

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

***Plasmodium vivax*' ın LDH ENZİMİNİN AKTİF
BÖLGE HALKASININ AMİNO TERMİNAL
UCUNUN ANALİZİ**

Bünyamin ATMIŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

ELAZIĞ – 2007

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

***Plasmodium vivax*' ın LDH ENZİMİNİN AKTİF
BÖLGE HALKASININ AMİNO TERMİNAL
UCUNUN ANALİZİ**

Bünyamin ATMIŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

ELAZIĞ – 2007

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

***Plasmodium vivax*' ın LDH ENZİMİNİN AKTİF BÖLGE HALKASININ AMİNO TERMİNAL UCUNUN ANALİZİ**

Bünyamin ATMIŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez, .../.../.... tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile başarılı / başarısız olarak değerlendirilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Dilek TURGUT – BALIK

Üye: Doç. Dr. Fikret KARATAŞ

Üye: Yrd. Doç.Dr. Mehmet TUZCU

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun/...../tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı yaptığım süre içerisinde bana her zaman destek olan bilimsel ve etik kuralları içerisinde disiplinli çalışmaya yönlendiren hocam Doç. Dr. Sn Dilek TURGUT-BALIK'a çok teşekkür ederim.

Lisans eğitimimi yaptığım ve yüksek lisans eğitimi yapmakta olduğum Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ne ve daima yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Proje çalışmama maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR VE SİMGELER	IX
ÖZET	XI
ABSTRACT	XII
BÖLÜM 1 GİRİŞ	1
1.1. Sıtma	1
1.2. Sıtmanın Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	2
1.2.1. Kinolin İçeren İlaçlar	3
1.2.2. Sülfonlar ve Sülfonamidler	3
1.2.3. Artemisininler	3
1.2.4. Antibiyotikler	3
1.2.5. Antifolatlar	4
1.3. Sıtmanın Tedavisinde Kullanılan Temel Hedefler	4
1.4. Sıtma Parazitleri LDH Enzimleri	5
1.5. <i>Plasmodium</i> ve Diğer Bazı <i>Apicomplexan</i> LDH'lerinin Aktif Bölge Yapısı	7
BÖLÜM 2 MATERYAL VE METOD	9
2.1. Materyal	9
2.1.1. Ekspresyon Vektörü	10
2.1.2. <i>Escherichia coli</i> Suşları	10
2.1.3. Bakteriyolojik Gelişim İçin Besiyerleri ve Solüsyonlar	10
2.1.4. Tamponlar ve Stok Solüsyonlar	11

2.1.5. Primerler	13
2.1.6. DNA Örneği	16
2.2. Metod	17
2.2.1. Plazmid DNA İzolasyonu	17
2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Yönlendirilmiş Mutageniz	17
2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi.	18
2.2.3.1. Etidyum Bromürle Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi	18
2.2.3.2. Kristal Viyole ile Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi	18
2.2.4. DNA'nın Jelden Geri Kazanılması	19
2.2.5. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle DNA'nın Kesilmesi (Digest)	19
2.2.6. Klonlanacak DNA ile Vektör DNA'sının Birleştirilmesi (Ligasyon)	19
2.2.7. Kalsiyum Klorür Etkileşimiyle Kompetant <i>E. coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması	20
2.2.8. Transformasyon	20
2.2.9. Koloni PCR	21
2.2.10. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	21
2.2.11. Western Blotla Mutant <i>Pf</i> LDH Proteinlerinin Belirlenmesi	22
2.2.12. Mutant Laktat Dehidrogenaz Enzimlerinin Aktivitelerinin Ölçülmesi	23
BÖLÜM 3 BULGULAR VE TARTIŞMA	24
3.1. <i>Plasmodium vivax</i> LDH' nın <i>Toxoplasma gondii</i> I'e Benzetilmesi	24
3.2. <i>Plasmodium vivax</i> LDH' nın <i>Toxoplasma gondii</i> II'ye Benzetilmesi	29
3.3. <i>Plasmodium vivax</i> LDH' nın <i>Eimeria tenella</i> 'ya Benzetilmesi	30
3.4. <i>Plasmodium vivax</i> LDH' nın <i>Eimeria acervulina</i> 'ya Benzetilmesi	32
3.5. <i>Plasmodium vivax</i> LDH' nın <i>Theileria parva</i> 'ya Benzetilmesi	34
BÖLÜM 4 SONUÇ	35
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1. <i>PvLM3Tg1</i> A ve B fragmentlerinin elde edilmesi.	25
Şekil 3.2. <i>PvLM3Tg1</i> geninin tam uzunluğunun elde edilmesi.	25
Şekil 3.3. Koloni PCR'dan sonra pozitif sonuçların jelde görüntülenmesi.	26
Şekil 3.4. <i>PvLM3Tg1</i> genini içeren JM 105 hücre süpernatant protein profilinin gösterilmesi	27
Şekil 3.5. <i>PvLDH</i> 'da yapılan mutasyon sonucunda a (3 saatlik) ve b (Bir gecelik) proteinlerin süpernatantların Western Blot yöntemiyle gösterilmesi	28
Şekil 3.6. <i>PvLM2TgII</i> genini içeren JM 105 hücre süpernatant protein profilinin gösterilmesi.	29
Şekil 3.7. <i>PvLM3Et</i> genini içeren JM 105 hücre süpernatant protein profilinin gösterilmesi	31
Şekil 3.8. <i>PvLM2Ea</i> genini içeren JM 105 hücre süpernatant protein profilinin gösterilmesi	33

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1.1. <i>Plasmodium</i> 'da sıtma tedavisi için kullanılan başlıca hedefler	5
Tablo 1.2. <i>Plasmodium vivax</i> ve diğer bazı <i>Apicomplexan</i> LDH'larının aktif bölgesindeki amino asit dizisi	8
Tablo 2.1. <i>Pv</i> LDH enzimini kodlayan genin nükleotid dizisi	15
Tablo 3.1. <i>Pv</i> LDH ve diğer bazı <i>Apicomplexan</i> LDH'larının mutasyonun yapılacağı aktif bölge halkası amino terminal ucu amino asitlerinin gösterilmesi	24
Tablo 3.2. <i>Pv</i> LM3Tg1 proteininin kinetik olarak tayini ve aktivitesinin ölçülmesi	28
Tablo 3.3. <i>Pv</i> LM2TgII proteininin kinetik olarak tayini ve aktivitesinin ölçülmesi	30
Tablo 3.4. <i>Pv</i> LM3Et proteininin kinetik olarak tayini ve aktivitesinin ölçülmesi	32
Tablo 3.5. <i>Pv</i> LM2Ea proteininin kinetik olarak tayini ve aktivitesinin ölçülmesi	34
Tablo 3.6. <i>P. vivax</i> LDH'ının amino asit dizisinin diğer bazı <i>Apicomplexan</i> LDH'larının amino asit dizisi ile karşılaştırılması	36

KISALTMALAR VE SİMGELER

Adenin	A
Adenozin trifosfat	ATP
Alanin	A/Ala
Amino asit	aa
Arjinin	R/Arg
Asparajin	N/Asn
Aspartik asit/ Aspartat	A /Asp
Baz çifti	bp
Deoksiribonükleikasit	DNA
Deoksiribonükleotidtrifosfat	dNTP
Distile su	dH ₂ O
Dünya sağlık örgütü	WHO
Etilendiamintetra-asetik asit	EDTA
Fenilalanin	F/Phe
Glisin	G/Gly
Glutamik asit/ Glutamat	E/Gln
Glutamin	Q/Gln
Gossilik nitril-1,1 diasetat	GNDA
Guanin	G
Histidin	H/His
Isopropil-B-D-thiogaltopiranosid	IPTG
Isolösin	I/Ile
Lisin	K/Lys
Low Molecular Weight	LM
Lösin	L/Leu
Metionin	M/Met
Kazanılmış immün yetmezlik sendromu	AIDS
Kristal viyole	CV
Laktat dehidrogenaz	LDH
Litre	l
Mikrolitre	µl
Miliamper	mA
Mililitre	ml

Milimolar	mM
Molar.....	M
Nikotiamid adenin dinükleotid	NAD
Nikotinamid adenin dinükleotid (indirgenmiş)	NADH
NNN'N'-Tetramethilenethilendiamin	TEMED
Optik dansite	OD
Phosphate buffered saline	PBS
<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Pf</i>
<i>Plasmodium falciparum</i> laktat dehidrogenaz enzimi	<i>Pf</i> LDH
<i>Plasmodium vivax</i> laktat dehidrogenaz enzimi	<i>Pv</i> LDH
Pikomol	pmol
Polimeraz Zincir Reaksiyonu	PCR
Prolin.....	P/Pro
Ribonükleik asit	RNA
Sample Amplification Buffer	SAB
Serin	S/Ser
Sistein	C/Cys
Sitozin.....	C
Sodyum dodesil sülfat	SDS
Timin	T
Treonin	T/Thr
Triptofan	W/Trp
Tris-Asetat-EDTA	TAE
Tirozin	Y/Tyr
Ultraviyole	UV
Ünite.....	u
Valin.....	V/Val
3,3'- Diaminobenzidin	DAB

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Plasmodium vivax' ın LDH AKTİF BÖLGE HALKASININ AMİNO TERMİNAL UCUNUN ANALİZİ

Bünyamin ATMIŞ

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

2007, Sayfa : 41

Bu çalışmada *Plasmodium vivax* LDH'nın aktif bölge halkası amino terminal ucu amino asitlerinin yönlendirilmiş mutagenез ile, *Toxoplasma gondii* I ve II, *Eimeria acervulina*, *Eimeria tenella* ve *Theileria parva* LDH'larına benzetilmesi amacıyla enzimin aktif bölge halkası amino terminal ucunda amino asit değişiklikleri yapılmıştır. Yapılan mutagenезler sonucunda, genel olarak PvLDH enzim aktivitesinde yabancı tip proteine göre bir düşüş gerçekleşmiş olmasına karşın, enzim substratı ile olan bağlantısını tamamen kaybetmemiş ve dolayısıyla enzim aktivitesi korunmuştur. Sözkonusu bölgeye müdahale sonucunda enzim aktivitesinin düşmesi ilgili bölgenin hassasiyetini göstermekte ve bu bölgenin ilaç tasarım çalışmaları için gerek *Plasmodium* gerek diğer *Apicomplexan*'lar için ideal bir hedef olarak kullanılabileceği fikrini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler : Sıtma, laktat dehidrogenaz, yönlendirilmiş mutagenез, *Plasmodium vivax*, *Apicomplexan*.

ABSTRACT

MASTER THESIS

ANALYSIS OF AMINO TERMINAL END OF ACTIVE SITE LOOP OF LDH FROM *PLASMODIUM VIVAX*

Bunyamin ATMIS

Fırat University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

2007, Page : 41

In this study, amino acid exchanges were made in the amino terminal end of active site loop of *Plasmodium vivax* LDH by mimicking *Toxoplasma gondii* I ve II, *Eimeria acervulina*, *Eimeria tenella* ve *Theileria parva* LDH's using the site directed mutagenesis method. Despite enzymatic activity was decreased compared to the production of the wild type protein, some of enzymatic activity was present meaning that enzyme was still in contact with its substrate. Decrease in the enzymatic activity indicates that this region is sensitive to changes and this supports the idea that this site could be evaluated as an ideal target for the drug design studies for both *Plasmodium* and some other *Apicomplexans*.

Keywords: Malaria, lactate dehydrogenase, Site-directed mutagenesis, *Plasmodium vivax*, *Apicomplexan*.

1. GİRİŞ

1.1.Sıtma

Sıtma, infekte dişi anofel sivrisineklerinin kan emerken taşıdıkları sporozoitleri konukçu canlıya transfer etmesi ile bulaşan bir enfeksiyon hastalığıdır. Hastalığa *Apicomplexan* şubesine ait tek hücreli ve zorunlu hücre içi paraziti olan *Plasmodium* genusu üyeleri sebep olmaktadır [1].

Hastalık etkeni olan *Plasmodium*'lar hayat döngülerinin bir bölümünü anofel cinsi dişi sivrisineklerde, diğer bölümünü insanda tamamlamaktadır. İnsanda sıtma etkeni olan *Plasmodium* türleri: *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Plasmodium ovale* (*P. ovale*) ve *Plasmodium malariae* (*P. malariae*)'dır [1]. *P. falciparum* ve *P. vivax* dünyadaki en yaygın türlerdir. *P. vivax* daha iyi seyirli ve nadir olarak yaşamı tehdit eder. Bu nedenle de *P. vivax*' ın yapmış olduğu sıtma benign sıtma olarak da adlandırılır. Türkiye'de yerli olarak görülen tür *P. vivax*'dır. *P. falciparum*, en şiddetli hastalığın sebebidir ve hemen hemen bütün ölümlerden sorumludur. Bundan dolayı malign sıtma olarak bilinir [2]. *P. ovale* yalnızca Batı Afrika'da görülür ve bu tür ile infekte kişilerde hastalık hafif seyreder. *P. malariae*'nın olgusuna pek rastlanılmamaktadır ve bu tür ile infekte kişilerde ateş nöbetleri görülmekle beraber yaşamı tehdit etmez [3, 4]. Bunun nedeni parazitin anofellerdeki evrimini uzun sürede gerçekleştirmesi nedeni ile sporogoni tamamlanamadan anofellerin yaşamlarını yitirmeleridir [5].

Sıtmayla mücadele yüz yıllardan beri devam etmesine rağmen sıtma dünyanın tropikal ve subtropikal ülkelerinde halk sağlığını ve buna bağlı olarak ekonominin gelişmesini tehdit eden önemli ve gittikçe büyüyen faktör olmaya devam etmektedir [6]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre sıtma, AIDS ve tüberküloz ile birlikte dünyanın en önemli enfeksiyon hastalıklarından biridir. Her yıl bir milyondan fazla insan ölmekte ve 107 ülkede yaşayan 3,2 milyar insan risk altında bulunmaktadır. Beş yaşından küçük çocukların ölüm oranının en yüksek olduğu Aşağı Sahara Afrika'da bütün ölümlerin %90 sıtmadan dolayıdır [7, 8].

Antimalarial ilaçlara ve insektisidlere karşı olan direnç, halk sağlığı alt yapısının bozulması, popülasyon hareketleri, politik kargaşalar ve çevresel değişimler sıtmanın yayılmasına katkıda bulunmaktadır. Yapılan son çalışmalar yeni kontrol metodları geliştirilip uygulanmadığı takdirde sıtma vakalarının önümüzdeki 20 yıl içinde iki katına çıkabileceğini

göstermektedir [9, 29]. Sıtmanın tüm dünyada kontrol dışına çıkmasının iki temel nedeni vardır. Bunlardan ilki; sıtma parazitlerinin tek konağı olan anofel cinsi sivrisineklerin bilinen insektisidlere karşı direnç kazanması, ikincisi ise günümüzde bazı sıtma parazitlerinin mevcut antimalarial ilaçlara karşı direnç kazanmış olmasıdır. Bu durum yeni antimalarial ilaçların geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Parazitlerin metabolik yollarında kullandıkları enzimler yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmalarının ilk hedeflerinden birisidir. *Plasmodium*'un glikolitik enzimleri hem yeni antimalarial ilaçlar için hedef moleküller hem de hastalığın teşhisinde kandaki parazit düzeyini gösteren birer indikatör olarak tanımlanmıştır [10, 11, 12].

