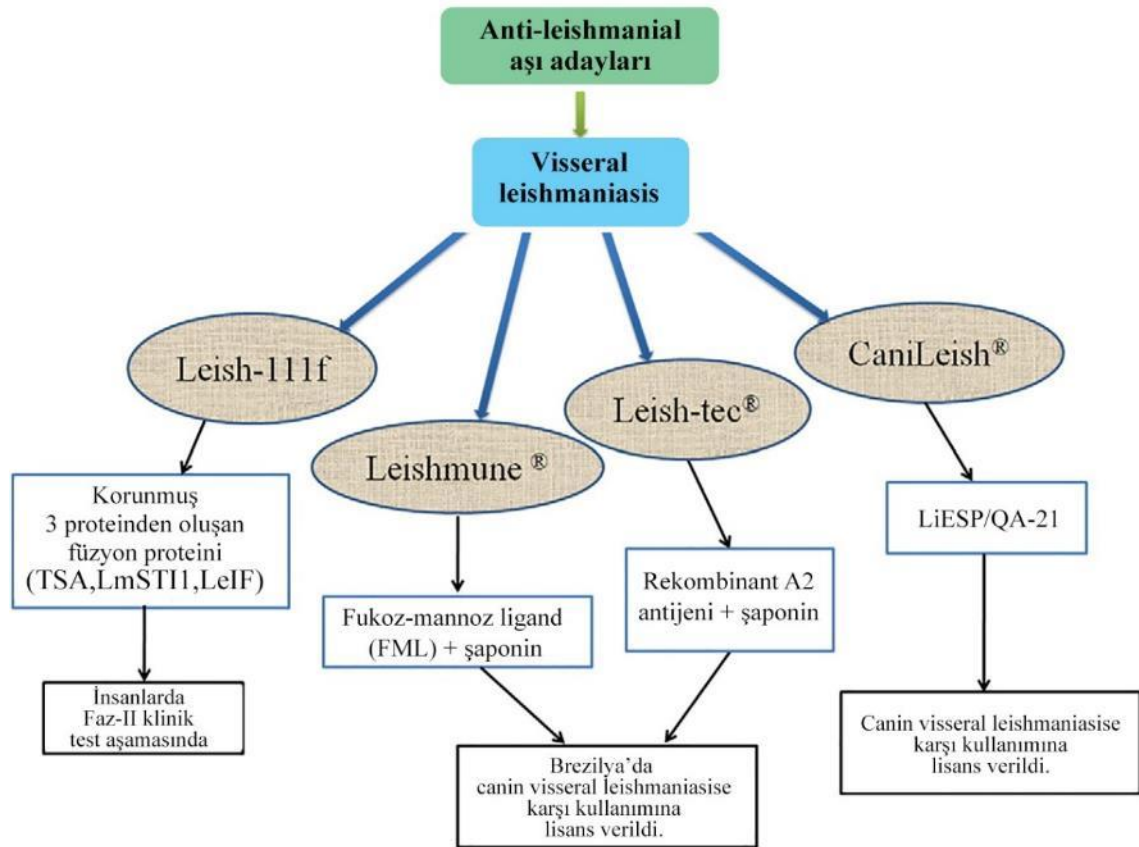
Sıra	Aşı Adayı Gen	Kullanılan Hayvan Modeli	Hedeflenen Leishmaniasis çeşidi	Hedeflenen <i>Leishmania</i> türleri
1	LACK	Canin, Fare	VL, CL	<i>L. donovani</i> , <i>L. chagasi</i> , <i>L. major</i> , <i>L. infantum</i>
2	GP63	Fare, Canin	CL, VL	<i>L. major</i> , <i>L. infantum</i>
3	KMP11	Fare	CL, VL	<i>L. major</i> , <i>L. donovani</i>
4	CPB	Canin, Fare	VL, CL	<i>L. infantum</i> , <i>L. major</i>
5	ORFF	Fare	VL	<i>L. donovani</i>
6	NH 36	Fare	VL, CL	<i>L. chagasi</i> , <i>L. maxicana</i>
7	TRYP	Canin	VL	<i>L. infantum</i>
8	PSA-2	Fare	CL	<i>L. major</i>

2.2.3.2. Multi-antijenik DNA aşıları

Son yıllarda ikinci ve üçüncü nesil aşı çalışmalarında genlerin ve antijenlerin tek olarak kullanılmasının yanında, iki veya daha fazla gen ve antijenden oluşan kombinasyonlar da kullanılmaya başlanmıştır. Bu multi-antijenik aşılara uygun adjuvanlar da eklenebilmektedir.

Leishmaniasise karşı DNA aşısı geliştirilmesi çalışmalarında parazite ait immünijenitesi yüksek olan aşı adayları genler öncelikle tekli olarak plazmidlere yerleştirilmiş ve koruyucu etkinlikleri araştırılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, tek başlarına immunojenitesi yeterli olmayan bu genlerin aynı plazmide sıralı olarak yerleştirilmesi ile elde edilen multi-antijenik aşılar öne çıkmaktadır. Bu aşılar multi-subunit aşılar

olarak da adlandırılmaktadır. Bu aşılarda faz çalışmaları devam etmektedir (58, 59). Leishmaniasise karşı multi-antijenik aşı adaylarının kullanıldığı hayvan deneylerinde umut verici sonuçlar elde edilmektedir. Bu nedenle günümüzdeki klinik çalışmalar daha çok multi-antijenik aşı adaylarına yönelmiştir. İnsanlarda visseral leishmaniasisi'e karşı faz-II klinik çalışmaları devam eden ve Leish-111f olarak adlandırılan multi-antijenik aşı adayı, parazitin hayat döngüsünde nispeten korunmuş olan TSA, LmSTI1 ve LeIF proteinlerinden oluşan bir füzyon proteindir (60). VL'e karşı DNA aşısı geliştirilmesi çalışmalarında parazite ait immunijenitesi yüksek olan aşı adayı genler öncelikle tekli olarak plazmidlere yerleştirilmiş ve koruyucu etkinlikleri araştırılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise tek başlarına immunijenitesi yeterli olmayan bu genlerin aynı plazmide sıralı olarak yerleştirilmesi ile elde edilen multi-antijenik aşılarda öne çıkmaktadır. Bu aşılarda, multi-subunit aşılarda da adlandırılmaktadır. Bu aşılarda faz çalışmaları devam etmektedir (69, 70). Leishmaniasis'e karşı klinik araştırmaları devam eden ve bazıları CVL'e karşı lisanslanmış olan aşı adayları Şekil 2.7'de özet olarak verilmiştir.



Şekil 2.7. Klinik araştırma aşamasındaki anti-leishmanial aşı adayları (60).

2.3. Adjuvanlar

Adjuvanlar, aşı içerisinde antijenlerine karşı bağışıklık tepkisini arttırmak veya değiştirmek için kullanılan katkı maddeleri olarak tanımlanabilir. Leishmaniasis'e karşı yeterli koruma sağlayamayan aşı adaylarının etkisini arttırmak için adjuvanlar kullanılmaktadır. Aşı geliştirilmesindeki en büyük engel T hücrelerini uyaran güvenli ve etkili adjuvanların elde edilememesidir. Leishmaniasis aşı adaylarında adjuvan olarak kullanılan moleküllerden biri interlökin-12 (IL-12)'dir. IL-12'nin KL hayvan modellerinde önleyici etkinliği gösterilmiştir. Ancak IL-12'nin dezavantajı immünize antijenlere güçlü immün yanıt oluşturmada yetersiz olmasıdır. Diğer bir adjuvan adayı ise monofosforil lipid A (MPL®)'dir. MPL® klinikte insanda, malarya aşılarında, hepatit B'de, genital herpes, alerji aşırı duyarlılığında ve insan papilloma virüsünde adjuvan olarak kullanılmaktadır. İnsan hastalıkları için muhtemel adjuvan adayı olan MPL®'nin, sistemik toksisitesi olduğuna dair kanıt bulunamamış, iyi tolere edildiği belirlenmiş ve insan kullanımı için T-hücre adjuvanı olarak onaylanmıştır. Böylece MPL®'nin leishmaniasis için aşı adjuvanı olarak kullanılmasının iyi bir çözüm olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra MPL®, TLR-4 (Toll benzeri reseptör 4)'e antijen sunan hücreleri aktive ettiği için, leishmaniasis'e karşı doğal ve kazanılmış bağışıklığa katkıda bulunan uygun bir adjuvandır.

İnsan aşılarında onaylanmış diğer iki adjuvan; kuvvetli antikor cevabını uyaran, ancak antijen-spesifik Th-1 yanıtının zayıf indükleyicisi olan, alum ve squalendir. Canlı vektörlerin, IL-12'nin, saf DNA'nın veya mikrokürelerin kullanımı ile oligonükleotidler içine DNA eklenmesi (CpG dizileri) gibi stratejiler, klinik öncesi modellerde geniş olarak değerlendirilmiştir (56).

BALB/c farenin *Leishmania* C kinaz (LACK) proteini ve adjuvan olarak IL-12 karışımıyla aşılansıyla *L. major*'e karşı kısa süreli immün cevap oluşumu görülmüştür. LACK antijeni, LACK DNA'sı ve IL-12 DNA'sından oluşan kombine aşı ile uzun süreli koruma sağlanabilmiştir.

2.4. Lack Geni

Leishmania Homolog Aktive C Kinaz Reseptörü (LACK) geni 939 bp'lik DNA dizisine sahiptir. LACK geni tarafından kodlanan LACK antijeni ise 313 aminoasit içerir ve 36-

kDa moleküler ağırlığa sahiptir. LACK antijeni ökaryotlarla sınırlı olup WD-40 protein ailesinde yer alır ve parazitin hayat dönemlerinde çok sayıda düzenleyici fonksiyona sahiptir (61). LACK antijeni, *Leishmania* türlerinin hem amastigot hem de promastigot dönemlerinde yüksek derecede korunmuş bir yapıdır (62).

L. infantum LACK geni taşıyan DNA plazmidi ve rekombinant vaccinia virüsünün (rVV) BALB/c farelere uygulanması ile KL'e karşı bağışıklık sağlandığı gösterilmiştir (63, 64). LACK antijenine ait DNA'nın leishmaniasise karşı immünojenitesi birçok çalışmada doğrulanmıştır (65-67).

LACK antijeninin *L. major* enfeksiyonunda immünopatojenik rolünün tespit edilmesi, antijenin leishmaniasis için potansiyel bir aşı adayı olarak büyük ilgi görmesine ve bu antijen üzerinde yoğunlaşılmasına sebep olmuştur (68).

2.5. KMP-11 Geni

Leishmania cinsinin içinde bulunduğu Kinetoplastida sınıfının tüm üyelerinde yüksek düzeyde korunmuş bir molekül olan Kinetoplastid Membran Proteini-11 (KMP-11) de yine LACK gibi parazitin tüm hayat dönemlerinde eksprese edilir ve parazitin zar yapıları ile sıkı bir şekilde bağlantılıdır (69-71). KMP-11 antijeni, 11-kDa moleküler ağırlıkta olup 276 bp.'lik DNA dizisi tarafından kodlanmakta ve 92 aminoasit içermektedir. KMP-11 geni ve antijeni leishmaniasise karşı Th1 ve Th2 immun yanıt oluşturmaları nedeniyle DNA ve protein aşısı çalışmalarında umut verici adaylar arasında yer almaktadır (58, 72).

2.6. Klonlama

Gen klonlaması, hedef genin vektöre yerleştirilmesi, bu vektörün hücrelere transformasyonu ve bu hücrelerin bölünmeleri sırasında vektörün içerdiği genin birçok kopyasını oluşturmaları işlemi olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde gen klonlaması çalışmaları; gen izolasyonu, gen bankalarının oluşturulması, yapı ve fonksiyonları üzerinde araştırmalar yapılması, klonlanan genlerin üzerinde mutasyonlar yapılarak fonksiyonel bölgelerinin belirlenmesi, DNA dizi analizlerinin kolaylaştırılması, DNA aşılarının oluşturulması ve rekombinant proteinlerin araştırılması gibi amaçlarla yapılmaktadır.

Klonlamada vektör olarak genellikle plazmidler, virüsler ve bakteriler kullanılmaktadır. Klonlama çalışmalarında yaygın olarak kullanılan plazmidler, bakterilere özgü bilinmekle beraber bazı ökaryotlarda da bulunabilmektedirler. Plazmidler, hücre kromozomundan bağımsız olarak kendini eşleyebilen, küçük, halkasal yapılı ve kromozom dışı DNA parçacıklarıdır. Biyoteknolojik gelişmeler sayesinde farklı özellikleri olan plazmidler elde edilebilmektedir. Plazmidlerde çoklu klonlama bölgeleri (multiple cloning sites) bulunmaktadır. Restriksiyon alanları içeren bu bölgeler sayesinde istenilen DNA parçalarının plazmide kolayca eklenmesi sağlanabilmektedir.

Klonlamada ilk işlem; uygun yöntemler kullanılarak organizmadan genomik veya komplementer DNA (cDNA) izolasyonu yapılmasıdır. Genomik DNA'da hedeflenen gen seçilmekte ve hedef gene spesifik primerlerle PCR analizi yapılarak genin amplifikasyonu sağlanmaktadır. Sonrasında elde edilen gen, uygun bir vektöre yerleştirilmektedir. Vektör DNA'sına, organizmaya ait bir DNA'nın yerleştirilmesiyle oluşturulan moleküle "rekombinant DNA" adı verilmektedir. Daha sonra rekombinant DNA'nın kompetan hücrelere transformasyonu yapılmaktadır. Transformasyon sonrasında oluşan kolonilerin rekombinant DNA'yı içerip içermediği araştırıldıktan sonra klonlamanın doğruluğu DNA dizi analizi ile kesinleştirilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma öncesi leishmaniasis, *L. infantum*, leishmaniasise karşı aşı çalışmaları, DNA ve protein aşılı, DNA aşılılarında hedef alınan genler, LACK ve KMP-11 genleri ve multi-antijenik DNA aşılı ile ilgili literatür taraması yapılmıştır. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne sunulan tez proje önerisinin onaylanması sonrasında malzemelerin temini ve deneyler için uygun alt yapı oluşturulması sağlanmıştır.

Çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan aşağıdaki cihaz (Tablo 3.1.) ve malzemeler (Tablo 3.2.) kullanılarak yürütülmüştür.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz/Adı
Santrifüj aleti (Hettich 32R, Almanya)
Santrifüj (Avanti® J-E, ABD)
ChemiDoc Mp Jel görüntüleme cihazı (Bio-Rad, ABD)
Güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)
Vorteks Bencmixer (Bencmark, ABD)
İnvert mikroskop (Leica, ABD)
PCR cihazı (Sensoquest, Almanya)
NanoDrop 2000c Spektrofotometre (Thermo scientific, ABD)
Su banyosu Jeio tech BS-06 (Jeio tech, G. Kore)
İnkübatörlü shaker Jeio tech SI-300 (Jeio tech, G. Kore)
Kuru Isı Blogu, Digital heat blog (Bencmark, ABD)
Mikrodalga fırın, MD 554 (Arçelik, Türkiye)
Manyetik karıştırıcı, MK 418 (Nüve, Türkiye)
-20 Derin dondurucu (Siemens, Almanya)
-80 Derin Dondurucu (Panasonic, Japonya)
+4 buzdolabı (Uğur, Türkiye)
Hassas terazi (Radwag, Polonya)
Yatay elektroforez cihazı (Bio-Rad, ABD)
Distile su cihazı (Elga, UK)

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan malzemeler.

Sıra	Tanımı/Adı
1	<i>Leishmania infantum</i> (MHOM/TR/2009/EP174) promastigotları
2	Medium 199 (M-199) (1x) (Sigma-Aldrich, ABD)
3	Medium 199 (M-199) (10x) (Sigma-Aldrich, ABD)
4	Fetal Calf Serum (FCS) (Sigma-Aldrich, ABD)
5	10,000 U/ml penicillin/10,000 µg/ml streptomycin (Invitrogen, ABD)
6	L-glutamine (Sigma-Aldrich, ABD)
7	Hepes 1M (Sigma-Aldrich, ABD)
8	Adenin 10 mM (50 mM HEPES içerisinde) (Sigma-Aldrich, ABD)
9	%0,25 Hemin (%50 trietanolamin içerisinde) (Sigma-Aldrich, ABD)
10	SOC sıvı besi yeri
11	15 ml'lik falkon, santrifüj tüpü (Sigma-Aldrich, ABD)
12	25 cm ³ kültür flask (Sigma-Aldrich, ABD)
13	RPMI-1640 Medium (Biochrome, Almanya)
14	LB katı besiyeri (Ampisilinli)
15	LB sıvı besiyeri (Ampisilinli)
16	Penicillin-Streptomycin 100X Solution (5000 units) (Invitrogen, ABD)
17	QIAamp DNA İzolasyon Kiti (Tissue) (Qiagen, ABD)
18	LiLACK F Primeri (5'- AAGCTTATGAACTACGAGGGTCACC -3')
19	LiLACK F1 Primeri (5'- CACCATGAACTACGAGGGTCACC -3')
20	LiLACK R Primeri (5'- GGATCCTTACTCGGCGTCGGAGA -3')
21	LiKMP-11 F Primeri; (5'- GAAATGGCCACCACGTACG-3')
22	LiKMP-11 R Primeri; (5'- TTACTTGGATGGGTACTGCGCA- 3')
23	PCR Master mix 2x (GeneAll Biotechnology, G. Kore)
24	Agaroz jel (Lonza, ABD)
25	100 bp. DNA Marker (GeneAll Biotechnology, G. Kore)
26	500 bp. DNA Marker (GeneAll Biotechnology, G. Kore)
27	1 kb DNA Marker (GeneAll Biotechnology, G. Kore)
28	CloneJET PCR Clonning Kit (Thermo Scientific, ABD)
29	pcDNA TM 3.1/V5-His TOPO Expression Kit (Invitrogen, ABD)
30	OneShot TOP10 ChemicallyCompetent <i>E. coli</i> hücreleri (Invitrogen, ABD)
31	EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kit (BioBASIC, Kanada)
32	GeneAll Expin ComboGP-Gel and PCR Purification Kit (GeneAll Biotechnology, G. Kore)
33	<i>HINDIII</i> -HF TM Restriksiyon Endonukleaz (NEB, İngiltere)
34	<i>BamHI</i> -HF TM Restriksiyon Endonukleaz (NEB, İngiltere)
35	CutSmart Restriksiyon Endonukleaz Buffer (NEB, İngiltere)
36	Pfu DNA polimeraz (Bio-Basic Kanada)
37	10x Pfu reaksiyon buffer (Bio-Basic Kanada)
38	2,5 mM dNTP mix (Bio-Basic Kanada),
39	T4 DNA Ligaz (NEB, İngiltere)
40	High Pure Plasmid isolation Kit (Roche, Almanya)
41	SigmaFast DAB tablet (Sigma-Aldrich, ABD)
42	Anti-HisG-HRP antikoru (Invitrogen, ABD)

3.1. *L. Infantum* Promastigot Kültürünün Yapılması

Çalışmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda kültürü devam ettirilen *L. infantum* (MHOM/TR/2009/EP174) promastigotları kullanılmıştır. Promastigot kültürünün yapılması için modifiye *Leishmania* besiyeri hazırlanmıştır. Modifiye *Leishmania* besiyeri için Tablo 3.3'de miktarları belirtilen malzemeler kullanılmıştır (73). Parazitin enfektif formu olan 'metasiklik promastigotların' yeterli miktarda elde edilebilmesi için bu besiyeri tercih edilmiştir. Parazitin vektörü olan tatarcık sineklerinin bağırsak dokusuna benzer koşulların oluşturulması ve metasiklogenezin gerçekleşebilmesi amacıyla promastigotlar 27 °C'de ve anaerobik ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Anaerobik koşulların oluşturulması amacıyla havası alınan flaskların ağzları parafin film ile kapatılmıştır.

Besiyeri aşağıdaki basamaklar uygulanarak hazırlanmıştır:

1. +4 °C'den alınan malzemeler steril laminar kabine alınmıştır.
2. Oda sıcaklığına ulaşan malzemeler 500 ml steril cam şişe içerisinde manyetik karıştırıcı ile tamamen çözününceye kadar karıştırılmıştır.
3. Elde edilen karışım 0,2 µm çapındaki steril filtreden geçirilerek steril cam şişe içerisine alınmıştır.
4. Hazırlanan besiyeri +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.3. Modifiye *Leishmania* besiyerinin içeriği.

Sıra	Miktarı/Tanımı/Adı
1	350 ml Medium 199 (M-199) (1x) (Sigma-Aldrich)
2	100 ml FCS (Sigma-Aldrich)
3	14,25 ml M-199 (10x) (Sigma-Aldrich)
4	5 ml 10,000 U/ml penicillin/10,000 µg/ml streptomycin
5	5 ml L-glutamine (Sigma-Aldrich)
6	20 ml 1M HEPES (Sigma-Aldrich)
7	5 ml of 10 mM adenin (50 mM HEPES içerisinde) (Sigma-Aldrich)
8	1 ml %0,25 hemin (%50 trietanolamin içerisinde) (Sigma-Aldrich)

Genomik DNA izolasyonunda kullanılacak *L. infantum* (MHOM/TR/2009/EP174) promastigot kültürü aşağıdaki basamaklar uygulanarak yapılmış ve gün aşırı pasajlanarak 4 hafta devam ettirilmiştir:

1. Modifiye *Leishmania* besiyerinden 15 ml alınarak 25 cm³'lük kültür flaskına eklenmiştir.
2. -80 °C'de muhafaza edilen *L. infantum* promastigotları 37 °C'de çözdürülmüştür.
3. Besiyeri ortamına 10-20 x 10⁶ promastigot ekimi yapılmıştır.
4. Promastigot sayımı için *L. infantum* promastigot kültüründen 20 µl alınmıştır.
5. 1,5 ml'lik tüp içerisine 20 µl %2'lik formaldehit konularak üzerine 20 µl kültür eklenmiştir.
6. Karışımdan 10 µl alınarak hemositometre üzerine yerleştirilmiştir.
7. Hücrelerin çökmesi için oda sıcaklığında 5 dk. beklenmiştir.
8. Hemositometre üzerindeki 5 kare sayılarak bulunan sayı 10⁵ ile çarpılmıştır ve 1 ml kültür içerisinde bulunan promastigot sayısı hesaplanmıştır.
9. Promastigot ekimi yapılan kültür flaskları kum sineklerinin bağırsak dokusundaki ortam koşulların oluşturulması amacıyla 27 °C'ye ayarlanan etüv içerisinde anaerobik ortamda inkübasyona bırakılmıştır.
10. Besiyerleri gün aşırı invert mikroskopla kontrol edilmiş ve pasajlama yapılmıştır.
11. Pasajlama için promastigot kültürü önce 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
12. Tüp 900 rpm'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılarak pelet üzerine taze besiyeri eklenmiş ve resüspanse edilmiştir.
13. Süspansiyon taze besiyeri içeren kültür flasklarına dağıtılarak 27 °C'de anaerobik koşullarda tekrar inkübasyona bırakılmıştır.
14. Promastigot kültürü gün aşırı pasajlanarak 4 hafta devam ettirilmiştir.

3.2. Kültürden Genomik DNA  zolasyonu

3.2.1. Kültürden Metasiklik Promastigotların  zolasyonu

Total genomik DNA izolasyonu  ncesi, *Leishmania* metasiklik promastigotlarının yeterli miktarda elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Ficoll gradyanı uygulaması aşağıdaki basamaklar takip edilerek yapılmıştır:

1. Promastigot kültüründen metasiklik formların izolasyonu için 6-9 günlük kültür kullanılmıştır.
2. Parazit süspansiyonu DMEM ile 1: 1 oranında karıştırılmıştır ve 200xg'de 8 dk. santrifüj edilmiştir.
3. Parazitleri içeren süpernatant yeni bir 50 ml t p içine aktarılmıştır ve 200xg'de 8 dk. tekrar santrifüj edilmiştir.
4. Parazitlerin çökmesi için süpernatant 3.000 xg'de 8 dk. santrifüj edilmiştir.
5. Elde edilen pellet 2 ml DMEM'de resüspanse edilmiştir.
6. 15 ml tüpe 2 ml %20 ficoll solüsyonu eklenmiştir. 2 ml %10 Ficoll solüsyonu elde etmek için 1 ml'lik %20 ficoll solüsyonu 1 ml DMEM ile seyreltilmiştir.
7. %10 ficoll solüsyonu hazırlanarak pipet yardımı ile %20'lik solüsyonun üzerine dikkatlice eklenmiştir.
8. Parazit süspansiyonunu Ficoll gradyanının üstüne dikkatlice pipetlenmiştir.
9. Hazırlanan t p 2,000 xg'de 15 dk. boyunca santrifüj edilmiştir.
10. Bu aşamada, santrifüj sonucu elde edilen üst iki katmanda metasiklik promastigotlar zenginleştirilmiştir.
11. Üst fazın tamamı ve ikinci fazın üçte ikisi pipet yardımı ile dikkatlice toplanmıştır.
12. Promastigot süspansiyonuna 5 ml DMEM eklenmiştir ve 3.000xg'da 8 dk. boyunca santrifüj edilmiştir.
13. Pelet, ilk kültür hacmine bağlı olarak yeterli miktarda (1-3 ml) DMEM resüspanse edilmiştir.
14. Hücre sayımı için parazit süspansiyonu 1:100 oranında %4 para-formaldehit ile seyreltilmiştir.
15. Hemositometre ile hücre sayımı yapılmıştır.

16. Mikroskop altında diğer promastigotlara göre uzamış vücut yapısına sahip ve uzun kamçılı metasiklik formlar gözlenmiştir.
17. Metasiklik promastigot süspansiyonu, 10^5 parazit / ml konsantrasyonu olacak şekilde DMEM ile seyreltilmiştir ve total genomik DNA izolasyonuna geçilmiştir.

3.2.2. Total Genomik DNA İzolasyonu

L. infantum'a ait total genomik DNA izolasyonu için metasiklik promastigotları içeren pelet aşağıdaki şekilde elde edilmiştir:

1. *L. infantum* metasiklik promastigot süspansiyonundan 500 µl alınarak 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne eklenmiştir.
2. Kültür 12.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılmıştır.
3. Promastigot miktarını artırmak için bu basamak 5 defa tekrar edilmiştir.
4. Tüp tabanında yeterli miktarda pelet elde edildikten sonra tüp sırasıyla -20°C 'de ve 37°C 'de 10 dk. bekletilmiştir.
5. Bu basamakta sıcaklık farkı sayesinde promastigotların fiziksel olarak parçalanması gerçekleştirilmiştir.

Parçalanmış promastigotlardan total genomik DNA izolasyonu için QIAamp Tissue Kit (Qiagen, ABD) prosedüründe yer alan basamaklar modifiye edilerek aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

1. Pelet üzerine 180 µl ATL buffer eklenmiştir ve karışım homojenize edilmiştir.
2. Karışım 12.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir ve oluşan üst sıvı alınmıştır.
3. Pelet üzerine 20 µl proteinaz-K (Sigma-Aldrich, ABD) eklenerek 15 saniye vortekslenmiştir.
4. Tüp 56°C 'deki su banyosuna alınarak bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
5. Tüp 15 saniye vortekslenildikten sonra üzerine 200 µl AL buffer eklenmiş ve tekrar 15 saniye vortekslenmiştir.
6. Tüp ısı bloğuna yerleştirilmiş ve 70°C 'de 10 dk. inkübasyona bırakılmıştır.
7. Tüp 15 saniye vortekslenmiş, üzerine 200 µl %100 etanol eklenmiş ve 15 saniye vortekslenmiştir.

8. Tüp içeriği kit içerisinde bulunan filtrasyon kolonuna aktarılmıştır.
9. Filtrasyon kolonu 2 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpü içerisine yerleştirilmiş ve 8.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
10. Alt süzüntü atılmış ve filtrasyon kolonu 2 ml'lik yeni mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
11. Filtrasyon kolonuna 500 µl AW1 buffer eklenerek 8.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
12. Alt süzüntü atılmış ve filtrasyon kolonu 2 ml'lik yeni mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
13. Filtrasyon kolonuna 500 µl AW2 buffer eklenmiş ve 14.000 rpm'de 3 dk. santrifüj edilmiştir.
14. Alt süzüntü atılmış ve filtrasyon kolonu 2 ml'lik yeni mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
15. Filtrasyon kolonu boş olarak 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiş ve filtrede kalmış olabilecek buffer uzaklaştırılmıştır.
16. Filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve üzerine 100 µl elisyon buffer (AE) eklenmiştir.
17. Filtrasyon kolonu 1 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
18. Filtrasyon kolonu 8.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
19. Son süzüntü içerisindeki total genomik DNA örneğinden 1 µl alınarak nanodrop spektrofotometre cihazında DNA miktarı ölçülmüştür.
20. Total genomik DNA izolatları PCR basamağına kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.3. Restriksiyon Reaksiyonlarında Kullanılacak Enzimlerin Belirlenmesi

Leishmania infantum LACK ve KMP-11 genlerinin pcDNA3.1 plazmidinde multi-antijenik olarak birleştirilmesi için kullanılabilecek restriksiyon endonukleaz çeşitleri belirlenmiştir. Bu amaçla LACK geni için GenBank'a yüklenen KT184317 numaralı "*Leishmania infantum* strain MHOM/TR/2009/EP174 activated protein kinase C receptor (LACK) gene, complete cds" gen dizisi, KMP-11 geni için ise KU379565 numaralı "*Leishmania infantum* isolate MHOM/TR/2009/EP174 kinetoplastid membrane protein (KMP-11) gene, complete cds" gen dizisi kullanılmıştır. Çalışma

sırasında kullanılacak olan pJet1.2/blunt plazmidi (ThermoScientific, ABD) ve pcDNATM3.1/V5-His TOPO (Invitrogen, ABD) plazmidine ait diziler ve restriksiyon bölgeleri incelenmiştir. LACK ve KMP-11 genlerini herhangi bir bölgeden kesmeyen restriksiyon enzimleri belirlenmiştir. Bu belirlemede Geneious v10.0.7 (Biomatters, ABD) (74) programı kullanılmıştır. Her iki sekansı da herhangi bir bölgesinden kesmeyen ve yaygın olarak kullanılan 22 restriksiyon enzimi tespit edilmiştir. Bu enzimler arasından, sub-klonlamada kullanılacak pcDNA3.1 plazmidinin T7 promotor bölgesinden sonra mevcut olanları belirlenmiştir. Yapılan inceleme sonucunda sub-klonlamada uygun olan ve ticari olarak temin edilmesi kolay olan *HINDIII* (A[^]AGCTT) ve *BAMHI* (G[^]GATCC) restriksiyon enzimleri tercih edilmiştir. Bu aşamadan sonra çalışma boyunca kullanılacak primerlerin tasarımına geçilmiştir.

3.4. LACK Geninin PJET1.2 Plazmitine Klonlanması

3.4.1. LACK Geni Primerleri ve PCR

Çalışmada öncelikle *L. infantum* LACK geninin pJet1.2/blunt plazmidine klonlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla PCR reaksiyonunda *L. infantum* LACK genine spesifik primerler tasarlanmıştır. KT184317 GenBank numaralı LACK dizisi referans alınmıştır. Primerler tasarlanırken LiLACK F primerinin başına *HINDIII* (A[^]AGCTT) restriksiyon dizisi, LiLACK R primerinin başına ise *BAMHI* (G[^]GATCC) restriksiyon dizisi eklenmiştir. *L. infantum* LACK geni için kurulan PCR reaksiyonunda aşağıdaki primerler kullanılmıştır.

LiLACK F; (5'- AAGCTTATGAACTACGAGGGTCACC -3')

LiLACK R; (5'- GGATCCTTACTCGGCGTCGGAGA -3')

PCR reaksiyonu için 12,5 µl Master mix (GeneAll Biotechnology, G. Kore), 2 µl genomik DNA ve 1 µl LiLACK F (20 pmol) ve 1µl LiLACK R (20 pmol) primerlerinden oluşan toplam 25 µl'lik karışım hazırlanmıştır. 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 dk. uzamadan oluşan 35 döngü sonrası 72 °C'de 15 dk.'lık son uzama ile biten termal profil kullanılmıştır. *HINDIII* ve *BAMHI* restriksiyon dizileri dahil 948 bp. uzunluğundaki PCR ürünü, etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde

yürütülmüştür ve ChemiDoc Mp Imaging System (Bio-Rad, ABD) cihazıyla görüntülenmiştir.

