

ANKARA ÜNİVERSİTESİ

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU**

**YENİ NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİSİ İLE
TÜRKİYE'DEN İZOLE EDİLEN KÜTANÖZ LEİSHMANİOSİS ETKENİ
LEISHMANIA INFANTUM'UN GENOM DİZİSİNİN ÇIKARILMASI**

Proje Yürütücüsünün İsmi: Prof. Dr. Ayşe Serpil Nalbantoğlu

Araştırmacıların İsmi: Dilek Güldemir, Zekiye Bakkaloğlu, Selma Usluca

Proje Numarası: 17L0239002

Başlama Tarihi: 30.03.2017

Bitiş Tarihi: 30.09.2018

Rapor Tarihi: 18.12.2018

1946
Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara - "2018"

ÖNSÖZ

Günümüzde *Leishmania* türleri üzerinde yapılan tüm genom dizileme çalışmaları oldukça sınırlı olup, sadece birkaç *Leishmania* türünün yüksek kalite ve tamamlanmış genomu bulunmaktadır. **Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü tarafından desteklenen bu proje “Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi ile Türkiye’den izole edilen kütanöz leishmaniosis etkeni *Leishmania infantum*’un genom dizisinin çıkarılması”nı kapsamaktadır.**

Bu çalışmanın konusu bir protozoon parazit olan *Leishmania infantum*’un tüm genom dizisinin çıkarılması, ülkemizde bir ilk olması açısından özgün niteliktedir. Çalışmanın kütanöz leishmaniosis etkeni *L. infantum* ile yapılmış olması çalışmayı daha özgün hale getirmektedir. Çalışmamızda elde edilen verilerin ülkemizde yapılacak *Leishmania* genom çalışmaları için bir temel oluşturduğu ve küresel düzeydeki tüm genom dizileme çalışmalarına katkı sağladığı kanaatindeyiz.

1946

I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi ile Türkiye’den izole edilen Kütanöz Leishmaniosis etkeni *Leishmania infantum*’un Genom Dizisinin Çıkarılması

Leishmania subgenus *Leishmania*, insan ve hayvanlarda deri ve iç organları tutabilen sistemik kronik bir hastalık olan “leishmaniosis” in etkenidir. Hastalık insanlarda genel olarak üç farklı klinik tablo [(visseral, kala-azar, VL) kütanöz (CL) ve mukokutanöz leishmaniosis (MCL)] ortaya çıkmaktadır. Leishmaniosis, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)’ne göre hala dünyanın en çok ihmal edilen hastalıklardan biridir. *Leishmania* tüm genomu dizisinin ilk kez çıkarılmasından bu yana ise sadece 10 yıllık bir zaman geçmiştir. Bununla beraber, doku tropizmindeki farklılıkların nedenleri gibi bilim insanları için hala aydınlatılması gereken birçok şey bulunmaktadır. Bu çalışmada “Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi” ile Türkiye’de kütanöz leishmaniosis olgusundan izole edilen *Leishmania infantum*’un tüm genom dizisinin çıkarılması amaçlanmıştır.

Genom sekanslama işlemi “Illumina HiSeq 2500” platformunda gerçekleştirilmiştir. Dizileme kütüphanelerini oluşturmak için, “Illumina HiSeq 2500” platformuyla uyumlu “TruSeq Nano DNA Low Throughput Library Prep Kit” kullanılmıştır. Sentez ile dizileme (SBS), HiSeq Rapid SBS Kit v2 ile iki fragmanın uç uca birleştirilmesi ile edilen tek fragman okumaları (2 x 150 bp; PE) şeklinde gerçekleştirilmiştir. Biyoinformatik analizler Geneious 11.0.5. (www.genius.com) platformu ile yapılmıştır.

Çalışmamızda *L. infantum*’un yüksek kalitede tüm genom dizisi (WGS) başarı ile sekanslanmış ve 36 kromozoma ait toplam 32.009.138 baz çifti büyüklüğünde genomik DNA elde edilmiştir. Ardından elde edilen genomik DNA, *National Center for Biotechnology Information, USA, (NCBI) GenBank*’a (www.ncbi.nlm.nih.gov) yüklenerek *Leishmania infantum* **TR01 (Lin_TR01)** ismi ile tescillenmiştir. Bu konuda yapılan WGS çalışmaları incelendiğinde, Lin_TR01 suşu kütanöz leishmaniosis olgusundan izole edilmiş olması açısından bir ilktir. Zira referans genom olan *L. infantum* JPCM5 (Peacock ve ark., 2007) suşu türün klasik doku ve organ tropizmine uygun olarak visseral leishmaniosis olgusundan elde edilmiştir. Diğer yandan Lin_TR01, JPCM5 suşundan bu yana dünya genelinde tüm genomu dizilenen ikinci suş olma niteliğindedir. Lin_TR01 genomu elde edilen diğer genomlar ile karşılaştırıldığında seviye olarak complete durumda olan tek *Leishmania infantum* tüm genom dizisidir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/249>).

Lin_TR01 genomunun 36 kromozomuna ait NCBI tarafından verilen *accession* (erişim) numaraları "CP027807, CP027810, CP027808, CP027811, CP027809, CP027812, CP027813, CP027814, CP027817, CP027818, CP027819, CP027815, CP027821, CP027816, CP027823, CP027820, CP027822, CP027824, CP027825, CP027826, CP027827, CP027828, CP027829, CP027830, CP027831, CP027832, CP027833, CP027834, CP027835, CP027836, CP027837, CP027838, CP027839, CP027840, CP027841, CP027842" şeklindedir. Lin_TR01 genomunun anotasyonu sonucunda 3153 polimorfizm, 8324 Gen, 8199 CDS, 8109 mRNA, 67 tRNA, 11 rRNA ve 58 ncRNA bulunmuştur. Elde edilen 8199 CDS’nin 5278 tanesi hipotetik protein niteliğindedir.

The Genome Sequencing with Next Generation Sequencing Technology of *Leishmania infantum* causing Cutaneous Leishmaniosis from Turkish isolate

Leishmania subgenus *Leishmania* is causing Leishmaniosis which is a chronic systemic disease in humans and animals can keep the skin and visceral organs. The disease generally constitute three different clinical table in humans [(visceral, kala-azar, VL) cutaneous (CL) ve mucocutaneous leishmaniosis (MCL)]. According to World Health Organization (WHO), Leishmaniosis is still one of the world's most neglected diseases. It has been nearly 10 years since the completion of the first entire genome sequence of a *Leishmania* parasite. However, there are still many things in the dark for scientists such as the causes of differences in tissue tropism. The aim of this study is to generate that the whole genome sequencing with next generation sequencing technology of *Leishmania infantum* causing cutaneous leishmaniosis from Turkish isolate.