Bu bilgiler ışığında plazmodial laktat dehidrogenaz (pLDH) yeni antimalarial ilaçların geliştirilmesi için hedef enzim olarak seçilmiştir [13, 14, 15, 16]. *Apicomplexan* şubesine ait olan *Plasmodium*'ların laktat dehidrogenazlarının amino asit dizisi diğer amino asit dizisi bilinen *Apicomplexan*'ların laktat dehidrogenazı ile karşılaştırıldığı zaman bazı önemli amino asitlerin sadece Plasmodial LDH'a özgü olduğu bazı önemli amino asitlerin ise *Apicomplexan*'lar arasında korunduğu gözlemlenmiştir [17]. Yapısal olarak önemli olan bu amino asitlerin rollerini daha iyi anlayabilmek ve yeni bir antimalarial tasarım çalışmasında kullanabilmek için yönlendirilmiş mutagenез çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır. Bu yüksek lisans tez çalışmasında da dünyada ve Türkiye'de en yaygın *Plasmodium* türü olan *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenaz enziminin aktif bölgesindeki amino termal uç bölgesinde (100_F, 101_T, 102_K, 103_A, 105_P, 106_G, 107_K, 108_S) yönlendirilmiş mutagenез çalışmaları yaparak enzimi diğer *Apicomplexan* LDH'larına (*Toxoplasma gondii* LDH1 ve LDH2, *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina*, *Theileria parva*) benzetip bu değişikliklerin enzim üzerindeki etkinliği ve meydana getirdiği değişimleri araştırmak amaçlanmıştır.

1.2 Sıtmanın Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Sağlık hizmetlerinin yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde sıtma tedavisinde kullanılacak ideal bir ilaç tek dozda etkili olmalı, ayrıca parazitin tüm evrelerine etki göstermelidir [4]. Henüz böyle bir ilaç geliştirilememiş olup [4] günümüzde kullanılan ilaçların büyük bir kısmı sıtma parazitlerinin farklı yaşam evrelerini hedeflemektedir [18].

Mevcut ilaçların etki ve direnç mekanizmalarının anlaşılması onların doğru kullanılmasına ve orijinal hedeflerle yeni tedavi edici ilaçların bulunmasına imkan sağlamaktadır [19]. Günümüzde antimalarial ilaçlar koruma (profilaktik), sağaltma (terapötik) ve bulaşmayı engelleme amaçları ile kullanılmaktadır (20).

Sıtmanın tedavisinde kullanılan bazı antimalarial ilaçlar ve etki mekanizmaları aşağıda verilmiştir:

1.2.1. Kinolin İçeren İlaçlar :

Kinolin içeren bileşikler yaygın olarak kullanılan antimalarial ilaçlar olup parazitin eritrosit aşamasına etki eden kan şizontositleridirler [19]. Bu ilaçların hemoglobinin yıkımı esnasında oluşan serbest hem bileşiğinin sıtma pigmenti olan hemozoin'e dönüşümünü engellediği belirtilmiştir [21, 22]. Hemoglobinin yıkımı esnasında hem bileşiği serbest kalmakta ve oksidatif bir mekanizma ile hemozoin olarak adlandırılan hücre içi sıvıda çözünmeyen toksik kristallere dönüşmektedir [23]. Dolayısıyla bu ilaçlar “hem” polimerizasyonu, oksitlenme, glutatyon bağımlı hem yıkımı gibi reaksiyonları inhibe etmektedir [24].

1.2.2. Sülfonlar ve Sülfonamidler :

Bu ilaçlar yalnızca mikroorganizmalarda bulunan dihidropterat sentetaz enzimi için yarışırılar, sıtmada etkensel profilaksi ve sağaltım için kullanılırlar [4].

1.2.3. Artemisininler :

Artemisia annua bitkisinde *Qinghaosu* (Artemisinin) adı verilen ve yapısı bilinen sıtma ilaçlarına benzemeyen bir aktif madde izole edilmiş, bu madde saflaştırılıp kristalize edilerek sıtmaya karşı etkinliği gösterilmiştir [4]. Artemisinin ve türevleri (dihidroartemisinin, artesunat, artemether, arteether) kan şizontosidi olup aseksüel intraeritrositik şizogoni evresinde ve aynı zamanda sivrisinekte seksüel aşamadaki genç gametositler üzerinde etkilidir [19]. Artemisinin ve türevleri nanomolar konsantrasyonda sıtma parazitleri için etkili olmakla beraber mikromolar konsantrasyonda memeli hücreleri için toksiktir [25].

1.2.4. Antibiyotikler :

Tetrasiklin, doksisisiklin, klindamisin ve florokinolonlar pre-eritrositik evrelere çok az etkili iken kan evrelerine yavaş ancak belirgin seviyede etkilidir. Bu ilaçların hepsi muhtemelen ribozomal protein sentezini inhibe ederler. Bu ilaçlar kinine dirençli sıtma suşlarına karşı klinik iyileştirmeyi güçlendirmek amacı ile kullanılırlar [4].

1.2.5. Antifolatlar :

Orjinleri hakkında pek fazla bilgi bulunmamaktadır. Bu ilaçlar (pirimetamin, sülfadoksin) gebelikte özellikle malaryal tedavide folat metabolizmasında rol almaktadır. Folat metabolizmasında; pirimetamin, dihidrofolat redüktaz (DHFR) enziminin inhibitörü, sülfadoksin ise dihidropterat sentetaz (DHPS) enziminin inhibitörü olarak görev yapmaktadır. Ayrıca bu ilaçlar profilaktik amaçlı olarak da kullanılmaktadır [26].

1.3. Sıtmanın Tedavisinde Kullanılan Temel Hedefler

Plasmodium türlerinin antimalarial ilaçlara karşı direnci tüm dünyada giderek ciddi boyutlara ulaşmaktadır. Sıtma ile mücadelede mevcut antimalarial ilaçların etkinliğini zamanla kaybetmesi yeni antimalarial ilaçların geliştirilmesini gerekli kılmıştır [4]. Bununla beraber *Plasmodium*'un yaşam döngüsünün kompleks olması uygun ilaç hedeflerinin belirlenmesini güçleştirmektedir. Antimalarial kemoterapi için seçilen uygun bir hedefin parazitin yaşam döngüsü için önemli bir rolü olması ve konukçudaki herhangi bir analog yöntemden önemli ölçüde farklı olması, hedeften kaçmayı sağlayan alternatif bir yolun olmaması, direncin gelişmesi için düşük potansiyel göstermesi, sınırlı oranda biyokimyasal yöntem ile ilgili olması, geçerli hedef üzerinde inhibitör etkisinin hızla test edilebilmesi ve bilinen spesifik inhibitörlerin var olması gibi özelliklere sahip olması gerekir [27]:

Bu özellikler dikkate alınarak sıtmanın tedavisinde kullanılan temel hedefler genel olarak 3 gruba ayrılmıştır [27]. Bunlar;

1. Sindirim vakuolünde meydana gelen hemoglobinin sindirimi, hemozoin oluşumu, redoks işlemleri, serbest radikal oluşumu gibi işlemler,
2. İlaçların taşınması gibi membran işlerinden sorumlu olan proteinler ve makromoleküller,
3. Metabolit ve makromolekül sentezinden sorumlu olan enzimlerdir.

Tablo 1.1'de başlıca temel hedeflerle beraber bu hedeflerle ilgili enzimler/işlemler ve yapılan çalışmalar verilmiştir [27].

Tablo 1.1 *Plasmodium*'da sıtma tedavisi için kullanılan başlıca hedefler [27].

Metabolik ve Biyokimyasal Yol	Enzim/İşlem	Notlar
Hemoglobin Metabolizması	Plasmeşsin I, II Falsipain Heme polimerizasyonu, depolimerizasyon Heme sentezi	Genler klonlandı ve ekspresyonu yapıldı; Plasmeşsin II'nin yapısı biliniyor. Klonlandı ve düşük oranda ekspresyonu yapıldı. Kimyasal reaksiyon bilinmiyor. Parazit özel ALA sentaza sahip
Folat Metabolizması	Dihidrofolat redüktaz	Genin iyi bir şekilde ekspresyonu yapıldı.
Pirimidin Sentezi	Karbomilfosfat sentaz II	Geni hedefleyen ribozimler tarafından parazit gelişmesi baskılandı.
DNA	Topoizomeraz I ve II	Her iki gen klonlandı, Topoizomeraz II kinolin için hedef olabilir.
Glikoliz	LDH	Gen klonlandı ve ekspresyonu yapıldı; yapısı çözüldü (Aktif bölgeye yakın yarığa sahip)

Bu yüksek lisans tez çalışması, enzimlere yönlendirilen bir antimalarial ilaç tasarım çalışmasını kapsamaktadır. Dolayısıyla yapılan çalışmada *Plasmodium vivax*'ın laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen (PvLDH) yeni antimalarial ilaçların geliştirilmesini sağlamak için hedef gen olarak belirlenmiştir.

1.4. Sıtma Parazitleri Laktat Dehidrogenaz Enzimleri

Plasmodium'ların genetik özellikleri alanındaki çalışmalar son yıllarda hız kazanmış olup, farklı türlerdeki ve türlerin kendi içindeki varyasyonların ilaç direnci, patojenite, immünite ve bulaşım farklılıkları konularında belirleyici olduğu bulunmuştur. Sıtma etkeni olan parazitin şu anda var olan ilaçlara karşı direnç göstermeye başlaması bilim adamlarını alternatif mücadele yöntemleri geliştirmeye zorlamaktadır [28].

Bu nedenle plasmodial laktat dehidrogenaz enzimi (pLDH) hedef enzim olarak belirlenmiştir [13, 14, 15, 16]. *Plasmodium*'un yaşam döngüsü için LDH enzimi hayati öneme

sahiptir [29]. Kan hücreleri içerisinde yer alan sıtma parazitleri işlevsel trikarboksilik asit döngüsüne sahip olmadıkları için [30]. ATP ihtiyaçlarını glikoliz ile sağlamaktadırlar. LDH enzimi glikolizin son ürünü olan pirüvik asidi dönüşümlü bir reaksiyonla laktik aside çevirmektedir. LDH enziminin etkinliğini önleyen maddelerin kan içerisinde bulunan *Plasmodium* 'un yaşamasına imkan vermediği bilinmektedir [31]. Ancak aynı enzim hem insanda hem de parazitte bulunduğu için insan LDH'sinin etkilenmeden kalması gerekmektedir. Yapılan çalışmalar pLDH'ın elektroforetik, kinetik ve yapısal olarak insan LDH'ından farklı olduğunu göstermiştir:

- i) İnsan LDH'ından farklı olarak pLDH yüksek pirüvat konsantrasyonunda inhibe olmamaktadır [29].
- ii) İnsan M₄-LDH'ından farklı olarak, pLDH 3-asetilpiridin adenin dinükleotit (APAD⁺) adlı koenzimi 0,5 M laktat konsantrasyonunda daha hızlı kullanabilme yeteğine sahiptir [10].
- iii) pLDH'ın gossilik nitril diasetat ve türevleri tarafından inhibisyona insan LDH'ından daha duyarlı olduğu bildirilmiştir [31].
- iv) İnsan M₄-LDH'ından farklı olarak pLDH, aktif bölge halkasında 5 ilave amino asit (DKEWN) içermektedir [13, 32].

*Pf*LDH geni ilk olarak 1993 yılında Bzik ve Fox tarafından Honduras I olarak adlandırılan soydan izole edilmiştir [32]. Daha sonra aynı gen K1 (Tayland) ve *PF* FCBR (Kolombiya) soylarından izole edilmiş ve klonlanmıştır [13].Yapılan karşılaştırmalar neticesinde izole edilen tüm bu soyların LDH geninin nükleotid dizilerinin aynı olduğu belirlenmiştir.Üç soy itibariyle yapılan bu değerlendirmenin tüm soylar için genellenemeyeceği de bir gerçektir [13].

*Pf*LDH, amino asit dizisi bilinen diğer türlerin LDH'ları ile karşılaştırılmış ve *Bacillus stearothermophilus* LDH'si ile %29, köpek balığı LDH'si ile %29, insan M₄-LDH'si ile %31, domuz LDH'si ile %33, insan H₄-LDH'si ile %29 [13] oranında amino asit düzeyinde benzerlik görüldüğü belirlenmiştir. *Pf*LDH'da iki pozisyonda amino asit eksikliği ve iki pozisyonda da amino asit fazlalığının varlığı belirlenmiştir. Glutamat-48 ve glisin-217 eksik olan iki amino asittir. Alanin-73 ve serin-74 arasında ilave bir tirozin bulunmaktadır. Diğer LDH'larla karşılaştırıldığında gözlenen en önemli farklılık *Pf*LDH'ın serin-108 ve arjinin-109 arasında ilave 5 amino asit (D_{108A}, K_{108B}, E_{108C}, W_{108D}, N_{108E}) içermesidir [13, 32]. X ışını kristalografisi çalışmaları ile bu 5 amino asit ilavesinin enzimin aktif bölge halkasına yakın yüzeyinde çok belirgin bir yarık oluşturduğu, fakat insandaki eşdeğeri olan LDH'da ise aynı bölgede hiçbir

ilave amino asit olmadığı için söz konusu yarığın olmadığı tespit edilmiştir [14]. İnsan LDH'ından farklı olarak *Pf*LDH'a özgü olan bu bölge, çeşitli enzim inhibitörlerini barındırma ve dolayısıyla enzim aktivitesini durdurarak parazitin insan kanı içerisinde ölümüne sebep olma potansiyeline sahip olduğu için ilaç tasarım çalışmalarında hedef bölge olarak kullanılmıştır [13, 14, 15].