3.4.2. LACK Geni PCR Ürününün Saflaştırılması

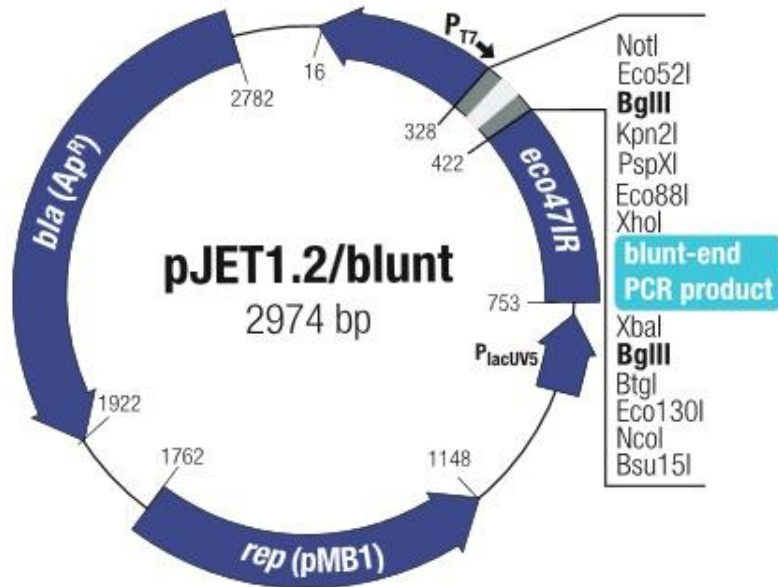
PCR ürününün saflaştırılması için GeneAll Expin Combo GP - Gel and PCR Purification Kit (GeneAll Biotechnology, G. Kore) protokolünde yer alan aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

1. %1,5'luk agaroz jelde görülen LACK genine ait bantlar bistüri ile dikkatli bir şekilde kesilerek 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
2. Tüp içerisindeki jel miktarı hassas terazi ile ölçülmüştür. Kit içerisinde yer alan membran bağlama solüsyonundan jel ağırlığına göre 1 mg jele 3 ml solüsyon olacak şekilde membran bağlama solüsyonun eklenmiştir.
3. Agaroz jel tamamen eriyinceye kadar ısı bloğu içerisinde 50 °C'de tutulmuş ve belirli aralıklarla vortekslenmiştir.
4. Kit içerisindeki filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
5. Tamamen erimiş olan karışım filtrasyon kolonuna aktarılmıştır. 13000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik yeni bir tüpe alınmış ve süzüntü atılmıştır. Bu basamak tüm karışım filtrasyon kolonundan geçirilene kadar tekrar edilmiştir.
6. Filtrasyon kolonuna 700 µl membran yıkama solüsyonu eklenmiş ve 13000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik yeni bir tüpe alınmıştır ve süzüntü atılmıştır.
7. Filtrasyon kolonuda kalan yıkama solüsyonunu uzaklaştırmak amacıyla boş olarak 13000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik yeni bir tüpe alınmış ve süzüntü atılmıştır.
8. Filtrasyon kolonunun membran bölgesine 50 µl elüsyon buffer eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dk. bekletildikten sonra 13000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
9. Elde edilen saflaştırılmış ürün NanoDrop 2000c-UV vis spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) cihazıyla ölçülmüştür.
10. Saflaştırılmış ürün klonlama işlemine kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.3. LACK Geninin pJET1/2 Plazmidine Klonlanması

PCR ürününün klonlanmasında CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılmış ve kit protokülünde yer alan aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

1. Klonlama reaksiyonu için 10 µl reaksiyon buffer, 1 µl DNA blunting enzim, 1 µl PCR ürününden oluşan 18 µl'lik karışım hazırlanmıştır.
2. Karışım 3-5 sn. vortekslenip santrifüj edildikten sonra 70 °C'de 5 dk. inkübe edilmiştir.
3. 70 °C'den alınarak buzlu suya konulmuştur.
4. Üzerine 1µl pJET1.2/blunt Cloning Vector (50ng/µl) (Şekil 3.1) ve 1 µl T4 DNA Ligaz eklenip 20 µl'ye tamamlanmıştır.
5. Karışım 3-5 sn. vortekslenmiştir ve oda sıcaklığında 5 dk. bekletildikten sonra 5 µl'si transformasyon için kullanılmıştır.
6. Kalan reaksiyon ürünü -20 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. pJET1.2/blunt (Thermo Scientific, ABD) vektör haritası (2972 bp.).

3.4.4. Rekombinant Plazmidin Kompetan Hücrelere Transformasyonu

Rekombinant plazmidin transformasyonu için kompetan hücre olarak OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* hücreleri (Invitrogen, ABD) kullanılmıştır. Kit protokolünde yer alan aşağıdaki basamaklar yapılmıştır:

1. -80 °C’de muhafaza edilen bir vial One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, ABD) kompetan hücre içeren tüp, buz içerisine alınarak çözülmesi beklenmiştir.
2. 3 µl’lik ligasyon ürünü, buz içerisinde bekletilen 100 µl OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* hücrelerine (Invitrogen, ABD) eklenmiştir.
3. Karışım buz içerisinde 30 dk. inkübe edilmiştir.
4. Karışım 42 °C’ye ayarlanmış su banyosu içerisinde 30 sn. bekletildikten sonra hızlı bir şekilde tekrar buz içerisine alınmıştır.
5. Buz içerisinde 1 dk. bekletilerek rekombinant plazmidin transformasyonu sağlanmıştır.
6. Üzerine oda sıcaklığına ısıtılmış 250 µl SOC sıvı besiyeri eklenmiştir.
7. Transformasyon karışımı inkübatörlü çalkalayıcı içerisinde 225 rpm.’de 37 °C’de 1,5 saat inkübe edilmiştir.
8. SOC sıvı besiyeri ikiye bölünerek ampisilinli LB katı besiyerine ekilmiş ve pleytler 37 °C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
9. LB katı besiyerinde koloni gelişimi gözlemlendikten sonra besiyerindeki koloniler numaralandırılmıştır.

3.4.5. Klonlamanın Doğrulanması

Ampisilinli katı besiyeri içeren pleytler 37 °C’de bir gece inkübasyondan sonra kontrol edilerek kolonilerin oluşumu tespit edilmiştir. Inkübasyon sonrası oluşan bu kolonilerin rekombinant pJET1.2+LACK plazmidini içerip içermediği PCR tarama, miniprep-PCR ve DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır.

3.4.5.1. PCR Tarama ile Doğrulama

LB katı besiyerinde oluşan kolonilerin rekombinant pJET1.2+LACK plazmidini içerip içermediğini tespit etmek için öncelikle PCR tarama yapılmıştır. PCR tarama için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

1. 0.5 ml'lik PCR tüpleri içerisinde 12,5 µl PCR 2x master-mix (GeneAll Biotechnology, G. Kore), 1 µl LiLACK F primeri, 1 µl LiLACK R primeri ve 9,5 µl distile su içeren karışım hazırlanmıştır.
2. Tüpler numaralandırıldıktan sonra LB katı besiyerinde üreyen numaralandırılmış kolonilerden steril ortamda pipet ucu ile alınan örnekler, tüplerdeki karışımlara bulaştırılmıştır.
3. Bölüm 3.4.1. deki protokol kullanılarak PCR kurulmuştur.
4. PCR ürünü, etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve jel ChemiDoc Mp görüntüleme cihazı (BioRad, Almanya) ile görüntülenmiştir.

3.4.5.2. Plazmid DNA PCR Analizi ile Doğrulama

Kolonilerde pJET1.2+LACK rekombinant plazmidinin varlığını doğrulamak için miniprep yapılmıştır. Miniprep işleminde EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kit BS413 (BioBASIC, Kanada) basamakları aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

1. Steril kabin içerisinde LB katı besiyerindeki kolonilerden pipet ucu yardımı ile alınarak 50 ml'lik falkon tüpü içerisinde 10 ml ampisilinli LB sıvı besiyerine ekim yapılmıştır.
2. Besiyeri inkübatörlü çalkalayıcı üzerinde 37 °C'de 225 rpm.'de bir gece inkübe edilmiştir.
3. Elde edilen 10 ml kültür 12.000 rpm.'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
4. Üst sıvı atıldıktan sonra oluşan pelet üzerine önceden RNAaz ilave edilmiş olan 100 µl solüsyon-I eklenmiştir. Pelet resüspanse edilip karışım oda sıcaklığında 1 dk. bekletilmiştir.
1. Karışım üzerine oda sıcaklığına ısıtılmış 200 µl solüsyon-II eklenmiştir. Tüp birkaç defa alt-üst edilerek karıştırılmış ve oda sıcaklığında 1 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Mavi renkli homojen bir karışım oluşmasına dikkat edilmiştir.

2. Karışıma 350 µl oda sıcaklığındaki solüsyon-III ilave edilmiştir. Tüp nazıkçe karıştırılmış ve oda sıcaklığında 1 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Beyaz renkli ve akışkan olmayan bir çökelti oluşuncaya kadar beklenmiştir.
5. Karışım 12.000 rpm.'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Oluşan berrak üst sıvı çökelti karışmamasına özen gösterilerek toplanmış ve kit içerisindeki filtrasyon kolonuna alınmıştır.
6. Filtrasyon kolonu 2 ml'lik toplama bir tüpüne alınarak 10.000 rpm.'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
7. Süzüntü atılarak toplama tüpü boşaltılmış ve filtrasyon kolonu tekrar tüpe yerleştirilmiştir.
8. Filtrasyon kolunu üzerine daha önceden %96'lık etanol eklenmiş olan 750 µl yıkama solüsyonu eklenmiştir ve 10.000 rpm.'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
9. Süzüntü atılarak toplama tüpü boşaltılmış ve filtrasyon kolonu tekrar tüpe yerleştirilmiştir.
10. Üzerine %96'lık etanol eklenmiş olan 750 µl yıkama solüsyonu eklenmiş ve 10.000 rpm.'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
11. Süzüntü atılarak toplama tüpü boşaltılmıştır ve filtrasyon kolonu tekrar tüpe yerleştirilmiştir.
12. Filtrasyon kolonuda kalan yıkama solüsyonunu uzaklaştırmak amacıyla boş olarak 10.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
13. Filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve süzüntü atılmıştır.
14. Filtrasyon kolonunun membran bölümüne gelecek şekilde 50 µl elüsyon buffer eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 dk. inkübe edildikten sonra sonra 10.000 rpm.'de 2 dk. santrifüj edilerek rekombinant plazmid elde edilmiştir.
15. Elde edilen saflaştırılmış rekombinant plazmid miktarı NanoDrop 2000c-UV vis spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) cihazıyla ölçülmüştür.
16. Miniprep ile elde edilen rekombinant plazmid DNA'nın 5'er µl'si alınarak etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüştür ve Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazıyla görüntülenmiştir (Carestream, ABD).
17. Görüntülenen rekombinant plazmidlerin hedef geni içerip içermediğini anlamak için Bölüm 3.4.1.'de verilen protokol kullanılarak PCR kurulmuştur. PCR

kurulurken kalıp DNA olarak miniprep ile elde edilen rekombinant plazmidten 1/10 oranında sulandırılarak 1 µl kullanılmıştır.

18. PCR ürünü, etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve Gel ChemiDoc Mp Jel görüntüleme cihazıyla (BioRad, Almanya) görüntülenmiştir (Carestream, ABD).
19. Kalan rekombinant plazmid sub-klonlama işlemine kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.5.3. DNA Dizi Analizi ile Doğrulama

Elde edilen rekombinant plazmid içerisinde klonlanan *L. infantum* LACK geninin varlığı ve dizisi, DNA dizi analizi yöntemi ile doğrulanmıştır. DNA dizi analizi için PCR sonucu elde edilen %1,5'luk agaroz jel GeneAll Expin Combo GP-Gel PCR Purification Kit (GeneAll Biotechnology, G. Kore) protokolüne göre saflaştırılmıştır. Dizi analizi BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Sti. (Ankara, Türkiye) firmasından hizmet satın alma yoluyla gerçekleştirilmiştir. Firma tarafından Big Dye Cycle Sequencing v3.1 kit (AppliedBiosystems, ABD) kullanılmış ve sonuçlar otomatik DNA dizi analiz cihazında (ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer, ABD) analiz edilmiştir. Dizi analizi F ve R primerleri ile 2 defa gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen DNA dizi sonuçları Chromas v.1.45 (ConorMcCarty School of Science Griffith University, Avustralya) programı ile incelendi. F ve R dizi analiz sonuçları Geneious v10.0.7 (Biomatters, ABD) (74) programına girilerek sekans hizalaması yapılmıştır ve *L. infantum* LACK genine ait konsensüs dizi elde edilmiştir.

L. infantum LACK geni DNA dizi analiz sonucu <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> internet adresinde yer alan web tabanlı BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sistemine girilerek GenBank veri tabanındaki mevcut DNA dizileri ile karşılaştırılmıştır.

L. infantum LACK geninin kodladığı LACK proteininin 3 boyutlu konfirmasyonunu elde etmek amacıyla DNA dizisi <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 sistemine yüklenmiştir. Elde edilen veri Jmol (open-source Java viewer) programında işlenerek görüntülenmiştir.

3.5. KMP-11 Geninin PCDNA3.1 Plazmitine Klonlanması

3.5.1. KMP-11 Geni Primerleri ve PCR

Leishmania infantum KMP-11 geninin memeli hücrelerinde ekspresyon vektörü olarak kullanılan ve multi-antijenik DNA aşısı için uygun bir vektör olan pcDNA3.1 plazmidine klonlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla PCR reaksiyonunda KU379565 GenBank numaralı dizi referans alınarak tasarlanan *L. infantum* KMP-11 genine spesifik aşağıdaki primerler kullanılmıştır:

LiKMP-11 F; (5'- GAAATGGCCACCACGTACG-3')

LiKMP-11 R; (5'- TTACTTGGATGGGTACTGCGCA- 3')

PCR reaksiyonu için 12,5 µl Master mix (GeneAll Biotechnology, G. Kore), 2 µl genomik DNA ve 1 µl LiKMP-11 F (20 pmol) ve 1µl LiKMP-11 R (20 pmol) primerlerinden oluşan toplam 25 µl'lik karışım hazırlanmıştır. 95 °C de 5 dk.'lık ön ısıtma ile başlayan sırasıyla 95 °C de 1 dk. denatürasyon, 62 °C de 1 dk. bağlanma, 72 °C de 1 dk. uzamadan oluşan 35 döngü sonrası 72 °C'de 15dk.'lık son uzama ile biten PCR programı kullanılmıştır. Elde edilen 279 bp. uzunluğundaki PCR ürünü, etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüştür ve ChemiDoc Mp Imaging System (Bio-Rad, ABD) cihazıyla görüntülenmiştir.

3.5.2. KMP-11 Geni PCR Ürününün Saflaştırılması

PCR ürününün saflaştırılması için GeneAll Expin Combo GP - Gel and PCR Purification Kit (GeneAll Biotechnology, G. Kore) protokolünde yer alan aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

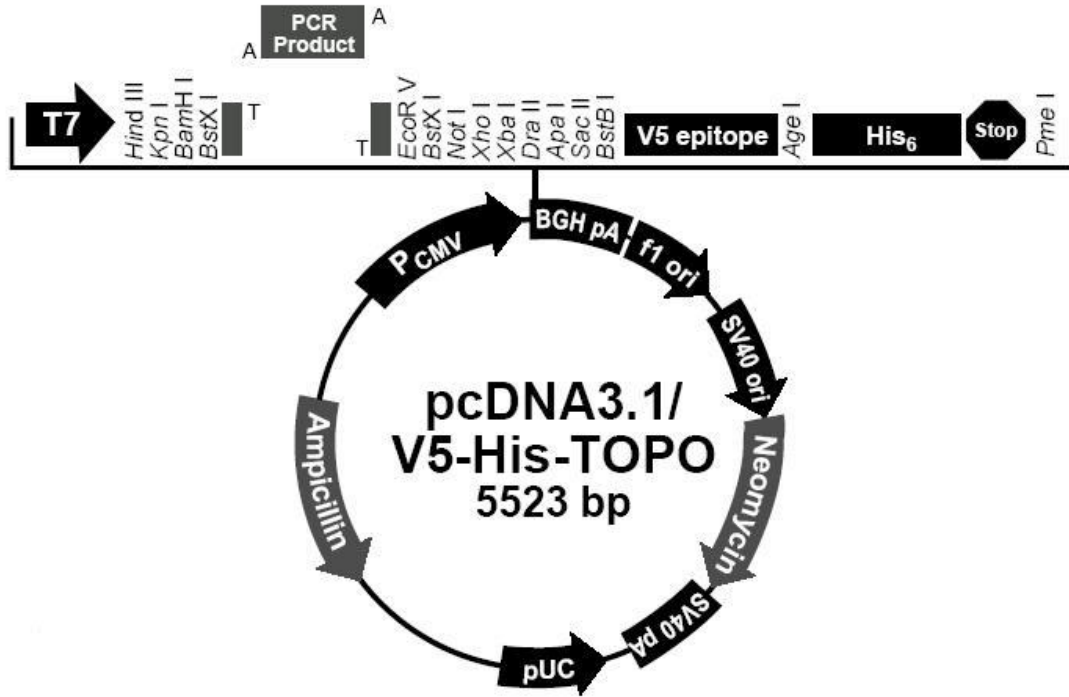
1. %1,5'luk agaroz jelde görülen LACK genine ait bantlar bistüri ile dikkatli bir şekilde kesilerek 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
2. Tüp içerisindeki jelin ağırlığı hassas terazi ile tartılmıştır. Kit içerisinde yer alan membran bağlama solüsyonundan jel ağırlığına göre 1 mg jele 3 ml solüsyon olacak şekilde eklenmiştir.
3. Agaroz jel tamamen eriyinceye kadar ısı bloğu içerisinde 50 °C'de tutulmuş ve belirli aralıklarla vortekslenmiştir.

4. Kit içindeki filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
5. Tamamen erimiş olan karışım filtrasyon kolonuna aktarılmıştır. 13000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik yeni bir tüpe alınmış ve süzüntü atılmıştır. Bu basamak tüm karışım filtrasyon kolonundan geçirilene kadar tekrar edilmiştir.
6. Filtrasyon kolonuna 700 µl membran yıkama solüsyonu eklenmiş ve 13000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik yeni bir tüpe alınmış ve süzüntü atılmıştır.
7. Filtrasyon kolonuda kalan yıkama solüsyonunu uzaklaştırmak amacıyla boş olarak 13000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik yeni bir tüpe alınmış ve süzüntü atılmıştır.
8. Filtrasyon kolonunun membran bölgesine 50 µl elüsyon buffer eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dk. bekletildikten sonra 13000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
9. Elde edilen saflaştırılmış ürün NanoDrop 2000c-UV vis spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) cihazıyla ölçülmüştür.
10. Saflaştırılmış ürün klonlama işlemine kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.5.3. KMP-11 Geninin pcDNA3.1/V5-his TOPO Plazmidine Klonlanması

Agaroz jelden saflaştırılmış *L. infantum* KMP-11 PCR ürününün klonlanmasında pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] ekspresyon plazmidi (Invitrogen, ABD) (Şekil 3.2) ve bu plazmide ait kit protokolü kullanılmıştır. Kit protokolündeki basamaklar aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

1. 0.5 ml'lik PCR tüpü içerisine 1 µl saflaştırılmış KMP-11 PCR ürünü, 1 µl tuz solüsyonu ve 3 µl steril su eklenerek toplam 5 µl'lik karışım hazırlanmıştır.
2. Karışımın üzerine 1 µl pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] vektörü eklenerek düşük hızda 3-5 sn. vortekslenmiştir.
3. Karışım oda sıcaklığında 15 dk. inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.2. pcDNA3.1/V5-his TOPO® (Invitrogen, ABD) vektör haritası (5523 bp.).

Bu reaksiyon sonucunda KMP-11 geninin pcDNA3.1/V5-his TOPO plazmidine klonlanması tamamlanmış ve elde edilen rekombinant plazmidin kompetan *E. coli* hücrelerine transformasyonu basamağına geçilmiştir.

3.5.4. Rekombinant Plazmidin Kompetan Hücrelere Transformasyonu

pcDNA3.1+KMP-11 rekombinant plazmidinin transformasyonu için kompetan hücre olarak OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* hücreleri (Invitrogen, ABD) kullanılmıştır. Kit protokolünde yer alan basamaklar modifiye edilerek aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

1. -80 °C’de muhafaza edilen ve One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, ABD) içeren tüp buz içerisine alınmıştır.
2. Kompetan hücrelerin çözülmesi için 30 dk. beklenmiştir.
3. 100 µl *E. coli* kompetan hücre tüpüne 2 µl ligasyon ürünü eklenmiştir.
4. Karışım buz içerisinde 30 dk. inkübe edilmiştir.
5. Karışım 42 °C’ye ayarlanmış su banyosu içerisinde 30 sn. bekletildikten sonra hızlı bir şekilde buz içerisine alınmıştır.

6. Buz içerisinde 1 dk. bekletilerek rekombinant plazmidin transformasyonu sağlanmıştır.
7. Tüp içerisine oda sıcaklığına ısıtılmış 250 µl SOC sıvı besiyeri eklenmiştir.
8. SOC sıvı besiyeri eklenmiş karışım inkübatörlü çalkalayıcı içerisinde 225 rpm.'de 37 °C'de 1,5 saat inkübe edilmiştir.
9. SOC sıvı besiyeri ikiye bölünerek ampisilinli LB katı besiyeri bulunan iki pleyte ekilmiş ve 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
10. LB katı besiyerinde koloni gelişimi gözlemlendikten sonra besiyerindeki koloniler numaralandırılmıştır.

3.5.5. Klonlamanın Doğrulanması

37 °C'de bir gece inkübasyon sonrası gözlenen kolonilerde rekombinant pcDNA3.1+KMP-11 plazmidinin varlığı PCR tarama, miniprep-PCR ve DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır.

3.5.5.1. PCR Tarama ile Doğrulama

LB katı besiyerinde oluşan kolonilerin rekombinant pcDNA3.1+KMP-11 plazmidini içerip içermediğini tespit etmek için öncelikle PCR tarama yapılmıştır. PCR Tarama için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

1. 0.5 ml'lik PCR tüpleri içerisine 12,5 µl PCR 2x master-mix (GeneAll Biotechnology, G. Kore), 1 µl LiKMP-11 F primeri, 1 µl LiKMP-11 R primeri ve 9,5 µl distile su eklenerek PCR karışımı hazırlanmıştır.
2. Tüpler numaralandırıldıktan sonra LB katı besiyerinde üreyen kolonilerden steril kabinde pipet ucu ile alınan örnekler tüplerdeki karışımlara eklenmiştir.
3. Bölüm 3.5.1. deki protokol kullanılarak PCR kurulmuştur.
5. PCR ürünü, etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve jel ChemiDoc Mp görüntüleme cihazı (BioRad, Almanya) ile görüntülenmiştir.

3.5.5.2. Plazmid DNA PCR Analizi ile Doğrulama

Kolonilerde pcDNA3.1+KMP-11 rekombinant plazmidinin varlığını doğrulamak için transforme hücrelerden plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Pürifikasyon işleminde EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kit BS413 (BioBASIC, Kanada) kullanılmıştır. Kit protokolü aşağıdaki şekilde modifiye edilerek uygulanmıştır:

1. LB katı besiyerindeki kolonilerden steril kabinde pipet ucu ile alınarak 50 ml'lik falkon tüpü içerisinde 10 ml ampisilinli LB sıvı besiyerine ekim yapılmıştır.
2. Besiyeri inkübatörlü çalkalayıcı üzerinde 37 °C'de 225 rpm.'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
3. Elde edilen 10 ml kültür 12.000 rpm.'de 2 dk. santrifüj edilerek pelet elde edilmiştir.
4. Pelet üzerindeki üst sıvı atıldıktan sonra tüpe RNAaz içeren 100 µl solüsyon-I eklenmiştir. Pelet resüspanse edilip karışım oda sıcaklığında 1 dk. inkübe edilmiştir.
3. Karışım üzerine 200 µl solüsyon-II eklenmiştir. Tüp birkaç defa alt-üst edilerek homojenize edilmiş ve oda sıcaklığında 1 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Mavi renkli homojen bir karışım oluşumu gözlenmiştir.
4. Karışıma 350 µl solüsyon-III eklenmiştir. Tüp dikkatli bir şekilde karıştırılmış ve oda sıcaklığında 1 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Beyaz renkli ve akışkan olmayan bir çökelti oluşuncaya kadar beklenmiştir.
5. Karışım 12.000 rpm.'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Oluşan berrak üst sıvı çökelti karışmamasına özen gösterilerek toplanmış ve kit içerisindeki filtrasyon kolonuna alınmıştır.
6. Filtrasyon kolonu 2 ml lik toplama bir tüpüne alınarak 10.000 rpm.'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
7. Süzüntü atılarak toplama tüpü boşaltılmış ve filtrasyon kolonu tekrar tüpe yerleştirilmiştir.
8. Filtrasyon kolunu üzerine daha önceden %96'lık etanol eklenmiş olan 750 µl yıkama solüsyonu eklenmiş ve 10.000 rpm.'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
9. Süzüntü atılarak toplama tüpü boşaltılmış ve filtrasyon kolonu tekrar tüpe yerleştirilmiştir.

10. Üzerine %96'lık etanol eklenmiş olan 750 µl yıkama solüsyonu eklenmiş ve 10.000 rpm.'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
11. Süzüntü atılarak toplama tüpü boşaltılmış ve filtrasyon kolonu tekrar tüpe yerleştirilmiştir.
12. Filtrasyon kolonuda kalan yıkama solüsyonunu uzaklaştırmak amacıyla boş olarak 10.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
13. Filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve süzüntü atılmıştır.
14. Filtrasyon kolonunun membran bölümüne gelecek şekilde 50 µl elüsyon buffer eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 dk. inkübe edildikten sonra sonra 10.000 rpm.'de 2 dk. santrifüj edilerek rekombinant plazmid elde edilmiştir.
15. Elde edilen saflaştırılmış rekombinant plazmid miktarı NanoDrop 2000c-UV vis spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) cihazıyla ölçülmüştür.
16. Miniprep ile elde edilen rekombinant plazmid DNA'nın 5'er µl'si alınarak etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazıyla görüntülenmiştir (Carestream, ABD).
17. Görüntülenen rekombinant plazmidlerin hedef geni içerip içermediğini anlamak için Bölüm 3.5.1.'de verilen protokol uygulanarak PCR kurulmuştur. PCR kurulurken kalıp DNA olarak miniprep ile elde edilen rekombinant plazmidten 1/10 oranında sulandırılarak 1 µl kullanılmıştır.
18. PCR ürünü, etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve jel ChemiDoc Mp cihazında (BioRad, Almanya) görüntülenmiştir (Carestream, ABD).
19. Kalan rekombinant plazmid -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.5.5.3. DNA Dizi Analizi ile Doğrulama

Elde edilen rekombinant plazmid içerisinde klonlanan *L. infantum* KMP-11 geninin varlığı ve dizisi, DNA dizi analizi yöntemi ile doğrulanmıştır. DNA dizi analizi için PCR sonucu elde edilen %1,5'luk agaroz jel GeneAll Expin Combo GP-Gel PCR Purification Kit (GeneAll Biotechnology, G. Kore) protokolüne göre saflaştırılmıştır. Dizi analizi BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Sti. (Ankara, Türkiye) firmasından hizmet satın alma yoluyla gerçekleştirilmiştir. Firma tarafından Big Dye Cycle Sequencing v3.1 kit (AppliedBiosystems, ABD) kullanılmış ve sonuçlar otomatik DNA

dizi analiz cihazında (ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer, ABD) analiz edilmiştir. Dizi analizi F ve R primerleri ile 2 defa gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen nükleotid sekansları Chromas v.1.45 (ConorMcCarty School of Science Griffith University, Avustralya) programı ile incelendi. F ve R dizi analiz sonuçları Geneious v10.0.7 (Biomatters, ABD) (74) programına girilerek sekans hizalaması yapılmış ve *L. infantum* KMP-11 genine ait konsensüs dizi elde edilmiştir.

L. infantum KMP-11 geni DNA dizi analiz sonucu <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> internet adresinde yer alan web tabanlı BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sistemine girilerek GenBank veri tabanındaki mevcut DNA dizileri ile karşılaştırılmıştır.

L. infantum KMP-11 geninin kodladığı LACK proteininin 3 boyutlu konfirmasyonunu elde etmek amacıyla DNA dizisi <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 sistemine yüklenmiştir. Elde edilen veri Jmol (open-source Java viewer) programı ile görüntülenmiştir.

3.6. LACK Geninin pCDNA3.1+KMP-11 Rekombinant Plazmidine SUB-Klonlanması

Bu basamakta, LACK geninin Bölüm 3.4.'de elde edilen pJet1.2+LACK plazmidinden *HINDIII* ve *BAMHI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek çıkarılması ve Bölüm 3.5.'de elde edilen pcDNA3.1+KMP-11 plazmidine sub-klonlaması yapılmıştır.

3.6.1. LACK Geninin Rekombinant Plazmidden Restriksiyon Enzimleri ile Çıkarılması

LACK geninin rekombinant plazmidden kesilerek çıkarılması için *HINDIII*-HFTM Restriksiyon Endonukleaz (NEB, İngiltere) ve *BamHI*-HFTM Restriksiyon Endonukleaz (NEB, İngiltere) kullanılmıştır. Restriksiyon ürününün agaroz jelden saflaştırılması basamağında zarar görmesini engellemek ve ürün miktarını arttırmak amacıyla *HINDIII* ve *BamHI* enzimleriyle aynı anda kesim yapılmıştır. Bu amaçla reaksiyon buffer olarak

CutSmart Restriksiyon Endonukleaz Buffer (NEB, İngiltere) kullanılmıştır. Kit protokolü aşağıdaki şekilde modifiye edilerek uygulanmıştır:

1. 0.5 ml'lik PCR tüpü içerisine 50 µl rekombinant pJet1.2-LACK plazmidi (15.000 ng), 15 µl *HINDIII*-HF™ restriksiyon enzimi (NEB, İngiltere), 15 µl *BamHI*-HF™ restriksiyon enzimi, 15 µl CutSmart buffer (NEB, İngiltere) ve 60 µl steril su eklenerek toplam 100 µl'lik karışım hazırlanmıştır.
2. Karışım 37 °C'de bir saat inkübe edilmiştir.
3. İnkübe edilen ürün etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jele yüklenmiş ve elektroforez sonrası BioRad ChemiDoc Mp görüntüleme cihazında (BioRad, Almanya) görüntülenmiştir.
4. Agaroz jelde LACK geninin ve pJet1.2 plazmidinin lineer olarak görünümü doğrulanmıştır.
5. Agaroz jelde görülen LACK genine ait bantlar bistüri ile dikkatli bir şekilde kesilerek 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
6. Restriksiyon ürününün saflaştırılması için GeneAll Expin Combo GP - Gel and PCR Purification Kit (GeneAll Biotechnology, G. Kore) protokolünde yer alan basamaklar uygulanmıştır.
7. *HINDIII* ve *BamHI* yapışkan bölgelerini içeren LACK geni ürünü sub-klonlama işlemine kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.6.2. pcDNA3.1+KMP-11 Rekombinant Plazmidinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi

pcDNA3.1+KMP-11 rekombinant plazmidinin sub-klonlama için lineer hale getirilmesi için *HINDIII*-HF™ Restriksiyon Endonukleaz (NEB, İngiltere) ve *BamHI*-HF™ Restriksiyon Endonukleaz (NEB, İngiltere) kullanılmıştır. Lineer hale getirilen rekombinant plazmid ürününün agaroz jelden saflaştırılması basamağında zarar görmesini engellemek ve ürün miktarını arttırmak amacıyla *HINDIII* ve *BamHI* enzimleriyle aynı anda kesim yapılmıştır. Bu amaçla reaksiyon buffer olarak CutSmart Restriksiyon Endonukleaz Buffer (NEB, İngiltere) kullanılmıştır. Kit protokolü aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

1. 0.5 ml'lik PCR tüpü içerisine 50 µl rekombinant pcDNA3.1+KMP-11 plazmidi (15.000 ng), 15 µl *HINDIII*-HF™ restriksiyon enzimi (NEB, İngiltere), 15 µl *BamHI*-HF™ restriksiyon enzimi, 15 µl CutSmart buffer (NEB, İngiltere) ve 60 µl steril su eklenerek toplam 100 µl'lik karışım hazırlanmıştır.
2. Karışım 37 °C'de bir saat inkübe edilmiştir.
3. İnkübe edilen ürün etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jele yüklenmiş ve elektroforez sonrası BioRad ChemiDoc Mp görüntüleme cihazında (BioRad, Almanya) görüntülenmiştir.
4. Agaroz jelde pcDNA3.1+KMP-11 plazmidinin lineer olarak görünümü doğrulanmıştır.
5. Agaroz jelde görülen pcDNA3.1+KMP-11 plazmidine ait bantlar bistüri ile dikkatli bir şekilde kesilerek 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
6. Restriksiyon ürününün saflaştırılması için GeneAll Expin Combo GP - Gel and PCR Purification Kit (GeneAll Biotechnology, G. Kore) protokolünde yer alan basamaklar uygulanmıştır.
7. *HINDIII* ve *BamHI* yapışkan bölgelerini içeren lineer pcDNA3.1+KMP-11 plazmidin ürünü sub-klonlama işlemine kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.6.3. pcDNA3.1+KMP-11 ve LACK DNA Parçalarının Ligasyonu

HINDIII ve *BamHI* restriksiyon enzimleriyle kesilen ve yapışkan uçlar içeren LACK geni ve lineer pcDNA3.1+KMP-11 plazmidinin ligasyonu için T4 DNA Ligaz (NEB, İngiltere) kiti kullanılmıştır. Kit protokolü aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

1. Buz içerisine alınan 0.5 ml'lik PCR tüpü içerisine 2 µl T4 DNA Ligase Buffer (10X), 1 µl vektör DNA (pcDNA3.1+KMP-11) (50 ng.) (0.020 pmol), 1 µl insert DNA (LACK) (37.5 ng) (0.060 pmol) ve 15 µl distile su eklenmiştir.
2. Karşıma son olarak 1 µl T4 DNA Ligaz (NEB, İngiltere) eklenerek toplamda 20 µl ligasyon karışımı elde edilmiştir.
3. Reaksiyon karışımı birkaç kez pipetleme yapılarak nazikçe karıştırılmıştır.
4. Karışım 16 °C'de bir gece inkübe edilmiştir.
5. Karışım enzim inaktivitesi için 65 °C'de 10 dk. bekletilmiştir.
6. Buz üzerine alınan karışım transformasyon işlemine kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.6.4. Multi-antijenik Rekombinant Plazmidin Kompetan Hücrelere Transformasyonu

Multi-antijenik rekombinant pcDNA3.1+LACK+KMP-11 plazmidinin transformasyonu için kompetan hücre olarak OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* hücreleri (Invitrogen, ABD) kullanılmıştır. Kit protokolünde yer alan aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

1. -80 °C'den alınan ve bir vial One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, ABD) içeren tüp buz içerisinde alınarak çözülmesi beklenmiştir.
2. 2 µl'lik ligasyon ürünü, buz içerisinde çözülen 100 µl OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* hücrelerine (Invitrogen, ABD) dikkatlice eklenmiştir.
3. Karışım buz içerisinde 30 dk. inkübe edilmiştir.
4. Karışım 42 °C'ye ayarlanmış su banyosu içerisinde 30 sn. bekletildikten sonra tekrar hızlı bir şekilde buz içerisinde alınmıştır.
5. Karışım buz içerisinde 1 dk. bekletilmiş ve rekombinant plazmidin kompetan hücrelere transformasyonu sağlanmıştır.
6. Tüp içerisinde oda sıcaklığında 250 µl SOC sıvı besiyeri eklenmiştir.
7. Transformasyon karışımı inkübatörlü çalkalayıcı içerisinde 225 rpm.'de 37 °C'de 1,5 saat inkübe edilmiştir.
8. SOC sıvı besiyeri ikiye bölünerek ampicilinli LB katı besiyerlerine ekilmiş ve pleytler 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
9. LB katı besiyerinde koloni gelişimi gözlemlendikten sonra besiyerindeki koloniler numaralandırılmıştır.