Genomic sequencing was performed on the Illumina HiSeq 2500 platform. The "TruSeq Nano DNA Low Throughput Library Prep Kit" compatible with the "Illumina HiSeq 2500" platform was used to create the library. Synthesis sequencing (SBS) was performed with HiSeq Rapid SBS Kit v2 in the form of single fragment readings (2 x 150 bp; PE) with two fragment end-to-end assemblies. Bioinformatics analyzes were performed Geneious 11.0.5. (www.genius.com) platform.

In our study, a high quality whole genome sequence (WGS) of *L. infantum* was successfully sequenced and a total of 32,009,137 base pairs of genomic DNA of 36 chromosomes were obtained. The resulting genomic DNA submitted to the National Center for Biotechnology Information, USA, (NCBI) GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) and registered under the name *Leishmania infantum*_TR01 (Lin_TR01). When the WGS studies on this subject are examined, Lin_TR01 strain is the first one to be isolated from cutaneous leishmaniosis. Because the reference genome, *L. infantum* JPCM5 (Peacock et al., 2007) was obtained from the visceral leishmaniosis case in accordance with the classical tissue and organ tropism of the species. On the other hand, Lin_TR01 is the second whole genome sequenced strain in the world since the JPCM5 strain. The Lin_TR01 genome is the only *Leishmania infantum* whole genome sequence that is complete level compared to the other genomes obtained (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/249>).

Accession numbers assigned by the NCBI of the 36 chromosomes of the Lin_TR01 genome are described in CP027807, CP027810, CP027808, CP027811, CP027809, CP027812, CP027813, CP027814, CP027817, CP027818, CP027819, CP027815, CP027821, CP027816, CP027823, CP027820, CP027822, CP027824, CP027825, CP027826, CP027827, CP027828, CP027829, CP027830, CP027831, CP027832, CP027833, CP027834, CP027835, CP027836, CP027837, CP027838, CP027839, CP027840, CP027841, CP027842. As the result of annotation with the Lin_TR01 genome were found 3153 polymorphisms, 8324 Gene, 8199 CDS, 8109 mRNA, 67 tRNA, 11 rRNA and 58 ncRNA. 5278 of 8199 CDS obtained are hypothetical proteins.

I. Amaç ve Kapsam

Günümüzde *Leishmania* türleri üzerinde yapılan tüm genom dizileme çalışmaları oldukça sınırlı olup, sadece birkaç *Leishmania* türünün yüksek kalite ve tamamlanmış genomu bulunmaktadır. Ülkemizde ise *Leishmania* türlerinde yapılan herhangi bir “tüm genom sekansı” çalışması bulunmamaktadır. Ayrıca, çalışmanın CL etkeni *L. infantum* ile yapılmış olması çalışmayı daha özgün hale getirmektedir.

Bu çalışmada “Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi” ile Türkiye’de kütanöz leishmaniosis olgusundan izole edilen *Leishmania infantum*’un tüm genom dizisinin çıkarılması amaçlanmıştır.

II. Materyal ve Yöntem

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2012-2017), Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı (MRLBÜDB) bünyesindeki “Ulusal Parazitoloji Referans Laboratuvarı”na Mersin’in Mut ilçesinden, Kutanöz Leishmaniosis ön tanılı 12 yaşında bir erkek hastadan izole edilen klinik örnek, mikroskopi kültür ve PCR yöntemleriyle *L. infantum* olarak tanımlanmış ve bu araştırmada tüm genom dizisi çıkarılmak üzere seçilmiştir.

1. DNA İzolasyonu: Doku örneği 180 mikrolitre ATL buffer içerisinde eritilecek ve homojenize edilmiştir. Homojenize dokudan DNA ekstraksiyonu spin kolon yöntemi ile QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden Germany) kullanılarak yapılmıştır. Aynı zamanda NNN besiyerine ekilerek kültürde de üretilen *L. infantum*’un DNA’sı yine QIAamp Mini Kit (Qiagen) ile elde edilmiş ve yine MRLBÜDB bünyesindeki “Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı”na gönderilmiştir.

2. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi: Amplifikasyon ürününün konsantrasyonu Qubit 2.0 florometri cihazı ile Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) kiti kullanılarak ölçülmüştür. Yeni nesil dizileme uygulamalarında gerekli başlangıç DNA miktarı 100 ng’dır, örnek/ler toplam hacimde 100 ng olacak şekilde ayarlanır. Ancak seçtiğimiz hastaya ait DNA konsantrasyonu 0.7 ng/µl olarak ölçülmüş olup, bu konsantrasyon test için oldukça düşüktür. Şöyle ki; testte kullanılacak maksimum örnek volümü 50 µl olup, bu da yüklenebilecek maksimum DNA miktarının 35 ng olması anlamına gelmekte yani istenen başlangıç DNA miktarının ancak 1/3’ü elde edilebilmektedir. Ancak DNA konsantrasyonu düşük olsa da elimizdeki Türk hastadan izole edilen CL etkeni *L. infantum* için madde 3.1-3.1.5 arasında yer alan çalışmaları yaparak 3.1.5’deki kalite kontrol aşamasının sonuçlarına göre elimizdeki DNA ile çalışmaya devam edil(me)mesine karar vermeyi öngördük. Sonuç olarak elimizdeki genomik DNA kalite kontrol çalışmalarında sekanslama işlemleri için uygun bulundu ve bununla çalışmaların devam ettirilmesine karar verildi.

3. Yeni Nesil DNA Dizileme Uygulamaları: Genom dizileme işlemi, kimyasal sentezleme temelli yeni nesil DNA dizileme sistemi kullanan “Illumina HiSeq 2500” platformunda hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Dizileme kütüphanelerini oluşturmak için, “Illumina HiSeq 2500” platformuyla uyumlu “TruSeq Nano DNA Low Throughput Library Prep Kit (Katalog No: 20015964; Illumina)” kullanılmıştır. Sentez ile dizileme (SBS, sequencing by synthesis), HiSeq Rapid SBS Kit v2 (Katalog No: FC-402-4023; Illumina) ile iki fragmanın uç uca birleştirilmesi ile edilen tek fragman okumaları (2 x 150

bp; PE, paired-end) şeklinde gerçekleştirilmiştir. Uygulama başlıca üç ana aşamadan oluşmaktadır. (i) Kütüphane oluşturma, (ii) Sekans reaksiyonu ve yürütme, (iii) Elde edilen sekans verilerinin biyoinformatik analizi.