P. falciparum LDH enzimini kodlayan genin klonlanmasından sonra *Plasmodium vivax* Belem soyu (Fransa) genomik DNA'sından laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen izole edilmiş, klonlanmış ve nükleotit dizisi belirlenmiştir [33]. *P. falciparum* ve *P. vivax* LDH genlerinin nükleotit dizileri karşılaştırıldığı zaman *Pf*LDH ve *Pv*LDH genlerinin nükleotit dizileri arasında %90 oranında bir benzerlik olduğu belirtilmektedir [34]. Bu benzerliğe dayanarak; *Pv*LDH geninde de, *Pf*LDH geninde olduğu gibi aktif bölgede ilave 5 amino asitin bulunduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda *Pf*LDH enziminin yapısal ve kinetik özellikleri üzerinde yapılan çalışmaların, *Pv*LDH enzimi üzerinde de yapılabileceği ve benzer sonuçlar alınacağı ümit edilmektedir. Yapılan son bir çalışma bu fikri desteklemiştir. *Pv*LDH proteininin X-ışını kristallografisi ile yapı analizi ve bazı kinetik analizleri yapılmış ve bu yapı eşdeğeri olan *P. falciparum*' un proteininin yapısı ile karşılaştırılmıştır [35]. Her iki enzimin de aktif bölgeleri ve kofaktör bağlanma ceplerinin son derece benzer olduğu ve *Pf*LDH'da bulunan ilave 5 amino asidin, *Pv*LDH'da da enzim yüzeyinde bir yarık oluşturduğu gözlenmiştir. Yüksek orandaki bu benzerlikler genel olarak geliştirilecek olan bir inhibitör ile her iki enzimin de engellenmesinin mümkün olacağı fikrini kuvvetlendirmiştir.

1.5. *Plasmodium* ve Diğer Bazı *Apicomplexan* LDH'larının Aktif Bölge Yapısı

Laktat dehidrogenaz enziminin aktif bölge halkası 100. ve 110. amino asitler arasında yer almaktadır [35]. *Apicomplexan* şubesine ait olan *Plasmodium*'lar ve diğer bazı *Apicomplexan* LDH enzimleri (*Toxoplasma gondii* LDH1 ve LDH2, *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina*, *Theileria parva*) insan LDH'ından farklı olarak aktif bölge halkasındaki 108. ve 109. amino asitler arasında bir ilave 5 amino asit içermektedir [13, 33, 17, 36]. Laktat dehidrogenaz enzimindeki bu 5 amino asit insersiyonun dizisi (*Plasmodium*'lar için D_{108A}, K_{108B}, E_{108C}, W_{108D}, N_{108E}) ve aynı zamanda aktif bölgesinin amino termal uç bölgesindeki amino asit dizisi (*Plasmodium malariae* dışındaki bütün bilinen *Plasmodium*'lar için F₁₀₀, T₁₀₁, K₁₀₂, A₁₀₃, P₁₀₅, G₁₀₆, K₁₀₇, S₁₀₈) *Apicomplexan* türleri arasında farklılık göstermektedir [17]. *Plasmodium vivax*'ın diğer *Apicomplexan* LDH'ları ve insan LDH'ına göre amino asit dizisinin farklılıkları Tablo 1.2'de verilmiştir.

Tablo 1.2. *Plasmodium vivax* ve diğer bazı *Apicomplexan* LDH'larının aktif bölgesindeki amino asit dizisi (104. amino asit tanımlanmamıştır.). (insan-m: İnsan LDH'ı kas formu; pvivax: *Plasmodium vivax*; toxgo1: *Toxoplasma gondii* LDH1; toxgo2: *Toxoplasma gondii* LDH2; etenella: *Eimeria tenella*; eacervulina: *Eimeria acervulina*; tparva: *Theileria parva*)

	98	108	109
insan-m	I T A G A R Q Q E G E S	R	
pvivax	V T A G F T K A P G K S D K E W N	R	
toxgo1	V T A G L T K V P G K P D S E W S	R	
toxgo2	I T A G L T K V P G K S D K E W S	R	
etenella	I T A G I T K A A G K S D Q E W S	R	
eacervulina	I T A G I T K I P G K S D K E W S	R	
tparva	V T A G L A K A P A K S N E E W N	R	

Bununla beraber X ışını kristalografisi çalışmaları ile üç boyutlu yapısı belirlenen *Apicomplexan*'ların tamamında bu 5 amino asit insersiyonu enzimin aktif bölge halkasına yakın yüzeyinde bir yarık oluşturmaktadır [14, 35, 36, 37, 38]. Dolayısıyla aynı yarığın üç boyutlu yapısı bilinmeyen bütün *Plasmodium* ve diğer bazı *Apicomplexan* LDH'larında da oluşturulacağı düşünülmektedir. *Plasmodium falciparum* LDH'ı (*PfLDH*) ile yapılan çalışmalar, bu yarığın klorokin ve azol-bazlı bileşikler ile bir kompleks meydana getirdiğini göstermiş ve bunların enzim üzerine olan inhibitör etkisi belirlenmiştir [39, 40]. Ayrıca yapılan moleküler modelleme çalışmaları gossipol türevi olan gossilik nitril-1,1' diasetat'ın (GNDA) *PfLDH*'ın bu yarık bölgesinde barındırılabilirliğini fakat insan LDH'ında bu yarık bulunmadığı için sözü edilen inhibitörün LDH'ın yapısına kabul edilmeyeceğini göstermiştir [41]. *PfLDH* ile yapılan bu çalışmayı aynı yarık bölgesine sahip olan diğer *Plasmodium*'lar ve *Apicomplexan*'lar için de genellemek mümkündür.

Plasmodium'ların ve diğer *Apicomplexan*'ların laktat dehidrogenaz enzimleri karşılaştırıldığı zaman 100. ve 110. amino asitler arasında yer alan aktif bölge halkasındaki bazı amino asitlerin korunduğu gözlemlenmiştir. Bununla beraber enzimin aktif bölgesindeki amino termal uç bölgesinde (100_F, 101_T, 102_K, 103_A, 105_P, 106_G, 107_K, 108_S) bulunan amino asit dizisi *Plasmodium*'lar ve diğer bazı *Apicomplexan*'lar arasında (*Toxoplasma gondii* LDH1 ve LDH2, *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina*, *Theileria parva*) veya aynı zamanda *Apicomplexan*'lar içinde de çeşitlilik göstermektedir [17]. Laktat dehidrogenaz enzimi için yapısal olarak önemli olan bu amino asitlerin rollerini daha iyi anlayabilmek ve yeni bir antimalarial tasarım çalışmasında kullanabilmek için yönlendirilmiş mutagenез çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır. Bu amaçla yapılmış olan bu yüksek lisans tez çalışmasında, çeşitli canlılarda hastalığa sebep olan bazı *Apicomplexan*'ların (*Toxoplasma gondii*, *Eimeria acervulina* ve

Eimeria tenella, ve *Theileria parva*) LDH'lerinin dünyada ve Türkiye'de en yaygın *Plasmodium* türü olan *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenaz enziminin aktif bölgesinin amino termal uç bölgesindeki (100_F, 101_T, 102_K, 103_A, 105_P, 106_G, 107_K, 108_S) amino asit dizileri *Plasmodium*'larla birlikte *Apicomplexan*'lar için de genel ilaç tasarımı çalışmalarında hedef bölge olarak kullanılabilmesi konusunda açıklamalar getirilmesi için *Plasmodium vivax* LDH'ı içerisinde taklit edilerek bu amino asitlerin önemleri, enzim üzerindeki etkinliği ve meydana getirdiği değişimler araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

Polimeraz zincir reaksiyonu amacıyla kullanılan *Taq* DNA Polimeraz enzimi, tampon çözelti ve MgCl₂ solüsyonu Promega'dan, USA; *Pfu Turbo* DNA Polimeraz enzimi ve tampon çözelti Stratagene'den, USA; DNA'nın kesilmesi için kullanılan *Eco* RI ve *Pst* I restriksiyon enzimleri ve tampon çözeltileri, ligasyon için kullanılan T4 DNA Ligaz enzimi ve tampon çözeltisi Promega'dan, USA; plazmid DNA izolasyonu için kullanılan QIAprep Spin Miniprep Kit, PCR sonrası elde edilen ürünlerin jelde koşturulduktan sonra saflaştırması aşamasında kullanılan QIAquick Gel Extraction Kit QIAGEN' den, Almanya, sağlanmıştır. Agaroz jel elektroforezi esnasında DNA bantlarının molekül ağırlıkları ve konsantrasyonunun tayininde kullanılan Hyper Ladder I Bioline'dan, USA; Lambda DNA Hind III Digest Amersham Pharmacia Biotech'den, USA; sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi sırasında protein bantlarının molekül ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılan SDS 7B Sigma'dan, USA; Low Molecular Weight (LMW) Kalibrasyon Kit Amersham Pharmacia Biotech'den, USA, alınmıştır.

Western Blot yapılırken faydalanılan primer antikor, yabani tip SDK1 *Pf*LDH proteini ile hazırlanan emülsiyonun Yeni Zelanda beyaz tavşanlarına enjeksiyonu ile elde edilmiş [15], sekonder antikor Goat Anti-Rabbit IgG ise Bio-Rad'dan, UK, ticari olarak sağlanmıştır.

Deneylerde kullanılan diğer bütün kimyasallar BDH, Sigma, Bio-Rad ve Merck'ten sağlanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonları aşamasında kullanılan primerler İontek ve MWG-Biotech, Almanya, tarafından sentezlenmiştir [42, 43].

2.1.1. Ekspresyon Vektörü

pKK223-3 : Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden

2.1.2. *Escherichia coli* Suşları

JM105 : {*supE endA sbcB15 hsdR4 rpsL thiΔ (lac-proAB)F'*[*traD36 proAB⁺ lacI^f lacZΔM15*] }

2.1.3. Bakteriyolojik Gelişim İçin Besiyerleri ve Solüsyonlar

Çift Kuvvetli Yeast-Trypton (2xYT) Buyyon

Maya Ekstraktı	10 g/l
Trypton	16 g/l
NaCl	5 g/l

Çift Kuvvetli Yeast-Trypton (2xYT) Agar

Maya Ekstraktı	10 g/l
Trypton	16g/l
NaCl	5 g/l
Agar	15 g/l

Minimal Agar

2x Minimal Tuzları	500 ml/l
%3,3 Agar	500 ml/l
%20 Glukoz	10 ml/l
%20 MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 ml/l
%0,1 Tiamin hidroklorür	0,5 ml/l

2x Minimal Tuzları

KH_2PO_4	14 g/l
KH_2PO_4	6 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g/l
Sodyum Sitrat	1 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/l

Amfisilin

100 mg/ml'lik solüsyon hazırlanır. Filtre yardımıyla sterilize edilir.

2.1.4 Tamponlar ve Stok Solüsyonlar**50x TAE Tampon Çözeltisi (Tris- Asetat- EDTA)**

Trizma Base	242 g/l
Asetik Asit	57,1 ml/l
0,5 M EDTA (pH: 8.0)	100 ml/l

dH₂O kullanılarak 1xTAE seyreltilip uygun solüsyon hazırlanır.

Agaroz Jel İçin SAB (Sample Amplification Buffer)

Sükroz	4 g/10 ml
2M Tris HCL	0,5 ml/10 ml
0,5 M EDTA	2 mg/10 ml
Bromfenol mavisi	4 g/10 ml

Kristal Viyole (CV) Solüsyonu

5 mg/ml stok solüsyon hazırlanır ve ışık görmeyen bir ortamda saklanır.

SAB+CV

Gliserol	50 ml/ml
Kristal viyole	2 µg/ml

CaCl₂ Solüsyonu

100 mM CaCl ₂ .6H ₂ O	21,9 g/l
5 mM MgCl ₂ .6H ₂ O	1,02 g/l
5 mM Tris HCl(pH:7.6)	5 ml/1(pH:7.6 olan stok 1 M Tris HCl çözeltisinden)

Bis-Tris Solüsyonu

0,02 M Bis-Tris	4,184 g/l
0,05 M KCl	3,725 g/l
pH: 6.0	

SDS-PAGE İçin SAB (Sample Amplification Buffer)

%10 SDS	1 g/10 ml
0,5M TrisHCl(pH:6.8)	0,6 g/10 ml
% 5 Gliserol	0,5 ml/10 ml
% 25 2-Merkaptoetanol	0,25 ml/10 ml
% 0,05 Bromfenol mavisi	0,005 g/10 ml

5x Tank Tamponu

0,25 M Trizma Base	15 g/l
0,192 M Glisin	72 g/l
% 0,01 SDS	5 g/l

dH₂O yardımıyla 1x'e seyreltilip çalışma solüsyonu hazırlanır.

Protein Boyama Solüsyonu

% 0,1 Coomassie Brilliant Mavisi

% 40 Metanol

% 10 Glasiyal Asetik Asit

Boya Uzaklaştırıcı (Destaining) Solüsyon

% 5 Metanol

% 7 Asetik Asit

Transfer Tamponu

39 mM Glisin 2,93 g/l

48 mM Trizma Base 5,81 g/l

1,3 mM SDS 0,375 g/l

%20 Metanol 200 ml/l

PBS (Phosphate Buffered Saline)

0,15 M NaCl 900 ml/l

0,1 M Na₂HPO₄ (pH : 7,4) 100 ml/l

PBS Tween 20

PBS 1000 ml

Tween 2 ml

% 5'lik Süt Tozu

Yağsız süt tozu 5 gr

PBS 100 ml'ye tamamlanır.

2.1.5. Primerler

PvLDH enziminin aktif bölgesinin amino terminal uç bölgesindeki amino asitlerin yönlendirilmiş mutagenез çalışmaları ile analizi için aşağıdaki spesifik primerler kullanılmıştır. Koyu renkli olan diziler mutagenез yapılan amino asitleri göstermektedir.

Tablo 2.1'de *Pv*LDH enzimini kodlayan genin nükleotid dizisi ve mutagenез çalışmaları için kullanılan primerlerin gen üzerindeki yerleri belirtilmiştir.