3.6.5. Klonlamanın Doğrulanması

Pleytler 37 °C'de bir gece inkübasyondan sonra kontrol edilmiştir ve üzerinde koloni oluşumu gözlenmiştir. Oluşan kolonilerin rekombinant pcDNA3.1+LACK+KMP-11 plazmidini içerip içermediği PCR tarama, miniprep-PCR ve DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır.

3.6.5.1. PCR Tarama ile Doğrulama

LB katı besiyerinde oluşan kolonilerin multi-antijenik rekombinant pcDNA3.1+LACK+KMP-11 plazmidini içerip içermediğini tespit etmek için öncelikle PCR tarama yapılmıştır. PCR Tarama için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

1. 0.5 ml'lik PCR tüpleri içerisinde 12,5 µl PCR 2x master-mix (GeneAll Biotechnology, G. Kore), 1 µl LiLACK F primeri, 1 µl LiLACK R primeri ve 9,5 µl distile su içeren 25 µl karışım hazırlanmıştır.
2. 0.5 ml'lik PCR tüpleri içerisinde 12,5 µl PCR 2x master-mix (GeneAll Biotechnology, G. Kore), 1 µl LiKMP-11 F primeri, 1 µl LiKMP-11 R primeri ve 9,5 µl distile su içeren 25 µl karışım hazırlanmıştır.
3. Tüpler numaralandırıldıktan sonra LB katı besiyerinde üreyen numaralandırılmış kolonilerden steril ortamda pipet ucu ile alınan örnekler, tüplerdeki karışımlara bulaştırılmıştır.
4. LACK ve KMP-11 genlerine ait protokoller kullanılarak PCR kurulmuştur.
5. PCR ürünleri, etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüştür ve jel ChemiDoc Mp görüntüleme cihazı (BioRad, Almanya) ile görüntülenmiştir.

3.6.5.2. Miniprep ve PCR ile Doğrulama

Kolonilerde multi-antijenik rekombinant pcDNA3.1+LACK-KMP+11 plazmidinin varlığını doğrulamak için miniprep yapılmıştır. Miniprep işleminde EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kit BS413 (BioBASIC, Kanada) basamakları aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

1. Steril kabin içerisinde LB katı besiyerindeki kolonilerden pipet ucu yardımı ile alınarak 50 ml'lik falkon tüpü içerisinde 10 ml ampisilinli LB sıvı besiyerine ekim yapılmıştır.
2. Besiyeri inkübatörlü çalkalayıcı üzerinde 37 °C'de 225 rpm.'de bir gece inkübe edilmiştir.
3. Elde edilen 10 ml kültür 12.000 rpm.'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.

4. Üst sıvı atıldıktan sonra oluşan pelet üzerine önceden RNAaz eklenmiş olan 100 µl solüsyon-I eklenmiştir. Pelet resüspanse edilip karışım oda sıcaklığında 1 dk. bekletilmiştir.
5. Karışım üzerine oda sıcaklığına ısıtılmış 200 µl solüsyon-II eklenmiştir. Tüp birkaç defa alt-üst edilerek karıştırılmış ve oda sıcaklığında 1 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Mavi renkli homojen bir karışım oluşmasına dikkat edilmiştir.
6. Karışıma 350 µl oda sıcaklığındaki solüsyon-III ilave edilmiştir. Tüp nazıkçe karıştırılmış ve oda sıcaklığında 1 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Beyaz renkli ve akışkan olmayan bir çökelti oluşuncaya kadar beklenmiştir.
5. Karışım 12.000 rpm.'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Oluşan berrak üst sıvı çökelti karışmamasına özen gösterilerek toplanmış ve kit içerisindeki filtrasyon kolonuna alınmıştır.
6. Filtrasyon kolonu 2 ml lik toplama bir tüpüne alınarak 10.000 rpm.'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
7. Süzüntü atılatak toplama tüpü boşaltılmış ve filtrasyon kolonu tekrar tüpe yerleştirilmiştir.
8. Filtrasyon kolunu üzerine daha önceden %96'lık etanol eklenmiş olan 750 µl yıkama solüsyonu eklenmiştir ve 10.000 rpm.'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
9. Süzüntü atılatak toplama tüpü boşaltılmıştır ve filtrasyon kolonu tekrar tüpe yerleştirilmiştir.
10. Üzerine %96'lık etanol eklenmiş olan 750 µl yıkama solüsyonu eklenmiştir ve 10.000 rpm.'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
11. Süzüntü atılarak toplama tüpü boşaltılmıştır ve filtrasyon kolonu tekrar tüpe yerleştirilmiştir.
12. Filtrasyon kolonuda kalan yıkama solüsyonunu uzaklaştırmak amacıyla boş olarak 10.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
13. Filtrasyon kolonu 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve süzüntü atılmıştır.
14. Filtrasyon kolonunun membran bölümüne gelecek şekilde 50 µl elüsyon buffer eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 dk. inkübe edildikten sonra 10.000 rpm.'de 2 dk. santrifüj edilerek rekombinant plazmid elde edilmiştir.
15. Elde edilen saflaştırılmış rekombinant plazmid miktarı NanoDrop 2000c-UV vis spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) cihazıyla ölçülmüştür.

16. Miniprep ile elde edilen rekombinant plazmid DNA'nın 5'er µl'si alınarak etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazıyla görüntülenmiştir (Carestream, ABD).
17. Görüntülenen rekombinant plazmidlerin hedef genleri içerip içermediğini anlamak için LiLACK F, LiLACK R, LiKMP-11 F ve LiKMP-11 R primerleri kullanılarak PCR kurulmuştur.
18. PCR ürünleri, etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve Gel ChemiDoc Mp Jel görüntüleme cihazıyla (BioRad, Almanya) görüntülenmiştir (Carestream, ABD).
19. Kalan multi-antijenik rekombinant plazmid -20 °C 'de muhafaza edilmiştir.

3.6.5.3. DNA Dizi Analizi ile Doğrulama

Elde edilen rekombinant plazmid içerisinde klonlanan *L. infantum* LACK ve KMP-11 genlerinin varlığı ve dizileri, DNA dizi analizi yöntemi ile doğrulanmıştır. DNA dizi analizi için miniprep ve PCR sonrası %1,5'luk agaroz jelde edilen bantlar GeneAll Expin Combo GP-Gel PCR Purification Kit (GeneAll Biotechnology, G. Kore) protokolüne göre saflaştırılmıştır. Dizi analizi BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Sti. (Ankara, Türkiye) firmasından hizmet satın alma yoluyla gerçekleştirildi. Firma tarafından Big Dye Cycle Sequencing v3.1 kit (AppliedBiosystems, ABD) kullanılmıştır ve sonuçlar otomatik DNA dizi analiz cihazında (ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer, ABD) analiz edilmiştir. Dizi analizi LiLACK F, LiLACK R, LiKMP-11 F, LiKMP-11 R, pcDNA3.1 T7 Sequencing ve pcDNA3.1 BGH Reverse Sequencing primerleri ile 6 defa gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen DNA dizi sonuçları Chromas v.1.45 (ConorMcCarty School of Science Griffith University, Avustralya) programı ile incelenmiştir. Tüm primerlere ait analiz sonuçları Geneious v10.0.7 (Biomatters, ABD) (74) programına girilerek sekans hizalaması yapılmıştır ve LACK-KMP11 genlerine ait konsensüs diziler elde edilmiştir.

3.7. Rekombinant Protein Ekspresyonu

3.7.1. LACK+KMP-11 Genlerinin pET100 Vektörüne Yerleştirilmesi

LACK+KMP-11 PCR ürününü elde etmek için 0,2 µl Pfu DNA polimeraz (Bio-Basic Kanada), 5 µl 10x Pfu reaksiyon buffer (Bio-Basic Kanada), 4 µl 2,5 mM dNTP karışımı (Bio-Basic Kanada), 1 µl 10 pmol CACC ön bölgesi içeren LiLACK F1 primeri (5'- CACCATGAACTACGAGGGTCACC -3'), 1 µl 10 pmol KMP-11 R primeri (5'- TTA CTTGGATGGGTACTGCGCA- 3') ve 37,8 µl distile su ile toplam 50 µl'lik PCR karışımı hazırlanmıştır. PCR karışımlarına kalıp DNA olarak distile su ile 1/100 oranında seyreltilmiş olan pcDNA3.1+LACK+KMP-11 plazmitinden 1 µl eklenmiştir.

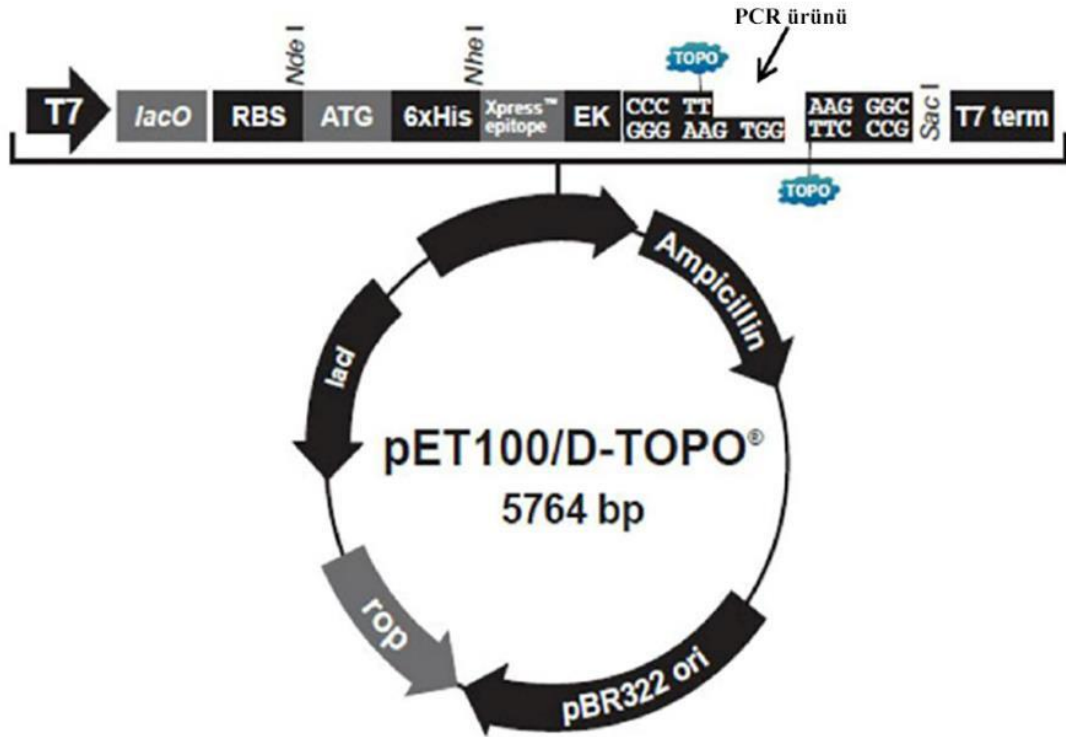
95 °C de 5 dk.'lık ön ısıtma ile başlayan sırasıyla 95°C de 2 dk. denatürasyon, 65 °C de 2 dk. bağlanma, 72 °C de 2 dk. uzamadan oluşan 35 döngü sonrası 72 °C'de 15 dk.'lık son uzama ile biten PCR programı kullanılmıştır. 1222 bp. uzunluğundaki PCR ürününün 5 µl'si etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve ChemiDoc Mp Imaging System (Bio-Rad, ABD) cihazıyla görüntülenmiştir. PCR ürünün saflığından emin olduktan sonra klonlama reaksiyonuna geçilmiştir.

Klonlama reaksiyonu için Champion pET100 Directional TOPO Expression Kit (Invitrogen, ABD) kullanılmıştır (Şekil 3.4). Klonlama reaksiyonunda kullanılan karışım aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

Klonlama reaksiyonu

PCR ürünü	4 µl
Tuz solüsyonu	1 µl
Steril su	0 µl
TOPO vektör	1 µl
Total volüm	6 µl

Klonlama reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 5 dk. inkübe edilerek rekombinant plazmid elde edilmiştir.



Şekil 3.3. Champion pET100 Directional TOPO (Thermo Scientific, ABD) vektör haritası (5764 bp.).

3.7.2. Multi-antijenik Rekombinant Plazmidin One Shot TOP10 Kompetan Hücrelerine Transformasyonu

Bu işlem için yukarıdaki şekilde elde edilen klonlama reaksiyonunun 3 µl'si kullanılmıştır.

1. Buz üzerinde ısıtılan 50 µl One Shot TOP10 kompetan *E. coli* (Invitrogen, ABD) vial içerisine 3 µl klonlama reaksiyon ürünü nazıkçe eklenmiştir. Tüpün dip kısmına hafifçe vurularak karışması sağlanmıştır.
2. Karışım buz üzerinde 30 dk. inkübe edilmiştir.
3. Karışım oda ısısına maruz kalmadan hızlı bir şekilde 42 °C'ye aktarılmış ve 2 dk. inkübe edilmiştir.
4. Karışım tekrar buz üzerine transfer edilerek 4 dk. inkübe edilmiştir.
5. Transformasyon karışımı üzerine oda sıcaklığında 250 µl SOC medium eklenmiş ve karıştırıcı üzerinde 37 °C'de 1,5 saat inkübe edilmiştir.

6. Transformasyon ürününün 100-200 µl'si oda sıcaklığına ısıtılmış ampisilinli LB agar pleytlere ekilerek 37 °C'de bir gece inkübe edilmiştir.

3.7.3. Klonlamanın Doğrulanması

Ampisilinli LB agar pleytlerinde oluşan her bir koloni, koloni kaybı olmaması için önce tek nokta ekimi ile çoğaltılmıştır. Sonrasında rekombinant plazmidin varlığı PCR ile doğrulanmıştır.

Bu işlem için 12.5 µl 2X PCR Master mix, 2 µl 20 pmol LiLACK F primeri, 2 µl 20 pmol KMP-11 R primeri ve 10.5 µl distile su ile toplam 25 µl'lik PCR karışımları hazırlanmıştır. PCR karışımlarına kalıp DNA olarak pipet ucu ile alınan koloniler ilave edilmiştir. 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 dk. uzamadan oluşan 35 döngü sonrası 72 °C'de 15 dk.'lık son uzama ile biten PCR programı kullanılmıştır. 1222 bp. uzunluğundaki PCR ürünü, etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve ChemiDoc Mp Imaging System (Bio-Rad, ABD) cihazıyla görüntülenmiştir.

3.7.4. Rekombinant pET100 Plazmid DNA İzolasyonu

PCR tarama ile pozitif olarak belirlenen koloniler ampisilin içeren 10 ml LB sıvı besiyerine ekilmiş ve 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Rekombinant plazmid DNA'sı High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Almanya) protokolünde yer alan basamaklar modifiye edilerek izole edilmiştir:

1. İzolasyona başlamadan önce kit içerisinde yer alan binding buffer buz üzerine alınmıştır.
2. Yaklaşık 5 ml *E. coli* kültürü 6000xg'de 30 sn. santrifüj edilmiştir.
3. Pelet, RNAaz eklenmiş 250 µl süspansiyon buffer ile resüspanse edilmiştir.
4. Resüspanse edilmiş pelet üzerine 250 µl lysis buffer eklenmiş ve 5-6 kez ters-düz edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında 5 dk. bekletilmiştir.
5. Karışıma 350 µl soğuk binding buffer eklenmiş ve buz içerisinde 5 dk. inkübe edilmiştir.

6. İnkübasyon sonrasında tüp 13500 rpm’de 10 dk. santrifüj edilmiş ve elde edilen üst sıvı kit içerisinde yer alan kolona aktarılmıştır. Kolon 13500 rpm’de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
7. Kolon üzerine 500 µl wash buffer I eklenmiş ve 13500 rpm’de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
8. Kolon üzerine 750 µl wash buffer II eklenmiş ve 13500 rpm’de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
9. Steril tüpe aktarılan kolona 50 µl elution buffer eklenmiş ve oda ısısında 2 dk. inkübe edilmiştir.
10. İnkübasyon sonrasında 13500 rpm’de 1 dk. santrifüj edilmiş ve plazmid DNA’sı izole edilmiştir.
11. Plazmid DNA miktarı NanoDrop 2000c Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) ile ölçülmüştür.

3.7.5. Multi-antijenik Rekombinant Plazmidin One Shot BL21 Star (DE3) Kompetan Hücrelerine Transformasyonu

LACK ve KMP-11 proteinlerinin eksprese edilebilmesi için rekombinant plazmidin prokaryotlarda protein ekspresyonuna uyumlu kompetan hücrelere transformasyonu yapılmıştır. Kompetan hücre olarak One Shot BL21 Star (DE3) (Invitrogen- ABD) *E. coli* hücreleri kullanılmıştır. pET100+LACK+KMP-11 rekombinant plazmidinin kompetan hücrelere transformasyonu aşağıdaki basamaklar uygulanarak yapılmıştır:

1. -80 °C’den alınan 50 µl hacim içerisindeki One Shot BL21 Star (DE3) (Invitrogen- ABD) *E. coli* hücreleri çözülmesi için yaklaşık 30 dk. buz üzerinde bekletilmiştir.
2. Tüp içerisine 5 µl pET100+LACK+KMP-11 plazmid DNA’sı eklenmiştir.
3. Karışım buz üzerinde 30 dk. inkübe edilmiştir.
4. Karışım 42 °C’de 1 dk. bekletilmiş ve hızlı bir şekilde tekrar buz üzerine transfer edilmiştir.

5. Buz içerisinde 4 dk. inkübe edilen karışım üzerine 250 µl SOC medium eklenmiş ve inkübatörlü çalkalayıcı içerisinde 37 °C’de 1,5 saat inkübe edilmiştir.
6. Transformasyon ürünü ampisilin içeren 10 ml LB sıvı besiyerine ekilerek 37 °C’de bir gece inkübe edilmiştir.

3.7.6. LACK+KMP-11 Füzyon Proteininin Ekspresyonu

10 ml’lik ampisilinli sıvı LB besiyeri içerisine rekombinant plazmidi içeren One Shot BL21 Star (DE3) (Invitrogen- ABD) *E. coli* hücrelerinin ekimi yapılmış ve bir gece inkübatörlü çalkalayıcı içerisinde 37 °C’de inkübe edilmiştir. Elde edilen 10 ml örnekten 500’er µl alınmış ve 10 ml’lik ampisilinli sıvı LB besiyeri içeren 2 tüpe tekrar ekilmiştir. Kültürler OD₆₀₀ değeri 0.5-0.8 olana kadar 37 °C’de yaklaşık 2 saat daha inkübe edilmiştir. Ardından her kültür 4 adet 5 ml’lik alt kültüre bölünmüştür.

Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ile indüklemeden önce kültürlerden 500 µl alınarak 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine konulmuştur. Tüpler 13000 rpm’de 1 dk. santrifüj edilmiş ve elde edilen peletler etiketlenerek -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Kültürlere son konsantrasyonu sıra ile 0,5 mM ve 1 mM olacak şekilde IPTG eklenmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılan tüpe ise IPTG eklenmemiştir. Dolayısıyla iki farklı IPTG konsantrasyonu ile indüklenmiş ve indüklenmemiş kültürler elde edilmiştir. 37 °C’de inkübasyona devam edilmiştir. Inkübasyon sürecinin 2,5., 4. ve 5,5. ve 7. saatlerinde her bir kültürden 500 µl örnek alınmış ve 13000 rpm’de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Elde edilen peletler etiketlenerek protein ekspresyon analizi için -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.7.7. LACK+KMP-11 Füzyon Proteininin Analizi

Rekombinant protein ekspresyonu sonucu elde edilen örnekler Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)’de yürütülmüştür. Örneklerden Western blot analizleri yapılarak rekombinant protein ekspresyonu tespit edilmiştir.

SDS-PAGE’de kullanılan solüsyonlar ve jelin hazırlanmasında aşağıdaki basamaklar takip edilerek yapılmıştır:

1. %30 akrilamid karışım hazırlanmıştır. 29 gr akrilamid + 1 gr NN metilen bisakrilamid 60 ml distile su içerisinde çözülmüştür. pH değeri ölçülerek 7 veya daha düşük olduğu kontrol edilmiştir. 0,45 µm'lik filtreden süzülerek oda ısısında ve karanlık ortamda muhafaza edilmiştir.
2. 1,5 M tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) (pH 8,8) hazırlanmıştır. 27,23 gr Tris baz 80 ml distile su içerisinde çözülmüştür. pH değeri HCl ile 8,8'e ayarlanmıştır distile su ile 150 ml'ye tamamlanarak +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
3. %10'luk amonyum persülfat hazırlanmıştır. 0,1 gr amonyum persülfat 1 ml distile su içerisinde çözülmüştür. Amonyum persülfat solüsyonunun jel hazırlanması sırasında taze olarak hazırlanmasına dikkat edilmiştir.
4. %10'luk Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) hazırlanmıştır. 10 gr SDS 100 ml distile su içerisinde çözülmüştür.
5. 1 M Tris (pH 6,8) hazırlanmıştır. 6 gr Tris baz 30 ml distile su içerisinde çözülmüş ve pH değeri 6,8'e ayarlanmıştır. Distile su ile 50 ml'ye tamamlanarak +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
6. Elde edilen solüsyonlar aşağıda verilen miktarlarda kullanılarak 2x SDS gel-loading buffer hazırlanmıştır ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Hazırlanan solüsyon 2 kat sulandırılarak kullanılmıştır.

1 M Tris (pH 6,8)	1,6 ml
%10 SDS	4 ml
Gliserol	2 ml
Beta-merkaptoetanol	1 ml
Brom fenol blue	4 mg
Distile su	1,4 ml

7. 5x Tris Glycine elektroforez buffer hazırlanmıştır. 7,5 gr Tris + 47 gr glisin 400 ml distile suda çözülmüştür. 25 ml %10'luk SDS eklenmiş ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır. Elde edilen buffer 5 kat sulandırılarak kullanılmıştır.
8. Elde edilen solüsyonlar aşağıda verilen miktarlarda kullanılarak 5 ml %10 luk ayrıştırma jeli hazırlanmıştır.

Distile su	1,9 ml
%30 akrilamid mix	1,7 ml

1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3 ml
%10'luk SDS hazırlanışı	50 μ l
%10'luk amonyum persülfat	50 μ l
TEMED	6 μ l

9. Elde edilen solüsyonlar aşağıda verilen miktarlarda kullanılarak 3 ml %5'lik sıkılaştırma jeli hazırlanmıştır.

Distile su	2,1 ml
%30 akrilamid mix	500 μ l
1 M Tris (pH 6,8)	380 μ l
%10'luk SDS hazırlanışı	30 μ l
%10'luk amonyum persülfat	30 μ l
TEMED	3 μ l

10. Diaminobenzidine (DAB) tablet solüsyonu hazırlanmıştır. 15 ml 50 mM pH:7,5 tris içerisinde 1 adet SigmaFast DAB tablet (Sigma-Aldrich, ABD) çözülmüştür. Solüsyon 0,2 μ m'lik filtreden süzülerek üzerine 20 μ l %30'luk H_2O_2 eklenmiştir.

Gerekli solüsyonlar hazırlandıktan sonra aşağıdaki basamaklar uygulanarak Western blot analizi yapılmış ve rekombinant proteinin ekspresyonu tespit edilmiştir:

1. İndükleme esnasında alınan örnekler üzerine 100 μ l gel-loading buffer eklenerek vortekslenmiştir.
2. Boya ile birlikte 2 dk. kaynatılan örneklerin 20 μ l'si protein marker eşliğinde jele yüklenmiştir.
3. 120 V'ta 4 saat elektroforez sonrasında jel üzerindeki proteinler nitroselüloz membrana transfer edilmiştir.
4. Blotlama sonrasında nitroselüloz membran blocking buffer (500 ml PBS+ 250 μ l Tween 20 + 25 gr yağsız süt tozu) içerisine alınarak shaker üzerinde oda ısısında 3 saat inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyon sonrasında membran 5 kez 5'er dk. süreyle yıkama solüsyonu (500 ml PBS + 250 μ l Tween 20) ile yıkanmıştır.

6. Yıkama sonrasında membran üzerine blocking buffer ile 1:5000 oranında sulandırılan Anti-HisG-HRP antikoru (Invitrogen, ABD) dökülmüştür. Membran shaker üzerinde oda ısında 1 gece inkübe edilmiştir.
7. İnkübasyon sonrasında membran 5 kez 5'er dk. yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır.
8. Yıkama sonrasında membran üzerine DAB tablet solüsyonu dökülerek bantlar görüntülenmiştir.

3.8. LACK ve KMP-11 Genlerinin Sekans ve Filogenetik Analizi

LACK ve KMP-11 gen bölgeleri için çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 10.0.7 (Biomatters, ABD) (74) yazılımı ile forward ve reverse dizilimlerin birleştirilmesi yapılarak, vektör DNA'sı ile kıyaslanmış, plazmide eklenmiş olan hedef gen bölgeleri belirlemiş ve konsensüs dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra GenBank'ta mevcut homolog izolatlara ait ilgili gen bölgesi sekanslarıyla Geneious v.10.0.7 (Biomatters, ABD) (74) yazılımı üzerinden çoklu hizalamaları yapılarak interspesifik ve intraspesifik nükleotid farklılıkları belirlenmiştir. Filogenetik yapılanmaların belirlenmesinde Bayesian analizleri (BA) uygulanmıştır. BA analizlerinde sekans evrimi için en uygun modelin belirlenmesinde jModelTest 2.1.7 (75) kullanılmıştır. Filogenetik ağacın oluşturulmasında en düşük Bayesian Bilgi Kriteri (BIC) değerine sahip olduğu belirlenen Hasegawa, Kishino and Yano 1985 (HKY85) + Gamma distributed (HKY85+G) modeli kullanılmıştır. Markov Chain Monte Carlo taramaları 1.100.000 jenerasyon için 4 zincir olacak şekilde belirlenmiştir. Ağaç örnekleme ise her 200 jenerasyonda bir (ilk 100.000 ağaç "burn in") olarak belirlenmiştir.

3.9. LACK ve KMP-11 Proteinlerinin Moleküler Karakterizasyonu

DNA dizi analiz sonuçlarına göre Geneious v.10.0.7 (Biomatters, ABD) (74) programı ile *L. infantum* LACK ve KMP-11 proteinlerinin aminoasit dizisi elde edilmiştir. Elde edilen LACK ve KMP-11 aminoasit dizileri Geneious v.10.0.7 (Biomatters, ABD) (74) programına eklenen EMBOSS v6.5.7. (76) plugin ile analiz edilerek antijenik olduğu

tahmin edilen bölgeler, bu bölgelerin aminoasit uzunluğu ve hangi aminoasitler arasında yer aldığı belirlenmiştir.