3.1. Kütüphane Oluşturma: Dizileme kütüphanelerini oluşturmak için, “Illumina HiSeq 2500” platformuyla uyumlu “TruSeq Nano DNA Low Throughput Library Prep Kit (Katalog No: 20015964; Illumina)” kullanılmıştır. Uygulama, kit protokolünde belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiş olup, aşağıda anlatıldığı gibidir.

3.1.1. Mekanik Fragmentasyon ile Adaptör Uyumlu DNA’ların Hazırlanması ve Pürifikasyonu: Fragmentasyon işlemi “TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit” ile uyumlu Covaris (Covaris Inc.) cihazı kullanılarak mekanik olarak yapılmıştır (350 bp boyutunda). Fragmentasyon sonucunda 3’ ucu ve 5’ ucunda overhang (çıkıntı) olan dsDNA elde edilmiştir. Parçalanmış DNA’ların pürifikasyonu, kit içeriğindeki SPB (manyetik pürifikasyon boncukları) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Kırık DNA Uçlarının Tamiri ve Kütüphane Boyutu Seçimi: Elde edilen DNA fragmanlarının kırık uçları kit içeriğinde bulunan End Repair Mix 2 ile kör uçlara çevrilmiştir. Bu reaksiyon sonucunda, 3’ ucundan 5’ ucuna ekzonükleaz aktivitesi ve 5’ uçtan 3’ uca polimeraz aktivitesi ile DNA fragmanlarının her iki ucu da tamir edilmiştir. Ardından kit içeriğinde bulunan SPB ile fazla uzun ve fazla kısa DNA fragmanları elenerek, 350 bp büyüklüğündeki DNA fragmanları kütüphane oluşturmak için seçilmiştir.

3.1.3. 3’- Uçların Adenilasyonu: Kit içeriğindeki ATL, RSB reagenleri kullanılarak kör uçlu DNA fragmanlarının her birinin 3’ uçlarına “A” nükleotidi eklenmiştir. Bu sayede adaptör ligasyonu aşamasından fragmanların kendi arasında birbirine bağlanması engellenir. Böylelikle kimerik oluşumların önüne geçilebilir.

3.1.4. Adaptörlerin Ligasyonu: Kit içeriğinde bulunan Ligation Mix 2 kullanılarak DNA fragmanlarının uçlarına Barkod adaptörler eklenmiştir. Barkod adaptörler aracılığıyla fragmanlar Akış Hücrelerine (Flow Cell) bağlanmakta ve ayrıca barkod bölgesi ile de örneklerin birbirinden ayırt edilmesi sağlanmaktadır. Ardından SPB manyetik pürifikasyon boncukları ile adaptör eklenmiş DNA parçaları, eklenmemiş olanlardan ayrılır.

3.1.5. DNA Fragmanlarının Zenginleştirilmesi ve Kütüphane Validasyonu, Kalite Kontrolü: Sekanslama prosedürü sırasında daha verimli sonuçlar ve okumalar elde edebilmek için kit içeriğinde bulunan PCR Primer Kokteyl Miksi kullanılarak PCR yöntemi ile adaptör eklenmiş DNA fragmanlarının zenginleştirilmesi yapılır. Ardından DNA kütüphanesinin kantitasyonu için qPCR yöntemi kullanılarak optimum boyut kümelemesi yapılmıştır. Son olarak örneklerin kalite kontrolü, Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer ile yapılarak boyut dağılım profilleri elde edilmiştir.

3.1.6. Kütüphane Normalizasyonu: Kit içeriğinde bulunan DCT plakalar kullanılarak DNA kütüphanesi 10 nM konsantrasyona ayarlanmış ve PDP plakada eşit hacimler ile DNA kütüphanesi bir araya getirilip bir havuz oluşturulmuştur.

3.2. Sekans Reaksiyonu ve Yürütme

“Illumina HiSeq 2500” dizileme cihazı ve “HiSeq SBS Kit v2” kullanılarak sekans reaksiyonu ve yürütme işlemi üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda

gerçekleştirilmiştir (Katalog No: FC-402-4023, Illumina).

3.3. Biyoinformatik Analizler

Elde edilen genom sekansları “FASTQ” formatındadır. Bu format sekans bilgisi ile birlikte kalite değerlerini de içermektedir. Kalite değerleri QC-0 ile QC-40 arasında olup, her bir sekans okumasındaki doğruluk oranını yansıtmaktadır. QC-20 %99, QC-30 ise %99,99 doğru baz okuma olasılığını temsil eder. Bu çalışmada elde edilen FASTQ dosyası web tabanlı Galaxy platformuna (<https://usegalaxy.org/>) yüklenerek kalite kontrol aşamasına geçilmiştir (Afgan ve ark, 2012; Galaxy, 2018). Galaxy platformunda bulunan “FastQC” aracı ile; sekans dosyasına ait basit istatistik, baz düzeyinde sekans kalitesi, sekans düzeyinde kalite değerlerinin dağılımı, baz ve sekans düzeyinde “GC” içeriği, okunamayan sekans içeriği, sekans uzunluk dağılımı, sekans tekrar düzeyi ve Kmer içeriği üzerine kalite raporu oluşturularak problemleri olabilecek kısımlar üzerinde hızlı bir değerlendirme yapılmıştır (Andrews 2010). FastQC raporunda elde edilen sonuçlara göre; sekansların GC oranı %58, sekansların uzunluk aralığı 36bp – 126bp ve toplam sekans sayısı 16850980 olarak bulunmuştur. Sekansların %100’ü 22 kalite skorunun üzerinde elde edilirken, sekansların %93’ü 30 kalite skorunun üzerindedir. Sekansların %99’undan fazlası 120bp-126bp arasında olup farklı boyutlarda elde edilen sekansların oranı oldukça düşüktür. Coverage değeri toplam sekans sayısı ve ortalama sekans uzunluğunun çarpımının genom boyutuna bölünmesiyle elde edilmektedir. Elde edilen verilere göre coverage değeri 60 olarak bulunmuştur.