***Pv7*: 5' GCC GAC CCG GAA TTG ATG ACG CCG AAA ATT GTG 3'**

***Pv13*: 5' TTT TCT GCA GTT AAA TGA GCG CCT TCA TCC TTT TAG TCT CC 3'**

***PvLM3Tg1F*: 5' GTC ACT GCG GGA CTG ACT AAAGTC CCA GGA AAG CCC
GAC AAG GAA TGG 3'**

***PvLM3Tg1R*: 5' CCA TTC CTT GTC GGG CTT TCC TGG CAC TTT AGT CAG
TCC CGC AGT GAC 3'**

***PvLM2Tg2F*: 5' GTC ACT GCG GGA CTG ACT AAA GTA CCA GGA AAG
AGC 3'**

***PvLM2Tg2R*: 5' GCT CTT TTC TGG TAC TTT AGT CAG TCC CGC AGT GAC 3'**

***PvLM3EtF* : 5' GTC ACT GCG GGA ATA ACT AAA GCA GCG GGA AAG
AGC GAC 3'**

***PvLM3EtR* : 5' GTC GCT CTT TCC CGC TGC TTT AGT TAT TCC CGC AGT
GAC 3'**

***PvLM2EaF* : 5' GTC ACT GCG GGA ATA ACT AAA ATA CCA GGA AAG
AGC 3'**

***PvLM2EaR* : 5' GTC CTT TCC TGG TAT TTT AGT TAT TCC CGC AGT GAC 3'**

***PvLM3TpF* : 5' GTC ACT GCG GGA TTG GCG AAA GCA CCA GCG AAG
AGC GAC AAG 3'**

***PvLM3TpR* : 5' CCT GTC GCT CTT CGC TGG TGC TTT CGC CAA TCC CGC
AGT GAC 3'**

Tablo 2.1 *Pv*LDH enzimini kodlayan genin nükleotid dizisi

```
ATGACGCCGAAACCCAAAATTGTGCTCGTCGGGTCGGGCATGATCGGAGGCGTGATGGCC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACTGCGGCTTTGGGTTTTAACACGAGCAGCCAGCCGTAAGCCTCCGCACTACCGG

ACGCTGATTGTGCAGAAGAACCTGGGGGACGTAGTGATGTTTGACGTAGTGAAAAACATG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
TGCGACTAACACGTCTTCTTGACCCCTGCATCACTACAACTGCATCACTTTTGTAC

CCCCAAGGAAAGGCACTAGATACGTCTCACTCGAATGTGATGGCTTATTCCAATTGCAAG
121  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GGGGTTCTTTCCGTGATCTATGCAGAGTGAGCTTACACTACCGAATAAGGTTAACGTTC

GTGACTGGCTCGAACTCGTATGATGACTTGAAGGGAGCCGACGTGGTGATCGTCACTGCG
181  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CACTGACCGAGCTTGAGCATACTACTGAACCTCCCTCGGCTGCACCACTAGCAGTGACGC

GGATTTACTAAAGCACCAGGAAAGAGCGACAAGGAATGGAACCGAGATGATTTACTCCCC
241  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCTAAATGATTTTCGTGGTCCTTTCTCGCTGTTCTTACCTTGGCTCTACTAAATGAGGGG

TTGAATAACAAAATTATGATTGAGATTGGGGGACATATTAAGAACCTTTGCCCAATGCC
301  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
AACTTATTGTTTTAATACTAACTCTAACCCCTGTATAATTCTTGAAACGGGGTTACGG

TTTATCATTGTGGTGACGAACCCAGTGGACGTGATGGTGCACTTACTCTTCGAGCATTCC
361  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
AAATAGTAACACCACTGCTTGGGTACCTGCACTACCACGTCAATGAGAAGCTCGTAAGG

GGAGTCCCAAAAAATAAATCATCGGATTAGGTGGTGTGCTAGATACATCTAGACTGAAA
421  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
CCTCAGGGTTTTTTATTTTAGTAGCCTAATCCACCACACGATCTATGTAGATCTGACTTT
```

TATTACATATCGCAGAAGTTGAACGTCTGCCCCGAGAGATGTTAATGCACTCATTGTCGGT
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 ATAATGTATAGCGTCTTCAACTTGCAGACGGGCTCTCTACAATTACGTGAGTAACAGCCA

 GCACATGGGAACAAGATGGTTCTCCTGAAAAGGTACATCACAGTTGGAGGTATCCCATTG
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 CGTGTACCCTTGTCTACCAAGAGGACTTTTCCATGTAGTGTCAACCTCCATAGGGTAAC

 CAAGAATTTATTAATAACAAAAAGATTACAGATGAAGAAGTGGAAGGCATATTTGATCGC
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 GTTCTTAATAATTATTGTTTTCTAATGTCTACTTCTTCACCTCCGTATAAACTAGCG

 ACTGTCAACACTGCTTTGGAGATTGTGAACCTCCTTGCTCTCCTTATGTTGCCCCAGCT
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
 TGACAGTTGTGACGAAACCTCTAACACTTGGAGGAACGGAGAGGAATACAACGGGGTCGA

 GCTGCCATCATCGAAATGGCCGAATCTTATTTGAAGGATATAAAGAAAGTGCTTGTTTGT
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
 CGACGGTAGTAGCTTTACCGGCTTAGAATAAACTTCCTATATTTCTTTCACGAACAAACA

 TCCACTCTACTAGAGGGACAATACGGCCACAGCAACATCTTTGGTGGTACTCCTCTCGTT
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 AGGTGAGATGATCTCCCTGTTATGCCGGTGTGTTGTAGAAACCACCATGAGGAGAGCAA

 ATCGGGGGCACC GGAGTTGAGCAAGTCATCGAGTTGCAGCTGAATGCCGAGGAGAAGACC
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
 TAGCCCCCGTGGCCTCAACTCGTTCACTAGCTCAACGTCGACTTACGGCTCCTCTTCTGG

 AAGTTCGACGAGGCAGTTGCGGAGACTAAAAGGATGAAGGCGCTCATTTAA
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 951
 TTCAAGCTGCTCCGTCAACGCCTCTGATTTTCTACTTCCGCGAGTAAATT

2.1.6 DNA Örneği

Bu tez çalışmasında, *Plasmodium vivax*'ın Belem soyundan klonlanarak pKK223-3 ekspresyon vektörüne altklonlaması yapılan laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan geni taşıyan plazmid DNA örneği yapılan bütün yönlendirilmiş mutagenез çalışmalarında kalıp olarak kullanılmıştır [33].

2.2. Metod

2.2.1. Plazmid DNA İzolasyonu

İçerisinde plazmid DNA bulunduran *E.coli* bakteri soyu 100 µg/ml amfisilin ihtiva eden çift kuvvetli (2x) YT agar besiyerinde geliştirilir. Steril bir kürdan yardımıyla daha önce seçilen kolonilerden bir tanesi alınarak içerisinde 5 µg/ml amfisilin bulunan 5 ml'lik 2XYT buyyona aktarılır. 37°C'de ve 100 rpm'de bir gece inkübe edilir. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne bir gece önce hazırladığımız kültürden 1,4 ml alınır. Bu işlem sonrası QIAprep Miniprep kiti, QIAGEN, kullanılarak DNA izole edilir [44].

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Yönlendirilmiş Mutageniz

Polimeraz zincir reaksiyonu ile iki aşamada mutageniz çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlk olarak *PvLDH*'ın mutasyon bölgeleri ile çakışan iki mutant DNA fragmenti (A ve B fragmentleri) elde edilmiştir. Bunun için *PvLDH* DNA'sının zincirlerine komplementer *Pv7* ve *Pv13* uç primerleri ile uygun mutageniz primerleri olmak üzere 4 primer kullanılmıştır. PCR şartları aşağıda verilmiştir:

10x <i>Pfu</i> Tampon	5µl (enzim ile beraber verilmiştir)
dNTP'ler	5µl (stok; herbiri 10mM olan dNTP'lerden)
5' Primeri	2,5 µl (stok; 20pmol/ µl)
3' Primeri	2,5 µl (stok; 20pmol/ µl)
Kalıp DNA	1µl
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	1µl (stok; 2,5 u/ µl)
Steril dH ₂ O	33 µl (son hacim 50 µl olacak şekilde)

Amplifikasyon 94°C'de 1,5 dakika, 58°C'de 2 dakika, 72°C'de 2 dakika ve 20 döngü olarak yapılmıştır.

Bu aşamadan sonra % 1'lik agaroz jelden safaştırılan mutant DNA'nın A ve B fragmentleri PCR yöntemiyle birleştirilmiştir. Konsantrasyonları esas alınarak belirlenen miktarlarda kullanılan A ve B fragmentleri ile son hacim 25 µl olacak şekilde yapılan PCR'ın reaksiyon şartları 94°C'de 2 dakika, 50°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika ve 7 döngü olarak

gerçekleştirilmiştir. Bunu takiben uç primerlerin ve diğer PCR bileşenlerinin ilavesi ile reaksiyon 50 µl ye tamamlanmış ve 94°C'de 1,5 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 2,5 20 dakika ve 20 döngü olarak yapılmıştır.

2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi BIORAD Sub-Cell GT horizontal jel elektroforez sistemi ile yapılmıştır. Amaca uygun olarak iki farklı şekilde boyanmış olan jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.1. Etidyum Bromürle Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi

Analitik amaçlı yapılan bütün elektroforez çalışmalarında etidyum bromür ile boyanan agaroz jel kullanılmıştır. Bunun için % 1 agaroz içeren 1 x TAE tampon çözeltisi kaynatılır. Oda sıcaklığında 55-65°C'ye kadar soğutulur. Bu esnada jelin döküleceği jel tepsi hazırlanır, taraklar yerine yerleştirilir. Jeli tepsiye dökmeden önce son konsantrasyon 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür ilave edilir. Jel tepsiye dökülür ve katılaşması beklenir. Katılaştıktan sonra tarak çıkarılır. Jel üzerindeki kuyucuklara yerleştirilecek olan DNA örneklerine 2 µl SAB ilave edilir. Elektroforez rutin agaroz jeller için 40-60 mA, düşük erime noktalı agaroz jeller için 30-40 mA'de bromfenol mavisini yaklaşık olarak jelin 2/3'üne ulaşıncaya kadar yürütülür. Jel ortamında, DNA'lar moleküler ağırlıklarına bağlı olarak bir ayırıma tabi tutulurlar. Elektroforez sonrası DNA bantları bir transillüminatör kullanılarak görüntülenir [45].

2.2.3.2. Kristal Viyole ile Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi

Bütün preparatif amaçlı elektroforez çalışmalarında kristal viyole ile boyanan agaroz jel kullanılmıştır. Bunun için % 1 agaroz içeren 1 x TAE tampon çözeltisi kaynatılır. Oda sıcaklığında 55-65°C'ye kadar soğutulur. Bu esnada jelin döküleceği jel tepsi hazırlanır, taraklar yerine yerleştirilir. Jeli tepsiye dökmeden önce son konsantrasyon 2 µl/ml olacak şekilde kristal viyole ilave edilir. Jel tepsiye dökülür ve katılaşması beklenir. Katılaştıktan sonra tarak çıkarılır. Jel üzerindeki kuyucuklara yerleştirilecek olan DNA örneklerine SAB+CV boyasından 2 µl ilave edilir. Elektroforez 2 µl/ml kristal viyole içeren 1x TAE tampon çözeltisi ile 40-60 mA'da gerçekleştirilir. Elektroforez süresince DNA bantlarının ayırımı izlenir. Bantlar jelin 2/3'ünü ilerleyinceye kadar elektroforez işlemine devam edilir. DNA bantları beyaz ışık kutusunda görüntülenir [46, 47].

2.2.4. DNA'nın Jelden Geri Kazanılması

Elektroforez sonrası jelden dilimler halinde kesilen spesifik DNA bantları 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine bırakılır ve DNA, QIAquick jel ekstraksiyon kiti, QIAGEN, kullanılarak saflaştırılır [48].

2.2.5. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle DNA'nın Kesilmesi (Digest)

Ekspresyon vektörü ve mutant DNA örnekleri, *Eco* RI ve *Pst* I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek birleştirmeye hazır yapışkan uçlar oluşturulmuştur. Reaksiyon şartları aşağıdaki gibidir:

	<u>Mutant DNA örnekleri</u>	<u>pKK223-3</u>
DNA	30 µl	5 µg
10x Tampon H (enzim ile beraber verilmiştir.) için	2 µl	1 µl/ 10 µl reaksiyon
<i>Eco</i> RI (12 u/µl)	2 µl	2 µl
<i>Pst</i> I (10 u/µl)	2 µl	2 µl
Steril dH ₂ O (şekilde)	2 µl	X µl(10 µl olacak

Bu reaksiyon 37°C'de su banyosunda 1,5 saat süre bekletilir. Daha sonra DNA örnekleri kristal viyole ile hazırlanmış boyalı jelde yürütülür ve QIAquick jel ekstraksiyon kiti, QIAGEN, kullanılarak jelden saflaştırılır [48].

2.2.6. Klonlanacak DNA ile Vektör DNA'sının Birleştirilmesi (Ligasyon)

DNA örnekleri, *Eco*RI ve *Pst*I restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesildikten sonra örneklerin konsantrasyonu dikkate alınarak çeşitli insert: vektör oranları ile ligasyon yapılmıştır. Ligasyon reaksiyonları ve bileşenleri aşağıda verilmiştir:

	<u>1:1 oranı</u>	<u>3:1 oranı</u>	<u>1:3oranı</u>
10x Ligasyon Tamponu	1 µl	1 µl	1µl
İnsert	100 ng	300 ng	100 ng
Vektör	100 ng	100 ng	300 ng
T4 DNA Ligaz (3 u/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Steril dH ₂ O	X µl	X µl	X µl
Toplam	10 µl	10 µl	10 µl

Ligasyon reaksiyonu hazırlandıktan sonra örnekler 4 °C'de bir gece bekletilir.

2.2.7. Kalsiyum Klorür Etkileşimiyle Kompetan *E .coli* Hücrelerinin Hazırlanması

E. coli hücreleri 2x YT agarda 37°C’de bir gece inkübe edilir. İnkübasyon sonrası tek bir koloni steril bir kürdan yardımı ile alınır, 5 ml 2x YT buyyon içerisine atılır ve 37°C’de 100 rpm’de çalkalamalı etüvde bir gece inkübe edilir. Bir gecelik kültürden 500 µl alınarak 250 ml’lik erlendeki 50 ml 2x YT buyyona inoküle edilir. OD₅₅₀’deki hücre yoğunluğu 0,3-0,4 arasında bir değere ulaşıncaya kadar inkübe edilir. Kültür belirtilen yoğunluğa ulaştınca iki falkon tüpüne bölünür. 25 ml’lik kültürün her biri 5.000 rpm’de 5 dakika boyunca 4°C’de santrifüjlenerek hücreler çöktürülür. Süpernatant (üstte kalan sıvı faz) dökülür. Pelet (altta kalan çökelti) üzerine 25 ml CaCl₂ solüsyonu ilave edilir. 30 dakika buz içerisinde bekletilir. 5.000 rpm’de 5 dakika 4°C’de santrifüj edilir. Bu aşamada tüpleri sarsmamaya dikkat edilir. Süpernatant dökülür. Pelete 1 ml CaCl₂ solüsyonu ilave edilir. 1,5- 2 saat buz içerisinde bekletilen hücreler ya hemen transformasyonda kullanılır yada daha sonra kullanılmak üzere sıvı nitrojen içerisinde gliserol stoku hazırlanarak -70°C’de saklanır [45].

2.2.8. Transformasyon

Ligasyonu yapılmış örneğin üzerine hazırlanan kompetant hücreden 200 µl ilave edilir ve karıştırılır. 30 dakika buzda bekletilir. Daha sonra 42°C'deki su banyosunda 90 saniye süreyle sıcak şoku uygulanır. Derhal 300 µl 2x YT buyyon ilave edilir. Çok iyi bir şekilde

karıştırılır. 30 dakika 37°C'de gerçekleştirilen inkübasyon sonrası 100 µl/ml amfisilin içeren 2x YT agar besiyeri içeren petrilere ekim yapılır ve 37°C'de bir gece inkübasyon gerçekleştirilir [45].