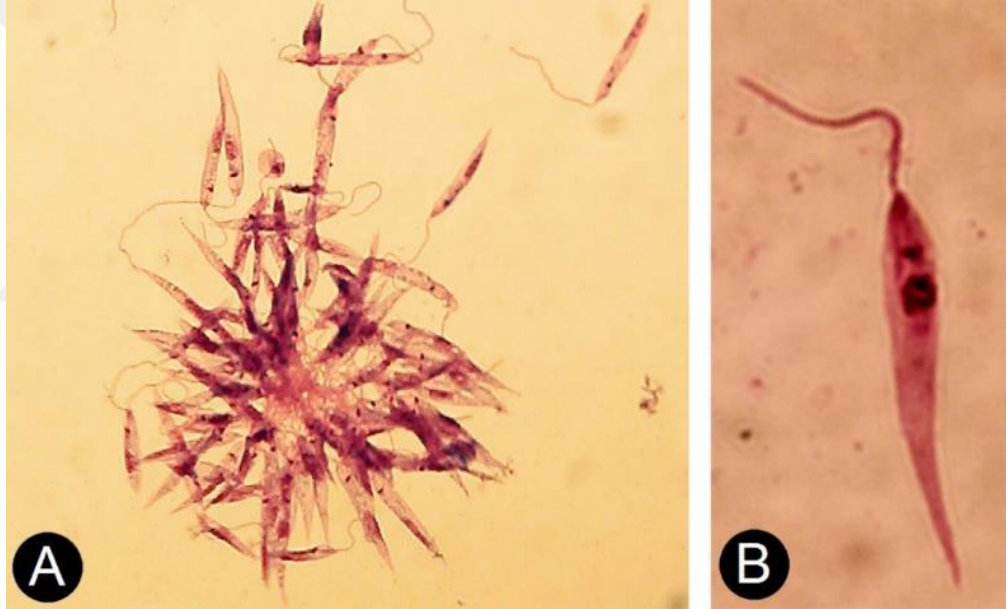
L. infantum LACK ve KMP-11 proteinlerinin üç boyutlu yapıları <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=indexweb> adresinde bulunan Phyre2 Protein Homology/Analogy Recognition Engine V 2.0 programı ile elde edilmiş ve görüntülenmesi Geneious v.10.0.7 (Biomatters, ABD) (74) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



4. BULGULAR

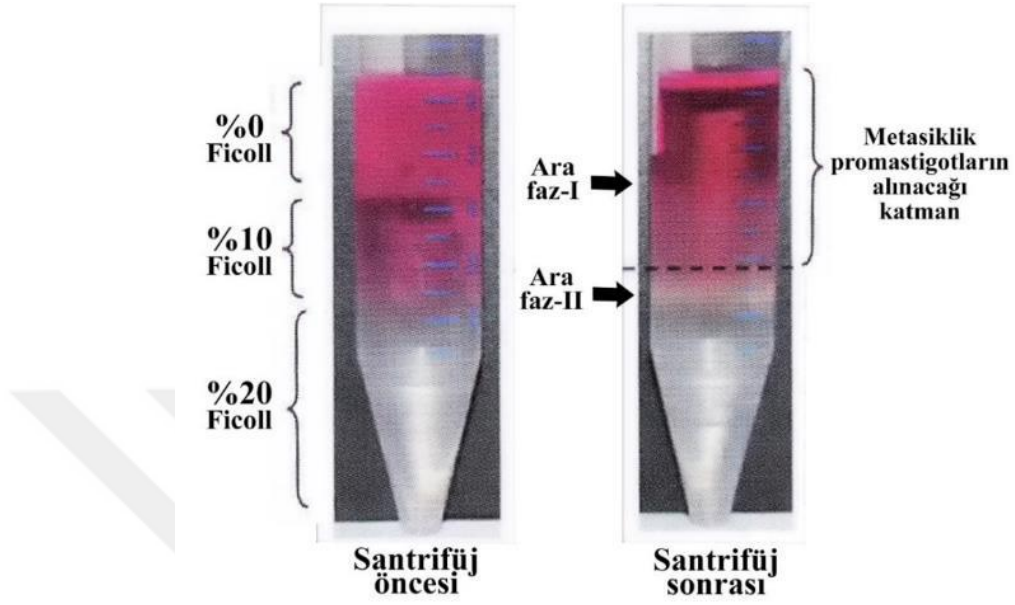
4.1. *L. Infantum* Kültür Sonuçları

Modifiye *Leishmania* besiyerinde kültürü yapılan *L. infantum* promastigotları Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. A. Modifiye *Leishmania* besiyerinde üreyen küme halindeki *L. infantum* promastigotları (X40), B. *L. infantum* promastigot formu (X100)

Ficoll gradyanı sonucu elde edilen ve metasiklik promastigotları bulunduran üst iki katman Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

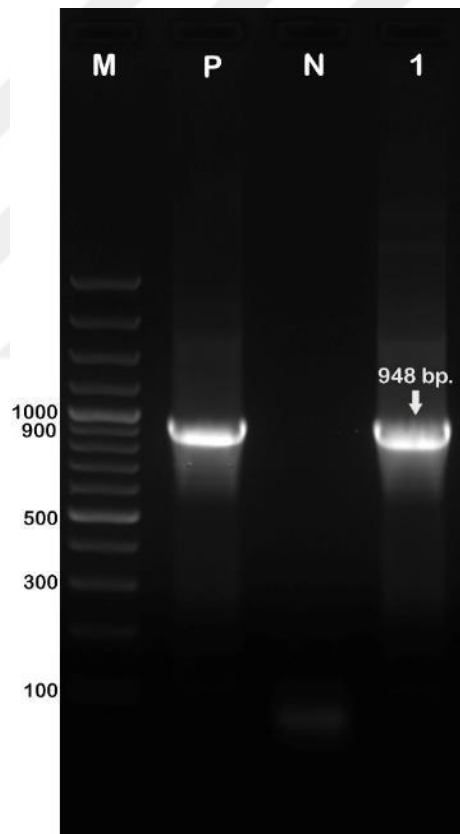


Şekil 4.2. Ficoll gradyanı uygulaması sonucu oluşan katmanlar.

4.2. *L. Infantum* LACK Geni Ampklifikasyon, Klonlama, Sekans ve Filogenetik Analizleri

4.2.1. Amplifikasyon Sonuçları

Total genomik DNA izolasyonu için 10^6 adet promastigot kullanılmıştır. PCR için, total genomik DNA ve *L. infantum* LACK genine spesifik primerler kullanılmıştır. PCR sonrasında 948 bp.'lik PCR ürünü, ethidium bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde 100 bp.'lik marker eşliğinde (SolisBioDyneFIREPol, Estonya) yürütülmüştür ve Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazıyla (Carestream, ABD) görüntülenmiştir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. PCR ürününün agaroz jel elektroforezde görünümü. **M.**100 bp.'lik marker (SolisBioDyne, Estonya), **P.** Pozitif kontrol **N.** Negatif kontrol, **1.** 948 bp.'lik *L. infantum* LACK PCR ürünü,

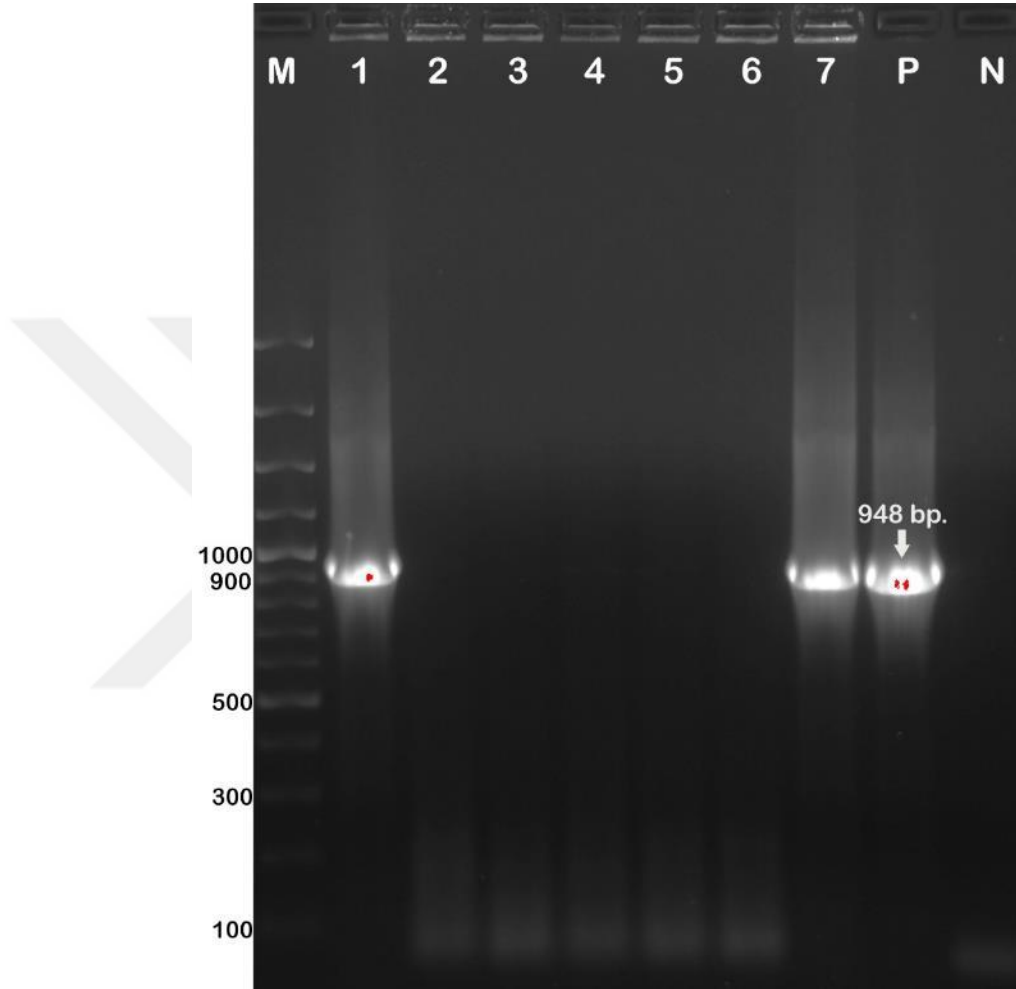
4.2.2. Klonlama Sonuçları

Elde edilen 948 bp.'lik PCR ürünü CloneJET PCR Clonning Kit (ThermoScientific, ABD) kullanılarak pJET1.2/blunt klonlama vektörüne yerleştirilmiştir. Ligasyon ürünü OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, ABD) kompetan hücrelerine transforme edilmiştir. 37 °C'de bir gece inkübasyon sonrası oluşan koloniler tespit edilmiştir (Şekil 4.4.).



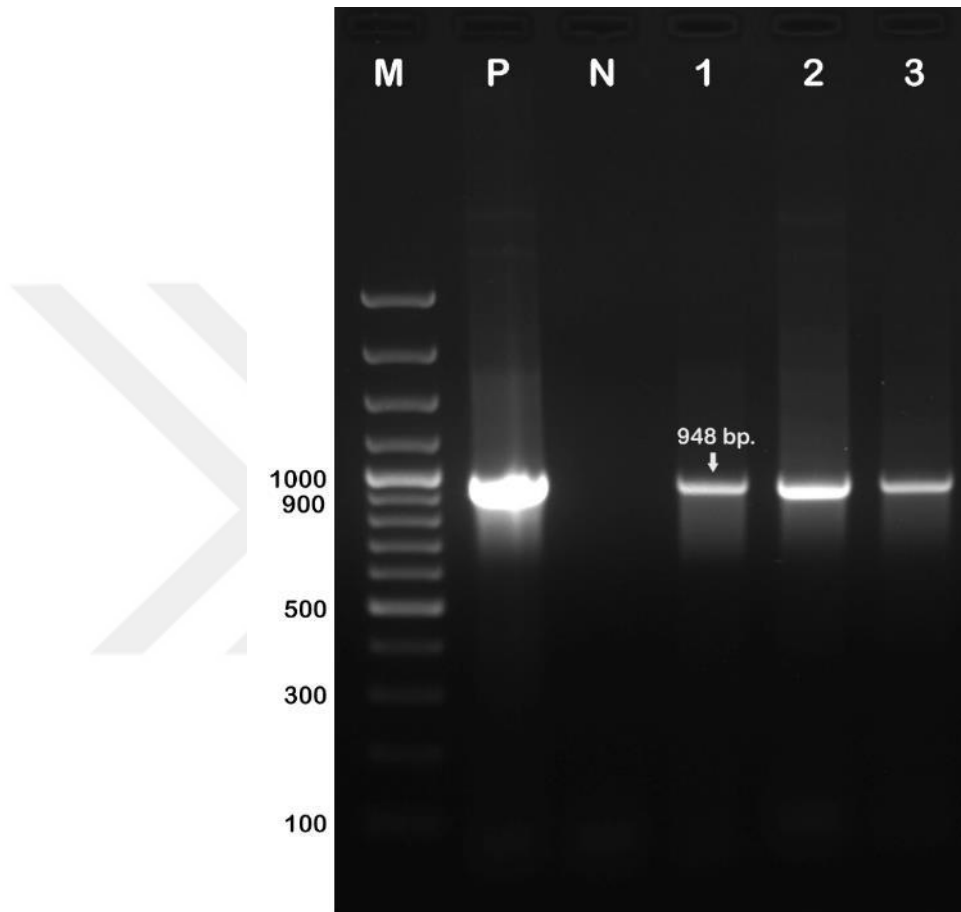
Şekil 4.4. *L. infantum* LACK PCR ürününün *E. coli* kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası üretilen koloniler

Transformasyon sonrası gözlenen kolonilerin rekombinant plazmidi içerip içermediğini anlamak için yapılan PCR taramasında katı besiyerinden seçilen 7 koloniden 2 tanesinin rekombinant plazmidi içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Kolonilerde rekombinant plazmid varlığının PCR tarama ile doğrulanması **M.** 100 bp.'lik marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya)**1,7.** PCR tarama sonucu pozitif örnekler, **2-6.** PCR tarama sonucu negatif örnekler, **P.** Pozitif kontrol, **N.** Negatif kontrol.

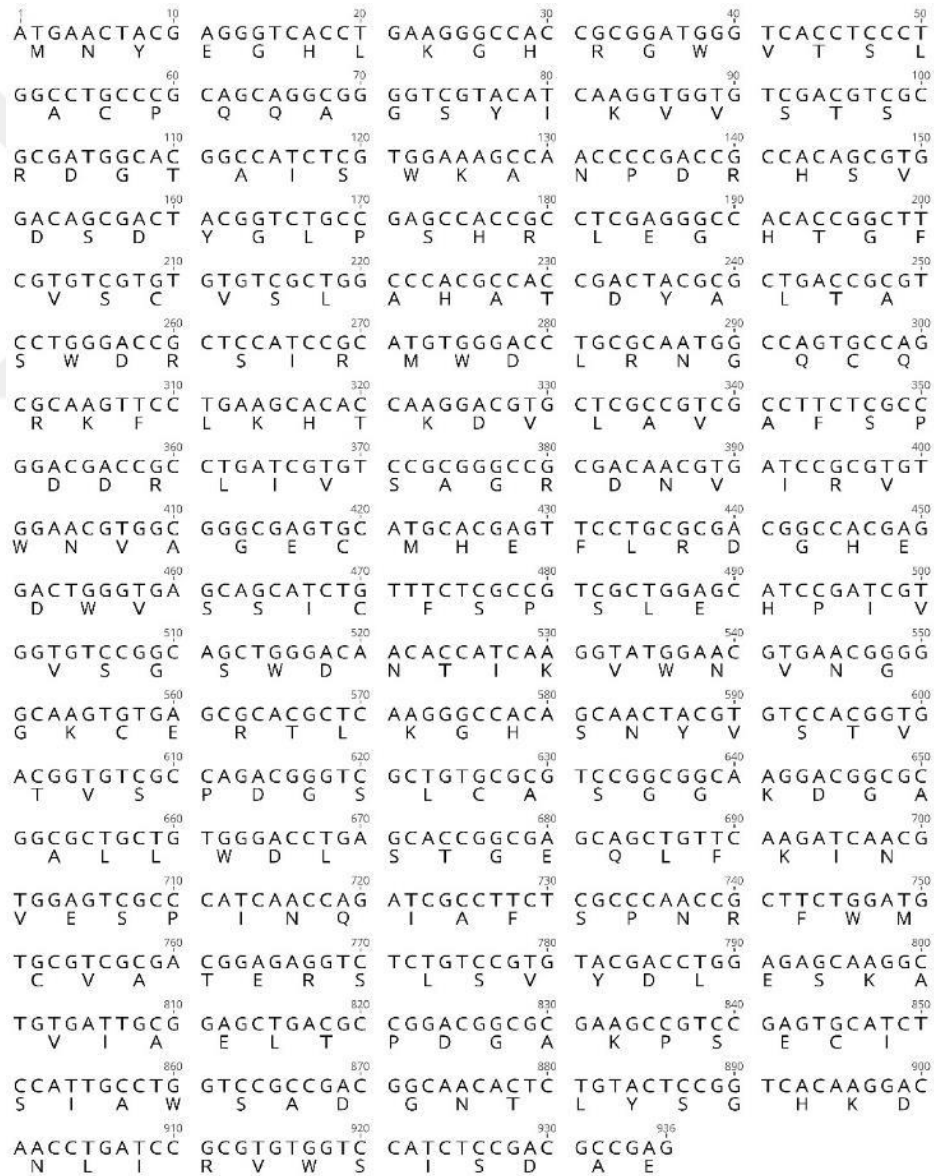
Rekombinant plazmid varlığı tespit edilen 7 numaralı koloniden miniprep yapılarak rekombinant plazmidler saflaştırılmıştır. Rekombinant plazmidin klonlanan geni içerdiği PCR ile gösterilmiştir (Şekil 4.6.). Miniprep ile saflaştırılan rekombinant plazmid, pJET1.2+LACK olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 4.6. Miniprep sonrası elde edilen rekombinant plazmidin PCR sonuçları. **M.** 100 bp.'lik marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya) **P.** Pozitif kontrol, **N.** Negatif kontrol, **1-3.** Template olarak rekombinant plazmidin kullanıldığı PCR sonucunda oluşan 948 bp.'lik ürün.

4.2.3. Sekans ve Filogenetik Analiz Sonuçları

Klonlamanın doğruluğunu kanıtlamak için rekombinant plazmidin DNA dizi analizi yapılarak, klonlanan *L. infantum* LACK geninin DNA dizisi elde edilmiştir. Elde edilen DNA dizi sonuçları Chromas v.1.45 (ConorMcCarty School of Science Griffith University, Avustralya) programı ile incelenmiştir. F ve R dizi analiz sonuçları Geneious v10.0.7 (Biomatters, ABD) (74) programına girilerek sekans hizalaması yapılmıştır ve *L. infantum* LACK genine ait konsensüs dizi ve kodlanan aminoasitler elde edilmiştir. (Şekil 4.7.).



ATGAACTACG M N Y	AGGGTCACCT E G H L	GAAGGGCCAC K G H	CGCGGATGGG R G W	TCACCTCCCT V T S L
GGCCTGCCCG A C P	CAGCAGGCGG Q Q A	GGTCGTACAT G S Y I	CAAGGTGGTG K V V	TCGACGTCTGC S T S
GCGATGGCAC R D G T	GGCCATCTCG A I S	TGGAAAGCCA W K A	ACCCCGACCG N P D R	CCACAGCGTG H S V
GACAGCGACT D S D	ACGGTCTGCC Y G L P	GAGCCACCGC S H R	CTCGAGGGCC L E G	ACACCGGCTT H T G F
CGTGTCGTGT V S C	GTGTCTGCTGG V S L	CCCACGCCAC A H A T	CGACTACGCG D Y A	CTGACCGCGT L T A
CCTGGGACCG S W D R	CTCCATCCGC S I R	ATGTGGGACC M W D	TGCGCAATGG L R N G	CCAGTGCCAG Q C Q
CGCAAGTTCC R K F	TGAAGCACAC L K H T	CAAGGACGTG K D V	CTCGCCGTGC L A V	CCTTCTCGCC A F S P
GGACGACCGC D D R	CTGATCGTGT L I V	CCGCGGGCCG S A G R	CGACAACGTG D N V	ATCCGCGTGT I R V
GGAACGTGGC W N V A	GGGCGAGTGC G E C	ATGCACGAGT M H E	TCCTGCGCGA F L R D	CGGCCACGAG G H E
GA CTGGGTGA D W V	GCAGCATCTG S S I C	TTTCTCGCCG F S P	TCGCTGGAGC S L E	ATCCGATCGT H P I V
GGTGTCGGGC V S G	AGCTGGGACA S W D	ACACCATCAA N T I K	GGTATGGAAC V W N	GTGAACGGGG V N G
GCAAGTGTGA G K C E	GCGCACGCTC R T L	AAGGGCCACA K G H	GCAACTACGT S N Y V	GTCCACGGTG S T V
ACGGTGTCTG T V S	CAGACGGGTC P D G S	GCTGTGCGCG L C A	TCCGGCGGCA S G G	AGGACGGGCG K D G A
GGCGCTGCTG A L L	TGGGACCTGA W D L	GCACCGGCGA S T G E	GCAGCTGTTT Q L F	AAGATCAACG K I N
TGGAGTCGCC V E S P	CATCAACCAG I N Q	ATCGCCTTCT I A F	CGCCCAACCG S P N R	CTTCTGGATG F W M
TGCGTCGCGA C V A	CGGAGAGGTC T E R S	TCTGTCCGTG L S V	TACGACCTGG Y D L	AGAGCAAGGC E S K A
TGTGATTGCG V I A	GAGCTGACGC E L T	CGGACGGGCG P D G A	GAAGCCGTCC K P S	GAGTGATCTT E C I
CCATTGCCTG S I A W	GTCCGCCGAC S A D	GGCAACACTC G N T	TGTACTCCGG L Y S G	TCACAAGGAC H K D
AACCTGATCC N L I	GCGTGTGGTC R V W S	CATCTCCGAC I S D	GCCGAG A E	

Şekil 4.7. *L. infantum* LACK DNA dizisi ve kodladığı aminosistler

L. infantum LACK geni DNA dizi analiz sonucu Geneious v10.0.7 (Biomatters, ABD) (74) programı ile web tabanlı BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sistemine girilerek GenBank veri tabanındaki mevcut DNA dizileri ile karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda elde edilen ve GenBank’a yüklenen KT184317 numaralı “*L. infantum* (MHOM/TR/2009/EP174) LACK gen dizisi mevcut 32 dizi ile karşılaştırma sonuçları Tablo 4.1’de ikili hizalama analizleri sonucu nükleotid farklılık oranları da Tablo 4.2’de verilmiştir. LACK gen bölgesine göre analiz edilen izolatların nükleotid dizilimlerinin çoklu hizalama analiz sonuçları Şekil 4.8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. *L. infantum* LACK gen dizisinin (KT184317) GenBank’a kayıtlı dizilerle karşılaştırma sonuçları

Sıra No	GenBank ID	Organizma	Suş	Ülke	Benzerlik (%)
1	XM_001470282	<i>Leishmania infantum</i>	JPCM5	-	100,00
2	U49695	<i>Leishmania infantum</i>	PB75	-	100,00
3	AB075696	<i>Leishmania donovani</i>	MHOM/CN/86/Sc-6	Çin Halk Cum.	99,90
4	AF363974	<i>Leishmania donovani</i>	MHOM/SD/001S-2D	Sudan	99,80
5	EU016105	<i>Leishmania chagasi</i>	MHOM/BR/73/M2269	Brezilya	99,90
6	JX305924	<i>Leishmania tropica</i>	MHOM/IR/04/Sensitive-2M	İran	98,90
7	JX305923	<i>Leishmania tropica</i>	MHOM/IR/04/Resist-439	İran	98,80
8	JX289832	<i>Leishmania tropica</i>	MHOM/IR/04/827	İran	98,80
9	JX305921	<i>Leishmania infantum</i>	MCAN/IR/10/Resist1	İran	98,70
10	JX289833	<i>Leishmania major</i>	MRHO/IR/75/ER	İran	98,70
11	XM_001684508	<i>Leishmania major</i>	Friedlin	Friedlin	98,40
12	AF034793	<i>Leishmania donovani</i>	-	-	98,30
13	XM_003877070	<i>Leishmania mexicana</i>	MHOM/GT/2001/U1103	Guetamala	98,20
14	AF363977	<i>Leishmania amazonensis</i>	Josefa	Brezilya	98,20
15	AF363975	<i>Leishmania major</i>	Abdou	Suriye	98,20
16	AF034804	<i>Leishmania major</i>	-	-	98,20
17	AB075697	<i>Leishmania amazonensis</i>	MPRO/BR/72/M1845	Brezilya	98,20
18	AY053464	<i>Leishmania amazonensis</i>	IFLA/BR/67/PH8	Brezilya	98,10
19	AF363978	<i>Leishmania braziliensis</i>	HOM/BR/75/M2903	Brezilya	98,10
20	AF034805	<i>Leishmania braziliensis</i>	Braziliensis	Brezilya	98,10
21	AF363976	<i>Leishmania mexicana</i>	-	Meksika	98,00
22	U27568	<i>Leishmania major</i>	-	-	97,90
23	XM_010702327	<i>Leishmania panamensis</i>	MHOM/PA/94/PSC-1	Panama	96,70
24	XM_001566271	<i>Leishmania braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M2904	Brezilya	96,50
25	AF125254	<i>Leishmania panamensis</i>	M/HOM/PA/71LS94	Panama	96,50
26	AF125255	<i>Leishmania panamensis</i>	M/HOM/PA/71LS94	Panama	96,30
27	AF357839	<i>Leishmania donovani</i>	-	Çin Halk Cum.	95,20
28	XM_015798033	<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	-	Çek Cumhuriyeti	88,60
29	XM_015798032	<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	-	Çek Cumhuriyeti	88,60
30	XM_015798031	<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	-	Çek Cumhuriyeti	88,60
31	XM_015798030	<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	-	Çek Cumhuriyeti	88,60
32	AF063022	<i>Crithidia fasciculata</i>	-	İspanya	87,70

Tablo 4.2. GenBank’a kayıtlı LACK sekanslarının ikili hizalama farklılıkları

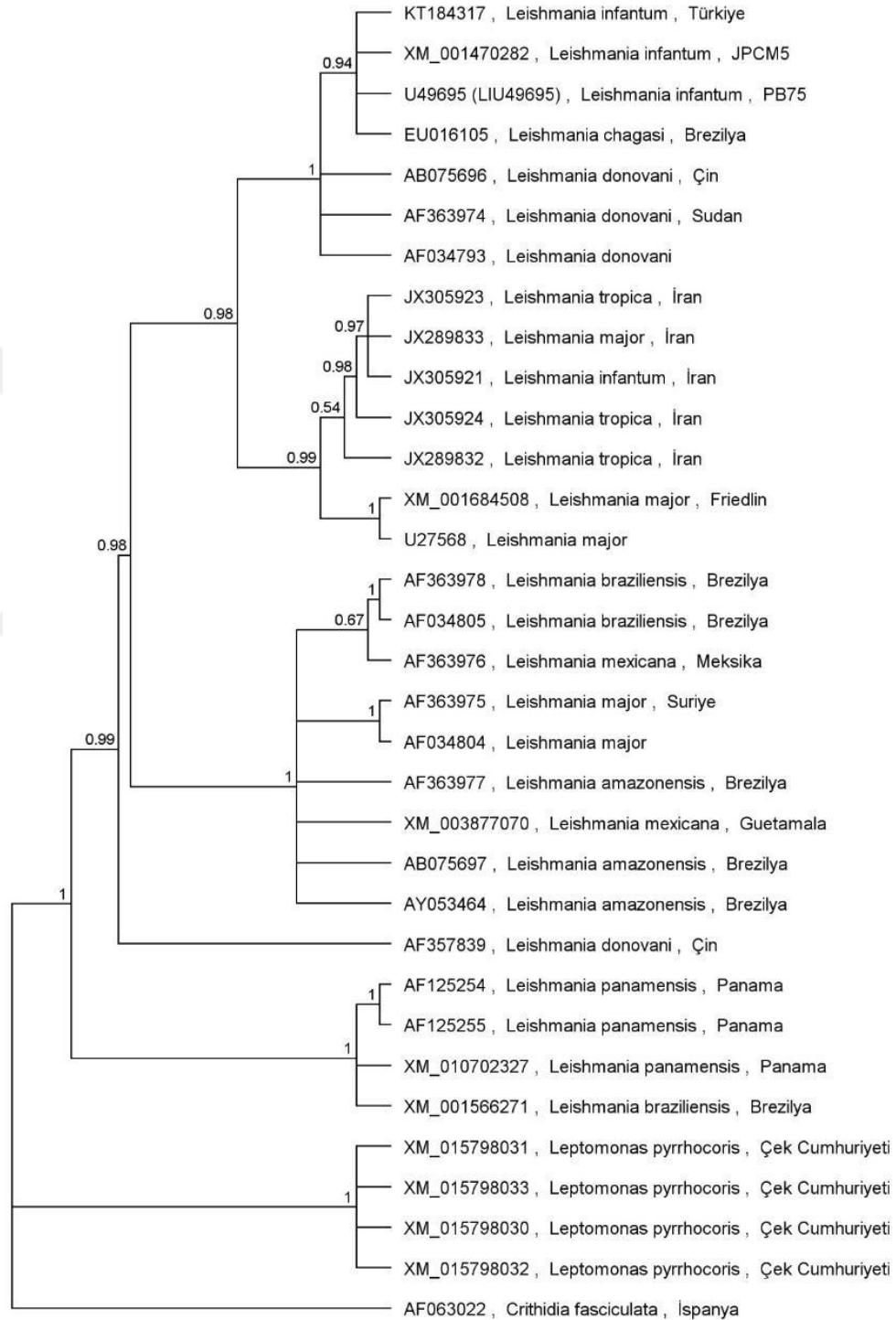
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
AF063022		0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.15	0.12	0.13	0.13	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.14	
KT184317	0.13		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.04	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.02	
XM_001470282	0.13	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.04	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.02	
U49695	0.13	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.04	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.02	
EU016105	0.13	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.04	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.02	
AB075696	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.04	0.03	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.02		
AF363974	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.03	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.02	
AF034793	0.14	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01		0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.05	0.04	0.05	0.05	0.13	0.13	0.13	0.13	0.03	
JX305924	0.13	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02		0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.03	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.02	
JX305923	0.13	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.00		0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.04	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.02	
JX289833	0.13	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.00	0.00		0.00	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.05	0.04	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.02	
JX305921	0.13	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00		0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.04	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.02	
JX289832	0.13	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.00	0.01	0.01	0.01		0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.03	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.02	
XM_001684508	0.13	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01		0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.05	0.04	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.01	
AF363975	0.13	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02		0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.05	0.04	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.03	
AF034804	0.13	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00		0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.05	0.04	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.03	
AF363977	0.13	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01		0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.05	0.04	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.03	
XM_003877070	0.13	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00		0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.05	0.03	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.03	
AB075697	0.13	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00		0.01	0.01	0.00	0.00	0.05	0.03	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.03	
AF363978	0.13	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01		0.00	0.00	0.01	0.05	0.04	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.03	
AF034805	0.13	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00		0.00	0.01	0.05	0.04	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.03	
AF363976	0.13	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.05	0.04	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.03	
AY053464	0.13	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00		0.05	0.04	0.04	0.04	0.12	0.12	0.12	0.12	0.03	
AF357839	0.15	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05		0.05	0.06	0.06	0.06	0.14	0.14	0.14	0.14	0.05
XM_010702327	0.12	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05		0.00	0.00	0.00	0.11	0.11	0.11	0.11	0.04
XM_001566271	0.13	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.06	0.00		0.01	0.01	0.11	0.11	0.11	0.11	0.04	
AF125254	0.13	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.06	0.00	0.01		0.00	0.12	0.12	0.12	0.12	0.04	
AF125255	0.13	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.06	0.00	0.01	0.00		0.12	0.12	0.12	0.12	0.05	
XM_015798031	0.08	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.13	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.14	0.11	0.11	0.12	0.12		0.00	0.00	0.00	0.13	
XM_015798033	0.08	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.13	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.14	0.11	0.11	0.12	0.12	0.00		0.00	0.00	0.13	
XM_015798030	0.08	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.13	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.14	0.11	0.11	0.12	0.12	0.00	0.00		0.00	0.13	
XM_015798032	0.08	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.13	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.14	0.11	0.11	0.12	0.12	0.00	0.00	0.00		0.13	
U27568	0.14	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.05	0.04	0.04	0.04	0.05	0.13	0.13	0.13	0.13	