FASTQ formatındaki sekans dosyaları paired end, illumina formatında Geneious 11.0.5. (www.geneious.com) platformuna yüklenerek, ileri ve geri okumaların birleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dosyada bulunan düşük kalitede ve düşük güvenilirlikte ki sekansların filtrelenmesi amacıyla BBtools paketinden (<https://jgi.doe.gov/>) BBnorm aracı kullanılmıştır. BBnorm aracında minimum coverage 6, hedeflenen coverage ise 40 olarak seçilmiştir. Hatalı sekansların temizlenmesi ve coverage değerlerinin sekanslar için normalize edilerek analizin doğruluğu artırılmıştır.

Genom haritalama (mapping) işlemi için referans genom olarak kullanılmak üzere *L. infantum* JPCM5 organizmasına ait 36 kromozom sekansı Geneious platformuna indirilmiştir. 36 kromozom tek bir dosya içinde listelenerek referans olarak kullanılmaya hazır hale getirilmiştir. Ardından Geneious mapper kullanılarak, orta hassasiyet ve 5 iterasyon parametreleri ile referansa karşı haritalama işlemi yürütülmüştür.

Elde edilen kontig dosyaları kromozomlara göre sınıflandırılmış ve referans genoma göre anotasyonları yapılmıştır. Kromozomlara ait kontig dosyalarının polimorfik bölgelerini bulmak için “Find Variations/SNPs” programı geneious platformu üzerinde kullanılmış ve üretilen polimorfik bölgeler delesyon, insersiyon, substitüsyon ve SNP olarak sınıflandırılmıştır. Ardından, kontiglerden oluşturulan konsensüs sekanslar FASTA formatında kaydedilerek NCBI veribankasına (www.ncbi.nlm.nih.gov) yüklenmiştir (NCBI, 2018a).

III. Analiz ve Bulgular

Leishmania tüm genomu dizisinin ilk kez çıkarılmasından bu yana yaklaşık on yıllık bir zaman geçmiştir. Bununla birlikte günümüzde *Leishmania* türleri üzerinde yapılan tüm genom dizileme (WGS) çalışmaları oldukça sınırlı olup, sadece birkaç *Leishmania* türünün yüksek kalite ve tamamlanmış genomu bulunmaktadır (Leprohon ve ark., 2015). Bunlar (i) VL için, *L. infantum* JPCM5 (Peacock ve ark., 2007) ve *L. donovani*

BPK282/0cl4 (Downing ve ark.,2011), (ii) CL için, *L. major* Friedlin (Ivens ve ark., 2005), *L. mexicana* U1103 (Rogers ve ark., 2011), (iii) MCL için, *L. braziliensis* M2904 (Peacock ve ark., 2007), (iv) *L. tarentolae* (Raymond ve ark., 2012) ve (v) *L. amazonensis* (Real ve ark., 2013) şeklindedir. Diğer parsiyel *Leishmania* genom dizilerine TriTrypDB (www.tritrypdb.org) adresinden ulaşılabilir.

Genomik ve transkriptomik analizler, *Leishmania*'nın biyolojisi ve parazit-konak-vektör üçgeni arasında meydana gelen karmaşık etkileşimleri daha iyi anlamamız için bizlere ışık tutmuştur (Cantacessi ve ark., 2015). *Leishmania* türlerinin tüm genomu dizisinin çıkarılması çalışmaları aşağıda kronolojik bir sırada verilmiştir.

İlk kez bir *Leishmania* türünün Ivens ve ark. (2005), tarafından tüm genom dizisini çıkardıkları bu çalışma İngiltere Wellcome Trust Sanger Enstitüsü (WTSI) ve Amerika Seattle Biomedical Research Enstitüsü işbirliği ile yapılmıştır. Sekans işleminde Shotgun Dizileme metodu kullanılmıştır. Bu çalışmada *Leishmania major* (Friedlin suşu, referans genom) sekanslandı; 36 kromozom üzerinde 32,8-megabase haploid genom, 911 RNA geni, 39 psödogen ve 8272 protein-kodlayan gen gösterildi. Bu genler arasında konak-patojen etkileşimlerinin düzenlenmesinde rol oynayan proteolitik enzimler ve kompleks yüzey glikokonjugatlarının sentezi gibi fonksiyonlardan sorumlu genler yer almaktadır (Ivens ve ark., 2005).

2007 yılında, *Leishmania infantum* ve *Leishmania braziliensis* türlerinin de genom dizileri WTSI liderliğinde çok merkezli bir çalışma ile tamamlanmıştır (Peacock ve ark., 2007). Bu iki türün tüm genom sekanslarını dizilerken araştırmacılar yaklaşık altı katı coverage elde etmek için, değişken uzunlukta (4 kb'a kadar) genom fragmentlerini ihtiva eden plazmid klonları ile shotgun dizilemesi kullanmışlardır. Peacock ve ark. (2007) bu çalışmada her iki türün tüm genomunu *L. major* ile karşılaştırmış ve genomlarının büyük ölçüde korunmuş olduğunu sadece 200 kadar genin her üç türde farklılık gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Psödogen formasyonları ve gen kaybı farklı genomları şekillendiren ana unsurlardır. Türler arasındaki farklı ve protein kodlayan genler konak-parazit interaksyonu ve makrofaj içerisindeki parazitin yaşamını devam ettirmesi açısından önemlidir.

Dört yıl sonra aynı teknikle *Leishmania mexicana*'nın tüm genom sekansı çıkarılmıştır (Rogers ve ark., 2011). Rogers ve ark. (2011) *L. mexicana* referans genomunu diğer *L. major*, *L. infantum*, ve *L. braziliensis* ile karşılaştırdıklarında türe özgü çok az sayıda gen veya paralog grup (sırasıyla 2, 14, 19, ve 67) taşıdıklarını göstermişlerdir.

Yine 2011'de, ilk kez "Yeni nesil DNA dizileme" teknolojisi ile *Leishmania donovani* referans genomunun dizisi tamamlanmıştır (Downing ve ark., 2011). Downing ve ark. (2011), bir pirosekans dizileme sistemi (454 Roche) kullanarak total 1,29 milyon *single end* ve 3,58 milyon *paired end* okuma (ortalama 167 baz bp uzunlukta) gerçekleştirmiş ve bu şekilde referans dizi %96 oranında oluşturulmuştur. Daha sonra Nepal ve Hindistan'da VL hastalarından elde edilen 17 klinik izolat (referans genom dahil) Illumina Sequencing ile sekanslanmış ve total olarak 41 Gb sekans verisi oluşturulmuştur. Ardından her bir izolattan elde edilen 76 bp'lik *paired end* okuma referans genom ile eşleştirilmiş ve *Leishmania* popülasyon genetiği ve ilaç direncine neden olan mekanizmaları anlamak için SNP (single nucleotide polymorphism) analizi yapılmıştır.