2.2.9. Koloni PCR

Alt klonlama sonrası besiyeri üzerinde gelişen kolonilere iki ayrı steril kürdan yardımı ile dokunulur. Kürdanlardan birisi 100 µl/ml amfisilin içeren 2x YT buyyon içerisine atılır. Buyyon, 37°C'de ve 100 rpm'de inkübasyona bırakılır. Diğer kürdan koloni PCR'ı gerçekleştirmek üzere içerisinde 50 µl steril dH₂O bulunan bir mikrosantrifüj tüpü içerisine aktarılır. Koloni kalıntısı kürdandan tamamen ayrılıncaya kadar kürdan su içerisinde karıştırılır. Daha sonra örnek 10 dakika kaynatılır, 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatantın 10µl'si kalıp olarak kullanılarak aşağıda şartlan verilen reaksiyon gerçekleştirilir.

<i>Taq</i> tamponu	5 µl (enzimle beraber verilmiştir.)
MgCl ₂	3 µl (stok; 25mM)
dNTP'ler	5 µl (stok; her biri 10mM olan dNTP'lerden 10'ar µl ve 10µl dH ₂ O)
<i>Pv</i> 7 primeri	2,5 µl (stok; 20 pmol/µl)
<i>Pv</i> 13 primeri	2,5 µl (stok; 20 pmol/µl)
Kalıp DNA	10 µl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	0,5 µl (stok; 5 u/µl)
dH ₂ O	21,5 µl (son hacim 50 µl olacak şekilde)

Amplifikasyon 94°C'de 1,5 dakika, 55°C'de 2 dakika, 72°C'de 2 dakika ve 25 döngü olarak gerçekleştirilir. Koloni PCR'dan pozitif sonuç alınması durumunda inkübasyona bırakılan kültürden stok kültür hazırlanır.

2.2.10. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE, BIO-RAD Mini-PROTEAN 3 Celi jel elektroferez sistemi kullanılarak yapılmıştır. Proteinleri ayırmak için kullanılan jel aşağıdaki gibi hazırlanmıştır [49]:

Ayırma jeli (% 12)

dH ₂ O	3,35 ml
1,5 M Tris HCl (pH: 8.8)	2,5 ml
% 10 SDS	100 µl
% 30 Akrilamid/ Bis	4 ml
% 10 Amonyum persülfat	75 µl
TEMED	15 µl

Yükleme jeli (% 4)

dH ₂ O	6,1 ml
0.5 M Tris HCl (pH: 6.8)	2,5 ml
%10 SDS	100 µl
%30 Akrilamid/ Bis	1,3 ml
% 10 Amonyum persülfat	60 µl
TEMED	12 µl

Örnekler jele yüklenmeden önce eşit miktarda SDS-PAGE SAB boyası ilave edilerek 5 dakika kaynatılır. Elektroforez için 1x Tank tamponu kullanılır ve bromfenol mavisi jelin sonuna gelinceye kadar 20 mA'da akım uygulanır. Elektroforez sonrası jel, 37°C'de 1 saat süreyle boyanır ve sonrasında protein bantları görünür hale gelinceye kadar boya uzaklaştırıcı solüsyon ile yıkanır. Jeller, fotoğrafları alındıktan sonra jel kurutma sistemi ile kurutularak saklanır. SDS-PAGE metodu, aynı zamanda hücre ekstraktlarının genel analizini yapmak için kullanılmıştır. Bunun için 500 µl hücre kültürü 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek pelet 50 µl dH₂O ile çözülür. Pelet ve süpernatant fraksiyonlarına eşit hacimde SDS-PAGE SAB boyasının ilavesinden sonra 5 dakika kaynatılır ve elektroforez işlemi yapılır [49].

2.2.11. Western Blot ile Mutant PvLDH Proteinlerinin Belirlenmesi

Blotlama öncesinde SDS-PAGE ile proteinlerin jel de ayrılması sağlanır. Immobilon-P transfer membranı jel büyüklüğünde kesilir. Filtre kağıtları ile birlikte 1 saat transfer tamponu içerisinde bekletilir. Elektroforez sonrasında jel 15 dakika transfer tamponu içerisinde bekletilir. Western blota özgü kasetin kapağı açılır. Alt tarafa filtre kağıdı ve onun üzerine jel yerleştirilir. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek membran ve tekrar bir filtre kağıdı yerleştirilir. Kasetin kapağı kapatılır ve elektroforez tankına yerleştirilir. Tankta buz ünitesi yerleştirildikten sonra transfer tamponu ile doldurulur ve güç kaynağına bağlanarak 100 V'da 1 saat akım verilir.

Blotlama manyetik karıştırıcı üzerinde gerçekleştirilerek ısının dağılması sağlanır. Blotlama sonrası membran, PBSTween 20'de 10 dakika yıkanır. % 5'lik yağsız süt tozu içerisinde 4°C'de bir gece bloklama yapılır. Bloklamadan sonra PBS Tween 20'de 10 dakika yıkanır. % 5'lik süt tozu ile 1/1,000 oranında seyreltilmiş primer antikor ilave edilir. Oda sıcaklığında 1 saat bekletilir. 10 dakika PBSTween 20 ile yıkama işlemi 3 defa tekrar edilir. Yıkama sonrasında 60 mg 3,3'-Diaminobenzidin, 100 ml PBS, 100 µl H₂O₂ içerisinde bantlar belirinceye kadar bekletilir. Daha sonra dH₂O içerisine alınarak reaksiyon durdurulur [45],

2.2.12. Mutant Laktat Dehidrogenaz Enzimlerinin Aktivitelerinin Ölçülmesi

Mutant PvLDH genini içeren *E. coli* hücreleri 100 µg/ml amfisilin içeren 2x YT buyyon içerisinde 37°C'de 100 rpm'de bir gece inkübe edilir. Bir gecelik kültürün 500 µl'si 100 µl/ml amfisilin içeren 50 ml 2x YT buyyon içerisine inoküle edilir ve 37°C'de 100 rpm'de OD₆₀₀: 0,6'ya ulaşınca kadar inkübe edilir. 1 mM IPTG (Isopropil-B-D-thiogalaktopiranosid) ilavesinden sonra belirli aralıklarla (1 saat, 2 saat, 3 saat, 5 saat, bir gecelik) kültür örnekleri alınır. 1 ml kültür 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Pelet 500 µl, 50 mM TEA, pH:7.5 içerisinde çözülür. Hücreler, sonikatör (Bandelin Sonopuls, Almanya) ile güç 2'de iki defa 10 saniye parçalanır. 5 dakika buz içerisinde bekletilir. 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant LDH aktivitesinin ölçümü için temiz bir tüpe alınır [16].

Mutant PvLDH enzimlerinin aktivitelerinin ölçülmesi, UNICAM UV-Visible spektrofotometre kullanılarak NADH'nin NAD⁺'a çevrilmesi ile 340 nm'deki (A A₃₄₀/dakika) absorbans değişim oranı takip edilerek yapılır. Bütün reaksiyonlar 50 mM KCl içeren 20 mM Bis-Tris solusyonu, pH: 6.0 ile 25°C'de gerçekleştirilir. Reaksiyon için 500 mM pürivat ve 50 mM NADH kullanılır. 1 ml'lik küvete enzim ve NADH solüsyonları bırakılır ve en son pürivat ilavesi ile reaksiyon başlatılır. Aktivite, 10 mM ve 1 mM pürivat konsantrasyonlarında ölçülür [16]. LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı, *Pv*LDH enzimi üzerinde yapılan araştırmaların bir sonucu olarak, *Pv*LDH aktivitesine engel olacak ve insan LDH enzimini engellemeyecek bir inhibitör araştırılmalarına yardımcı olmak üzere *Pv*LDH'nin aktif bölgesinin amino terminal ucu aminoasitlerinin analizinin yapılmasıdır.

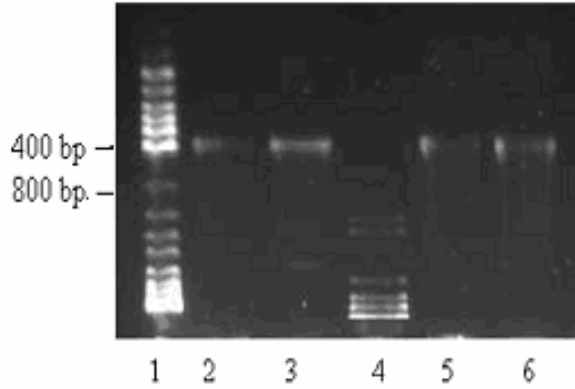
Bu tez çalışmasında laktat dehidrogenaz enziminin aktif bölge halkasındaki ilave 5 amino asit ilavesinden önceki bölgede mutagenез çalışmaları yaparak enzimi diğer *Apicomplexan* LDH'larına (*Toxoplasma gondii* 1 ve 2, *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* ve *Theileria parva*) benzetip bu değişikliklerin enzim üzerindeki etkilerini test ederek bu bölgenin önemini vurgulamak amaçlanmıştır. Bu bölgede yapılan değişiklikler Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. *Pv*LDH ve diğer bazı *Apicomplexan* LDH'larının mutasyonun yapılacağı aktif bölge halkası amino terminal ucu amino asitlerinin gösterilmesi.

	100	108
<i>Pv</i> LDH	F T K A - P G K S	
<i>Tg</i> I LDH	L T K V - P G K P	
<i>Tg</i> II LDH	L T K V - P G K S	
<i>Et</i> LDH	I T K A - A G K S	
<i>Ea</i> LDH	I T K I - P G K S	
<i>Tp</i> LDH	L A K A - P A K S	

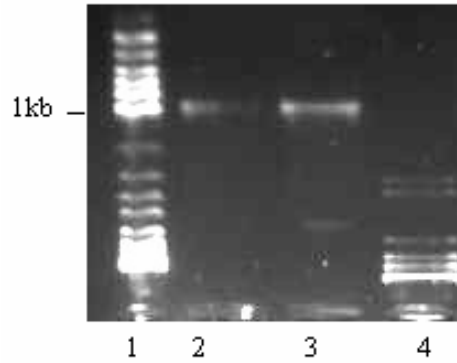
3.1. *Plasmodium vivax* LDH' nın *Toxoplasma gondii* I'e Benzetilmesi

*Pv*LDH' ın aktif bölge halkasındaki 5 amino asit ilavesinden önceki bölgede 100_F, 103_A, 108_S mutagenез çalışması yapılarak *Toxoplasma gondii* I LDH'ına benzetilmiş ve 100_L, 103_V, 108_P mutasyonları yapılmıştır. Elde edilen mutant DNA *Pv*LM3Tg1 olarak adlandırılmıştır. Bu amaçla ilk önce *Pv*LM3Tg1'nin iki mutant DNA fragmentleri elde edilmiş ve bunlar *Pv*LM3Tg1A fragmenti ve *Pv*LM3Tg1B fragmenti olarak adlandırılmıştır (Şekil 3.1). PCR için mutagenез primerleri ile birlikte *Pv*7 ve *Pv*13 primerleri kullanılmış ve her iki PCR denemesi ile de beklenen büyüklükte DNA bantları görülmüştür.



Şekil 3.1. *PvLM3Tg1* A ve B fragmentlerinin elde edilmesi. Hatlar : (1) Markır (Hayper Ladder); (2 ve 3) *PvLM3Tg1*A fragmentleri; (4) Markır (Lambda DNA Hind III Digest); (5 ve 6) *PvLM3Tg1* B fragmentleri.

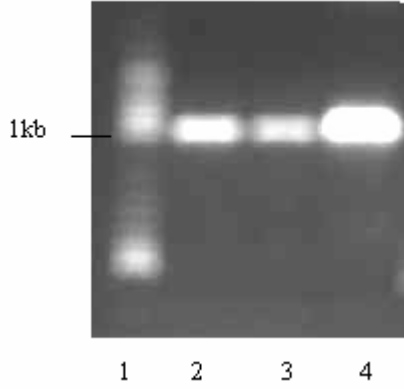
Polimeraz zincir reaksiyonu ile yönlendirilmiş mutagenез yöntemiyle ilk aşamada elde edilen *PvLM3Tg1*A fragmenti ve *PvLM3Tg1*B fragmenti iki aşamada PCR ile birleştirilerek *PvLM3Tg1* geni tam uzunlukta elde edilmiş ve elde edilen tam uzunluktaki *PvLM3Tg1* geni %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 3.2). *PvLM3Tg1* DNA'sı ve genin aktarılacağı ekspresyon vektörü materyal ve metod bölümünde anlatıldığı gibi aynı enzimlerle kesilerek yapışkan uçlar oluşturulmuş ve devamında ligasyon ile bu iki DNA birleştirilmiştir.



Şekil 3.2. *PvLM3Tg1* geninin tam uzunluğunun elde edilmesi. Hatlar: (1) Marker (Hyper Ladder 1); (2 ve 3) *PvLM3Tg1* geni; (4) Marker; (Lamda DNA Hind III Digest)

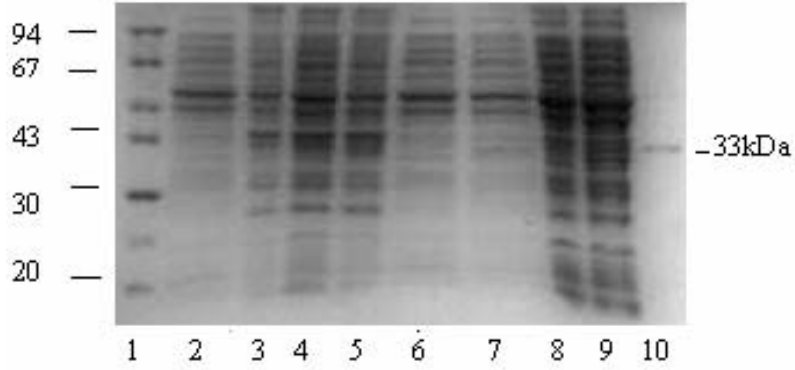
Ligasyon sonrası elde edilen rekombinant DNA örnekleri *E. coli* JM105 hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyon sonrası seçilen bazı kolonilerin *PvLDH* genine sahip olup

olmadıklarını anlamak için koloni PCR'ları yapılmıştır. Bunun için genin tam uzunluğunu amplifiye edecek olan uç primerleri kullanılmıştır. Koloni PCR sonrası jel üzerinde klonlanan genin büyüklüğünde bir bant görülmesi seçilen koloninin bu geni taşıdığını göstermiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Koloni PCR'dan sonra pozitif sonuçların jelde görüntülenmesi. Hatlar:(1) Markır (Hyper Ladder I); (2, 3, 4) tam uzunluktaki *PvLM3Tg1* geni.