1. KT184317	GTCCGGCGCAAGGACGGCGGCGCTGCTGTGGGACCTGAGCACCGGCGAGCAGCTGTTCAGATCAACGTGGAGTCCGCCATCAACGAGATCGCTCTTCGCC	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730
2. XM_001470282	GUCCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
3. U49695 (U49695)	GUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
4. EU016105	GTCCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCTGCTGTGGGACCTGAGCACCGGCGAGCAGCTGTTCAGATCAACGTGGAGTCCGCCATCAACGAGATCGCTCTTCGCC										
5. AB075696	GUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
6. AF363974	GTCCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
7. JX305924	GUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
8. JX289832	GUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
9. JX305923	GUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
10. JX289833	GUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
11. JX305921	GUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
12. XM_001684508	UUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
13. AF034793	GTCCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCTGCTGTGGGACCTGAGCACCGGCGAGCAGCTGTTCAGATCAACGTGGAGTCCGCCATCAACGAGATCGCTCTTCGCC										
14. AF363975	GTCCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCTGTTCAGATCAACGTGGAGTCCGCCATCAACGAGATCGCTCTTCGCC										
15. AF363977	GTCCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCTGCTGTGGGACCTGAGCACCGGCGAGCAGCTGTTCAGATCAACGTGGAGTCCGCCATCAACGAGATCGCTCTTCGCC										
16. XM_003877070	GUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
17. AF034804	GUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCTGCTGTGGGACCTGAGCACCGGCGAGCAGCTGTTCAGATCAACGTGGAGTCCGCCATCAACGAGATCGCTCTTCGCC										
18. AB075697	GUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
19. AF363978	GUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCTGCTGTGGGACCTGAGCACCGGCGAGCAGCTGTTCAGATCAACGTGGAGTCCGCCATCAACGAGATCGCTCTTCGCC										
20. AY053464	GUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
21. AF034805	GTCCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCTGCTGTGGGACCTGAGCACCGGCGAGCAGCTGTTCAGATCAACGTGGAGTCCGCCATCAACGAGATCGCTCTTCGCC										
22. AF363976	GTCCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCTGCTGTGGGACCTGAGCACCGGCGAGCAGCTGTTCAGATCAACGTGGAGTCCGCCATCAACGAGATCGCTCTTCGCC										
23. U27568 (LMU27568)	UUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
24. XM_010702327	UUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
25. XM_001566271	UUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
26. AF125254	UUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
27. AF125255	UUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
28. AF37839	UUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
29. XM_015798031	UUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
30. XM_015798033	UUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
31. XM_015798030	UUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
32. XM_015798032	UUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCGUGUGUGGACACGAGCACCGGCGAGCAGCUGUUAAGAUCAACUGGAGUGCCCAUACACGAGUCCUUCUGCC										
33. AF063022	UUCGGCGCAAGGACGGCGGCGGCTGCTGTGGGACCTGAGCACCGGCGAGCAGCTGTTCAGATCAACGTGGAGTCCGCCATCAACGAGATCGCTCTTCGCC										
1. KT184317	CAACCGCTTCTGGATGTGCTGCTGCGACGGAGAGGCTCTGTCCGTGTACGACCTGGAGAGCAAGGCGTATTGCGGAGCTGAC	740	750	760	770	780	790	800	810	820	830
2. XM_001470282	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
3. U49695 (U49695)	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
4. EU016105	CAACCGCTTCTGGATGTGCTGCTGCGACGGAGAGGCTCTGTCCGTGTACGACCTGGAGAGCAAGGCGTATTGCGGAGCTGAC										
5. AB075696	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
6. AF363974	CAACCGCTTCTGGATGTGCTGCTGCGACGGAGAGGCTCTGTCCGTGTACGACCTGGAGAGCAAGGCGTATTGCGGAGCTGAC										
7. JX305924	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
8. JX289832	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
9. JX305923	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
10. JX289833	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
11. JX305921	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
12. XM_001684508	CAACCGCTTCTGGATGTGCTGCTGCGACGGAGAGGCTCTGTCCGTGTACGACCTGGAGAGCAAGGCGTATTGCGGAGCTGAC										
13. AF034793	CAACCGCTTCTGGATGTGCTGCTGCGACGGAGAGGCTCTGTCCGTGTACGACCTGGAGAGCAAGGCGTATTGCGGAGCTGAC										
14. AF363975	CAACCGCTTCTGGATGTGCTGCTGCGACGGAGAGGCTCTGTCCGTGTACGACCTGGAGAGCAAGGCGTATTGCGGAGCTGAC										
15. AF363977	CAACCGCTTCTGGATGTGCTGCTGCGACGGAGAGGCTCTGTCCGTGTACGACCTGGAGAGCAAGGCGTATTGCGGAGCTGAC										
16. XM_003877070	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
17. AF034804	CAACCGCTTCTGGATGTGCTGCTGCGACGGAGAGGCTCTGTCCGTGTACGACCTGGAGAGCAAGGCGTATTGCGGAGCTGAC										
18. AB075697	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
19. AF363978	CAACCGCTTCTGGATGTGCTGCTGCGACGGAGAGGCTCTGTCCGTGTACGACCTGGAGAGCAAGGCGTATTGCGGAGCTGAC										
20. AY053464	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
21. AF034805	CAACCGCTTCTGGATGTGCTGCTGCGACGGAGAGGCTCTGTCCGTGTACGACCTGGAGAGCAAGGCGTATTGCGGAGCTGAC										
22. AF363976	CAACCGCTTCTGGATGTGCTGCTGCGACGGAGAGGCTCTGTCCGTGTACGACCTGGAGAGCAAGGCGTATTGCGGAGCTGAC										
23. U27568 (LMU27568)	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
24. XM_010702327	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
25. XM_001566271	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
26. AF125254	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
27. AF125255	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
28. AF37839	CAACCGCTTCTGGATGTGCTGCTGCGACGGAGAGGCTCTGTCCGTGTACGACCTGGAGAGCAAGGCGTATTGCGGAGCTGAC										
29. XM_015798031	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
30. XM_015798033	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
31. XM_015798030	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
32. XM_015798032	CAACCGCUUUGGAGUGGUGCGGCGACGGAGAGGUCUCUGUCCUGUAGCAGCUGGAGAGCAAGGCGUGAUUUGCGAGGUGUAC										
33. AF063022	CAACCGCTTCTGGATGTGCTGCTGCGACGGAGAGGCTCTGTCCGTGTACGACCTGGAGAGCAAGGCGTATTGCGGAGCTGAC										
1. KT184317	CCGAGTGATCTCCATTGCTGCTGCTGCGGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG	840	850	860	870	880	890	900	910	920	930
2. XM_001470282	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
3. U49695 (U49695)	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
4. EU016105	CCGAGTGATCTCCATTGCTGCTGCTGCGGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
5. AB075696	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
6. AF363974	CCGAGTGATCTCCATTGCTGCTGCTGCGGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
7. JX305924	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
8. JX289832	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
9. JX305923	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
10. JX289833	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
11. JX305921	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
12. XM_001684508	CCGAGTGATCTCCATTGCTGCTGCTGCGGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
13. AF034793	CCGAGTGATCTCCATTGCTGCTGCTGCGGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
14. AF363975	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
15. AF363977	CCGAGTGATCTCCATTGCTGCTGCTGCGGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
16. XM_003877070	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
17. AF034804	CCGAGTGATCTCCATTGCTGCTGCTGCGGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
18. AB075697	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
19. AF363978	CCGAGTGATCTCCATTGCTGCTGCTGCGGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
20. AY053464	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
21. AF034805	CCGAGTGATCTCCATTGCTGCTGCTGCGGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
22. AF363976	CCGAGTGATCTCCATTGCTGCTGCTGCGGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
23. U27568 (LMU27568)	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
24. XM_010702327	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
25. XM_001566271	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
26. AF125254	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
27. AF125255	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
28. AF37839	CCGAGTGATCTCCATTGCTGCTGCTGCGGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
29. XM_015798031	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
30. XM_015798033	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
31. XM_015798030	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
32. XM_015798032	CCGAGUGCAUCCAUUGCCUGUGCCGCCGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										
33. AF063022	CCGAGTGATCTCCATTGCTGCTGCTGCGGACGGCAACACCTGTACTCCGGCCACAAGGACAACTGATCCGGCTGTGGTTCATCTCCGAGCCGAG										

Şekil 4.8. LACK nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları

Bayesian filogenisine göre oluşturulan ağaç üzerinde (Şekil 4.9.) görüleceği üzere çalışmamızda karakterize edilen izolataın (KT184317) *L. infantum* JPCM5, PB75 izolatları ve Brezilya'dan bildirilmiş bir *L. chagasi* izolatı ile en yüksek identikliği gösterdiği ve birlikte cluster oluşturdukları saptanmıştır. Bayesian filogenetik çözünürlüğü yüksek posterior olasılıklarla desteklenmiştir (>0,54). *Leishmania*

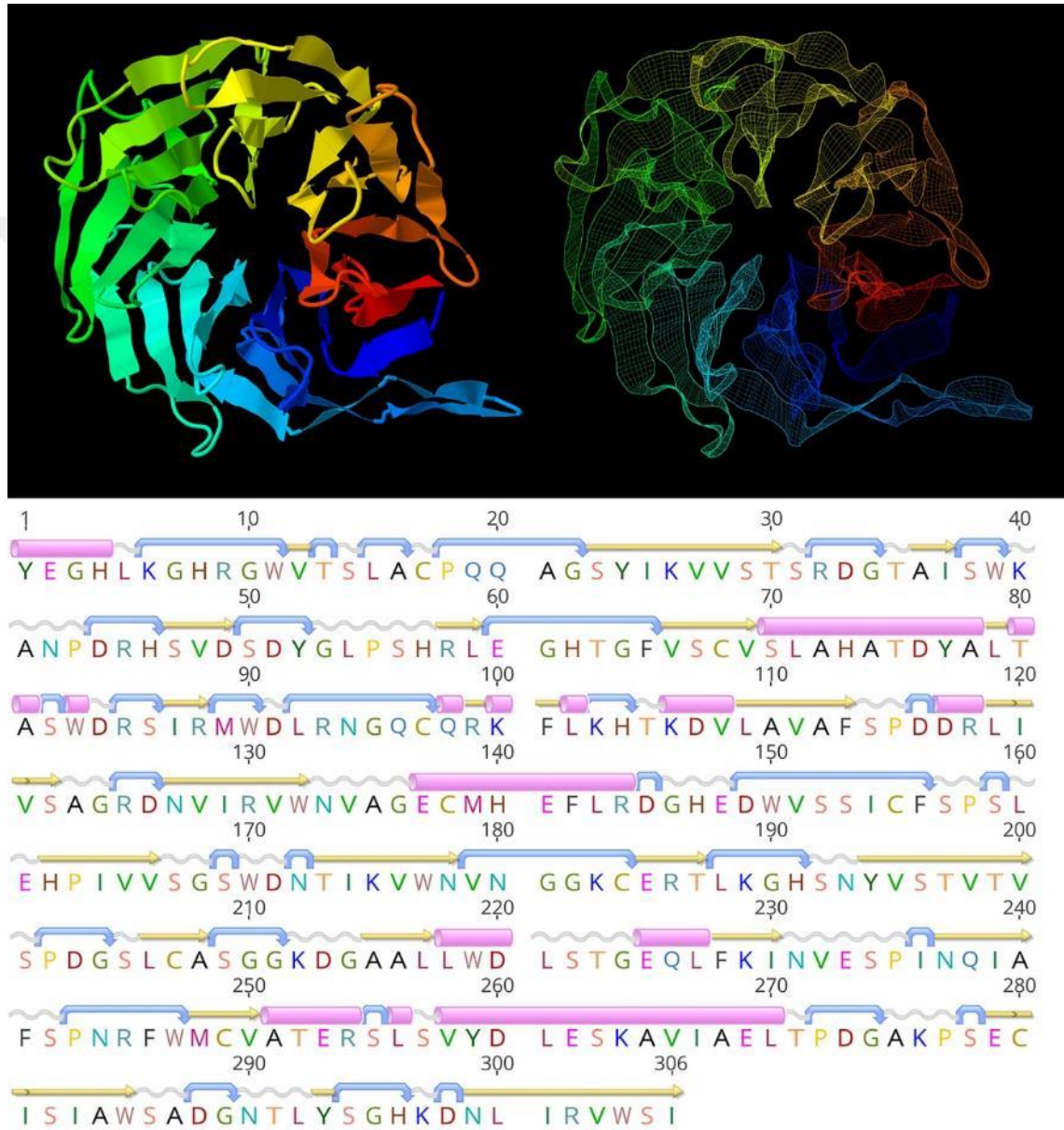
izolatlarının LACK gen bölgesi sekans analizleri, bu gen bölgesindeki intraspesifik nükleotid farklılıklarının interspesifik nükleotid farklılıklarla çakıştığını ve dolayısıyla filogenetik bazda tür ayırımına olanak vermediğini ortaya koymuştur.



Şekil 4.9. *L. infantum* LACK gen dizisinin (KT184317) GenBank'a kayıtlı dizilerle karşılaştırma sonuçları

4.2.4. Protein Analiz Sonuçları

LACK geninin amino asit dizilimi ve üç boyutlu yapısı Şekil 4.10'da gösterilmiştir. 939 nükleotid tarafından kodlanan 313 aminositlik LACK proteininin üç boyutlu yapısında yer alan katlanmalar belirlenmiş ve korunmuş bir yapıya sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 4.10. *L. infantum* LACK proteininin 3 boyutlu görünümü ve aminoasit dizisi

L. infantum LACK proteini, antijenite açısından incelendiğinde puanı 1.061 ile 1.220 arasında, aminoasit uzunlukları ise 7 ile 20 arasında değişen 13 antijenik bölge tespit edilmiş bunların 8 tanesinde aminosit uzunluğunun 15 ve üzerinde olduğu görülmüştür (Tablo 4.3.). Antijenik bölgelerin protein üzerinde dağılımı Şekil 4.11.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. *L. infantum* LACK proteininde tespit edilen antijenik bölgeler

Sıra No	Aminoasit Dizisi	Başlangıç	Bitiş	Aminoasit Sayısı	Antijenik Puan
1	HSNYVSTVTVSPDGSLCASG	191	210	20	1.163
2	WVTSLACPQQAGSYIKVVST	11	30	20	1.156
3	TGFVSCVSLAHATDYALTA	63	81	19	1.220
4	WVSSICFSPSLEHPIVVSG	150	168	19	1.170
5	QRKFLKHTKDVLAFAFS	98	114	17	1.178
6	SLSVYDLESKAVIAEL	255	270	16	1.133
7	LFKINVESPINQIAFS	227	242	16	1.085
8	RHSVDSYGLPSHRL	45	59	15	1.061
9	VIRVWNVAGE	128	137	10	1.120
10	PSECISIAW	277	285	9	1.100
11	DDRLIVSA	116	123	8	1.087
12	AALLWDL	215	221	7	1.091
13	WMCVATE	247	253	7	1.083

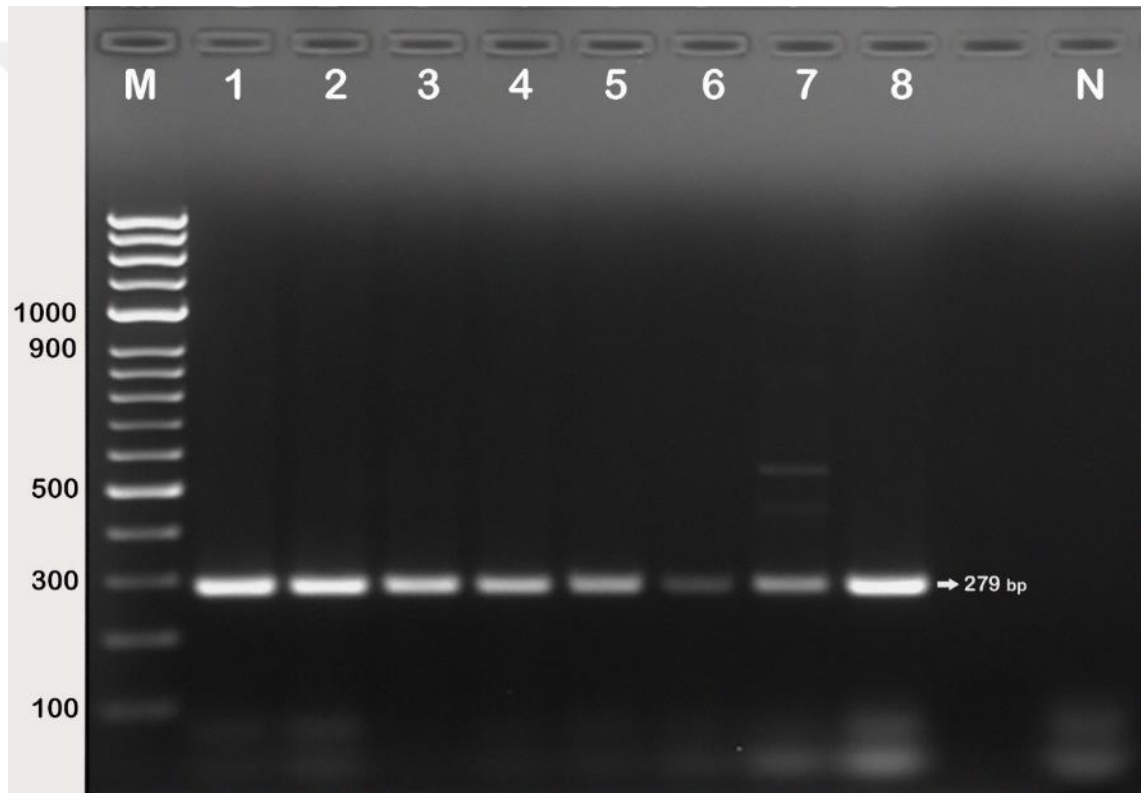


Şekil 4.11. *L. infantum* LACK proteininde yer alan antijenik bölgeler

4.3. *L. Infantum* KMP-11 Geni Ampklifikasyon, Klonlama, Sekans ve Filogenetik Analizleri

4.3.1. Amplifikasyon Sonuçları

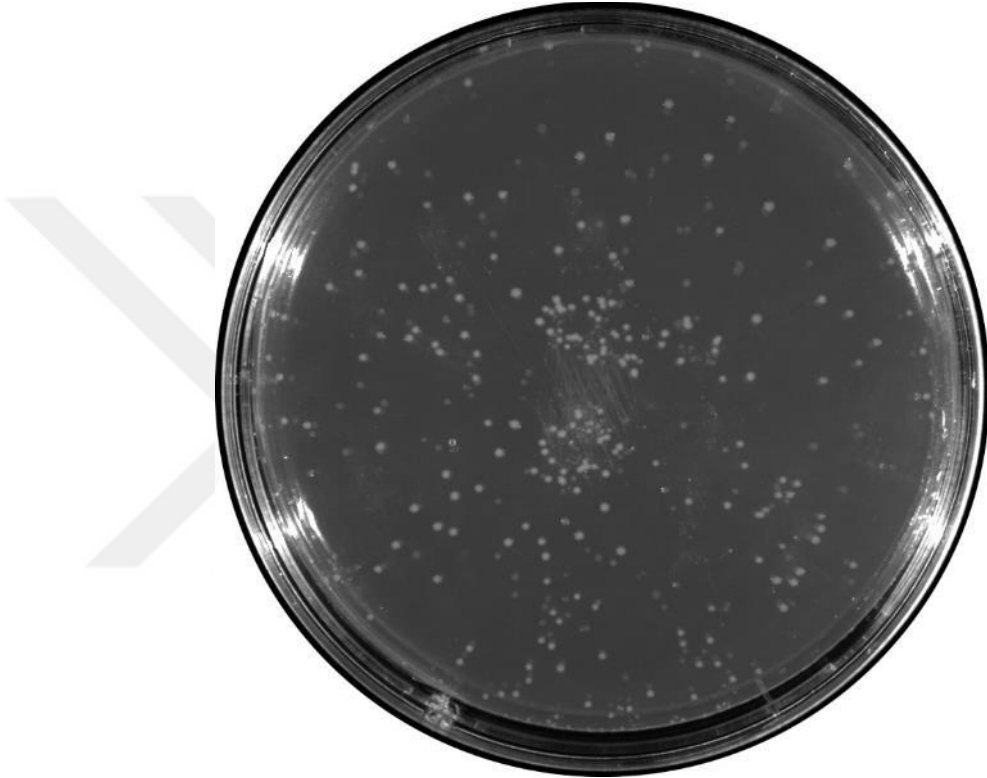
L. infantum KMP-11 geninin klonlanması için total genomik DNA ve *L. infantum* KMP-11 genine spesifik primerler kullanılarak PCR kurulmuştur. PCR sonrasında 279 bp.'lik PCR ürünü, ethidium bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jelde 100 bp.'lik marker eşliğinde (SolisBioDyneFIREPol, Estonya) yürütülmüş ve Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazıyla (Carestream, ABD) görüntülenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. KMP-11 PCR ürününün agaroz jel elektroforezde görünümü. **M.** 100 bp.'lik marker (SolisBioDyne, Estonya), **1-8.** 279 bp.'lik *L. infantum* KMP-11 PCR ürünü, **N.** Negatif kontrol

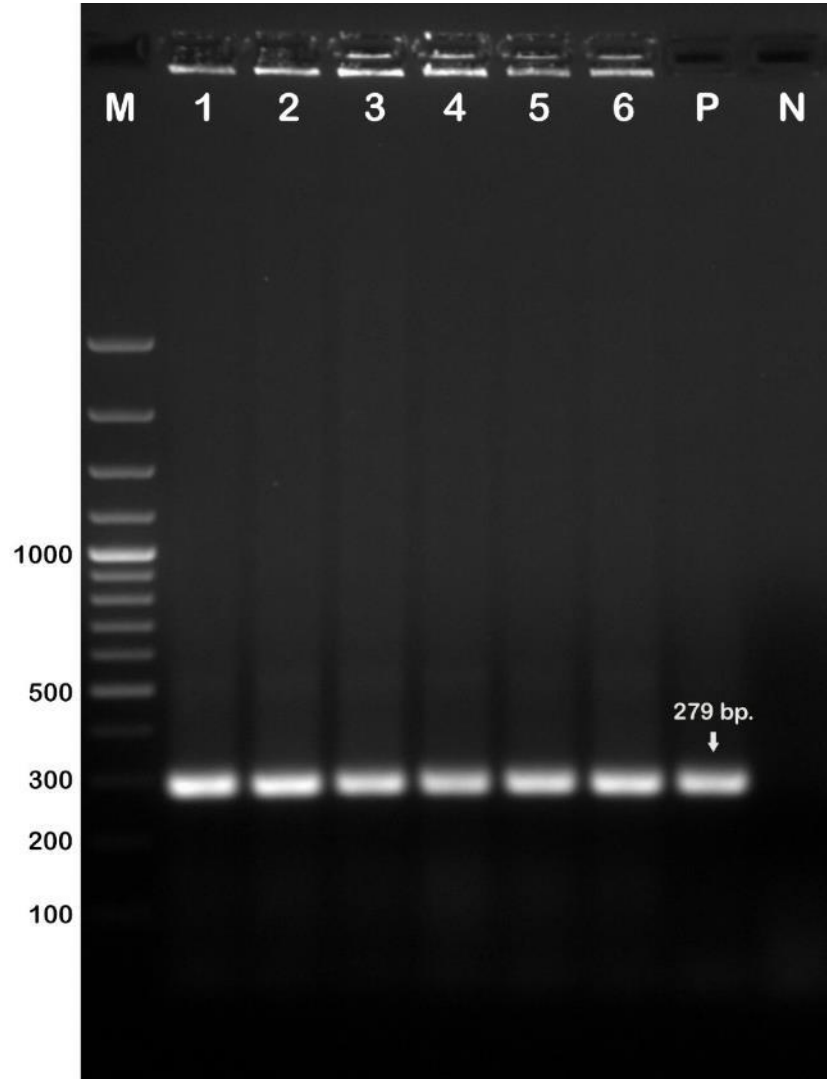
4.3.2. Klonlama Sonuçları

Agaroz jelden saflaştırılan 279 bp.'lik *L. infantum* KMP-11 PCR ürünü, pcDNA™3.1/V5-His TOPO (Invitrogen, ABD) ekspresyon plazmidine klonlanmıştır. Elde edilen rekombinant plazmid kompetan *E. coli* hücrelerine transforme edilmiştir ve 37 °C'de bir gece inkübasyona sonrası oluşan koloniler tespit edilmiştir (Şekil 4.13.).



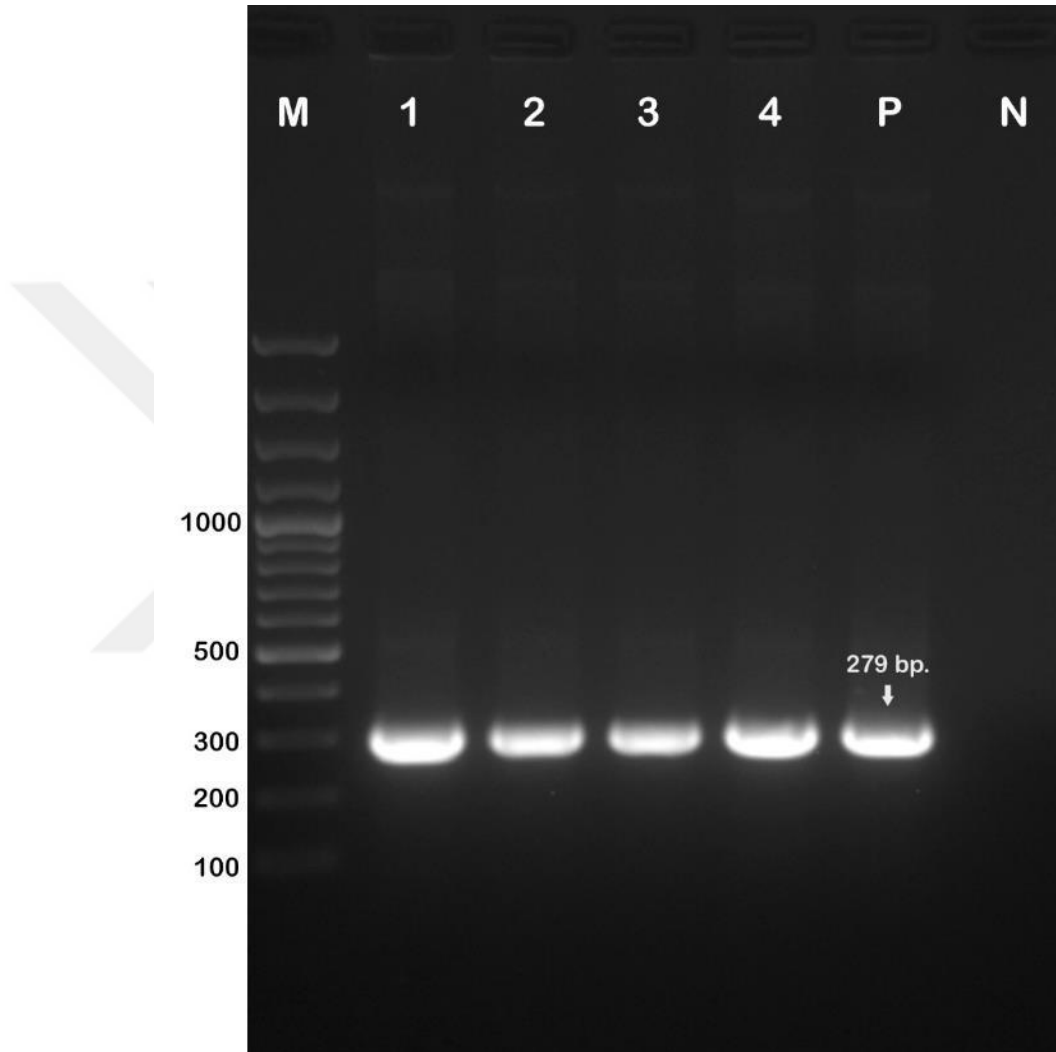
Şekil 4.13. *L. infantum* KMP-11 PCR ürününün *E. coli* kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası üretilen koloniler

Transformasyon sonrası gözlenen kolonilerin rekombinant plazmidi içerip içermediğini anlamak için PCR tarama yapılmıştır. Katı besiyerinden seçilen 6 koloninin tamamının rekombinant plazmidi içerdiği PCR tarama ile gösterilmiştir (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. Kolonilerde rekombinant plazmid varlığının PCR tarama ile doğrulanması **M.** 100 bp.'lik marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya) **1-6.** PCR tarama sonucu pozitif örnekler, **P.** Pozitif kontrol, **N.** Negatif kontrol.

Rekombinant plazmid varlığı tespit edilen 1 numaralı kolonilerden miniprep yapılarak rekombinant plazmidler saflaştırılmıştır. Rekombinant plazmidin klonlanan geni içerdiği PCR ile gösterilmiştir (Şekil 4.15.). Miniprep ile saflaştırılan rekombinant plazmid, pcDNA3.1+KMP-11 olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 4.15. Miniprep sonrası elde edilen rekombinant plazmidin PCR sonuçları. **M.** 100 bp.'lik marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya) **1-3.** DNA olarak rekombinant plazmidin kullanıldığı PCR sonucunda oluşan 279 bp.'lik ürün. **P.** Pozitif kontrol, **N.** Negatif kontrol.

L. infantum KMP-11 geni DNA dizi analiz sonucu Geneious v10.0.7 (Biomatters, ABD) (74) programı ile web tabanlı BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sistemine girilerek GenBank veri tabanındaki mevcut DNA dizileri ile karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda elde edilen ve GenBank’a yüklenen KU379565 numaralı “*L. infantum* (MHOM/TR/2009/EP174) KMP-11 gen dizisinin mevcut 52 dizi ile karşılaştırma sonuçları Tablo 4.4’de ikili hizalama analizleri sonucu nükleotid farklılık oranları da Tablo 4.5’de verilmiştir. KMP-11 gen bölgesine göre analiz edilen izolatların nükleotid dizilimlerinin çoklu hizalama analiz sonuçları Şekil 4.17’de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. *L. infantum* KMP-11 gen dizisinin (KU379565) GenBank’a kayıtlı dizilerle karşılaştırma sonuçları

Sıra No	GenBank ID	Organizma	Suş	Ülke	Benzerlik (%)
1	XM_001468994	<i>Leishmania infantum</i>	JPCM5	-	99,60
2	XM_001468995	<i>Leishmania infantum</i>	JPCM5	-	99,30
3	XM_003864758	<i>Leishmania donovani</i>	BPK282A1	-	99,30
4	X95627	<i>Leishmania infantum</i>	LEM78 MON-1	-	98,60
5	X95626	<i>Leishmania infantum</i>	LEM78 MON-1	-	98,60
6	AJ000078	<i>Leishmania tropica</i>	-	İspanya	98,60
7	S77039	<i>Leishmania donovani</i>	LD3	-	98,20
8	AY490814	<i>Leishmania major</i>	-	Tunus	98,20
9	XM_003722568	<i>Leishmania major</i>	Friedlin	-	98,20
10	XM_003879168	<i>Leishmania mexicana</i>	MHOM/GT/2001/U1103	Guatemala	98,10
11	XM_003879170	<i>Leishmania mexicana</i>	MHOM/GT/2001/U1103	Guatemala	97,80
12	XM_003722567	<i>Leishmania major</i>	Friedlin	-	97,80
13	XM_003879169	<i>Leishmania mexicana</i>	MHOM/GT/2001/U1103	Guatemala	97,50
14	AF193432	<i>Leishmania amazonensis</i>	IFLA/BR/67/PH8	Brezilya	97,50
15	JF422108	<i>Leishmania infantum</i>	MHOM/TN/80/IPI1	Tunus	97,10
16	U93582	<i>Leishmania panamensis</i>	M/HOM/PA/71LS94/6/7	Panama	96,40
17	U93579	<i>Leishmania panamensis</i>	M/HOM/PA/71LS94/3/7	Panama	96,40
18	KF150697	<i>Leishmania infantum</i>	MCAN/IR/07/Moheb-gh	İran	96,40
19	U93581	<i>Leishmania panamensis</i>	M/HOM/PA/71LS94/5/7	Panama	96,10
20	U93580	<i>Leishmania panamensis</i>	M/HOM/PA/71LS94/4/7	Panama	96,10
21	U93578	<i>Leishmania panamensis</i>	M/HOM/PA/71LS94/2/7	Panama	96,10
22	U93577	<i>Leishmania panamensis</i>	M/HOM/PA/71LS94/1/7	Panama	96,10
23	AF026144	<i>Leishmania guyanensis</i>	MHOM/BR/75/M-4147	Brezilya	96,10
24	AF026143	<i>Leishmania guyanensis</i>	MHOM/BR/75/M-4147	Brezilya	96,10
25	AF026142	<i>Leishmania guyanensis</i>	MHOM/BR/75/M-4147	Brezilya	96,10
26	AF026140	<i>Leishmania guyanensis</i>	MHOM/BR/75/M-4147	Brezilya	96,10
27	AF026138	<i>Leishmania braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M-2903	Brezilya	96,10

Tablo 4.4. devamı

Sıra No	GenBank ID	Organizma	Suş	Ülke	Benzerlik (%)
28	AF026135	<i>Leishmania braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M-2903	Brezilya	96,10
29	XM_010704331	<i>Leishmania panamensis</i>	MHOM/PA/94/PSC-1	Guatemala	95,70
30	XM_001568273	<i>Leishmania braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M2904	Brezilya	95,70
31	AF219228	<i>Leishmania panamensis</i>	-	Kolombiya	95,70
32	AF026137	<i>Leishmania braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M-2903	Brezilya	95,70
33	AF026134	<i>Leishmania braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M-2903	Brezilya	95,70
34	AF026133	<i>Leishmania braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M-2903	Brezilya	95,70
35	XM_015796612	<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	-	Çek Cumhuriyeti	90,30
36	XM_015796611	<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	-	Çek Cumhuriyeti	90,30
37	AF142990	<i>Leishmania braziliensis</i>	MOHM/PE/95/LQ-8	Peru	90,30
38	XM_015796616	<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	-	Çek Cumhuriyeti	89,60
39	XM_015796615	<i>Leptomonas pyrrhocoris</i> ,	-	Çek Cumhuriyeti	89,60
40	XM_015796614	<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	-	Çek Cumhuriyeti	89,60
41	XM_015796613	<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	-	Çek Cumhuriyeti	89,60
42	XM_009318228	<i>Trypanosoma grayi</i>	ANR4	Gambiya	83,90
43	EF101350	<i>Trypanosoma rangeli</i>	-	Kolombiya	83,70
44	EF101349	<i>Trypanosoma rangeli</i>	-	Kolombiya	83,70
45	DQ194341	<i>Trypanosoma rangeli</i>	H14	Kolombiya	83,30
46	AY147904	<i>Trypanosoma rangeli</i>	-	Kolombiya	83,00
47	DQ194340	<i>Crithidia</i> sp,	CJP-2005	Kolombiya	82,60
48	AY325812	<i>Trypanosoma rangeli</i>	-	Kolombiya	82,60
49	DQ194344	<i>Trypanosoma rangeli</i>	-	Kolombiya	82,20
50	DQ194339	<i>Crithidia</i> sp.	CJP-2005	Kolombiya	82,20