En son *Leishmania* genom dizisi (*Leishmania amazonensis*), 454 ve Illumina sekanslama sisteminin birlikte kullanılarak elde edilmiştir (Real ve ark., 2013). Yaklaşık olarak 179 000 454 okuma elde edildi, bu ise *L. amazonensis* genomunun iki kat coverage na karşılık

gelmekte olup, 27 856 kontig (=contig, çakışan DNA fragmanları serisi) 4411 scaffold (kontiglerin birleştirilmesi ile elde edilen dizi) ile elde edilmiştir. Yaklaşık olarak 37 milyon 76-bp çift yönlü Illumina dizisi 2627 scaffold derlenmiştir.

Leprohon ve ark. (2015) tarafından yapılan bir derlemede *Leishmania* ilaç direnci ve bunun yeni yönlerini anlamımıza ışık tutacak tüm genom sekansında çalışmalarında gelinen son noktalar özetlenmiştir. *L. infantum*, *L. donovani*, *L. major* ve *L. tarentolae* 36 kromozomdan oluşurken, *L. braziliensis*'de 20 ve 34'üncü kromozomlarının füzyon ile birleşmesine bağlı olarak 35 kromozomdan bulunmaktadır (Britto ve ark., 1998; Peacock ve ark., 2007). *L. mexicana* ise 34 kromozomdan oluşmaktadır, zira 8 ile 29 ve 20 ile 36'ınca kromozomları füzyon ile birleşmişlerdir (Britto ve ark., 1998; Rogers ve ark., 2011).

Tahmini olarak 20-100 milyon yıl önce *L. Viannia* spp. ve *L. Leishmania* spp. türleri ayrılmış olmasına rağmen, genomik yapı türler arasında yüksek derecede *synteny* (aynı kromozom üzerindeki bir genetik lokusun fiziksel olarak ko-lokalizasyonunu) ile karakterizedir (Peacock ve ark., 2007). Karşılaştırmalı genomik ile de son derece az sayıda türe özgü gen ortaya çıkarılmıştır. *Leishmania infantum*, *L. major* veya *L. mexicana*'da türe spesifik yirmiden az gen veya paralog grup bulunmaktadır (Britto ve ark., 1998; Rogers ve ark., 2011). Paralog grupların sayısı nispeten *L. braziliensis* (67 gen) ve *L. tarentolae* (95 gen) türlerinde, sırasıyla *Viannia* subgenus ve *SauroLeishmania* subgenusunda yer almaları ile uyumlu olarak biraz daha fazladır. Dahası, *L. tarentolae* patojen türlerin hücre içi yaşam evresi ile ilişkili genler bulunmamaktadır (Raymond ve ark., 2012). *Leishmania brazillensis*'in, *Leishmania* subgenus *Leishmania* türlerinde bulunan fonksiyonel RNA interferans ve transpozon elementleri gibi özellikleri taşımadığı gösterilmiştir (Peacock ve ark., 2007; Lye ve ark., 2010). **Bu türe özgü genlerin çok az olması, hastalık tropizmi ve türler arasında ilaç duyarlılığındaki varasyonların gen ekspresyonu ve ortak bir çekirdek genin ifadesindeki dozaj farklılıkları ile ortaya çıktığını akla getirmektedir** (Yardley et al., 2005; Sanchez-Canete et al., 2009).

Leishmania parazitlerinin gen ekspresyonunun kendine özgü bir mekanizmasına bulunmaktadır. Protein kodlayan genler aynı DNA sarmalı üzerindeki bitişik birimlerin parçası olarak kromozomlar üzerinde dağılmışlardır. RNA polimeraz II tarafından polisistronik transkripsiyon birimleri gibi ko-transkripsiyona uğrarlar (Haile ve Papadopoulou, 2007). Transkripsiyonel kontrol olmaksızın çevresel strese adapte olmak için (ilaç etkisi de dahil olmak üzere) *Leishmania* mRNA düzeylerini değiştirmek için, gen amplifikasyonu ile gen dozajının artırılması, dublikasyon, delesyon ve anöploidi gibi mekanizmalar geliştirdi (Ubeda ve ark., 2008; Leprohon et al., 2009) Bunun aksine ilaç hedefleri, transporter veya anahtar enzimler gen ekspresyonunun değişmesine gerek duymaksızın iyi bir şekilde adaptasyon göstermektedirler (Ritt et al., 2013).

Son yıllarda NGS teknolojisi ile *Leishmania* ilaç direnci biyomarker ve determinantlarının identifikasyonu çalışmaları artarak devam etmektedir. Dirençli *Leishmania* suşlarında gen ekspresyonundaki modülasyonun belirlenmesini, gen ifadesindeki dozaj değişikliklerini, kromozom kopya sayısındaki değişimleri, SNP'leri saptamaya olanak sağlamıştır. Popülasyon içerisindeki klonların da genellikle hem genotip hem de fenotiplerinin farklı olduğu, popülasyon düzeyinde etkileyici bir heterojenitenin olduğu gözlenmiş, bu nedenle direnç mekanizmalarının aydınlatılması zorlaşmıştır (Leprohon ve ark., 2015).

Özetle, *Leishmania* genomu ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda; (i) Genetik çeşitliliğin ileri düzeyde olduğu görülmüş, taksonomisi güncellenmiştir. (ii) Atasal DNA

araştırmaları türlerin tarihsel ayrışmasını ortaya koymuştur. (iii) *Leishmania* türlerinin biyolojisi ve parazit-konak-vektör üçgeni daha iyi anlaşmıştır. (iv) *Leishmania* türlerinin doku tropizminde ortaya çıkan farklılıkların nedenlerinin anlaşılacağı düşünülmektedir. (v) NGS teknolojisi ilaç direnci biyomarker ve determinantlarının identifikasyonuna imkan vermektedir.