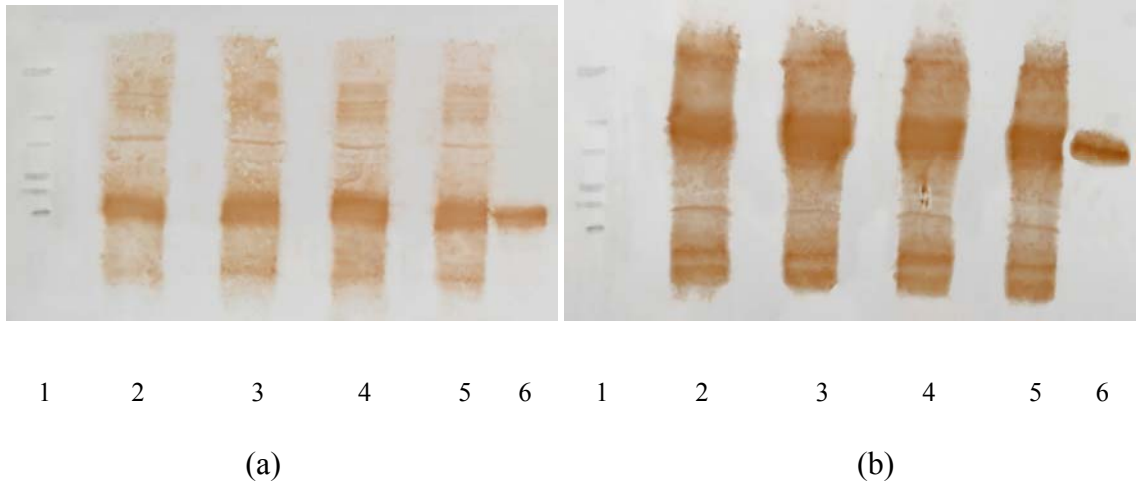
Sonucun pozitif görülmesinden sonra *PvLM3Tg1* geninin JM105 bakteri hücrelerine aktarılan doğru mutant gen olup olmadığını anlamak için DNA örnekleri hazırlanarak dizi analizine gönderilmiş ve *PvLM3Tg1* geninin mutant proteini üretilip üretilmediğini anlamak için SDS-PAGE ile geni içeren JM105 bakteri hücre ekstraktının kontrolü yapılmıştır. Bu işlem için hücreler logaritmik faza ($OD_{600} : 0,6$) ulaştığında 1 mM IPTG indükleyici olarak kullanılarak genin ekspresyonu artırılmıştır. Bu işlem sonrası alınan örneklerde proteinin ekspresyonu SDS-PAGE ile jel üzerinde Şekil 3.4'de görüldüğü gibi kontrol edilmiştir.



Şekil 3.4. *PvLM3Tg1* geni içeren JM 105 hücre süpernatant protein profilinin gösterilmesi. Hatlar: (1) Markır (LMW); (2) Herhangi bir genin aktarılmadığı JM 105 hücrelerinin süpernatant fazı; (3 ve 4); İndüklenmiş ve indüklenmemiş *PvLM3Tg1* geni içeren 3 saatlik JM 105 hücrelerinin genel protein profili, (5 ve 6); İndüklenmiş ve indüklenmemiş *PvLM3Tg1* geni içeren bir gecelik JM 105 hücrelerinin süpernatant fazı; (8 ve 9); İndüklenmiş ve indüklenmemiş *PvLM3Tg1* geni içeren bir gecelik JM 105 hücrelerinin süpernatant fazı; (10) Saf insan LDH proteini.

Jelde, herhangi bir genin aktarılmadığı JM 105 hücrelerinin süpernatant fazı, IPTG ile indüklenmiş ve indüklenmemiş *PvLM3Tg1* geni içeren 3 saatlik JM 105 hücrelerinin genel protein profili, indüklenmiş ve indüklenmemiş *PvLM3Tg1* geni içeren bir gecelik JM 105 hücrelerinin süpernatant fazı, indüklenmiş ve indüklenmemiş *PvLM3Tg1* geni içeren bir gecelik JM 105 hücrelerinin süpernatant fazı koşturulmuştur. *PvLM3Tg1* proteinin büyüklüğünü daha iyi belirlemek için jelde koşturma işlemi yapılırken aynı zaman 33 kDa büyüklüğe sahip saf insan LDH proteini de koşturulmuştur. En iyi gözlenen protein ekspresyonu bir gecelik

örneklerden elde edilmiştir. Ancak protein ekspresyonu çok kuvvetli olmadığı için mutant *PvLDH* proteinin ifade edildiği western blotlama ile ayrıca gösterilmiştir (Şekil 3.5, a3 ve b3) ve dizi analizi ile mutasyonun yapıldığı belirlenmiştir.



Şekil 3.5 *PvLDH*'da yapılan mutasyon sonucunda a (3 saatlik) ve b (Bir gecelik) proteinlerin süpernatantların Western blot yöntemiyle gösterilmesi. Hatlar ; (1) Markır (SDS 7B); (2) *PvLM2Ea*; (3) *PvLM3Tg1*; (4) *PvLM3Et*; (5) *PvLM2TgII*; (6) Kontrol LDH (*PvLDH*)

PvLM3Tg1 proteininin ekspresyonu kontrol edildikten sonra bu proteinin aktivitesinin tayini, geni ihtiva eden JM105 hücrelerinin süpernatant fraksiyonu hazırlandıktan sonra, *PvLM3Tg1* proteininin kinetik olarak aktivite tayininin yapılması için bu süpernatant fazı kullanarak ve NADH'ın 340nm'deki absorbansına bakılarak yapılmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. *PvLM3Tg1* proteinin kinetik olarak tayini ve aktivitesinin ölçülmesi. (LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiş olup tabloda elde edilen değerlerin ortalaması verilmiştir)

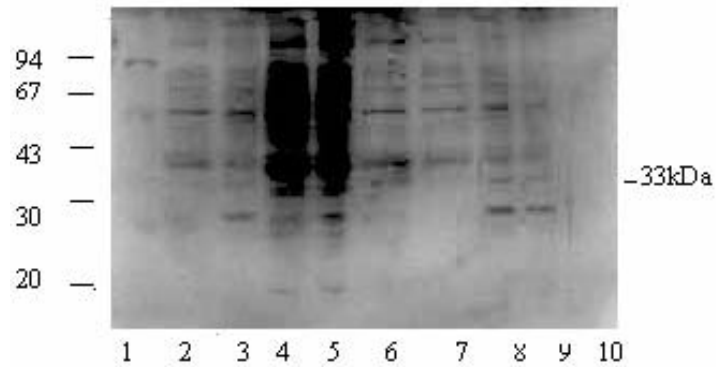
ΔA_{340} / dakika			1mM Pürivat
<i>PvLM3Tg1</i> genini içeren JM105	İndüklenmemiş	3 saat	0,029
	İndüklenmiş		0,063
	İndüklenmemiş	Bir gece	0,065
	İndüklenmiş		0,252
JM105	3 saat		0,028
	Bir gece		0,032

Belirtildiği gibi *PvLM3Tg1* proteininde meydana getirilen değişikliğe rağmen enzimin aktivitesini kaybetmediği görülmüştür. Bu durum fenil alaninin löisine değiştirilmesinin protein konformasyonunu çok değiştirmediğini ve enzimin substratı ile olan etkileşiminin devamının sağlandığı görülmüştür.

3.2. *Plasmodium vivax* LDH' nın *Toxoplasma gondii* II'ye Benzetilmesi

İkinci mutagenез çalışması olarak *PvLDH*' ın aktif bölge amino terminal ucunda bulunan 100_F ve 103_A, mutagenез çalışması yapılarak *Toxoplasma gondii* II LDH'ına benzetilmiş ve 100_L ve 104_V mutasyonları yapılmıştır. Elde edilen mutant DNA *PvLM2TgII* olarak adlandırılmıştır. Bu amaçla ilk önce *PvLM2TgII*'nin iki mutant DNA fragmentleri (A ve B fragmentleri) elde edilmiş ve bunlar *PvLDH* uç primerleri kullanılarak tam uzunluktaki *PvLM2TgII* mutant geni elde edilmiştir. Restriksiyon enzimi ile kesim, ligasyon ve transfromasyon aşamalarının uygulanmasının ardından yine koloni PCR ile bir *PvLDH* geninin klonlandığı gösterilmiş ve doğru mutagenезin yapıldığı dizi analizi ile onaylanmıştır.

PvLM2TgII geninin mutant proteini üretilip üretilmediğini anlamak için SDS- PAGE ile geni içeren JM105 bakteri hücre ekstratının kontrolü yapılmıştır. Bu işlem için hücreler logaritmik faza (OD₆₀₀ : 0,6) ulaştığında 1 mM IPTG indükleyici olarak kullanılarak genin ekspresyonu artırılmıştır. Bu işlem sonrası protein ekspresyonu SDS- PAGE ile kontrol edilmiştir (Şekil 3.6). 33 kDa büyüklüğündeki saf insan LDH proteini, ekspresyonu zayıf olan *PvLM2TgII* proteininin varlığının doğru büyüklükte olup olmadığını takibini kolaylaştırmak için jelde koşturulmuştur. En iyi gözlenen protein ekspresyonu bir gecelik örneklerden elde edilmiştir. JM105 hücrelerinin protein profillerine bakıldığı zaman IPTG ile muamele edilen örneklerin profilleri, IPTG ile muamele edilmeyen örneklerin profillerine göre daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3.6. *PvLM2TgII* geni içeren JM 105 hücre süpernatant protein profilinin gösterilmesi. Hatlar: (1) Markır (LMW); (2) Herhangi bir genin aktarılmadığı JM 105 hücrelerinin süpernatant fazları; (3 ve 4); İndüklenmiş ve indüklenmemiş *PvLM2Tg2* geni içeren 3 saatlik JM 105 hücrelerinin genel protein profili, (5 ve 6); İndüklenmiş ve indüklenmemiş *PvLM2Tg2* geni içeren bir gecelik JM 105 hücrelerinin süpernatant fazı; (8 ve 9); İndüklenmiş ve indüklenmemiş *PvLM2Tg2* geni içeren bir gecelik JM 105 hücrelerinin süpernatant fazı; (10) Saf insan LDH proteini.

Mutant proteinin ifade edilmiş olduğu Western blotlama ile de gösterilmiştir (Şekil 3.5, a5 ve b5). PvLM2Tg2 proteinin ekspresyonu kontrol edildikten sonra bu proteinin aktif olup olmadığını anlamak için geni ihtiva eden JM105 hücrelerinin süpernatantı materyal ve metoda belirtildiği gibi hazırlandıktan sonra, PvLM2TgII proteinin kinetik olarak tayini ve aktivitesinin ölçülmesi için kullanılmış ve tayin NADH'nın 340nm'deki absorbansına bakılarak yapılmıştır (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. PvLM2TgII proteinin kinetik olarak tayini ve aktivitesinin ölçülmesi. (LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiş olup tabloda elde edilen değerlerin ortalaması verilmiştir)

ΔA_{340} / dakika			1mM Pürivat
<i>PvLM2Tg2</i> genini içeren JM105	İndüklenmemiş	3 saat	0,036
	İndüklenmiş		0,135
	İndüklenmemiş	Bir gece	0,024
	İndüklenmiş		0,195
JM105	3 saat		0,028
	Bir gece		0,032

Görüleceği gibi PvLDH'nın 100_F, 103_A amino asitlerinin mutagenез yapılarak 100_L ve 104_V amino asitlerine dönüştürülerek *T. gondii* LDH II'ye benzetilmesi, aynı bölgenin *T. gondii* LDH I'e benzetilmesi ile kıyaslandığı zaman, enzim aktivitesinde genel olarak düşme gözlemlendiği ancak IPTG indüklemesinden 3 saat sonra alınan örneklerde yapılan kinetik ölçümlerde enzim aktivitesinin *T. gondii* LDH I enziminin aktivitesine göre artış gösterdiği görülmüştür. Ancak sözkonusu amino asit değişikliklerinin yapılması *T. gondii* I LDH'nda olduğu gibi PvLDH üzerinde enzim aktivitesini ortadan kaldıracak bir etkiye sahip olmamıştır.

3.3. *Plasmodium vivax* LDH' nın *Eimeria tenella* 'ya Benzetilmesi

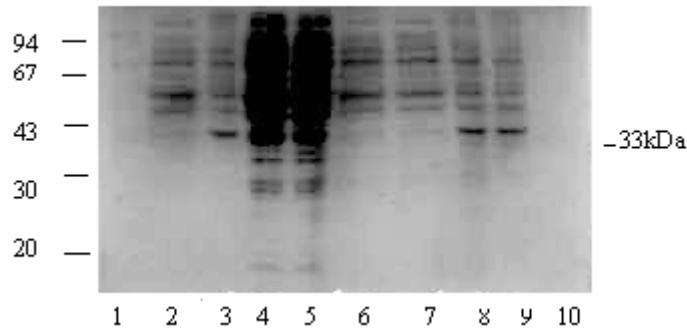
Üçüncü mutagenез çalışması olarak PvLDH'nın aktif bölge halkasındaki ilave 5 amino asit ilavesinden önceki bölgede bulunan 100_F, 105_P amino asitleri, mutagenез çalışması yapılarak 100_I, 105_A amino asitlerine dönüştürülmüş ve PvLDH'nın sözkonusu bölgesi *Eimeria*

tenella LDH'sının aynı bölgesine benzetilmiştir. Oluşan mutant protein PvLM3Et olarak adlandırılmıştır.

Bu amaçla ilk önce PvLM3Et'nin iki mutant DNA fragmentleri elde edilmiş ve bunlar PvLM3Et A fragmenti ve PvLM3Et B fragmenti olarak adlandırılmıştır. PCR için mutagenез primerleri ile birlikte PvLDH uç primerleri kullanılmış ve her iki PCR denemesi ile de beklenen büyüklükte DNA bantları görülmüştür.

Polimeraz zincir reaksiyonu ile uygulanan yönlendirilmiş mutagenез yöntemiyle ilk aşamada elde edilen PvLM3Et A fragmenti ve PvLM3Et B fragmenti iki aşamada PCR ile birleştirilerek tam uzunluktaki PvLM3Et geni elde edilmiştir. *Eco* RI ve *Pst* I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim, ligasyon ve transfromasyon aşamalarının uygulanmasının ardından koloni PCR ile bir PvLDH geninin klonlandığı gösterilmiş ve doğru mutagenезin yapıldığı dizi analizi ile onaylanmıştır.