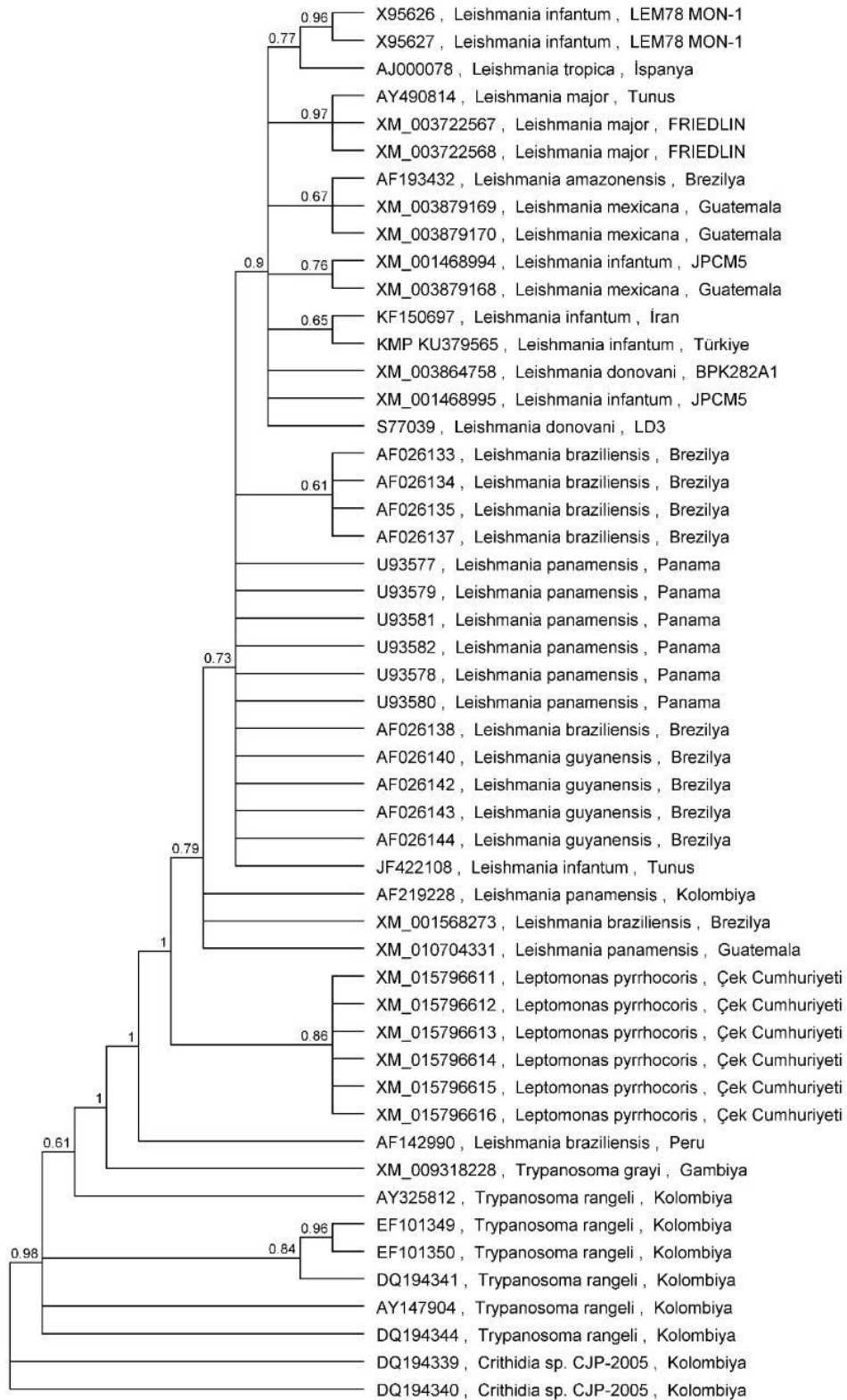
Tablo 4.5. GenBank’a kayıtlı KMP-11 sekanslarının ikili hizalama farklılıkları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51		
DQ194339		0.01	0.20	0.23	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.23	0.24	0.24	0.23	0.24	0.25	0.23	0.23	0.26	0.22	0.22	0.22	0.21	0.22	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.47	0.20	0.20	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.15	0.11	0.02	0.01	0.01	0.02	0.03	0.04	0.02	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.23	
DQ194340	0.01		0.20	0.23	0.24	0.24	0.23	0.24	0.23	0.23	0.23	0.24	0.23	0.24	0.25	0.23	0.23	0.36	0.22	0.22	0.21	0.22	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.47	0.20	0.20	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.15	0.11	0.02	0.01	0.01	0.03	0.03	0.02	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.23		
AF219228	0.20	0.30		0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.03	0.04	0.06	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.28	0.00	0.01	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.16	0.19	0.20	0.20	0.22	0.22	0.21	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.04			
AJ000078	0.23	0.23	0.03		0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.03	0.01	0.02	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.29	0.03	0.03	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.19	0.22	0.23	0.23	0.25	0.25	0.24	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02
X95626	0.24	0.24	0.04	0.01		0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.04	0.01	0.02	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.30	0.04	0.04	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.10	0.20	0.23	0.23	0.24	0.26	0.26	0.24	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	
X95627	0.24	0.24	0.04	0.01	0.01		0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.04	0.01	0.02	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.30	0.04	0.04	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10	0.20	0.23	0.23	0.24	0.25	0.26	0.24	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	
AY490814	0.24	0.23	0.04	0.02	0.02	0.02		0.01	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.01	0.02	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.29	0.04	0.04	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.19	0.23	0.23	0.23	0.25	0.25	0.24	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02		
XM_003722567	0.24	0.24	0.04	0.02	0.02	0.02	0.01		0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.01	0.02	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.30	0.04	0.04	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10	0.19	0.23	0.23	0.24	0.25	0.26	0.24	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02		
XM_003722568	0.24	0.23	0.04	0.02	0.02	0.02	0.00	0.01		0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.01	0.02	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.29	0.04	0.04	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.19	0.23	0.23	0.23	0.25	0.25	0.24	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02			
XM_003864758	0.23	0.23	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01		0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.00	0.01	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.29	0.03	0.03	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.09	0.18	0.22	0.22	0.23	0.24	0.25	0.23	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01			
AF193432	0.24	0.23	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01		0.01	0.01	0.03	0.03	0.01	0.02	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.30	0.04	0.04	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10	0.19	0.23	0.23	0.24	0.25	0.26	0.24	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02		
XM_003879169	0.24	0.24	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01		0.01	0.03	0.03	0.01	0.02	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.30	0.04	0.04	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10	0.19	0.23	0.23	0.24	0.25	0.26	0.24	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02		
XM_003879170	0.23	0.23	0.04	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01		0.03	0.03	0.01	0.02	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.29	0.04	0.04	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.19	0.23	0.23	0.23	0.25	0.25	0.24	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02			
XM_001468994	0.24	0.24	0.04	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.30	0.04	0.05	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.20	0.24	0.24	0.24	0.26	0.26	0.25	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03			
XM_003879168	0.25	0.25	0.05	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02		0.02	0.03	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.31	0.05	0.05	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.11	0.20	0.24	0.24	0.25	0.26	0.27	0.25	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03		
XM_001468995	0.23	0.23	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02		0.01	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.29	0.03	0.03	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.09	0.18	0.22	0.22	0.23	0.24	0.25	0.23	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01		
S77039	0.24	0.23	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.01		0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.29	0.04	0.04	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.19	0.23	0.23	0.23	0.25	0.25	0.24	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02		
KF150697	0.26	0.26	0.06	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05	0.06	0.03	0.04		0.06	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.32	0.06	0.06	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.12	0.22	0.25	0.25	0.26	0.27	0.28	0.26	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03			
AF026133	0.22	0.22	0.02	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.05	0.03	0.04	0.06		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.28	0.02	0.02	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.08	0.17	0.21	0.21	0.22	0.23	0.24	0.22	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.04			
AF026134	0.22	0.22	0.02	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.05	0.03	0.04	0.06	0.01		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.28	0.02	0.02	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.08	0.17	0.21	0.21	0.22	0.23	0.24	0.22	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.04			
AF026135	0.22	0.21	0.02	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.05	0.03	0.03	0.06	0.01	0.01		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.28	0.02	0.02	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.17	0.21	0.21	0.21	0.23	0.23	0.22	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03			
AF026137	0.22	0.22	0.02	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.03	0.04	0.06	0.01	0.01		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.28	0.02	0.02	0.03	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.18	0.21	0.22	0.22	0.24	0.24	0.23	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.04		
AF026138	0.21	0.21	0.01	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.02	0.03	0.05	0.01	0.01	0.01	0.02		0.01	0.01	0.01	0.27	0.01	0.02	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.17	0.20	0.21	0.21	0.23	0.23	0.22	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03			
AF026140	0.21	0.21	0.01	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.02	0.03	0.05	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01		0.01	0.01	0.27	0.01	0.02	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.17	0.20	0.21	0.21	0.23	0.23	0.22	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03		
AF026142	0.21	0.21	0.01	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.02	0.03	0.05	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01		0.01	0.01	0.27	0.01	0.02	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.17	0.21	0.21	0.21	0.23	0.23	0.22	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03		
AF026143	0.21	0.21	0.01	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03</																																							

Şekil 4.17. KMP- 11 nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları

Bayesian filogenisine göre oluşturulan ağaç üzerinde (Şekil 4.18.) görüleceği üzere çalışmamızda karakterize edilen izolatın (KU379565) İran'dan izole edilen *L. infantum* (KF150697) izolatı ile en yüksek identikliği gösterdiği ve birlikte cluster oluşturdukları saptanmıştır. Bayesian filogenetik çözünürlüğü yüksek posterior olasılıklarla desteklenmiştir ($>0,61$). *Leishmania* izolatlarının KMP-11 gen bölgesi sekans analizleri, bu gen bölgesindeki intraspesifik nükleotid farklılıklarının interspesifik nükleotid farklılıklarla çakıştığını ve dolayısıyla filogenetik bazda tür ayırımına olanak vermediğini ortaya koymuştur.

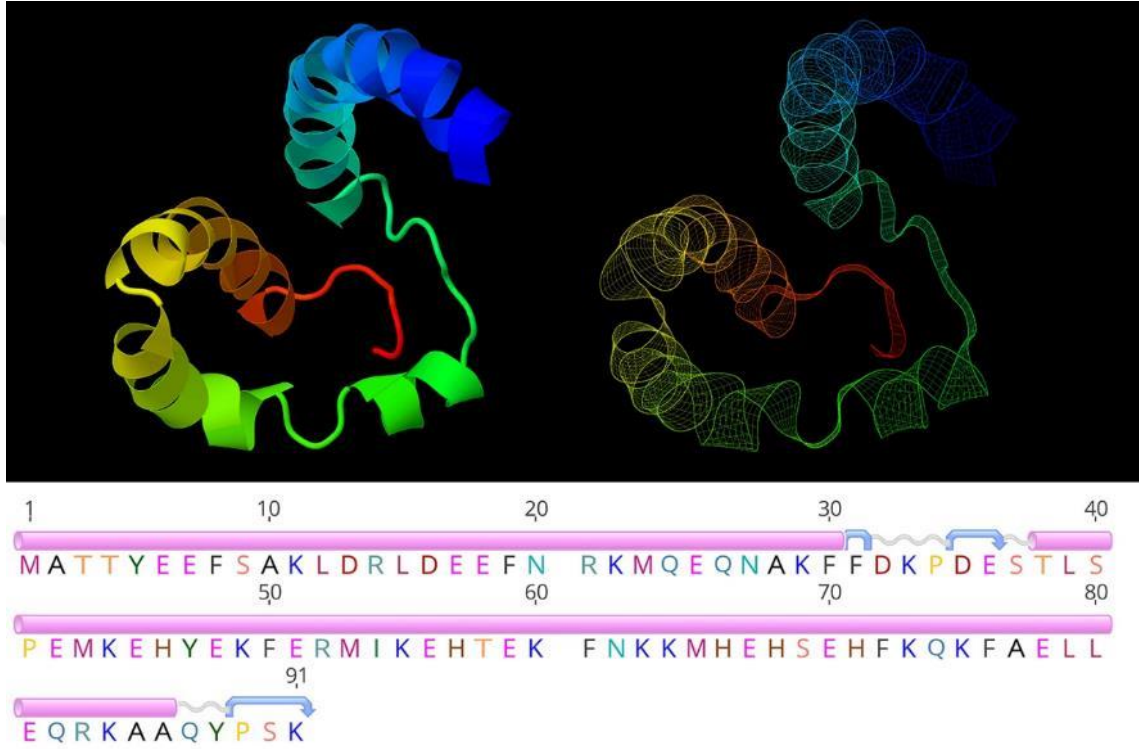




Şekil 4.18. *L. infantum* KMP-11 gen dizisinin (KU379565) GenBank'a kayıtlı dizilerle karşılaştırma sonuçları

4.3.4. Protein Analiz Sonuçları

L. infantum KMP-11 geninin amino asit dizilimi ve üç boyutlu yapısı Şekil 4.19’da gösterilmiştir. 276 nükleotid tarafından kodlanan 92 aminositlik KMP-11 proteininin üç boyutlu yapısında yer alan katlanmalar belirlenmiştir.

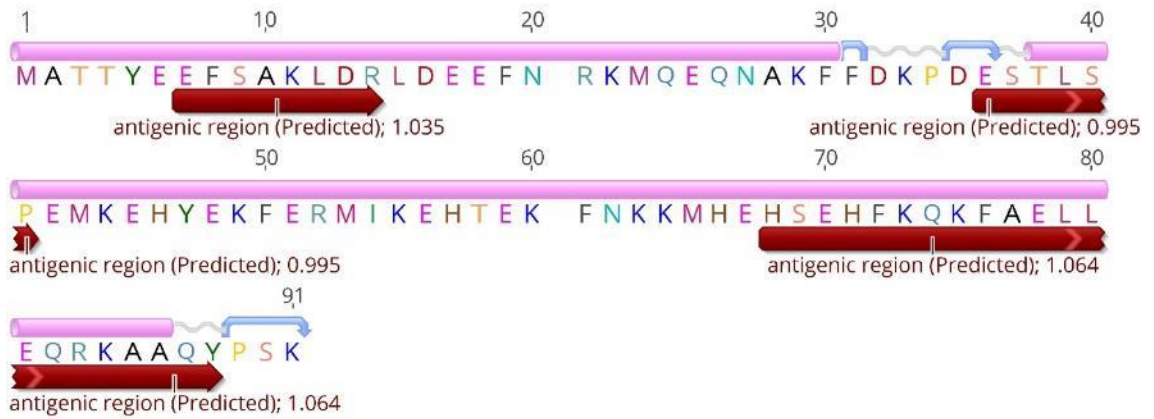


Şekil 4.19. *L. infantum* KMP-11 proteininin 3 boyutlu görünümü ve aminoasit dizisi

L. infantum KMP-11 proteininin antijenik yapısı incelendiğinde, antijenik puanı 1.064 ile 0.995 arasında, aminoasit uzunlukları ise 6 ile 21 arasında değişen 3 antijenik bölge tespit edilmiştir (Tablo 4.6.). Özellikle 68. ve 88. aminoasitler arasında yer alan 21 aminoasitlik antijenik bölge ön plana çıkmaktadır. Antijenik bölgelerin protein üzerinde dağılımı Şekil 4.20.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.6. *L. infantum* KMP-11 proteininde yer alan antijenik bölgeler

Sıra No	Aminoasit Dizisi	Başlangıç	Bitiş	Aminoasit Sayısı	Antijenik Puan
1	HSEHFKQKFAELLE QRKAAQY	68	88	21	1.064
2	EFSAKLDR	7	14	8	1.035
3	ESTLSP	36	41	6	0.995

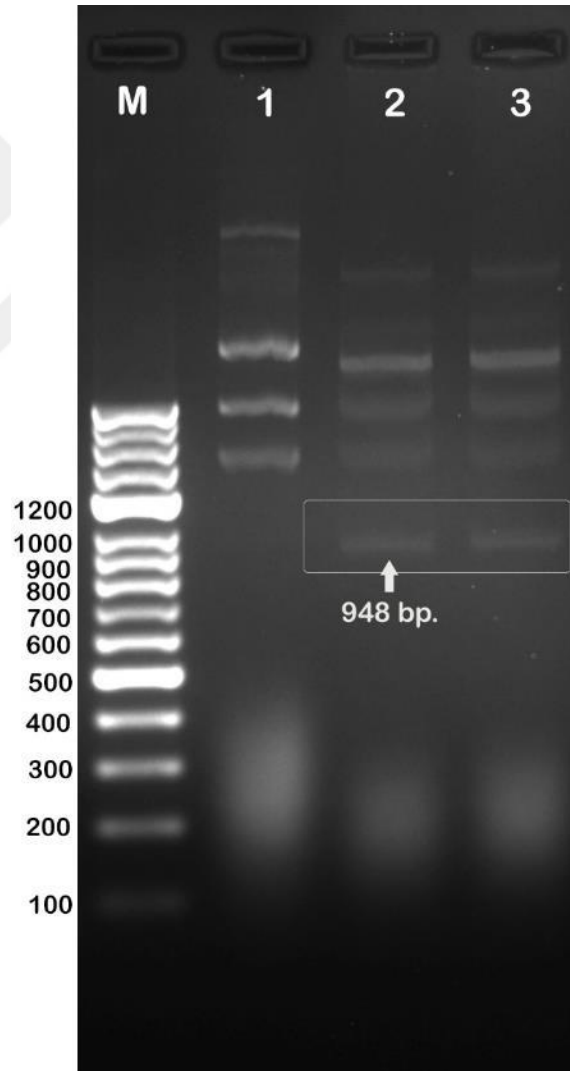


Şekil 4.20. *L. infantum* KMP-11 proteininde yer alan antijenik bölgeler.

4.4. LACK ve KMP-11 Genlerinin Füzyonu

4.4.1. Restriksiyon Analizleri

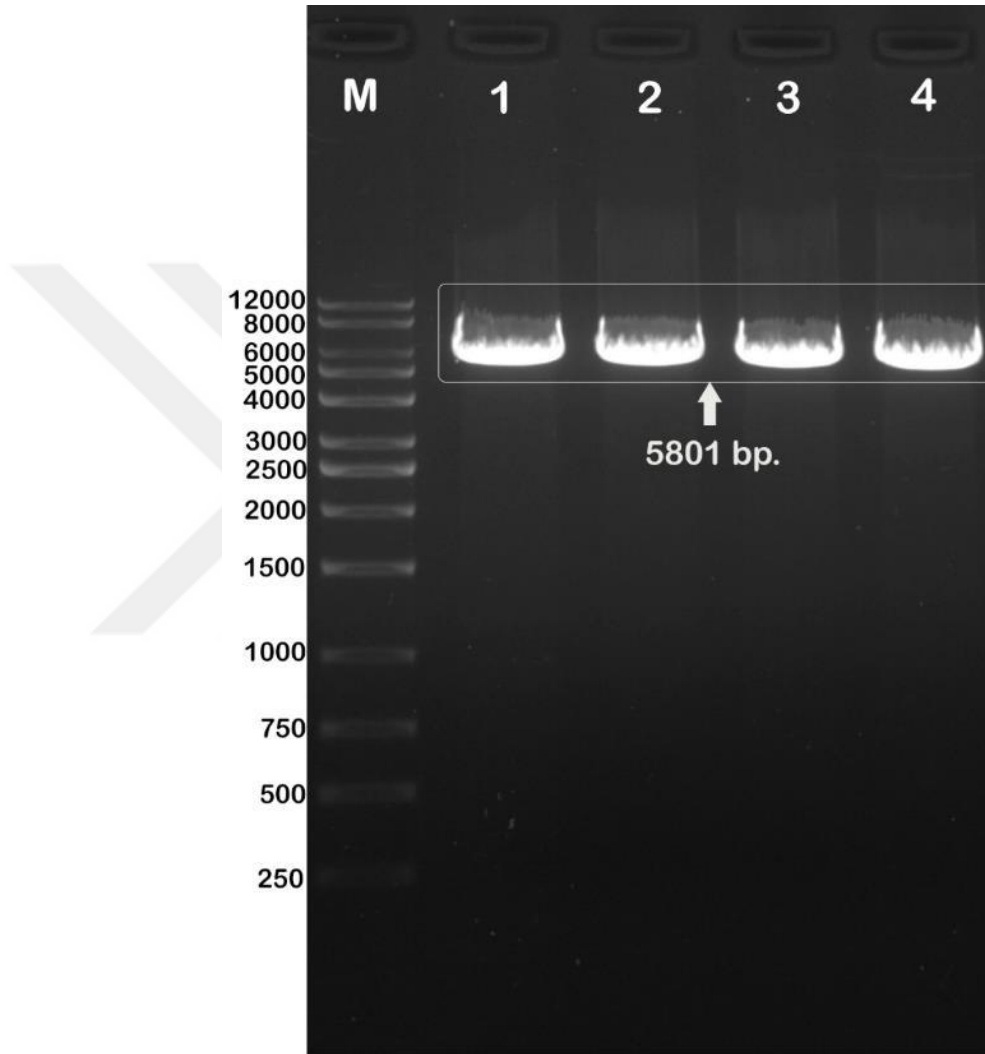
LACK geninin pcDNA3.1+KMP-11 rekombinant plazmidine sub-klonlama için pJet1.2+LACK plazmidi *HINDIII*-HF™ (NEB, İngiltere) ve *BamHI*-HF™ (NEB, İngiltere) enzimleri ile aynı anda restriksiyon yapılmıştır. *HINDIII* ve *BamHI* yapışkan bölgesi taşıyan LACK genini içeren ürünü etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jele yüklenmiş ve elektroforez sonrası BioRad ChemiDoc Mp görüntüleme cihazında (BioRad, Almanya) görüntülenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. *HINDIII* ve *BamHI* yapışkan bölgesi taşıyan LACK genini içeren restriksiyon ürünü.

pcDNA3.1+KMP-11 rekombinant plazmidi sub-klonlama için *HINDIII*-HF™ (NEB, İngiltere) ve *BamHI*-HF™ (NEB, İngiltere) restriksiyon enzimleri ile aynı anda

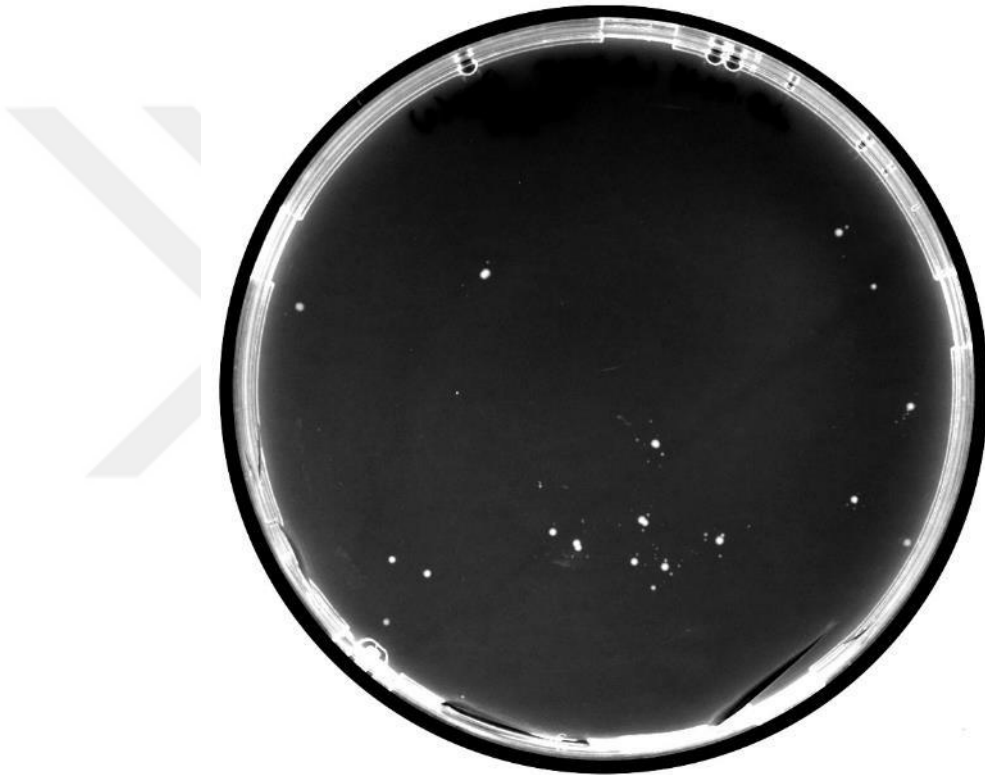
kesilmiştir. *HINDIII* ve *BamHI* yapışkan bölgesi taşıyan lineer pcDNA3.1+KMP-11 ürünü etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jele yüklenmiş ve elektroforez sonrası BioRad ChemiDoc Mp görüntüleme cihazında (BioRad, Almanya) görüntülenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. *HINDIII* ve *BamHI* yapışkan bölgesi taşıyan lineer pcDNA3.1+KMP-11 plazmidini içeren restriksiyon ürünü.

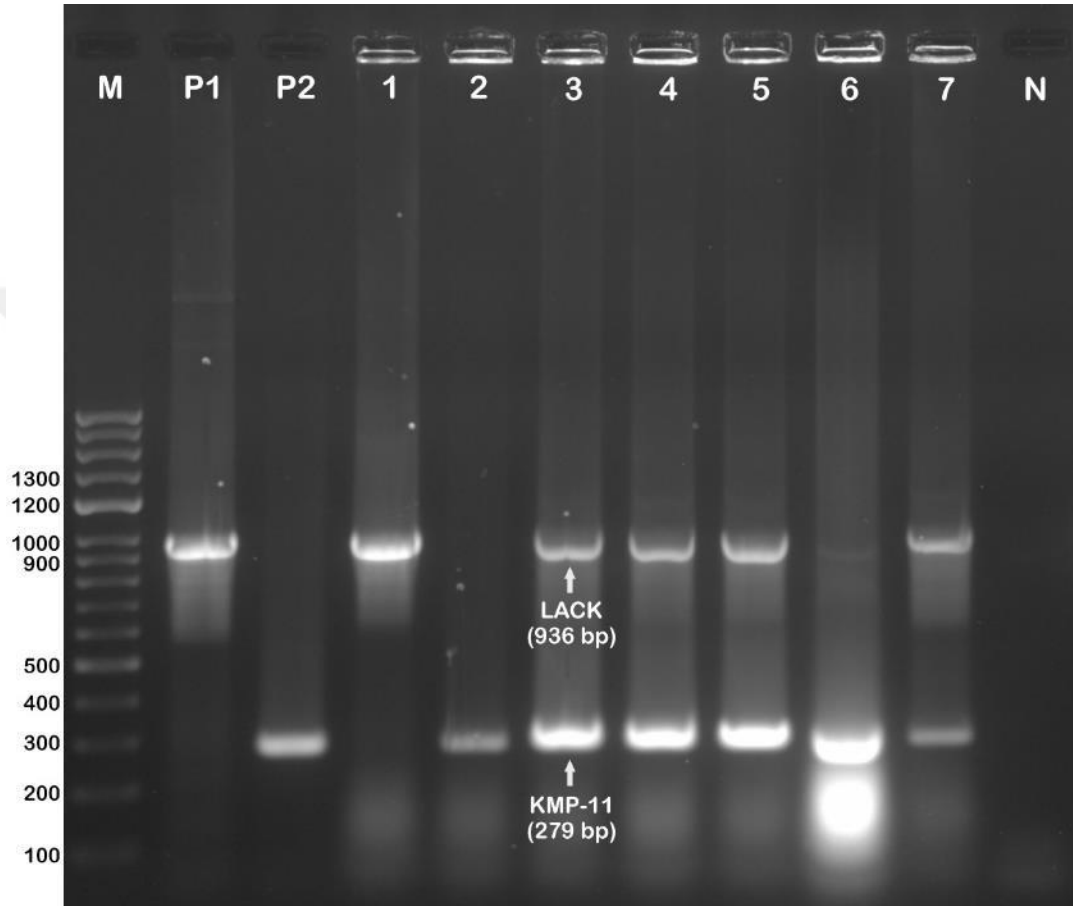
4.4.2. Füzyon Genlerin Klonlama Sonuçları

Multi-antijenik rekombinant pcDNA3.1+LACK+KMP-11 plazmidinin OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* hücreleri (Invitrogen, ABD) transformasyonu yapılmıştır. Katı besiyerinin 37 °C’de bir gece inkübasyona sonrası oluşan koloniler tespit edilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Multi-antijenik rekombinant pcDNA3.1+LACK+KMP-11 plazmidinin *E. coli* kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası üretilen koloniler.

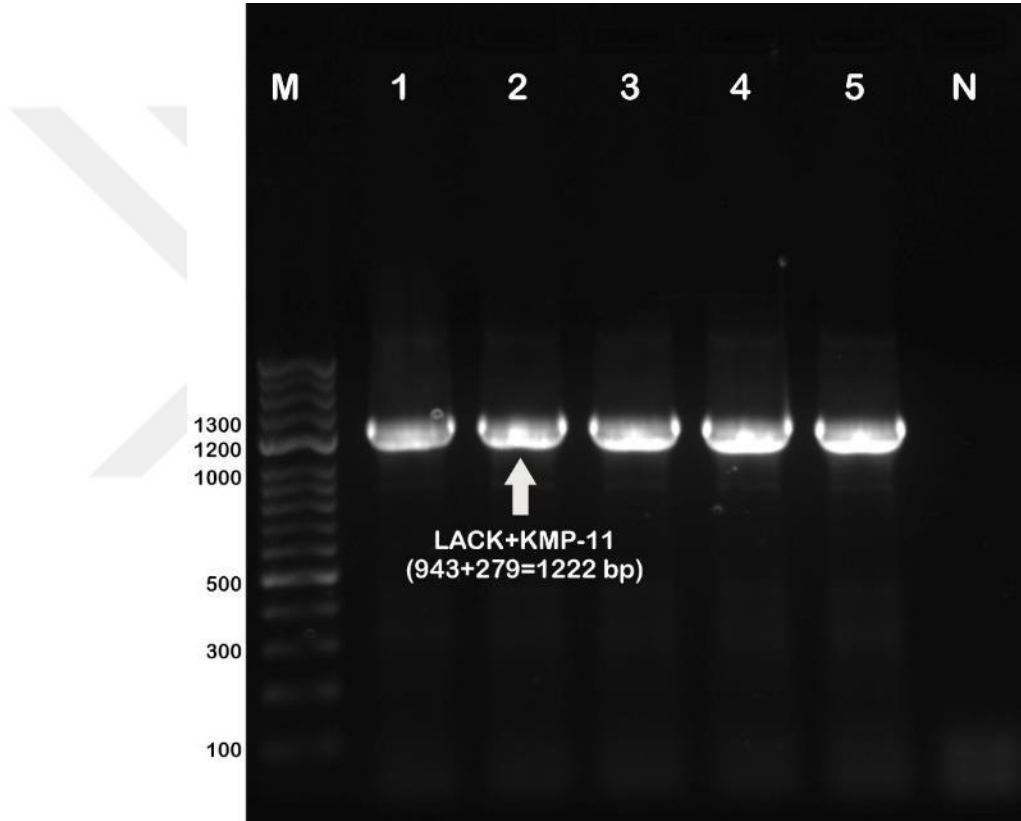
Transformasyon sonrası gözlenen kolonilerin rekombinant pcDNA3.1+LACK+KMP-11 plazmidini içerip içermediğini tespit etmek için PCR tarama yapılmıştır. Katı besiyerinden seçilen 6 koloninin tamamının rekombinant plazmidi içerdiği PCR tarama ile gösterilmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Kolonilerde rekombinant plazmid varlığının PCR tarama ile doğrulanması. **M.** 100 bp.'lik marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya) **P1.** LACK pozitif kontrol, **P2.** KMP-11 pozitif kontrol **1.** 1 No'lu koloni LACK F ve LACK R primerleri ile **2.** 1 No'lu koloni KMP-11 F ve KMP-11 R primerleri ile **3.** 1 No'lu koloni LACK F-R ve KMP-11 F-R primerleri ile **4-7.** PCR tarama sonucu LACK F-R ve KMP-11 F-R primerleri pozitif diğer örnekler, **N.** Negatif kontrol.