Bizim çalışmamızda *L. infantum*'un yüksek kalitede tüm genom dizisi başarı ile sekanslanmış ve 36 kromozoma ait toplam 32.009.138 baz çifti büyüklüğünde genomik DNA elde edilmiştir. Ardından elde edilen genomik DNA, "National Center for Biotechnology Information, USA, (NCBI) GenBank"a (www.ncbi.nlm.nih.gov) yüklenerek, ***Leishmania infantum*_TR01 (Lin_TR01)** ismi ile kaydedilmiştir (NCBI, 2018a). Lin_TR01 genomunun 36 kromozomuna ait NCBI tarafından verilen erişim numaraları (*accession number*) "CP027807, CP027810, CP027808, CP027811, CP027809, CP027812, CP027813, CP027814, CP027817, CP027818, CP027819, CP027815, CP027821, CP027816, CP027823, CP027820, CP027822, CP027824, CP027825, CP027826, CP027827, CP027828, CP027829, CP027830, CP027831, CP027832, CP027833, CP027834, CP027835, CP027836, CP027837, CP027838, CP027839, CP027840, CP027841, CP027842" şeklindedir (Şekil 1; NCBI, 2018b).



Organism Overview : Genome Assembly and Annotation report
Leishmania infantum
 Leishmania infantum Genome sequencing

Lineage: Eukaryota[3282]; Euglenozoa[46]; Kinetoplastida[44]; Trypanosomatidae[42]; Leishmaniinae[24]; Leishmania[15]; Leishmania[8]; Leishmania donovani species complex[2]; Leishmania infantum[1]

Summary

Submitter: Public Health General Directorate, National Parasitology Reference Laboratory
 Assembly level: Complete Genome
 Assembly: GCA_003020905.1 ASM302090v1 scaffolds: 36 contigs: 36 N50: 1,046,244 L50: 1
 BioProjects: PRJNA437593
 Statistics: total length (Mb): 32.0001
 GC%: 59.5825

Replicon Info

Loc	Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%
Chr		1	-	CP027807.1	0.28	63.0
Chr		2	-	CP027818.1	0.34	62.4
Chr		3	-	CP027829.1	0.38	62.8
Chr		4	-	CP027837.1	0.48	61.3
Chr		5	-	CP027838.1	0.45	61.9
Chr		6	-	CP027839.1	0.53	62.0
Chr		7	-	CP027840.1	0.59	61.3
Chr		8	-	CP027841.1	0.5	61.7
Chr		9	-	CP027842.1	0.57	60.9
Chr		10	-	CP027808.1	0.55	60.1
Chr		11	-	CP027809.1	0.56	59.3
Chr		12	-	CP027810.1	0.57	60.5
Chr		13	-	CP027811.1	0.65	60.2
Chr		14	-	CP027812.1	0.64	59.8
Chr		15	-	CP027813.1	0.62	61.2
Chr		16	-	CP027814.1	0.7	61.2
Chr		17	-	CP027815.1	0.67	60.8
Chr		18	-	CP027816.1	0.72	58.9
Chr		19	-	CP027817.1	0.74	59.2
Chr		20	-	CP027819.1	0.73	59.7
Chr		21	-	CP027820.1	0.76	60.4
Chr		22	-	CP027821.1	0.66	59.6
Chr		23	-	CP027822.1	0.78	59.4
Chr		24	-	CP027823.1	0.87	60.4
Chr		25	-	CP027824.1	0.89	60.1
Chr		26	-	CP027825.1	1.05	60.2
Chr		27	-	CP027826.1	1.05	59.3
Chr		28	-	CP027827.1	1.17	59.2
Chr		29	-	CP027828.1	1.22	58.6
Chr		30	-	CP027830.1	1.37	58.7
Chr		31	-	CP027831.1	1.47	58.9
Chr		32	-	CP027832.1	1.55	58.8
Chr		33	-	CP027833.1	1.45	58.6
Chr		34	-	CP027834.1	1.67	58.6
Chr		35	-	CP027835.1	2.07	58.1
Chr		36	-	CP027836.1	2.68	58.1

Chromosomes

Genome Region

Leishmania infantum strain TR01 isolate Lin_TR01 chromosome 36
 complete sequence

Go to nucleotide: [Graphics](#) [FASTA](#) [GenBank](#)

CP027836.1 • Find: [input] [search] [back] [forward] [zoom in] [zoom out] [tools] [tracks] [help]

[200 K] [400 K] [600 K] [800 K] [1 M] [1,200 K] [1,400 K] [1,600 K] [1,800 K] [2 M] [2,200 K] [2,600,433]

CP027836.1: 1..2.7M (2.7Mbp) [tracks shown: 1/2]

Şekil 1. Leishmania infantum_TR01 (Lin_TR01). (NCBI, 2018b).

Günümüzde sadece birkaç tane yüksek kalite *L. infantum* tüm genomu mevcuttur. Çalışmamızda elde edilen tüm genom dizisi referans genomdan bu yana elde edilen dünyada ikinci WGS, ülkemizde ilk WGS niteliğinde olup, seviye olarak *complete* durumda olan tek WGS'dir (Şekil 2; NCBI, 2018c).

Ayrıca Lin_TR01 suşu kütanöz leishmaniosis olgusundan izole edilmiş olması açısından da bir ilktir. Zira referans genom olan *L. infantum* JPCM5 (Peacock ve ark., 2007) suşu türün klasik doku ve organ tropizmine uygun olarak visseral leishmaniosis olgusundan elde edilmiştir.

Organism/Name	Strain	BioSample	BioProject	Assembly	Level	Size (Mb)	GC%	Replicons	WGS	Scaffolds	Gene	Protein	Release Date	Modify Date	FTP
Leishmania infantum	JPCM5	SAMEA3138175	PRJNA12658	GCA_00002875.2	●	32.1221	59.57	chromosome 1 NC_009386.2 FR796433.1 chromosome 2 NC_009387.2 FR796434.1 chromosome 3 NC_009388.2 FR796435.1 Show all 36 replicons	CACT01	76	8366	8150	2007/04/04	2011/11/03	◆◆
Leishmania infantum	TR01	SAMN05583618	PRJNA437593	GCA_003020995.1	●	32.0091	59.56	chromosome 1 CP927807.1 chromosome 2 CP927818.1 chromosome 3 CP927829.1 Show all 36 replicons		36	-	-	2018/03/27	2018/04/06	◆
Leishmania infantum	-	SAMEA103972945	PRJEB20254	GCA_000506025.1	●	32.8832	59.70	-	LIN801	36	8747	8526	2018/08/06	2018/08/06	◆
Leishmania infantum	HUJF514	SAMN07588840	PRJNA398352	GCA_003671315.1	●	32.5789	59.50	-	NSC081	2507	-	-	2018/10/22	2018/10/22	◆

Şekil 2. NCBI'da yer alan *L. infantum* WGS dizileri. Leishmania infantum TR01 çalışmamızda elde edilen WGS dizisini göstermektedir (NCBI, 2018c).