Mutant proteinin ekspresyonu için daha önce anlatıldığı gibi hücreler logaritmik faza (OD_{600} : 0,6) ulaştığında 1 mM IPTG indükleyici olarak kullanılarak genin ekspresyonu artırılmıştır. Bu işlem sonrası alınan protein örnekleri SDS- PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. PvLM3Et geni içeren JM 105 hücre süpernatant protein profilinin gösterilmesi. Hatlar: (1) Markır (LMW); (2) Herhangi bir genin aktarılmadığı JM 105 hücrelerinin süpernatant fazları; (3 ve 4); İndüklenmiş ve indüklenmemiş PvLM3Et geni içeren 3 saatlik JM 105 hücrelerinin genel protein profili, (5 ve 6); İndüklenmiş ve indüklenmemiş PvLM3Et geni içeren bir gecelik JM 105 hücrelerinin süpernatant fazı; (8 ve 9); İndüklenmiş ve indüklenmemiş PvLM3Et geni içeren bir gecelik JM 105 hücrelerinin süpernatant fazı; (10) Saf insan LDH proteini.

PvLM3Et proteinin büyüklüğünü daha iyi belirlemek için jelde koşturma işlemi yapılırken aynı zamanda 33 kDa büyüklüğe sahip insan saf LDH proteini de koşturulmuştur. En iyi gözlenen protein ekspresyonu yine bir gecelik örneklerden elde edilmiştir. JM105

hücrelerinin protein profillerine bakıldığı zaman IPTG ile muamele edilen örneklerin profilleri, IPTG ile muamele edilmeyen örneklerin profillerine göre daha güçlü olduğu gözlemlenmiştir.

Mutant proteinin ifade edilmiş olduğu Western blotlama ile de gösterilmiştir (Şekil 3.5, a4 ve b4). *PvLM3Et* proteinin ekspresyonu kontrol edildikten sonra *PvLM3Et* proteininin aktif olup olmadığını anlamak için geni ihtiva eden JM105 hücrelerinin süpernatantı hazırlandıktan sonra, kinetik olarak analiz edilmiştir.

Tablo 3.4. *PvLM3Et* proteinin kinetik olarak tayini ve aktivitesinin ölçülmesi. (LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiş olup bu değerlerin ortalaması verilmiştir.)

ΔA_{340} / dakika			1mM Pürivat
<i>PvLM3Et</i> genini içeren JM105	İndüklenmemiş	3 saat	0,021
	İndüklenmiş		0,060
	İndüklenmemiş	Bir gece	0,048
	İndüklenmiş		0,220
JM105	3 saat		0,028
	Bir gece		0,032

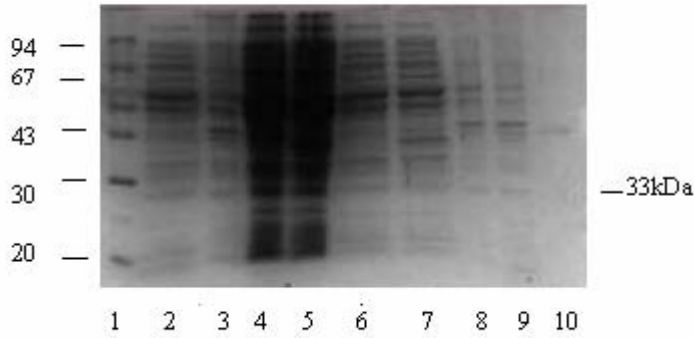
Yapılan mutagenезlerin sonucunda *PvLM3Et* mutant proteini de aktif enzim oluşumu ile sonuçlanmıştır. 3 saatlik mutant protein örneklerinde enzim aktivitesi düşük olmakla beraber bir gecelik inkübasyon sonucunda elde edilen örneklerde aktif protein oluşumu gözlemlenmiştir. Bu sonuç şu ana kadar yapılan değişimlere rağmen *PvLDH*'ın etkilenmeden enzim aktivitesini sürdürdüğünü göstermiştir.

3.4. *Plasmodium vivax* LDH'ının *Eimeria acervulina*'ya Benzetilmesi

Dördüncü mutagenез çalışması olarak *PvLDH*'ın aktif bölge halkasındaki ilave 5 aminosit ilavesinden önceki bölgede 100_F, 103_A amino asitleri mutagenез çalışması yapılar 100_I, 103_I olarak değiştirilmiştir. Meydana gelen mutant protein *PvLM2Ea* olarak adlandırılmıştır. Böylece meydana getirilen amino asit değişimleri sonucunda *PvLDH*'ın bu bölgesi yine bir Apicomplexan üyesi LDH'ı olan *Eimeria acervulina*'nın LDH'ına benzetilmiştir.

Bu amaçla ilk önce *PvLM2Ea*'nin iki mutant DNA fragmentleri elde edilmiş ve bunlar *PvLM2Ea* A fragmenti ve *PvLM2Ea* B fragmenti olarak adlandırılmıştır. PCR için mutageniz primerleri ile birlikte *PvLDH* primerleri kullanılmış ve her iki PCR denemesi ile de beklenen büyüklükte DNA bantları görülmüştür. İlk aşamada elde edilen *PvLM2Ea* A fragmenti ve *PvLM2Ea* B fragmenti iki aşamada PCR ile birleştirilerek *PvLM2Ea* geninin tam uzunluğunun elde edilmesi sağlanmıştır. Restriksiyon enzimleri ile kesim, ligasyon, transformasyon, koloni PCR ve dizi analizlerinin yapılması sonucunda doğru genin klonlandığı ve istenen mutagenizin yapıldığı görülmüştür.

PvLM2Ea geninin mutant proteini üretip üretmediğini anlamak için SDS- PAGE ile geni içeren JM105 bakteri hücre ekstratının analizi yapılmıştır. Bu işlem için hücreler logaritmik faza (OD_{600} : 0,6) ulaştığında 1 mM IPTG indükleyici olarak kullanılarak genin ekspresyonu artırılmıştır. Bu işlem sonrası alınan örneklerdeki protein ekspresyonu SDS- PAGE ile kontrol edilmiştir. Jelde, logaritmik faz sonrası kültürlerden alınan 3 saatlik ve bir gecelik numuneler koşturulmuştur. *PvLM2Ea* proteinin büyüklüğünü daha iyi belirlemek için jelde koşturma işlemi yapılırken aynı zaman 33 kDa büyüklüğe sahip insan saf LDH proteini de koşturulmuştur. En iyi gözlenen protein ekspresyonu bir gecelik örneklerden elde edilmiştir. JM105 hücrelerinin protein profillerine bakıldığı zaman IPTG ile muamele edilen örneklerin profilleri, IPTG ile muamele edilmeyen örneklerin profillerine göre daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. *PvLM2Ea* geni içeren JM 105 hücre süpernatant protein profilinin gösterilmesi. Hatlar: (1) Markır (LMW); (2) Herhangi bir genin aktarılmadığı JM 105 hücrelerinin süpernatant fazları; (3 ve 4); İndüklenmiş ve indüklenmemiş *PvLM2Ea* geni içeren 3 saatlik JM 105 hücrelerinin genel protein profili, (5 ve 6); İndüklenmiş ve indüklenmemiş *PvLM2Ea* geni içeren bir gecelik JM 105 hücrelerinin süpernatant fazı; (8 ve 9); İndüklenmiş ve indüklenmemiş *PvLM2Ea* geni içeren bir gecelik JM 105 hücrelerinin süpernatant fazı; (10) Saf insan LDH proteini

Mutant proteinin ifade edilmiş olduğu Western blotlama ile de gösterilmiştir (Şekil 3.5, a2 ve b2). PvLM2Ea proteinin ekspresyonun sonucu kontrol edildikten sonra bu proteinin aktif olup olmadığını anlamak için geni ihtiva eden JM105 hücrelerinin süpernatantı hazırlanıp, PvLM2Ea proteinin kinetik olarak tayini ve aktivitesinin ölçülmesi için bu süpernatant fazı kullanarak ve NADH'ın 340nm'deki absorbansına bakılarak analiz yapılmıştır (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. PvLM2Ea proteinin kinetik olarak tayini ve aktivitesinin ölçülmesi.(LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiş olup bu değerlerin ortalaması verilmiştir.)

ΔA_{340} / dakika			1mM Pürivat
PvLM2Ea genini içeren JM105	İndüklenmemiş	3 saat	0,019
	İndüklenmiş		0,052
	İndüklenmemiş	Bir gece	0,080
	İndüklenmiş		0,165
JM105	3 saat		0,028
	Bir gece		0,032

Görüldüğü gibi PvLM2Ea proteininde meydana getirilen enzim değişikliğe toleranslı olduğu ve meydana getirilen değişikliğe rağmen proteinin aktif olduğu ortaya çıkmıştır.

3.5. Plasmodium vivax LDH' nın Theileria parva 'ya Benzetilmesi

Beşinci ve son mutagenез çalışması olarak PvLDH'ın aktif bölge halkasındaki ilave 5 amino asit ilavesinden önceki bölge olan amino terminal ucunda bulunan 100_F, 106_G amino asitlerinin mutagenез çalışması yapılarak 100_L ve 106_A amino asitlerine dönüştürülmesini içermektedir. Oluşturulan mutant gen PvLM3Tp olarak adlandırılmış ve PvLDH Theileria parva LDH'ına benzetilmesi amaçlanmıştır. amaçla ilk önce PvLM3Tp 'nin iki mutant DNA fragmentleri elde edilmiş ve bunlar PvLM3Tp A fragmenti ve PvLM3Tp B fragmenti olarak adlandırılmıştır.PCR için mutagenез primerleri ile birlikte Pv7 ve Pv13 primerleri kullanılmış ve her iki PCR denemesi ile de beklenen büyüklükte DNA bantları görülmüştür.

Yapılan diğer mutagenizelerde olduğu gibi ilk aşamada elde edilen PvLM3Tp A fragmenti ve PvLM3Tp B fragmenti iki aşamada PCR ile birleştirilerek PvLM3Tp geninin tam uzunluğu elde edilmiştir. Tam uzunluktaki DNA, *Eco* RI ve *Pst* I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek yapışkan uçlar oluşturularak ligasyona hazırlanmıştır. Restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim sonrası PvLM3Tp DNA'sı ve klonlamanın yapılacağı ekspresyon vektörü DNA'sı jelde koşturulmuş ve doğru bant büyüklükleri görülmüştür. Ligasyon sonrası elde edilen rekombinant DNA örnekleri ve pozitif kontrol olarak hiçbir enzim ile kesilmemiş vektör, *E. coli* JM105 hücrelerine transformasyon yapılmıştır. Bu işlem sonrası transformasyonun sonucu koloni PCR yapılarak kontrol edilmiştir. Sonucun koloni PCR ile pozitif görülmesinden sonra hazırlanan plazmid DNA örnekleri dizi analizi için gönderilmiş ancak sonuç negatif olarak dönmüştür. Bütün klonlama işlemleri üç ayrı defa tekrarlanıp aynı negatif sonuç alınmıştır. Klonlama tekrarı ile beraber PvLDH protein ekspresyonu ve enzim aktivitesi de kontrol edilmiş ancak hiçbir enzim aktivitesi gözlemlenmemiştir. Dizi analizi, protein ekspresyonu ve enzim aktivite ölçümlerinin tamamının negatif sonuç vermesi, doğru büyüklüklerdeki DNA bantları elde edildiği halde mutant PvLDH geninin oluşturulamadığını göstermiştir. Bütün deneysel uygulamalar aynı olmasına karşın yine de sonuç alınamamasının muhtemelen PvLM3Tp mutant primerinin hatalı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4 SONUÇ

Laktat dehidrogenaz enziminin aktif bölge halkası 100. ve 110. amino asitler arasında yer almaktadır [35]. Apicomplexan şubesine ait olan *Plasmodium*'lar ve diğer bazı Apicomplexan LDH enzimleri (*Toxoplasma gondii* LDH1 ve LDH2, *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina*, *Theileria parva*) diğer LDH'lerden farklı olarak aktif bölge halkasındaki 108. ve 109. amino asitler arasında ilave 5 amino asit içermektedir [13, 33, 17, 36]. Laktat dehidrogenaz enzimindeki bu 5 amino asit insersiyonun dizisi (*Plasmodium*'lar için D_{108A}, K_{108B}, E_{108C}, W_{108D}, N_{108E}) ve aynı zamanda aktif bölgesinin amino terminal uç bölgesindeki amino asit dizisi (*Plasmodium malariae* dışındaki bütün bilinen *Plasmodium*'lar için F₁₀₀, T₁₀₁, K₁₀₂, A₁₀₃, P₁₀₅, G₁₀₆, K₁₀₇, S₁₀₈) Apicomplexan türleri arasında farklılık göstermektedir [17] (Tablo 3.6).

Bununla beraber X ışını kristalografisi çalışmaları ile üç boyutlu yapısı belirlenen Apicomplexan'ların tamamında bu 5 amino asit insersiyonu enzimin aktif bölge halkasına yakın yüzeyinde bir yarık oluşturmaktadır [14, 35, 36, 37, 38]. Dolayısıyla aynı yarığın üç boyutlu yapısı bilinmeyen bütün *Plasmodium* ve diğer bazı Apicomplexan LDH'lerinde de oluşturulacağı düşünülmektedir. *Plasmodium falciparum* LDH'si (PfLDH) ile yapılan çalışmalar, bu yarığın klorokin ve azol-bazlı bileşikler ile bir kompleks meydana getirdiğini

Tablo 3.6. *P. vivax* LDH'nin amino asit dizisinin diğer bazı Apicomplexan LDH'lerinin amino asit dizisi ile karşılaştırılması.