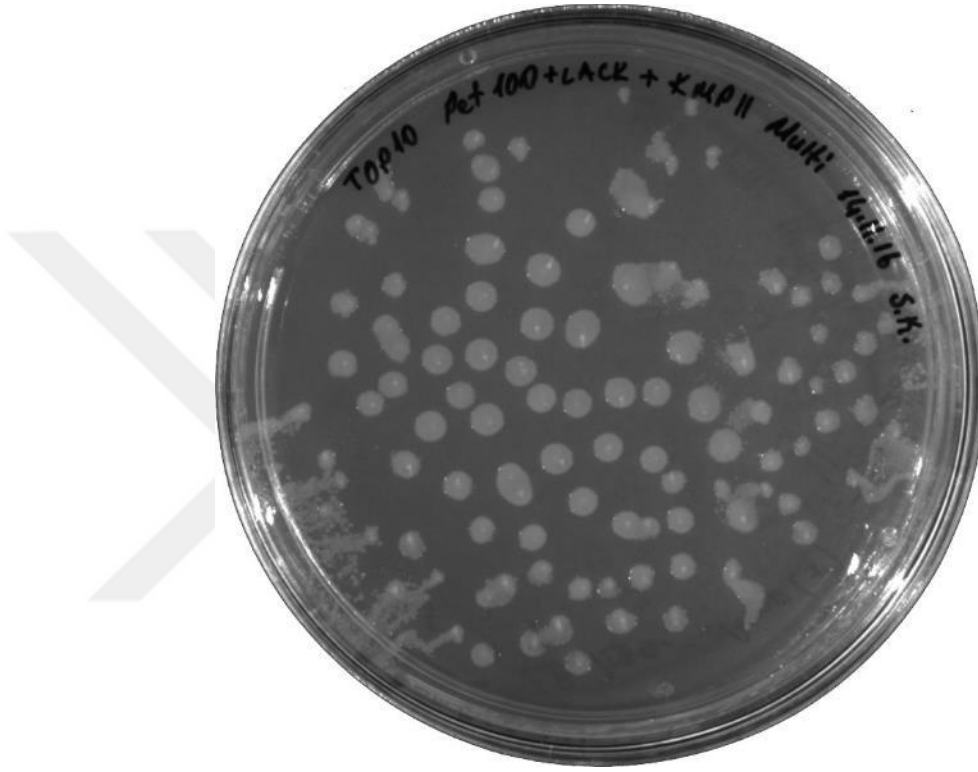
4.5. Füzyon Protein Ekspresyon Analiz Sonuçları

LACK+KMP-11 multi-antijenik genlerinin protein ekspresyonu için kullanılacak pET100 Directional TOPO (Thermo Scientific, ABD) plazmidine sub-klonlaması için CACC ön bölgesini içeren LiLACK F1 primeri ve KMP-11 R primeri PCR kurulmuştur. Elde edilen PCR ürünü etidyum bromidle boyanmış %1,5'luk agaroz jele yüklenmiş ve elektroforez sonrası BioRad ChemiDoc Mp görüntüleme cihazında (BioRad, Almanya) görüntülenmiştir (Şekil 4.25).



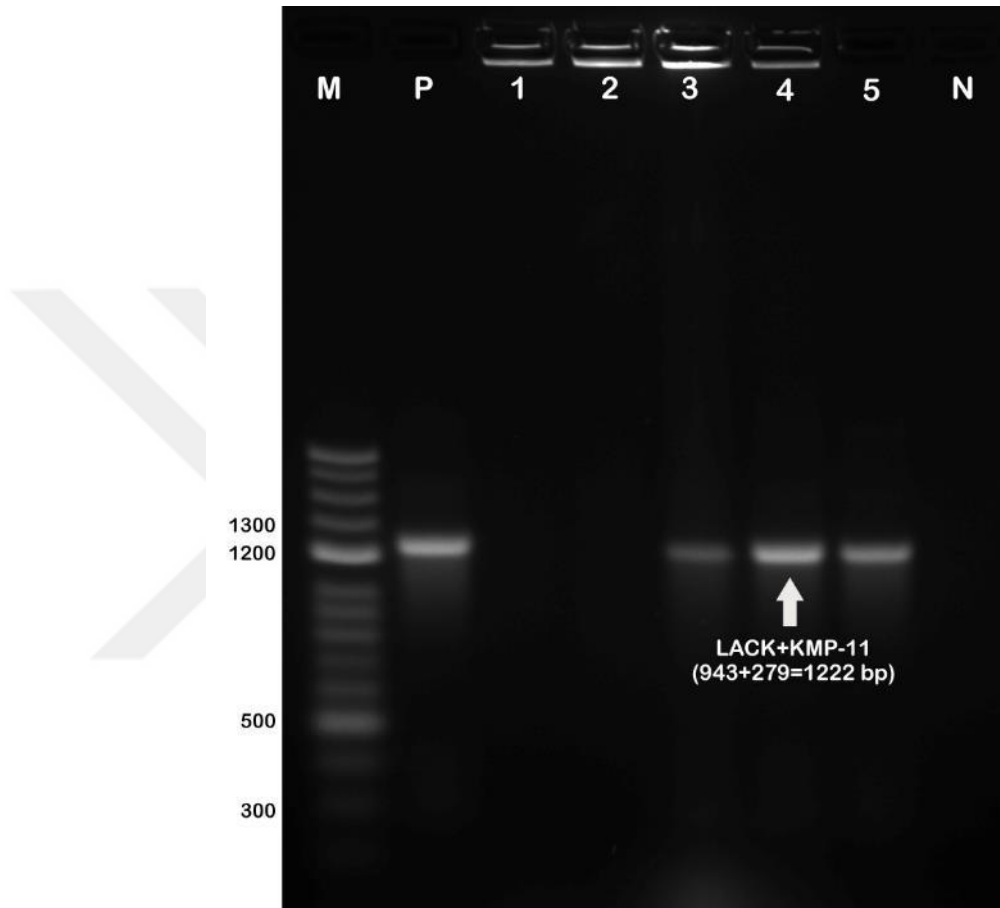
Şekil 4.25. LACK+KMP-11 PCR ürününün agaroz jel elektroforezde görünümü. **M.** 100 bp.'lik marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya) **1-5.** 1222 bp. LACK+KMP-11 Pozitif örnekler, **N.** Negatif kontrol.

Agaroz jelden saflaştırılmış *L. infantum* 1222 bp.'lik LACK+KMP-11 PCR ürünü pET100 Directional TOPO (Thermo Scientific, ABD) ekspresyon plazmidine klonlanmıştır. Elde edilen rekombinant plazmid One Shot TOP10 kompetan *E. coli* hücrelerine transforme edilmiş ve 37 °C'de bir gece inkübasyona sonrası oluşan koloniler tespit edilmiştir (şekil 4.26).



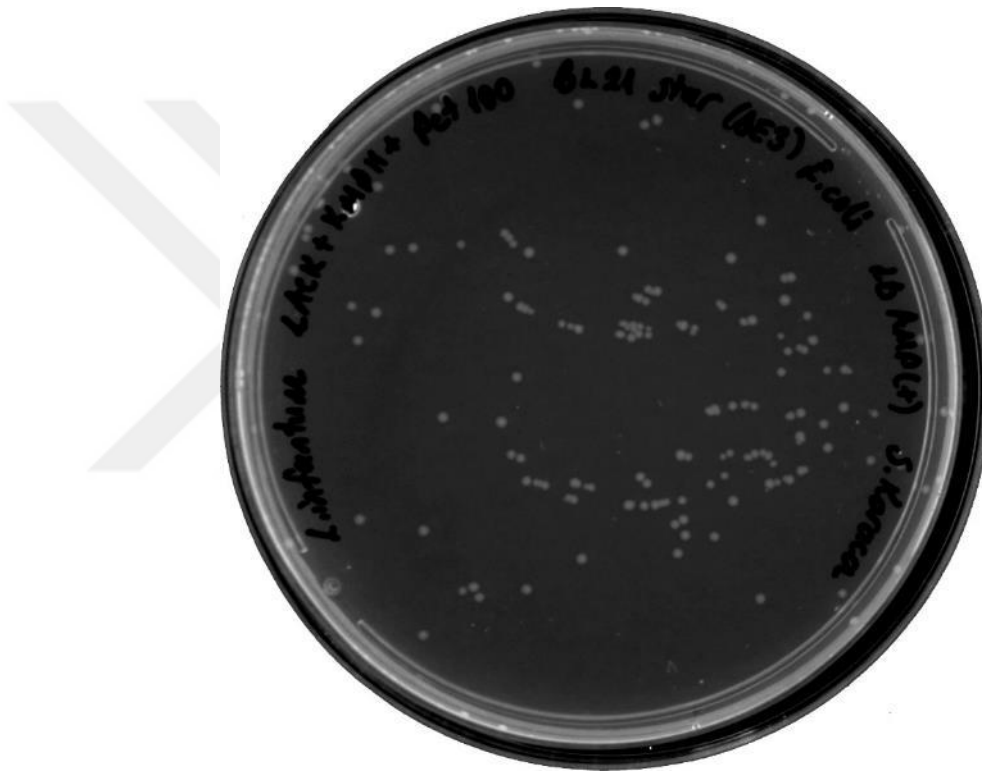
şekil 4.26. *L. infantum* LACK+KMP-11 PCR ürününün One Shot Top10 *E. coli* kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası üretilen koloniler

Transformasyon sonrası gözlenen kolonilerin rekombinant pET100+LACK+KMP-11 plazmidini içerip içermediğini tespit etmek için PCR tarama yapılmıştır. Katı besiyerinden seçilen 5 koloniden 3 tanesinin rekombinant plazmidi içerdiği PCR tarama ile gösterilmiştir (Şekil 4.27).



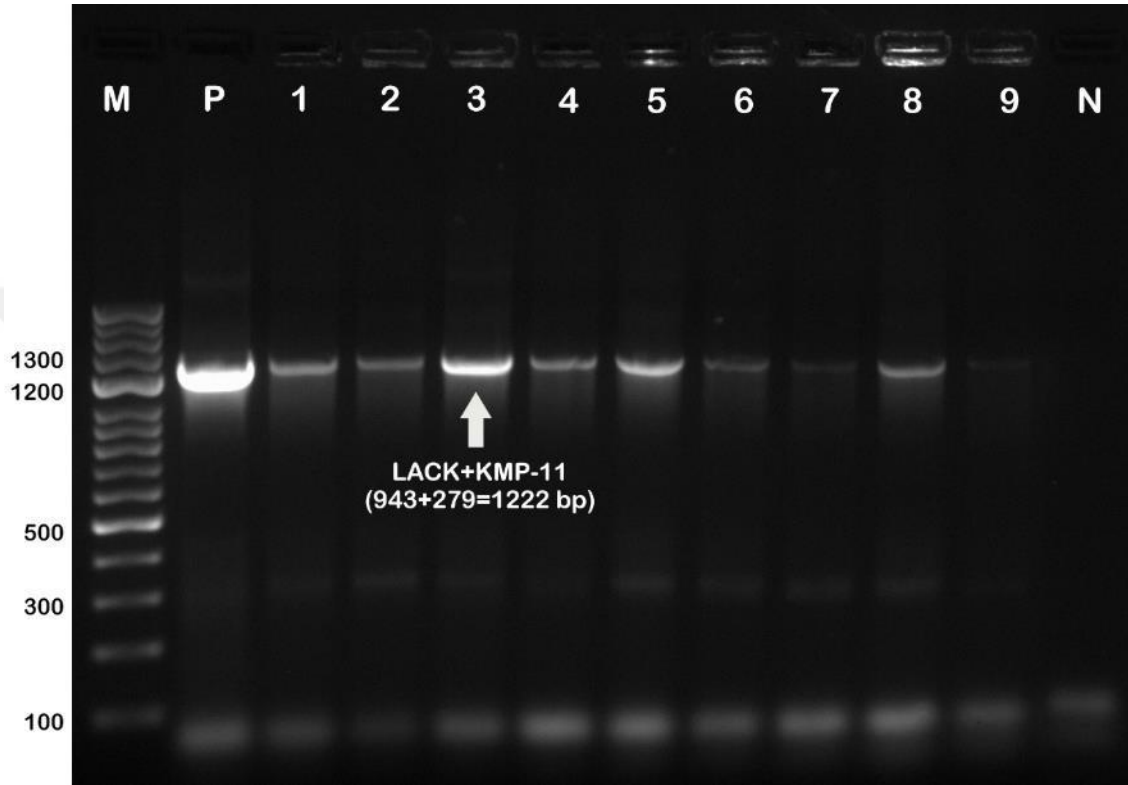
Şekil 4.27. Kolonilerde rekombinant plazmid varlığının PCR tarama ile doğrulanması. **M.** 100 bp.'lik marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya) **P.** LACK+KMP11 pozitif kontrol **1-5.** LACK F1 ve KMP-11 R primerleri ile kurulan PCR örnekleri **N.** Negatif kontrol.

PCR Screening ile pozitif olarak belirlenen koloniler ampisilin içeren 10 ml LB sıvı besi yerine ekilerek 37 °C 'de bir gece inkübe edilmiştir. Rekombinant pET100+LACK+KMP-11 plazmidi High Pure Plasmid isolation Kiti (Roche) kullanılarak izole edilmiştir. Minipreple elde edilen rekombinant plazmidin One Shot BL21 Star (DE3) *E. coli* hücrelerine (Invitrogen, ABD) transformasyonu yapılmıştır. Katı besiyerinin 37 °C'de bir gece inkübasyon sonrası oluşan koloniler tespit edilmiştir (Şekil 4.28).



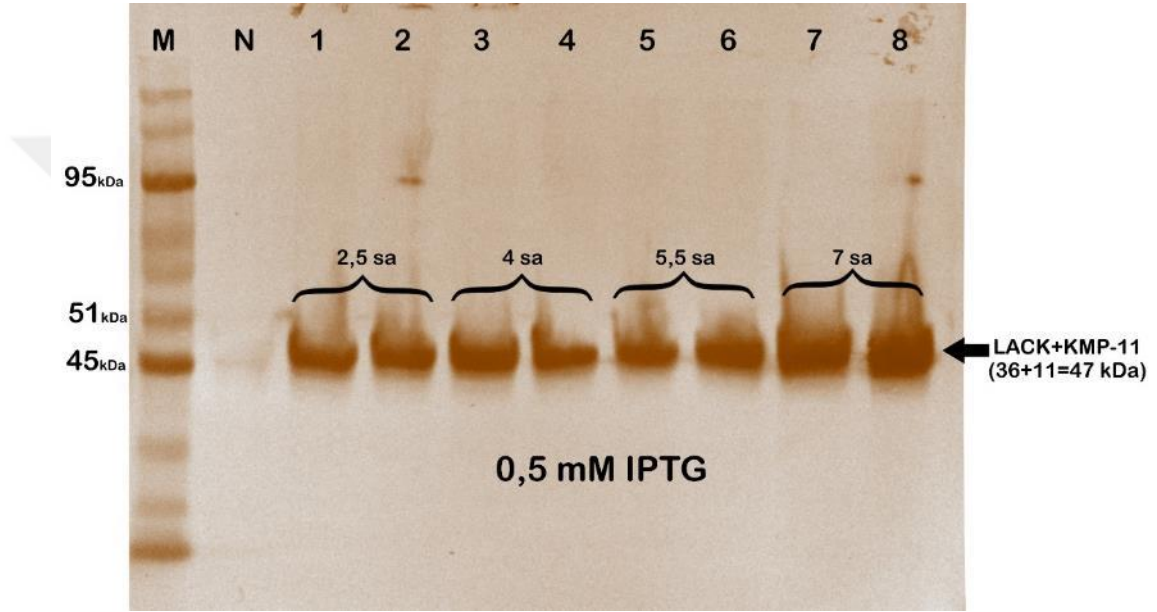
Şekil 4.28. *L. infantum* KMP-11 PCR ürününün One Shot BL21 Star (DE3) *E. coli* kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası üretilen koloniler.

Transformasyon sonrası gözlenen kolonilerin rekombinant pET100+LACK+KMP-11 plazmidini içerip içermediğini tespit etmek için PCR tarama yapılmıştır. Katı besiyerinden seçilen 9 koloninin tamamının rekombinant plazmidi içerdiği PCR tarama ile gösterilmiştir (Şekil 4.29).

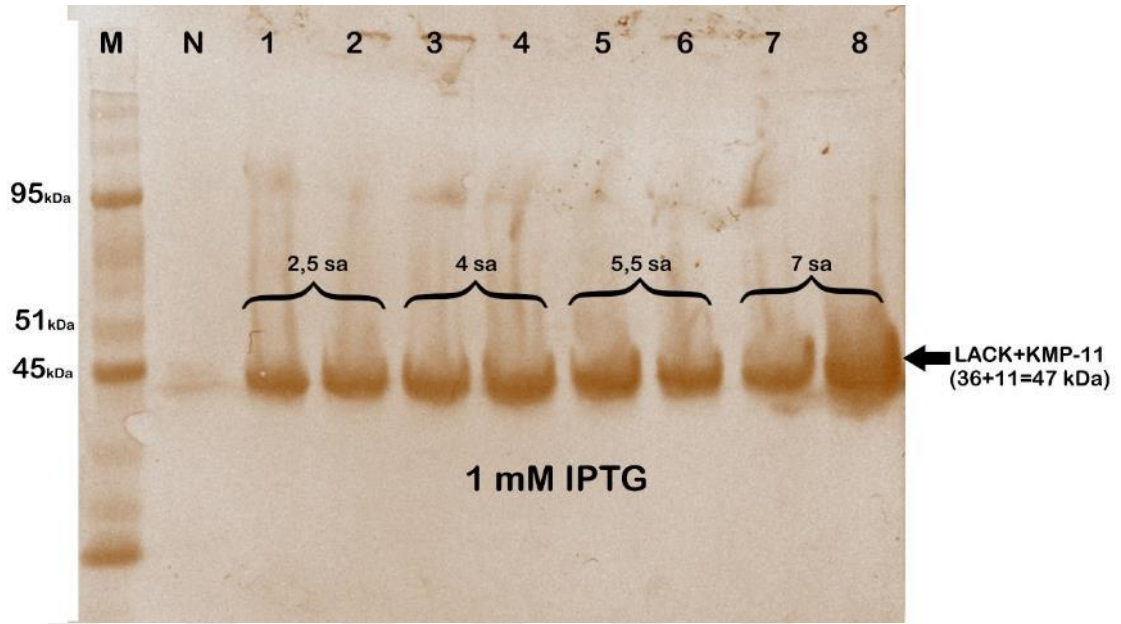


Şekil 4.29. Kolonilerde rekombinant plazmid varlığının PCR tarama ile doğrulanması **M.** 100 bp.'lik marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya) **P.** LACK+KMP11 pozitif kontrol **1-9.** LACK F1 ve KMP-11 R primerleri ile kurulan PCR örnekleri **N.** Negatif kontrol.

Rekombinant protein ekspresyonu sonucu elde edilen örnekler SDS-PAGE’de yürütülmüştür. Örneklerden Western blot analizi yapılarak rekombinant protein ekspresyonu tespit edilmiştir. 0.5 mM (Şekil 4.30) ve 1 mM (Şekil 4.31) IPTG konsantrasyonu ile indükleme, anti-HisG-HRP antikoru (Invitrogen, ABD) ile inkübasyon ve DAB tablet solüsyonu ile boyama ile elde edilen bantlar BioRad ChemiDoc Mp cihazında (BioRad, Almanya) cihazında görüntülenmiştir.



Şekil 4.30. 0.5 mM IPTG konsantrasyonu ile indükleme sonucu elde edilen bantlar. **M.** Protein marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya) **1-2.** 2,5 saat sonra alınan örnekler, **3-4.** 4 saat sonra alınan örnekler, **5-6.** 5,5 saat sonra alınan örnekler, **7-8.** 7 saat sonra alınan örnekler, **N.** Negatif kontrol.



Şekil 4.31. 1 mM IPTG konsantrasyonu ile indüklemeye sonucu elde edilen bantlar. **M.** Protein marker (SolisBio Dyne FIREPol, Estonya) **1-2.** 2,5 saat sonra alınan örnekler, **3-4.** 4 saat sonra alınan örnekler, **5-6.** 5,5 saat sonra alınan örnekler, **7-8.** 7 saat sonra alınan örnekler, **N.** Negatif kontrol.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Leishmaniasisin farklı formları arasında en ölümcül olanı, retiküloendotelial sistemleri etkileyen VL'dir. Dünya çapında genellikle ölümle sonuçlanan yıllık yaklaşık 200.000-400.000 yeni VL olgusu görülmektedir (6). VL'e Eski Dünya ülkelerinde *L. donovani* ve *L. infantum* türleri, Yeni dünya ülkelerinde ise *L. chagasi* türü neden olmaktadır. *L. donovani*, Hint alt kıtasında ve Doğu Afrika ülkelerinde özellikle Sudan, Etiyopya, Kenya ve Somali'de VL etkenidir. Bu tür çoğunlukla deniz seviyesine yakın bölgelerde yaygın olarak görülmektedir (77). Yaygın *Leishmania* türlerinden biri olan *L. infantum* ise Avrupa, Akdeniz havzası, Ortadoğu ve Asya ülkelerine kadar uzanan bölgede VL'e neden olmaktadır. HIV ve diğer immün yetmezliklerin giderek artması, seyahatler, savaşlar ve laboratuvar tanısındaki problemler leishmaniasisin yayılmasında önemli rol oynamaktadır (26).

Türkiye'de hemen hemen bütün bölgelerde VL olguları bildirilmiş olmakla birlikte daha çok Ege ve Akdeniz bölgelerinde görülmekte ve hastalık etkeni de çoğunlukla *L. infantum*'dur. Türkiye'deki VL olgularının çoğu 11 yaşından küçük çocuklarda görülmüştür ve klinik özellikleri leishmaniasisin Akdeniz formu ile tutarlılık göstermektedir (78).

VL tedavisinde yaygın olarak pentavalan antimon bileşiklerinden meglumin antimoniat ve sodyum stiboglukonat kullanılmaktadır. Pentavalan antimon bileşiklerine karşı artan direnç en önemli problemdir. Bu durum Hindistan Kuzey Bihar'da antimon tedavisinde başarı oranını %50'den fazla düşürmüştür (34). Pentavalan antimon bileşikleri, intramusküler yapılan uygulamalarında muskuler fibrozis ve abse oluşumu gibi yan etkilere de neden olabilmektedir.

Beş değerli (pentavalan) antimon bileşiklerine dirençli olgularda *Streptomyces nodosus* aktinomisetlerinden elde edilen, makrolid grubu bir preparat olan Amphotericin B

kullanılmaktadır. Amphotericin B ise özellikle nefrotoksik özelliği sebebiyle fazla tercih edilememektedir (36). Son yıllarda, özellikle gelir seviyesi yüksek ülkelerde VL tedavisi için Amphotericin B'nin liposomal formu (L-AMB) tercih edilmekle birlikte, yüksek maliyeti nedeniyle hastalığın endemik olduğu dar gelirli ülkelerde bu ilacın kullanım oranı düşüktür (37).

VL'e karşı ilk oral-aktif ilaç olarak geliştirilen Miltefosin ile yapılan çalışmalar 3-4 hafta içerisinde %95-100'lere ulaşan olumlu sonuçlar vermiştir (38). Miltefosinin tedavi potansiyelinin yüksek olduğu düşünülmeyle birlikte kullanımının uygunluğu ve miltefosine karşı olası direnç ile ilgili endişeler devam etmektedir (34).

Dirençli VL olgularında kullanılan diğer bir alternatif ilaç olan pentamidinin kullanımı da toksisitesi nedeniyle sınırlandırılmıştır (38, 39). Kuzey Bihar'da dirençli olgularda paramomisin (aminosidin) etkili bir şekilde kullanılmasına rağmen Sudan, Kenya ve Etiyopya'da paramomisin, sodium stibogluconate ve bu ikisini birlikte içeren ilaçlar tedavide etkisiz kalmıştır (40).

VL ve KL tedavisinde kullanılan pentavalan antimon bileşiklerinin ve diğer tedavi edici ajanların toksisite ve yan etkilerinin çokluğu, L-AMB benzeri tedavi edici ajanların yüksek maliyeti, bu ajanlara karşı direnç gelişimi gibi faktörler alternatif tedavi yöntemlerinin ve aşı geliştirilmesinin gerekliliğini arttırmaktadır. Leishmaniasise karşı etkin bir aşı henüz geliştirilememiştir.

Leishmaniasise karşı geliştirilen aday aşılar; birinci, ikinci ve üçüncü nesil aşılar olarak üç ana gruba ayrılmaktadır. Birinci nesil aşılarda parazitin öldürülmüş formunun veya zayıflatılmış formunun verilmesi metodu kullanılmaktadır. Yöntemin standardize edilememesi, kullanılan suşun virulansındaki değişiklikler, zaman zaman inoküle edilen bölgede oluşan inatçı ve devam eden lezyonlar birinci nesil aşıların yaygın kullanımlarını engellemektedir (54).

İkinci nesil olarak tanımlanan aşılar içerisinde; saflaştırılmış parazit antijenlerini ve rekombinant proteinleri içeren protein aşılarının yanında, canlı parazitlerden belli bir genin uzaklaştırılması (knock-out) veya eklenmesi (knock in) yolu ile elde edilen aşılar yer almaktadır.

Biyoteknolojik yöntemlerin gelişmesiyle, üçüncü nesil aşılar olarak tanımlanan DNA ve multi-antijenik DNA aşı çalışmaları ön plana çıkmaktadır. DNA aşıları, daha dayanıklı olmaları, üretim maliyetinin daha düşük olması, taşınmasında soğuk zincire ihtiyaç duyulmaması ve farklı antijenik genlerin bir araya getirebilmesi gibi özellikler sayesinde rekombinant protein aşılara göre daha kullanışlıdır. Leishmaniasis karşı aşı adayları olarak kullanılan antijenlere ait DNA dizileri genellikle DNA aşı adayları olarak da kullanılmaktadır.

Leishmaniasis karşı DNA aşısı geliştirilmesi çalışmalarında, parazite ait immunitesi yüksek olan aşı adayları genler, öncelikle tekli olarak plazmidlere yerleştirilmiş ve koruyucu etkinlikleri araştırılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, tek başlarına immunitesi yeterli olmayan bu genlerin aynı plazmide sıralı olarak yerleştirilmesi ile elde edilen multi-antijenik aşılar öne çıkmaktadır. Bu aşılar multi-subunit aşılar olarak da adlandırılmaktadır. Bu aşılar da faz çalışmaları halen devam etmektedir (58, 59).

Leishmaniasis karşı multi-antijenik DNA ve protein aşı adaylarının kullanıldığı hayvan deneylerinde umut verici sonuçlar elde edilmektedir. Bu nedenle günümüzdeki aşı çalışmaları daha çok multi-antijenik aşı adaylarına yönelmiştir.

Leish-111f-MPL-SE olarak adlandırılan multi-antijenik DNA aşı adayları, insan klinik deneylerinde leishmaniasis için ilk tanımlanan aşıdır. Infectious Disease Research Institute (IDRI) tarafından geliştirilmiştir ve Sudan’da faz-II klinik çalışmaları devam etmektedir. Leish-111f, parazitin hayat döngüsünde nispeten korunmuş olan tiol-spesifik antioksidan (TSA), *L. major* stres indüklenbilir protein 1 (LmSTI1) ve *Leishmania* uzama başlatma faktörü (LeIF) proteinlerinden oluşan, üç bileşenli bir füzyon proteindir (60). Bu proteinlerin daha önce kutanöz veya mukozal leishmaniasis karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Leish-111f, adjuvan olarak Monofosforil lipid A (MPL-SE) ile kombine edilerek *L. infantum*’un neden olduğu VL’e karşı koruyucu etkinliği araştırılmıştır. Leish-111f-MPL-SE kombinasyonu kullanılarak farelerde ve hamsterlarda yapılan ön çalışmalarda CD4⁺ T hücrelerinden gamma interferon, interlekin 2 (IL-2) ve tümör nekroz faktör sitokinlerin salgısının arttığı, Th1-tip güçlü immün yanıt oluştuğu ve VL’e karşı önemli ölçüde koruma sağladığı tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada, *L. infantum* enfeksiyonuna karşı parazit yükünde %99,6 azalma rapor edilmiştir. Bu rakam, VL hayvan modellerinde denenen aşı adayları arasında

bildirilen en yüksek oran olmuştur. Leish-111f-MPL-SE için sağlıklı insan deneklerde faz I-II güvenlik ve immünojenite testleri tamamlanmıştır (79).

Bu çalışmada *L. infantum* aktive edilmiş protein kinaz C reseptörü (LACK) geni ve kinetoplastid membran proteini-11 (KMP-11) genleri ve proteinleri hedef olarak seçilmiştir. Her iki gen de üçüncü nesil aşilar olarak kabul edilen ümit verici DNA aşı adayları arasında yer almaktadır.

Leishmaniasis aşı adaylarında hedef antijenlerden biri olan LACK antijeni ökaryotlarla sınırlı, WD-40 protein ailesinde yer alan, 36 kDa moleküler ağırlıkta ve çok sayıda düzenleyici fonksiyona sahip olan bir proteindir (61). LACK antijeni *Leishmania* türlerinde hem promastigot hem de amastigot dönemde korunmuş bir yapıdır. LACK antijenine ait DNA'nın leishmaniasise karşı immünojenitesi doğrulanmıştır (65-67). Yapılan çalışmalar, *L. infantum* LACK geni taşıyan rekombinant plazmidin ve rekombinant vaccinia virüsünün (rVV) BALB/c farelere uygulanması ile KL'e karşı bağışıklık sağlandığını göstermiştir (63, 64).

Bu çalışmada, *L. infantum* (MHOM/TR/2009/EP174) LACK genine ait DNA dizisi elde edilmiştir. 939 bp. uzunluğa sahip KT184317 GenBank numaralı LACK gen sekansı, mevcut homolog izolatlarla ait ilgili gen bölgesi sekanslarıyla çoklu hizalamaları yapılarak, interspesifik ve intraspesifik nükleotid farklılıkları açısından incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda; *L. infantum* JPCM5 (XM_001470282) ve *L. infantum* PB75 (U49695) suşu ile %100 identik olduğu tespit edilmiştir. GenBank'ta LACK genine ait diğer sekanslarla karşılaştırıldığında; Çin Halk Cumhuriyeti'nden izole edilen *L. donovani* (AB075696) suşu ile %99.90, Brezilya'dan izole edilen *L. chagasi* (EU016105) suşu ile %99.90, İran'dan izole edilen *L. tropica* (JX305924) suşu ile %98.90, İran'dan izole edilen *L. major* (JX305924) suşu ile %98.70, Guetamala'dan izole edilen *L. mexicana* (XM_003877070) suşu ile %98.20, Brezilya'dan izole edilen *L. amazonensis* (AF363977) suşu ile %98.20, Brezilya'dan izole edilen *L. braziliensis* (AF363978) suşu ile %98.10, Panama'dan izole edilen *L. panamensis* (XM_010702327) suşu ile %96.70 oranında identik oldukları tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada elde edilen *L. infantum* (MHOM/TR/2009/EP174) LACK sekansının; Çin Halk Cumhuriyeti'nden izole edilen *Leptomonas pyrrhocoris* (XM_015798033) suşu ile %88,60 ve İspanya'dan izole edilen *Crithidia fasciculata* (AF063022) suşu ile

%87,70 oranında identik olması LACK geninin diğer Kinetoplastida üyelerinde de mevcut olduğunu göstermektedir.

BA filogenetik analizlerinde *L. infantum* LACK sekansının (KT184317) *L. infantum* JPCM5 (XM_001470282), *L. infantum* PB75 (U49695) ve Brezilya'dan izole edilen *L. chagasi* (EU016105) suşu ile aynı filogenetik dalda yer aldığı tespit edilmiştir. *Leishmania* izolatlarının LACK gen bölgesi sekans ve filogenetik analizleri, bu gen bölgesinde farklı oranda intra ve interspesifik nükleotid farklılıklarını ortaya koymuştur. İntraspesifik ve interspesifik nükleotid farklılıklar arasında gözlenen çakışmalar filogenetik bazda bu gen bölgesinin tür ayrımı ve barkodlama için uygun olmadığını ortaya koymuştur.

Bu çalışmada, *L. infantum* (MHOM/TR/2009/EP174) LACK genine ait DNA dizi analiz sonuçlarının translasyonu ile LACK proteinine ait toplam 313 aminoasitlik dizi elde edilmiş ve aminoasit sekans analizlerinde ilgili genin kodladığı proteinin *Leishmania* türleri arasında yüksek oranda korunmuş olduğunu ortaya çıkarmıştır. *L. infantum* (MHOM/TR/2009/EP174) LACK proteini, antijenite açısından incelenmiştir. Antijenik puanı 1.061 ile 1.220 arasında, aminoasit uzunlukları ise 7 ile 20 arasında değişen 13 antijenik bölge tespit edilmiş bunların 8 tanesinde aminosit uzunluğunun 15 ve üzerinde olduğu görülmüştür. Ayrıca LACK proteininin 3 boyutlu yapısı elde edilmiş ve korunmuş bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. Bu özellikleri ile LACK geni ve LACK antijeninin ikinci ve üçüncü nesil aşı adayları arasında önemli bir yerde rol aldığı konfirme edilmiştir.