L. infantum genomu anotasyonu sonucunda 36 kromozoma ait;

- 3153 polimorfizm,
- 8324 Gen,
- 8199 CDS,
- 8109 mRNA,
- 67 tRNA,
- 11 rRNA ve
- 58 ncRNA bulunmuştur.

Elde edilen 8199 CDS'nin 5278 tanesi hipotetik protein (Hypothetical protein CDS) niteliğindedir.

IV. Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak, bu çalışmada ülkemizde ilk defa *Leishmania infantum*'un yüksek kalitede tüm genom dizisi başarı ile çıkarılmış ve ardından elde edilen 36 kromozoma ait toplam 32.009.138 baz çifti büyüklüğündeki genomik DNA GenBank'a (www.ncbi.nlm.nih.gov) yüklenerek *Leishmania infantum_TR01 (Lin_TR01)* ismi ile tescillenmiştir. Diğer yandan Lin_TR01 suşu kütanöz leishmaniosis olgusundan izole edilmiş olması açısından bir ilktir. Zira referans genom olan *L. infantum* JPCM5 (Peacock ve ark., 2007) suşu türün klasik doku ve organ tropizmine uygun olarak visseral leishmaniosis olgusundan elde edilmiştir. Lin_TR01, JPCM5 suşundan bu yana dünya genelinde tüm genomu dizilenen ikinci suş olma niteliğindedir. Lin_TR01 genomu elde edilen diğer genomlar ile karşılaştırıldığında seviye olarak *complete* durumda olan tek *Leishmania infantum* tüm genom dizisidir. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/249>).

Bundan sonraki aşamada polimorfizmlerin protein üzerindeki etkisinin araştırılmasına, protein ekspresyonu gibi ilave deneylere ve biyoinformatik araçlar kullanılarak yapılabilecek ilave analizlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu konuda çalışmak isteyen araştırmacılara polimorfizm analizi, protein ekspresyonu ve/ya protein modelleme çalışmaları yapmalarını önermekteyiz.

V. Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkılar

Bu çalışmada elde edilen veriler esasen *Leishmania* genomu konusunda önümüzde katedilecek daha çok yol olduğunu gösterse de, çalışmamızın bilime katkı sağlayacağı, ülkemizde yapılacak *Leishmania* genom çalışmaları için bir temel oluşturacağı ve global düzlemdeki çalışmalara katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

VI. Kaynaklar

AFGAN, E, CHAPMAN, B., & TAYLOR, J. (2012). CloudMan as a platform for tool, data, and analysis distribution. *BMC bioinformatics*, 13(1), 315.

ANDREWS, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.

BRITTO C, RAVEL C, BASTIEN P, BLAINEAU C, PAGES M, DEDET JP, WINCKER P (1998). Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between OldWorld and NewWorld *Leishmania* genomes. *Gene*, **222**:107–117.

CANTACESSI C, DANTAS-TORRES F, NOLAN MJ, OTRANTO D (2015). The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends Parasitol*, 31(3):100-108. doi: 10.1016/j.pt.2014.12.012. Epub 2015 Jan 28.

DOWNING T, IMAMURA H, DECUYPERE S, CLARK TG, COOMBS GH, COTTON JA, HILLEY JD, DE DONCKER S, MAES I, MOTTRAM JC, QUAIL MA, RIJAL S, SANDERS M, SCHÖNIAN G, STARK O, SUNDAR S, VANAERSCHOT M, HERTZ-FOWLER C, DUJARDIN JC, BERRIMAN M (2011). Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Res*, 21:2143–2156.

GALAXY (2018). <https://usegalaxy.org/> (Erişim tarihi: 11.12.2018).

GENEIOUS (2018). <https://www.geneious.com/> (Erişim tarihi: 11.12.2018).

HAÏLE S, PAPADOPOULOU B (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**:569–577.

IVENS AC, PEACOCK CS, WORTHEY EA, MURPHY L, AGGARWAL G, BERRIMAN M, SISK E, RAJANDREAM MA, ADLEM E, AERT R, ANUPAMA A, APOSTOLOU Z, ATTİPOE P, BASON N, BAUSER C, BECK A, BEVERLEY SM, BIANCHETTIN G, BORZYM K, BOTHE G, BRUSCHÍ CV, COLLINS M, CADAG E, CIARLONI L, CLAYTON C, COULSON RM, CRONIN A, CRUZ AK, DAVIES RM, DE GAUDENZI J, DOBSON DE, DUESTERHOEFT A, FAZELINA G, FOSKER N, FRASCH AC, FRASER A, FUCHS M, GABEL C, GOBLE A, GOFFEAU A, HARRIS D, HERTZ-FOWLER C, HILBERT H, HORN D, HUANG Y, KLAGES S, KNIGHTS A, KUBE M, LARKE N, LITVIN L, LORD A, LOUIE T, MARRA M, MASUY D, MATTHEWS K, MICHAELI S, MOTTRAM JC, MÜLLER-AUER S, MUNDEN H, NELSON S, NORBERTCZAK H, OLIVER K, O'NEIL S, PENTONY M, POHL TM, PRICE C, PURNELLE B, QUAIL MA, RABBINOWITSCH E, REINHARDT R, RIEGER M, RINTA J, ROBBEN J, ROBERTSON L, RUIZ JC, RUTTER S, SAUNDERS D, SCHÄFER M, SCHEIN J, SCHWARTZ DC, SEEGER K, SEYLER A, SHARP S, SHIN H, SIVAM D, SQUARES R, SQUARES S, TOSATO V, VOGT C, VOLCKAERT G, WAMBUTT R, WARREN T, WEDLER J, WOODWARD J, ZHOU S, ZIMMERMANN W, SMITH DF, BLACKWELL JM, STUART KD, BARRELL B, MYLER PJ (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309:436–442.

JGI (JOINT GENOME INSTITUTE) (2018). <https://jgi.doe.gov/> (Erişim tarihi: 11.12.2018).

LEPROHON P, LEGARE D, RAYMOND F, MADORE E, HARDIMAN G, CORBEIL J, OUELLETTE M (2009). Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucl. Acids Res.* **37**:1387–1399.

LEPROHON P, FERNANDEZ-PRADA C, GAZANION É, MONTE-NETO R, OUELLETTE M (2014). Drug resistance analysis by next generation sequencing in *Leishmania*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* **22**;5(1):26-35. doi: 10.1016/j.ijpddr.2014.09.005. eCollection 2015.