Bu çalışmada hedef alınan diğer molekül olan Kinetoplastid Membran Proteini-11 (KMP-11) de yine LACK gibi parazitin tüm hayat dönemlerinde eksprese edilmektedir. Kinetoplastida sınıfının tüm üyelerinde yüksek düzeyde korunmuş bir molekül olan KMP-11, parazitin zar yapıları ile sıkı şekilde bağlantılıdır (69-71). KMP-11 antijeni, 11 kDa moleküler ağırlıkta olup 276 bp.'lik DNA dizisi tarafından kodlanmakta ve 92 aminoasit içermektedir. KMP-11 geni ve antijeni leishmaniasise karşı Th1 ve Th2 immun yanıt oluşturmaları nedeniyle DNA ve protein aşısı çalışmalarında umut verici adaylar arasında yer almaktadır (58, 72).

Bu çalışmada, *L. infantum* (MHOM/TR/2009/EP174) KMP-11 genine ait DNA dizisi elde edilmiştir. 276 bp. büyüklükteki, KU379565 GenBank numaralı *L. infantum* (MHOM/TR/2009/EP174) KMP-11 gen sekansı, mevcut homolog izolatlarla ait ilgili gen bölgesi sekanslarıyla çoklu hizalamaları yapılarak interspesifik ve intraspesifik nükleotid farklılıkları incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda; en fazla benzerlik %99,60 oranında *L. infantum* JPCM5 (XM_001468994) suşu, %99,30 oranında *L. infantum* JPCM5 (XM_001468995) suşu ve %99,30 oranında *L. donovani* BPK282A1 (XM_003864758) suşu arasında olduğu tespit edilmiştir. KMP-11 genine ait diğer sekanslar incelendiğinde; İspanya'dan izole edilen *L. tropica* (AJ000078) suşu ile %98,20, Tunus'dan izole edilen *L. major* (AY490814) suşu ile %98,20, Guatemala'dan izole edilen *L. mexicana* (XM_003879168) suşu ile %98,10, Brezilya'dan izole edilen *L. amazonensis* (AF193432) suşu ile %98,10, Panama'dan izole edilen *L. panamensis* (U93582) suşu ile %96,40, Brezilya'dan izole edilen *L. guyanensis* (AF026144) suşu ile %96,10 oranında identik oldukları tespit edilmiştir. Bu durum, LACK genine benzer olarak KMP-11 geninin de farklı *Leishmania* türlerinde korunmuş bir yapı olduğunu göstermektedir. Yine çalışmada elde edilen *L. infantum* (MHOM/TR/2009/EP174) LACK sekansının; Çek Cumhuriyeti'nden izole edilen *Leptomonas pyrrhocoris* (XM_015796612) suşu ile %90,30, Gambiya'dan izole edilen *Trypanosoma grayi* (XM_009318228) suşu ile %83,90 ve Kolombiya'dan izole edilen *Crithidia* sp. (DQ194340) suşu ile %82,60 oranında benzer olması KMP-11 geninin diğer Kinetoplastida üyelerinde de mevcut olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, *L. infantum* (MHOM/TR/2009/EP174) KMP-11 genine ait DNA dizi analiz sonuçlarının translasyonu ile KMP-11 proteinine ait toplam 62 aminoasitlik dizi elde edilmiştir. *L. infantum* (MHOM/TR/2009/EP174) KMP-11 proteininin antijenik yapısı incelendiğinde, antijenik puanı 1.064 ile 0.995 arasında, aminoasit uzunlukları ise 6 ile 21 arasında değişen 3 antijenik bölge tespit edilmiştir. Özellikle 68. ve 88. aminoasitler arasında yer alan 21 aminoasitlik antijenik bölge ön plana çıkmaktadır. Nispeten küçük bir polipeptit olan KMP-11 proteininde bu antijenik bölgelerin bulunması, bu proteinin leishmaniasise karşı denenmekte olan aşı adaylarında hedef molekül olarak tercih edilmesinde önemlidir. Ayrıca KMP-11 proteininin 3 boyutlu yapısı elde edilmiş ve korunmuş bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. Bu özellikleri ile

KMP-11 geni ve KMP-11 antijeni, leishmaniasise karşı ikinci ve üçüncü nesil aşı adayları arasında yer almaktadır.

Leishmaniasise karşı immünolojik cevap daha çok hücresel bağışıklığa endeksli olup koruyucu bağışıklık da hücresel bağışıklıkla ilgilidir. Enfeksiyonun sonucu, konağın yardımcı T hücreleri (Th-1 veya Th-2) yanıtına bağlıdır. VL'te, Th-1 hücrelerinin fonksiyonunu kaybetmiş olması ile birlikte Th-2 aktivitesi de artmamaktadır. Diğer yandan parazit, makrofaj yüzeyindeki yardımcı uyarıcı molekülleri inhibe etmektedir. Enfekte inbred BALB/C farelerin enfeksiyonu sırasında I-A major histocompatibilite kompleksi sınıf-II (MHC II) molekülleri eksprese edilmekte, immünodominant LACK antijenin ekspresyonu IL-4 salgılanmasını tetiklemekte, hastalığı tanımlayan T hücreleri de V β 4/V α 8 T-hücresi reseptörünü eksprese etmektedir. LACK-reaktif T hücrelerinin tükenmesi erken IL-4 yanıtını azaltmaktadır. Bu durum, koruyucu bir Th-1 fenotipi geliştirilmesine imkân sağlamaktadır (80, 81).

Farelerde *L. major* enfeksiyonu üzerinde yapılan çalışmalarda, rekombinant LACK antijeni ile birlikte adjuvan olarak IL-12'nin aşılama kullanılması ile CD4⁺ T hücre indükleyici koruma sağlanmasına (62, 68, 82), IFN- γ seviyesinde de bir artış gözlenmesine (62, 68) karşılık IL-4 salgılayan lenf düğümü hücrelerinin sayısında azalma tespit edilmiştir (62). Bu sonuçlar, LACK antijenine karşı büyük ilgi duyulmasını ve LACK'ın leishmaniasis için potansiyel aşı adayları arasında öne çıkmasını sağlamıştır. Ancak LACK ile aşılama, *L. amazonensis* ve *L. donovani*'ye karşı fareleri korumada başarısız olmuş ve IFN- γ seviyesinde azalma ile birlikte anti-LACK ve parazite özgü antijenlerde artış gözlenmiştir (62, 83, 84). KL hastalarında, LACK antijenine yanıt olarak artan IFN- γ ve IL-10 üretimi gözlenmiştir (85). Başka bir çalışmada daha önce LACK antijenine maruz kalmayan bireylerin periferik kan mononükleer hücrelerinin bu antijenle uyarılması sonucunda CD8⁺ T hücrelerinin ve natural killer (NK) hücrelerinin arttığı gözlenmiştir (86, 87). Ayrıca KL ve MKL hastalarının çözünebilir *Leishmania* antijeni (SLA) ile uyarılmış periferik kan mononükleer hücrelerine LACK antijeninin eklenmesi sonucu artan IL-10 üretimi ile birlikte IFN- γ üretiminde baskılanma gözlenmiştir (88).

İspanya'da 1998 yılında yapılan bir çalışmada, rekombinant KMP-11 proteinini kullanılarak immunoblot analizi yapılmıştır. KL, MKL ve VL'li hasta serumlarının

kullanıldığı çalışmada sırası ile %80, %77 ve %100 oranlarında rKMP-11 proteini ile reaksiyon veren antikorların tespit edildiği bildirilmiştir. *Leishmania* ile enfekte asemptomatik bireylerin serumlarında ise western blot ile %86 oranında pozitiflik belirlenmiştir. Bu kişilerin serumlarında immunoblot analizi ile rKMP-11 karşı oluşmuş olan IgG antikorlarının varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışma sonunda leishmaniasis tanısında KMP-11 antijeninin serolojik belirteç olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (89). H3, H2A ve KMP-11 antijenlerin birlikte kullanıldığı bir çalışmada immün yanıt değerlendirilmiş ve KMP-11 antijeni ile uyarılan leishmaniasis'li hastalarda IL-10 seviyesinde artış gözlenmiştir. KL, VL ve asemptomatik *L. chagasi* ile enfekte bireylerin serumlarında KMP-11 antikorları tespit edilmiş ve böylece KMP-11 antijeninin, leishmaniasis'in farklı klinik formu hasta serumlarında tanındığı gösterilmiştir. Ayrıca IL-10 üretimindeki artış KMP-11'in Th1 immün yanıtında önemli bir antijen adayı olduğunu kanıtlamıştır (90). Leishmaniasisin farklı klinik formlarında yapılan çalışmalarda, KMP-11 antijen yapısının ortak olduğu ve ileride bütün klinik formlar için etkin bir aşı adayı olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Başka bir çalışmada, endotoksinlerinden arındırılmış KMP-11 DNA'sı ile aşılanan hamsterler, enfeksiyondan sonra sekiz ay daha yaşamlarını sürdürebilmişlerdir (91). *L. donovani*'nin antimon bileşiklerine karşı duyarlı ve dirençli iki suşunun kullanıldığı bu çalışma sonucunda, deney hayvanlarında Th1 ve Th2 immün yanıtının oluştuğu tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada, deneysel olarak parazitle enfekte edilen köpeklerde *L. infantum* heat-shock protein-70 (HSP-70), paraflagellar çubuk proteini-2 (PFR)-2 ve KMP-11 rekombinant proteini kullanılmıştır. Bu rekombinant proteinlerin IFN- γ artışını indükledikleri ve köpeklerin serumlarında bu üç proteine karşı antikor yanıtı olduğu tespit edilmiştir (92). Hamsterlarda yapılan çalışmada ise *L. chagasi* enfeksiyonuna karşı, KMP-11 ve kum sineklerinin tükürük proteini olan LJM19'u kodlayan DNA'lar kombine edilerek kullanılmıştır. Aşılama sonrasında IFN- γ üretiminde artış saptanmıştır (93). Hindistan'da yapılan bir çalışmada, VL'ye karşı prime-boost aşı tekniği kullanılmıştır. Prime-boost aşı tekniğinde, KMP-11 DNA aşısı ve KMP-11 antijenini eksprese eden rekombinant aşı virüsü (rVV) ile aşılama yapılmıştır. Aşı etkinliği hamster ve fareler üzerinde araştırılmış ve koruma sağlandığı tespit edilmiştir. Bu aşı stratejisi ile güçlü sitotoksik yanıt ve KMP-11 antijene özgü T hücre proliferasyonu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonrası araştırmacılar, KMP-11 antijeni ve prime-boost aşı

stratejisi ile enfeksiyona karşı etkin bir aşı adayı oluşturulabileceğini bildirmişlerdir (94).

Leishmaniasise karşı LACK ve KMP-11 gen bölgelerini ayrı ayrı baz alan DNA aşısı çalışmaları bulunmaktadır (12, 13). Bu çalışmada, LACK ve KMP-11 genleri memelilerde protein ekspresyonu ve DNA aşısı olarak kullanıma uygun olan pcDNATM3.1/V5 (Invitrogen, ABD) plazmidine klonlanarak pcDNA3.1+LACK+KMP-11 multi-antijenik DNA aşı adayı olan rekombinant plazmid elde edilmiştir. İki genin aynı plazmidde yer alması, aşı etkinliğinin önemli ölçüde artırılmasının yanında maliyetin düşürülmesi ve üretim kolaylığı açısından da önem arz etmektedir.

LACK ve KMP-11 genleri prokaryotlarda protein ekspresyon vektörü olarak kullanılan pET100 (Invitrogen, 45-0170) plazmidine sub-klonlanmış pET100+LACK+KMP-11 rekombinant plazmidi elde edilmiştir. Rekombinant plazmidin One Shot BL21 Star (DE3) *E. coli* kompetan hücrelerine (Invitrogen, ABD) transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Kompetan hücrelerin 0.5 mM ve 1 mM Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ile indüklenmesi sonrası LACK+KMP-11 füzyon proteininin eksprese edildiği SDS-PAGE ve western-blot ile doğrulanmıştır. Çalışma sonucunda leishmaniasis için protein aşı adayı LACK+KMP-11 füzyon proteini elde edilmiştir. Elde edilen füzyon proteini ile LACK ve KMP-11 proteinlerinin antijenik özellikleri birleştirilmiştir. LACK+KMP-11 füzyon proteini tabanlı protein aşısının aşı etkinliğini artıracığı düşünülmektedir.

Aşıda temel amaç, uzun süreli ve koruyucu bir immün yanıtın elde edilmesidir. DNA ve rekombinant protein aşılama sonrasında istenen ölçüde sonuç alınamaması, yeni aşılama tekniklerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu konuda en ümit verici sonuçlardan biri “prime-boost” olarak tanımlanan yaklaşımdan elde edilmiştir (95). Bu yaklaşımın temelini, farklı antijenlerin, farklı yol veya farklı bölgelere uygulanmasıyla daha güçlü bir immün yanıt elde edilmesi oluşturmaktadır (96). DNA aşısını uygulamayı takiben protein aşısının uygulanması ve intramusküler uygulama sonrası intraperitoneal immünizasyon bu yöntemle bir örnektir. Prime-boost yaklaşım, yüksek seviyede bellek T hücrelerini oluşturması nedeniyle son yıllardaki aşı çalışmalarında yaygın olarak tercih edilmektedir (96). Bazı çalışmalarda DNA immünizasyonunu takiben antikor üretimini arttırmak için prime-boost yaklaşımı kullanılmış ve hem humoral hem de

hücresel cevabın etkin şekilde arttırıldığı rapor edilmiştir (97, 98). DNA prime protein boost yaklaşımının, tek başına DNA veya rekombinant protein aşı uygulamasıyla karşılaştırıldığında daha yüksek bir immün koruma sağladığı tespit edilmiştir (99, 100). Bu nedenle çalışmada elde edilen pcDNA3.1+LACK+KMP-11 multi-antijenik DNA aşı adayı ve LACK+KMP-11 füzyon proteini ileriki çalışmalarda prime boost (DNA/Protein) yaklaşımla kullanılması mümkün olabilecektir.

Türkiye’de bu çalışmadan elde edilen *L. infantum* LACK (KT184317) ve *L. infantum* KMP-11 (KU379565) izolatu ile yapılacak aşılarda benzerliği dolayısıyla diğer ülkelerde de kullanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca çalışmada elde edilen *L. infantum* LACK (KT184317) ve *L. infantum* KMP-11 (KU379565) nükleotid sekanslarının, *L. tropica*, *L. major*, *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. panamensis*, *L. chagasi* ve *L. mexicana* gibi farklı *Leishmania* türleri ile değişen oranlarda amino asit sekanslarının ise yüksek oranda benzer oldukları tespit edilmiştir. Bu açıdan çalışma ile elde edilen DNA ve protein aşı adayları, diğer *Leishmania* türlerinin sebep olduğu farklı leishmaniasis formlarına yönelik aşı çalışmalarında da kullanılabilirliği üzerine bilimsel veriler sağlanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışma ile antijenik özelliği yüksek olan *L. infantum* LACK ve KMP-11 genlerinin moleküler karakterizasyonları yapılmış, literatürde ilk kez olmak üzere bu iki gen bölgesi birleştirilerek füzyon protein ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Leishmaniasis, aralarında Türkiye’nin de bulunduğu 98 ülkede, yaklaşık 350 milyon insanı tehdit etmektedir. Türkiye’den rapor edilen yıllık leishmaniasis olgu sayısı Suriye iç savaşı sonrasında gerçekleşen göç nedeniyle önemli ölçüde artmıştır. Bu durum özellikle KL’in Türkiye’deki epidemiyolojisini etkilemektedir ve yakın gelecekte leishmaniasisin Türkiye için ciddi bir sağlık sorunu haline gelebileceğini göstermektedir. *Leishmania* türlerinin birbirine çok yakın olması, epidemiyolojisinin kompleks olması, zoonotik ve antroponotik döngülere sahip olması gibi nedenler leishmaniasis’le mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı leishmaniasise karşı aşı geliştirme çalışmaları günümüzde oldukça önem kazanmıştır. Bu tez çalışması, ilgili alanda model bir araştırma niteliğinde olup çalışma ile karakterize ve izole edilen DNA ve rekombinant füzyon proteini, aşı geliştirilmesi için önemli olan bir basamağı tamamlamış ve ileriki deneysel aşılama ve takiben faz

alışmaları için gerekli altyapıyı oluşturmuştur. Çalışma ile elde edilen pcDNA3.1+LACK+KMP-11 multi-antijenik plazmidinin ve LACK+KMP-11 füzyon proteininin, uygun adjuvanlarla kombine edilerek leishmaniasis'e karşı aşı geliştirme çalışmalarında prime-boost yaklaşımla kullanılması üzerine ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.



6. KAYNAKLAR

1. World Health Organization., UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Global report for research on infectious diseases of poverty 2012 World Health Organization, Geneva, 2012:13-14.
2. WEB_1. About Leishmaniasis.<http://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/> (22.06.2016).
3. WEB_2. (2016). Leishmaniasis, Fact sheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> (02.10.2016).
4. Adel A, Berkvens D, Abatih E, et al. Evaluation of Immunofluorescence Antibody Test Used for the Diagnosis of Canine Leishmaniasis in the Mediterranean Basin: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS One. 2016;11(8):e0161051.
5. Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. J Infect Dev Ctries. 2015;9(6):588-96.
6. World Health O. Control of the leishmaniasis. World Health Organization technical report series. 2010(949):xii-xiii, 1-186, back cover.
7. WEB_3. Centers For Disease Control and Prevention - Parasites - Leishmaniasis. <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> (16.06.2013).
8. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. PLoS neglected tropical diseases. 2016;10(3):e0004349.
9. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, et al. A revised classification for Leishmania and Endotrypanum. Parasitology today. 2000;16(4):142-4.

10. Gradoni L, Gramiccia M, Leger N, et al. Isoenzyme characterization of *Leishmania* from man, dog and sandflies in the Maltese islands. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1991;85(2):217-9.
11. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, et al. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de parasitologie humaine et comparee*. 1990;65(3):111-25.
12. Palatnik-de-Sousa CB, Barbosa Ade F, Oliveira SM, et al. FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. *Expert review of vaccines*. 2008;7(6):833-51.
13. Mortazavidehkordi N, Farjadfar A, Khanahmad H, et al. Evaluation of a novel lentiviral vaccine expressing KMP11-HASPB fusion protein against *Leishmania infantum* in BALB/c mice. *Parasite immunology*. 2016;38(11):670-7.
14. WEB_4. (2006). History of Leishmaniasis. <https://web.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Leishmaniasis/history.htm> (10.02.2017).
15. Cox FE. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(4):595-612.
16. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999;354(9185):1191-9.
17. Unat EK. *Leyismanyaz'ların Tarihçesi. "Leishmaniasis". Türkiye Parazitoloji Derneği*. 1981:1-9.
18. Yazar S, Kuk S, Miman Ö, et al. *Saygı'nın Temel Tıbbi Parazitolojisi Erciyes Üniversitesi Yayınları, Kayseri*, 2016: 66-76
19. Oryan A, Akbari M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pac J Trop Med*. 2016;9(10):925-32.
20. Martinez S, Marr JJ. Allopurinol in the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *The New England journal of medicine*. 1992;326(11):741-4.
21. Gurel MS, Yesilova Y, Olgen MK, et al. [Cutaneous leishmaniasis in Turkey]. *Turkiye parazitolojii dergisi / Türkiye Parazitoloji Derneği = Acta parasitologica Turcica / Turkish Society for Parasitology*. 2012;36(2):121-9.
22. Singh SP, Reddy DC, Rai M, et al. Serious underreporting of visceral leishmaniasis through passive case reporting in Bihar, India. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2006;11(6):899-905.

23. WEB_5. Epidemiological situation of Leishmaniasis. <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> (19.12.2016).
24. Gurel MS, Ulukanligil M, Ozbilge H. Cutaneous leishmaniasis in Sanliurfa: epidemiologic and clinical features of the last four years (1997-2000). *International journal of dermatology*. 2002;41(1):32-7.
25. Ozkeklikci A, Karakus M, Ozbel Y, et al. The new situation of Cutaneous Leishmaniasis after Syrian civil war in Gaziantep city, Southeastern region of Turkey. *Acta Trop*. 2016.
26. Dujardin JC, Campino L, Canavate C, et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(7):1013-8.
27. Pintado V, Martin-Rabadan P, Rivera ML, et al. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine*. 2001;80(1):54-73.
28. Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in parasitology*. 2007;64:1-109.
29. Salotra P, Duncan RC, Singh R, et al. Upregulation of surface proteins in *Leishmania donovani* isolated from patients of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2006;8(3):637-44.
30. Desjeux P. Leishmaniasis. *Nature reviews Microbiology*. 2004;2(9):692.
31. Antoine JC, Prina E, Courret N, et al. *Leishmania* spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. *Advances in parasitology*. 2004;58:1-68.
32. Kemp M, Hey AS, Kurtzhals JA, et al. Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. I. Th1-like response to *Leishmania* major promastigote antigens in individuals recovered from cutaneous leishmaniasis. *Clinical and experimental immunology*. 1994;96(3):410-5.
33. Zijlstra EE, el-Hassan AM. Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001;95 Suppl 1:S27-58.

34. Murray HW, Berman JD, Davies CR, et al. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366(9496):1561-77.
35. Gallin JI, Farber JM, Holland SM, et al. Interferon-gamma in the management of infectious diseases. *Annals of internal medicine*. 1995;123(3):216-24.
36. Piscopo TV, Mallia AC. Leishmaniasis. *Postgraduate medical journal*. 2006;82(972):649-57.
37. Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, et al. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *The New England journal of medicine*. 2010;362(6):504-12.
38. Sundar S, Makharia A, More DK, et al. Short-course of oral miltefosine for treatment of visceral leishmaniasis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2000;31(4):1110-3.
39. Jha TK. Evaluation of diamidine compound (pentamidine isethionate) in the treatment resistant cases of kala-azar occurring in North Bihar, India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1983;77(2):167-70.
40. Hailu A, Musa A, Wasunna M, et al. Geographical variation in the response of visceral leishmaniasis to paromomycin in East Africa: a multicentre, open-label, randomized trial. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(10):e709.
41. Sundar S, Sinha PK, Rai M, et al. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet*. 2011;377(9764):477-86.
42. Bassiouny A, El Meshad M, Talaat M, et al. Cryosurgery in cutaneous leishmaniasis. *The British journal of dermatology*. 1982;107(4):467-74.
43. Junaid AJ. Treatment of cutaneous leishmaniasis with infrared heat. *International journal of dermatology*. 1986;25(7):470-2.
44. Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(22):9375-80.

45. Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology today*. 2000;16(5):188-9.
46. BenSaid M, Guerbouj S, Saghrouni F, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* cutaneous leishmaniasis in central Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006;100(6):521-6.
47. Le Blancq SM, Peters W. *Leishmania* in the Old World: 4. The distribution of *L. donovani* sensu lato zymodemes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1986;80(3):367-77.
48. Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, et al. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2005;7(11-12):1224-34.
49. Cornelissen AW, Schetters TP. Vaccines against protozoal diseases of veterinary importance. *FEMS immunology and medical microbiology*. 1996;15(2-3):61-72.
50. Agnandji ST, Lell B, Soulanoudjingar SS, et al. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *The New England journal of medicine*. 2011;365(20):1863-75.
51. da 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 Goncalo do Amaranto, RN). *Vaccine*. 2000;19(9-10):1082-92.
52. Das A, Ali N. Vaccine Development Against *Leishmania donovani*. *Frontiers in immunology*. 2012;3:99.
53. Nadim A, Javadian E, Tahvildar-Bidruni G, et al. Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales*. 1983;76(4):377-83.
54. Turgay N. [Last updates on leishmania vaccine studies: when are we going to be vaccinated?]. *Turkiye parazitolojii dergisi / Turkiye Parazitoloji Dernegi = Acta parasitologica Turcica / Turkish Society for Parasitology*. 2005;29(4):232-4.
55. Velez ID, Gilchrist K, Arbelaez MP, et al. Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2005;99(8):593-8.

56. Allahverdiyev A, Bagirova M, Cakir Koc R, et al. Approaches and problems in vaccine development against leishmaniasis. *Turkiye parazitolojii dergisi / Turkiye Parazitoloji Dernegi = Acta parasitologica Turcica / Turkish Society for Parasitology*. 2010;34(2):122-30.
57. Duarte MC, Lage DP, Martins VT, et al. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(4):398-407.
58. Kumar R, Engwerda C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin Transl Immunology*. 2014;3(3):e13.
59. Skeiky YA, Coler RN, Brannon M, et al. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. *Vaccine*. 2002;20(27-28):3292-303.
60. Jain K, Jain NK. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *J Immunol Methods*. 2015;422:1-12.
61. Gonzalez-Aseguinolaza G, Taladriz S, Marquet A, et al. Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1999;259(3):909-16.
62. Mougneau E, Altare F, Wakil AE, et al. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science*. 1995;268(5210):563-6.
63. Gonzalo RM, Rodriguez JR, Rodriguez D, et al. Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2001;3(9):701-11.
64. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 1994;76(2):241-51.

65. Kemp M, Hey AS, Bendtzen K, et al. Th1-like human T-cell clones recognizing Leishmania gp63 inhibit Leishmania major in human macrophages. *Scandinavian journal of immunology*. 1994;40(6):629-35.
66. Coelho EA, Tavares CA, Lima Kde M, et al. Mycobacterium hsp65 DNA entrapped into TDM-loaded PLGA microspheres induces protection in mice against Leishmania (Leishmania) major infection. *Parasitology research*. 2006;98(6):568-75.
67. Perez-Jimenez E, Kochan G, Gherardi MM, et al. MVA-LACK as a safe and efficient vector for vaccination against leishmaniasis. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2006;8(3):810-22.
68. Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, et al. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with Leishmania major. *The Journal of experimental medicine*. 1997;186(7):1137-47.
69. Berberich C, Machado G, Morales G, et al. The expression of the Leishmania infantum KMP-11 protein is developmentally regulated and stage specific. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1442(2-3):230-7.
70. Jardim A, Funk V, Caprioli RM, et al. Isolation and structural characterization of the Leishmania donovani kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Biochem J*. 1995;305 (Pt 1):307-13.
71. Jardim A, Hanson S, Ullman B, et al. Cloning and structure-function analysis of the Leishmania donovani kinetoplastid membrane protein-11. *Biochem J*. 1995;305 (Pt 1):315-20.
72. Agallou M, Margaroni M, Karagouni E. Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of Leishmania infantum KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2011;29(31):5053-64.
73. Fischer MR, John D, Kautz-Neu K, et al. Animal model for cutaneous leishmaniasis. *Methods Mol Biol*. 2013;961:389-402.

74. Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012;28(12):1647-9.
75. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*. 2012;9(8):772.
76. Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet*. 2000;16(6):276-7.
77. Hailu T, Yimer M, Mulu W, et al. Challenges in visceral leishmaniasis control and elimination in the developing countries: A review. *J Vector Borne Dis*. 2016;53(3):193-8.
78. Ok UZ, Balcioglu IC, Taylan Ozkan A, et al. Leishmaniasis in Turkey. *Acta Trop*. 2002;84(1):43-8.
79. Coler RN, Goto Y, Bogatzki L, et al. Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4⁺ T cells. *Infection and immunity*. 2007;75(9):4648-54.
80. Launois P, Maillard I, Pingel S, et al. IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4⁺ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity*. 1997;6(5):541-9.
81. Julia V, Rassoulzadegan M, Glaichenhaus N. Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science*. 1996;274(5286):421-3.
82. Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, et al. Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nature medicine*. 1998;4(12):1409-15.
83. Coelho EA, Tavares CA, Carvalho FA, et al. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infection and immunity*. 2003;71(7):3988-94.
84. Pinto EF, Pinheiro RO, Rayol A, et al. Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK. *Infection and immunity*. 2004;72(8):4521-7.

85. Bourreau E, Prevot G, Gardon J, et al. LACK-specific CD4(+) T cells that induce gamma interferon production in patients with localized cutaneous leishmaniasis during an early stage of infection. *Infection and immunity*. 2002;70(6):3122-9.
86. Maasho K, Satti I, Nylen S, et al. A Leishmania homologue of receptors for activated C-kinase (LACK) induces both interferon-gamma and interleukin-10 in natural killer cells of healthy blood donors. *The Journal of infectious diseases*. 2000;182(2):570-8.
87. Bourreau E, Collet M, Prevot G, et al. IFN-gamma-producing CD45RA+CD8+ and IL-10-producing CD45RA-CD4+ T cells generated in response to LACK in naive subjects never exposed to Leishmania. *European journal of immunology*. 2002;32(2):510-20.
88. Carvalho LP, Passos S, Dutra WO, et al. Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scandinavian journal of immunology*. 2005;61(4):337-42.
89. Ramírez JR, Berberich C, Jaramillo A, et al. Molecular and antigenic characterization of the Leishmania (Viannia) panamensis kinetoplastid membrane protein-11. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1998;93(2):247-54.
90. de Carvalho LP, Soto M, Jerônimo S, et al. Characterization of the immune response to Leishmania infantum recombinant antigens. *Microbes and Infection*. 2003;5(1):7-12.
91. Basu R, Bhaumik S, Basu JM, et al. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and-resistant strains of Leishmania donovani that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1-and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. 2005;174(11):7160-71.
92. Carrillo E, Crusat M, Nieto J, et al. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2008;26(15):1902-11.

93. da Silva RA, Tavares NM, Costa D, et al. DNA vaccination with KMP11 and *Lutzomyia longipalpis* salivary protein protects hamsters against visceral leishmaniasis. *Acta tropica*. 2011;120(3):185-90.
94. Guha R, Das S, Ghosh J, et al. Heterologous priming–boosting with DNA and vaccinia virus expressing kinetoplastid membrane protein-11 induces potent cellular immune response and confers protection against infection with antimony resistant and sensitive strains of *Leishmania (Leishmania) donovani*. *Vaccine*. 2013;31(15):1905-15.
95. Shedlock DJ, Weiner DB. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *Journal of leukocyte biology*. 2000;68(6):793-806.
96. Woodland DL. Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends Immunol*. 2004;25(2):98-104.
97. Min J, Qu D, Li C, et al. Enhancement of protective immune responses induced by *Toxoplasma gondii* dense granule antigen 7 (GRA7) against toxoplasmosis in mice using a prime-boost vaccination strategy. *Vaccine*. 2012;30(38):5631-6.
98. Zhang G, Huong VT, Battur B, et al. A heterologous prime-boost vaccination regime using DNA and a vaccinia virus, both expressing GRA4, induced protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasitology*. 2007;134(Pt 10):1339-46.
99. Rafati S, Ghaemimanesh F, Zahedifard F. Comparison of potential protection induced by three vaccination strategies (DNA/DNA, Protein/Protein and DNA/Protein) against *Leishmania* major infection using Signal Peptidase type I in BALB/c mice. *Vaccine*. 2006;24(16):3290-7.
100. Allen TM, Vogel TU, Fuller DH, et al. Induction of AIDS virus-specific CTL activity in fresh, unstimulated peripheral blood lymphocytes from rhesus macaques vaccinated with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara boost regimen. *Journal of immunology*. 2000;164(9):4968-78.

LEISHMANIA INFANTUM AŞI ADAYI LACK VE KMP-11 GENLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU, FÜZYON PROTEİNİN EKSPRESYONU VE ANTİJENİK YAPISI

ORIJINALLIK RAPORU

% **10**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **9**

İNTERNET
KAYNAKLARI

% **7**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

www.turkiyeparazitolderg.org

İnternet Kaynağı

% **4**

2

www.tparazitolderg.org

İnternet Kaynağı

% **2**

3

www.researchgate.net

İnternet Kaynağı

<% **1**

4

library.cu.edu.tr

İnternet Kaynağı

<% **1**

5

gaheder.org

İnternet Kaynağı

<% **1**

6

exon.bic.nus.edu.sg

İnternet Kaynağı

<% **1**

7

tr.wikipedia.org

İnternet Kaynağı

<% **1**

8

Mariana Costa Duarte, Daniela Pagliara Lage,
Vívian Tamietti Martins, Miguel Angel Chávez-

<% **1**

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Serkan KARACA
Uyruğu : Türkiye (T.C.)
Doğum Tarihi ve Yeri : 12.01.1977, İzmir
Medeni Hali : Evli
Email : serkankaraca@hotmail.com
Yazışma Adresi : Gültepe Mah. Köşk Cad. No:19 Örtten Sit. B-Blok D:11
Melikgazi / KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Parazitoloji	2012
Lisans	Dokuz Eylül Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliği	1997
Lise	İzmir Bayraklı Lisesi	1993

YABANCI DİL

İngilizce

KATILDIĞI KURSLAR SINAVLAR

Erciyes Üniversitesi DEKAM Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası
Microsoft Office Program Kullanım Sertifikası