LYE LF, OWENS K, SHI H, MURTA SM, VIEIRA AC, TURCO SJ, TSCHUDI C, ULLU E, BEVERLEY SM (2010). Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. *PLoS Pathog.* **6**: e1001161.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION) (2018a). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Erişim tarihi: 05.12.2018)

NCBI (2018b). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/249?genome_assembly_id=368466 (Erişim tarihi: 11.12.2018)

NCBI (2018c). (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/249>) (Erişim tarihi: 11.12.2018)

RİTT JF, RAYMOND F, LEPROHON P, LEGARE D, CORBEİL J, OUELLETTE M (2013). Gene amplification and point mutations in pyrimidine metabolic genes in 5-fluorouracil resistant *Leishmania infantum*. *PLoS Negl. Trop. Dis* **7**: 2564.

PEACOCK CS, SEEGER K, HARRİS D, MURPHY L, RUIZ JC, QUAIL MA, PETERS N, ADLEM E, TIVEY A, ASLETT M, KERHORNOU A, IVENS A, FRASER A, RAJANDREAM MA, CARVER T, NORBERTCZAK H, CHILLINGWORTH T, HANCE Z, JAGELS K, MOULE S, ORMOND D, RUTTER S, SQUARES R, WHITEHEAD S, RABBINOWİTSCH E, ARROWSMİTH C, WHITE B, THURSTON S, BRİNGAUD F, BALDAUF SL, FAULCONBRIDGE A, JEFFARES D, DEPLEGGE DP, OYOLA SO, HİLLEY JD, BRİTO LO, TOSİ LR, BARRELL B, CRUZ AK, MOTTRAM JC, SMİTH DF, BERRİMAN M (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat. Genet.* **39**: 839–847.

RAYMOND F, BOİSVERT S, ROY G, RİTT JF, LEGARE D, ISNARD A, STANKE M, OLİVIER M, TREMBLAY MJ, PAPADOPOULOU B, OUELLETTE M, CORBEİL J (2012). Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucl. Acids Res.* **40**:1131–1147.

REAL F, VİDAL RO, CARAZZOLLE MF, MONDEGO JM, COSTA GG, HERAİ RH, WÜRTELE M, DE CARVALHO LM, CARMONA E FERREİRA R, MORTARA RA, BARBIÉRİ CL, MİECZKOWSKİ P, DA SİLVEİRA JF, BRİONES MR, PEREİRA GA, BAHİA D. (2013) The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA Res.* **20**:567–581.

ROGERS MB, HİLLEY JD, DİCKENS NJ, WİLKES J, BATES PA, DEPLEGGE DP, HARRİS D, HER Y, HERZYK P, IMAMURA H, OTTO TD, SANDERS M, SEEGER K, DUJARDİN JC, BERRİMAN M, SMİTH DF, HERTZ-FOWLER C, MOTTRAM JC (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*, *Genome Res.* **21**: 129–2142.

SANCHEZ-CANETE MP, CARVALHO L, PEREZ-VİCTORİA FJ, GAMARRO F, CASTANYS S (2009). Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**:1305–1313.

TriTrypDB (The Kinetoplastid Genomics Resource, 2018). <http://tritrypdb.org/tritrypdb/> (Erişim tarihi: 05.12.2018)

UBEDA JM, LEGARE D, RAYMOND F, OUAMEU, AA, BOİSVERT S, RİGAULT P, CORBEİL J, TREMBLAY MJ, OLİVIER M, PAPADOPOULOU B, OUELLETTE M (2008). Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. *Genome Biol.* **9**: R115.

YARDLEY V, CROFT SL, DE DONCKER S, DUJARDİN JC, KOİRALA S, RİJAL S, MİRANDA C, LLANOS-CUENTAS A, CHAPPUİS F (2005). The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**:272–275

VII. Ekler

a. Mali Bilanço ve Açıklamaları

Proje için ayrılan 25.000 TL'nin **20.060 TL**'si hizmet alımı (bütçe kodu: 3.5) için harcanmış olup, geriye 4.940 TL kalmıştır.

Yeni Nesil Düzleme Teknolojisi ile Türkiye'den İzole Edilen Kütanöz Leishmaniasis 17.0239002 Geçici Olarak Tamamlandı													
Genel Bilgiler		Yardımcılar	İş Planı	Gider Listesi	Odenekler	Yayımlar ve Afif Sayıları	Hakemler	Dosyalar	İhtiyaç Formları	Raporlar	Bap.Kom. Kararları	Son	
P: Proje Bütçesi (Başlangıç ödeneginde proje kabul edilene kadar teklif edilen, kabul edildikten sonra kabul edilen rakamlar gösterilir)													
Bütçe Yılı	Detaylar												
Bütçe Kodu	Açıklama	Önceki Yılları Devir	Başlangıç Ödenegi	Eklenen Aktarma	Düğülen Aktarma	Eklenen Ödenek	Düğülen Ödenek	Net Ödenek	Harcanan	Bloke Edilen (Avans)	Bloke Edilen (Diğer)	Kalan	
2017	03.2	TÜKETİME YONELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	0,00	25.000,00	0,00	25.000,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	03.5	HİZMET ALIMLARI	0,00	0,00	25.000,00	0,00	0,00	25.000,00	0,00	0,00	0,00	25.000,00	
	Toplam		0,00	25.000,00	25.000,00	25.000,00	0,00	0,00	25.000,00	0,00	0,00	25.000,00	
2018	03.5	HİZMET ALIMLARI	25.000,00	0,00	0,00	0,00	0,00	25.000,00	20.060,00	0,00	0,00	4.940,00	
	Toplam		25.000,00	0,00	0,00	0,00	0,00	25.000,00	20.060,00	0,00	0,00	4.940,00	

NOT: Verilen sonuç raporu bir (1) nüsha olarak ciltsiz şekilde verilecek, sonuç raporu Komisyon onayından sonra ciltlenerek bir kopyasının yer aldığı CD ile birlikte sunulacaktır. Sonuç raporunda proje sonuçlarını içeren, ISI' nın SCI veya SSCI veya AHCI dizinleri kapsamında ve diğer uluslar arası dizinlerce taranan hakemli dergilerde yayınlanmış makaleler, III. Materyal ve Yöntem ve IV. Analiz ve Bulgular bölümleri yerine kabul edilir.