	1	2729	32	48	53	61	65	72	76	85
pvivax			MTPKPKIVLVGSGMIGGVMATLIVQKNLGD.	VVMFDVVKNMPQGKALDTS	SHSNVMAYS	NCKVTGS	NSYDDLK	GADVVI		
toxgo1		MAPALVQRRKKVAMIGSGMIGGTMGYLCALRELAD.	VVLVDVVKGMPEGKALDDS	QATSIADTNVSVTSANQYEKIAGSDVVI						
toxgo2		MTGTVSRRKKIAMIGSGMIGGTMGYLCVRELAD.	VVLFDDVVTGMPEGKALDDS	QATSIADTNVSVTSANQYEKIAGSDVVI						
tparva		MSGIRRKLIISLIGSGNIGGIMGYLSQLTELAD.	TVFFDIVPNIGAGKSLDIMHANSIQGKAYCKGTNNYKDIAGSDVCI							
etenella		MAVFEKVRPKIALVGSGMIGGTMGFLCSLRELGD.	VVLFDDVVPNMPAGKALDLCHTA	AAVADNGVRVQGANSYASLEGADVVI						
eacervul		MAVFEKNTRPKIAMVGSGMIGGTMAFLCSLRELGD.	VVLFDDVVPNMPMGKAMDISHNSSV	VDTGITVYGSNSYECLKGADVVI						
	98	109110	116	140	143	156	163	168171173		
pvivax			VTAGFTKAPGKSDKEWNRDDLPLNNKIMIEIGGHIKNLCPNAFIIVVTNPVDVMVQLLFEHSGVPKNKIIGLGGVLDTSRLKYYISQKLNVC							
toxgo1			VTAGLTQVPGKPDSEWSRNDLLPFNSKIIREIGQNIKKYCPKTFIIVVTNPDCMVKMCEASGVPTNMICGMACMLDSGRFRRYVADALSVSP							
toxgo2			ITAGLTQVPGKSDKEWSRNDLLPFNAKIIEVAQGVKKYCPAFVIVVTNPDCMVKCFHEASGLPKNMVCGMANVLDSARFRRFIADQLEISP							
tparva			VTAGLAKAPAKSNEEWNRDDLVAFNAKIITEVAENIKKYAPKAFVIVITNPMDDVMVHMLKVTGFSKNMVVGMGGLDSSRMNCYIAEKLGVNP							
etenella			ITAGITKAAGKSDQEWSRKDLLPVNVKILREVGAAIKQFCPHAFVINITNPLDVMVAALREAAGLPAARVCGMAGVLDSARFRRLLADRLGVSP							
eacervul			ITAGITKIPGKSDKEWSRMDLLPVNIKIMREVGAAIKSYCPNAFVINITNPLDVMVAALQESSGLPHHRICGMAGMLDSSRFRMIADKLEVP							
	188	195	204	237	243246	250	270			
pvivax			RDVNALIVGAHGNKMVLLKRYITVGGIPLQEFINN.KITDEE.VEGIFDRTVNTALEIVNLLASPYVAPAAAIEMAESYLKDIKKVLVCSTL							
toxgo1			RDVQATVIGTHGDCMVPLVRYITVNGYPIQKFIDKGVVTEKQLEEIAEHTKVSGGEIVRFLGQGSAYYAPAAASAVAMATSFLNDEKRVIPCSVY							
toxgo2			RDIQATVIGTHGDHMLPLARYVTVSGFPLREFIKKGKMTEAKLAEIVERTKKAGGEIVRLLGQGSAYYAPALSAITMAQAFKDEKRVLPSCVY							
tparva			KYVHGSVIGAHGDSMIPLVSRSTVYGIPILDFVEKGYLTHEDIKEIEERTITSIEILKLYGSGSSYFAPATAAIEMASAYLNDKKSVPFCSCY							
etenella			RDVQAMVLGVHGDNMVPLSRFATVNGVPLGELARQGWISEAEIREVERQTRAAGGDIVRLLGQGSAYFAPGAAAVAMAEAYLKDQKRVFVCSCY							
eacervul			RDVQGMVIGVHGDHMLVPLSRATVNGIPLSEFVKKGWIKQEEVDDIVQKTKVAGGEIVRLLGQGSAYYAPGASAIQMAESYLKDRKRVFVCSCY							
	280	290	311	318	322					
pvivax			LEGQYGH.SNIFGGTPLVIGGTGVEQVIELQLNAEEKTKFDEAVAETKRMKALI							
toxgo1			CNGEYGLK.DMFIGLPAVIGGAGIERVIELELNEEEEKKQFQKSVDDVMALNKAVAALQA.							
toxgo2			CQGEYGLH.DMFIGLPAVIGGGGIEQVIELELTHEEQECFRKSVDDVVELNKSALALG.							
tparva			LEGQYGHK.EVYCGTPAVIGANGVEKVLELKLTPQEQQKFNDSIKEIRRLESLIK.							
etenella			LEGPYGV.RGHCLGVPCVVGAGGVERVIELPLDAREAQLLQASIDEVREMRQLAAADAAAE							

göstermiş ve bunların enzim üzerine olan inhibitör etkisi belirlenmiştir [39, 40]. Ayrıca yapılan moleküler modelleme çalışmaları gossipol türevi olan gossilik nitril-1,1' diasetat'ın (GNDA) *PfLDH*'ın bu yarık bölgesinde barındırılabilceğini fakat insan LDH'ında bu yarık bulunmadığı için sözü edilen inhibitörün LDH'ın yapısına kabul edilmeyeceğini göstermiştir [41]. *PfLDH* ile yapılan bu çalışmayı aynı yarık bölgesine sahip olan diğer *Plasmodium*'lar ve *Apicomplexan*'lar için de genellemek mümkündür.

Plasmodium'ların ve diğer *Apicomplexan*'ların laktat dehidrogenaz enzimleri karşılaştırıldığı zaman 100. ve 110. amino asitler arasında yer alan aktif bölge halkasındaki bazı amino asitlerin korunduğu gözlemlenmiştir. Bununla beraber enzimin aktif bölgesindeki amino terminal uç bölgesinde (100_F, 101_T, 102_K, 103_A, 105_P, 106_G, 107_K, 108_S) bulunan amino asit dizisi *Plasmodium*'lar ve diğer bazı *Apicomplexan*'lar arasında (*Toxoplasma gondii* LDH1 ve LDH2, *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina*, *Theileria parva*) veya aynı zamanda *Apicomplexan*'lar içinde de çeşitlilik göstermektedir [17]. Laktat dehidrogenaz enzimi için yapısal olarak önemli olan bu amino asitlerin rollerini daha iyi anlayabilmek için bu tez çalışmasında yönlendirilmiş mutagenез çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla çeşitli canlılarda hastalığa sebep olan bazı *Apicomplexan*'ların (*Toxoplasma gondii*, *Eimeria acervulina* ve *Eimeria tenella*, ve *Theileria parva*) LDH'larının dünyada ve Türkiye'de en yaygın *Plasmodium* türü olan *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenaz enziminin aktif bölgesinin amino terminal uç bölgesindeki (100_F, 101_T, 102_K, 103_A, 105_P, 106_G, 107_K, 108_S) amino asit dizileri *Plasmodium*'larla birlikte *Apicomplexan*'lar için de genel ilaç tasarım çalışmalarında hedef bölge olarak kullanılabilmesi konusunda açıklamalar getirilmesi için *Plasmodium vivax* LDH'ı içerisinde taklit edilerek bu amino asitlerin önemleri, enzim üzerindeki etkinliği ve meydana getirdiği değişimler araştırılmıştır.

Bu çalışmada *Plasmodium vivax* LDH'ının aktif bölge halkası amino terminal ucu amino asitlerinin yönlendirilmiş mutagenез ile, *Toxoplasma gondii* I ve II, *Eimeria acervulina* ve *Eimeria tenella* LDH'larına benzetilmesi amacıyla amino asit değişikliklerinin yapılması sonucunda, enzim aktivitesinin korunduğu görülmüştür. Genel olarak *PvLDH* enzim aktivitesinde yabancıl tip proteine [33] göre bir düşüş gerçekleşmiş olmasına karşın, enzim substratı ile olan bağlantısını kaybetmemiş ve dolayısıyla enzim aktivitesi korunmuştur. Söz konusu bölgeye müdahale sonucunda enzim aktivitesinin düşmesi ile birlikte, son zamanlarda yapmış olduğumuz bir çalışmada [50] bu tezde çalışılan aktif bölge halkasının devamı olan ilave 5 amino asitin bulunduğu bölgenin tamamen çıkarılması durumunda enzim aktivitesinin tam olarak ortadan kalkması, bu bölgenin ilaç tasarım çalışmaları için gerek *Plasmodium* gerek diğer *Apicomplexan*'lar için ideal bir hedef olarak kullanılabilceği fikrini desteklemektedir.

KAYNAKLAR

1. Knell, A.J., 1991, *Malaria*, Oxford University Press, Oxford, 91p.
2. Akdur, R., 1997, *Sıtma Eđitim Notları*, Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüđü, Ankara, 71s.
3. Darwin, K., *Malaria...At A Glance*, 2002, Wellcome News Malaria Supplement 6, The Wellcome Trust, 36p.
4. Gilles, H.M., 1993, *Diagnostic Methods in Malaria*, In Bruce-Chwatt's Essential Malariology, 3rd Edition (Gilles, H.M., Warrel, D.A. eds), Edward Arnold, , 340p.
5. Unat, E.K., Yücel, A., Altaş, K., Samastı, M., 1995, *Unat'ın Tıp Parazitolojisi - İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları*, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları:15 , İstanbul, 664s.
6. Gardner, M.J., *et. al.*, 2002, Genome Sequence of The Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*, 419, 498-511.
7. World Health Organization (WHO), Roll Back Malaria (RBM) Department and the United Nations Children's Fund (UNICEF), World Malaria Report, 2005.
8. www.rbm.who.int
9. Greenwood, B., Mutabinga, T., 2002 Malaria in 2002 Nature, 415, 670-672
10. Makler, M.T., Hinrichs, D.J., 1993, Measurement of the Lactate Dehydrogenase Activity of *Plasmodium falciparum* as an Assessment of Parasitemia, Journal of Tropical Medicine and Hygiene., 48, 2, 205-210.
11. Roth, E.F. JR, Calvin, M.C., Max-Audit, I., Rosa, J., Rosa, R., 1988, The Enzymes of the Glycolytic Pathway in Erythrocytes Infected With *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites, Blood, 72, 6, 1922-1925.
12. Klenerman, P., Dickson, H., 1992, Plasma Lactate Dehydrogenase Estimation in the Diagnosis of Malaria, Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 86, 563-565.
13. Turgut-Balik, D., Holbrook, J. J., 2001, Determination of The DNA and Amino Acid Sequences of the Lactate Dehydrogenase Gene from *Plasmodium falciparum* Strains K1 and PF FCBP: A Route to the Design of New Antimalarials, Turkish Journal of Biology, 25, 241-250.
14. Dunn, C.R., Banfield, M.J., Barker, J.J., Higham, C.W., Moreton, K.M., Turgut-Balik, D., Brady, R.L. and Holbrook, J.J., 1996, The Structure of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* Reveals a New Target for Anti-malarial Design, Nature Structural Biology, 3, 11, 912-915.

15. Turgut-Balik, D., Shoemark, D.K., Sessions, R.B., Moreton, K.M. & Holbrook, J.J., 2001, Mutagenic Exploration of the Active Site of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*, *Biotechnology Letters*, 23, 923-927.
16. Turgut-Balik, D., Shoemark, D.K., Moreton, K.M., Sessions, R.B., Holbrook, J.J., 2001, Over-Production of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* Opens Route to New Antimalarials, *Biotechnology Letters*, 23, 917-921.
17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
18. Tracey, J., Webster, L., 1996, *Drugs Used in The Chemotherapy of Protozoal Infections*. (In: Hardman, J., Molinoff, P., Rudon, R. and Gilman, A., Editors). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Pergamon Press, New York, 978-1017pp.
19. Olliaro, P., 2001, Mode of Action and Mechanisms of Resistance for Antimalarial Drugs, *Pharmacol.&Therapeutics*, 89, 207-219.
20. Ok, Ü.Z., Girginkardeşler, N., Kilimcioğlu, A.A., 1999, Sıtmada Sağaltım ve Kemoprofilaksi, In: Özcel, M.A.(ed.), *Sıtma-Malaria*, Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın No. 16, İzmir, 295s.
21. Sanchez, C. P., Lanzer, M., 2000, *Current Opinion in infect. Dis.*13, 653-658.
22. Ginsburg, H., War, S. A., Bray, P. G., 1999, *Parasitology Today*, 15, 357-360.
23. Loria, P., Miller, S., Foley, M., Tilley, L., 1999, *Biochemical Journal*, 339, 363-370.
24. Foley, M., Tilley, L., 1998, *Pharmacology & Therapeutics*, 79, 55-87.
25. Meshnick, S.R., Taylor, T.E., Kamchonwongpaisan, S., 1996, Artemisinin and The Antimalarial Endoperoxides: From Herbal Remedy To Targeted Chemotherapy, *Microbiol Rev.*, 60, 2, 301-315.
26. Ridley, R.G., 2002, Medical Need, Scientific Opportunity and The Drive for Antimalarial Drugs, *Nature*, 415, 686-693.
27. Olliaro, P., Yuthavong, Y., 1999, An Overview of Chemotherapeutic Targets for Antimalarial Drug Discovery, *Pharmacol. Ther.*, 81, 2, 91-110.
28. Turgut-Balik, D., 2001, Sıtma Parazitlerinin Moleküler Biyolojisi, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 25, 4, 380-383.
29. Vander-Jagt, D.L., Hunsaker, L.A., Heidrich, J.E., 1981, Partial Purification and Characterization of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 4, 255-264.
30. Sherman, I.W., 1979, *Biochemistry of Plasmodium (Malaria Parasites)*. *Microbiology Review*, 43, 453-495.
31. Royer, R.E., Deck, L.M., Campos, N.M., Hunsaker, L.A., Vander Jagt, D.L., 1986, Biologically Active Derivatives of Gossypol: Synthesis and Antimalarial Activities of Peri-Acylated Gossylic Nitriles, *Journal of Medicinal Chemistry*, 29, 1799-1801.

32. Bzik D.J., Fox, B.A., Gonyer, K., 1993, Expression of *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase in *Escherichia coli*, Molecular and Biochemical Parasitology, 59, 155-166.
33. Turgut-Balik, D., Akbulut, E., Shoemark, D.K., Celik, V., Moreton, K.M., Sessions, R.B., Holbrook, J.J., Brady, R.L., 2004, Cloning, Sequence and Expression of The Lactate Dehydrogenase Gene From The Human Malaria Parasite, *Plasmodium vivax*, Biotechnology Letters, 26, 1051-1055.
34. Akbulut, E., Çelik, V., Turgut-Balık, D., 2005, *Plasmodium vivax* ve *Plasmodium falciparum*'un Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genlerinin Nükleotid Düzeyinde Karşılaştırmalı Analizi, Türkiye Parazitoloji Dergisi (Acta Parasitologica Turcica), 29, 3, 149-153.
35. Chaikuad, A., Fairweather, V., Connors, R., Joseph-Horne, T., Turgut-Balik, D., Brady, R.L. 2005, Structure of Lactate Dehydrogenase From *Plasmodium vivax*: Complexes With NADH and APADH, Biochemistry USA, 44, 49, 16221-16228.
36. Winter, V.J., Cameron, A., Tranter, R., Sessions, R.B., Brady, R.L., 2003, Crystal Structure of *Plasmodium berghei* Lactate Dehydrogenase Indicates The Unique Structural Differences of These Enzymes Are Shared Across The *Plasmodium* Genus, Molecular and Biochemical Parasitology, 131, 1, 1-10.
37. Kavanagh, K.L., Elling, R.A., Wilson, D.K., 2004, Structure of *Toxoplasma gondii* LDH1: Active-Site Differences From Human Lactate dehydrogenases and The Structural Basis For Efficient APAD⁺ Use, Biochemistry US, 43, 4, 879-889.
38. Schaap, D., Arts, G., Kroze, J., Niessen, R., Roosmalen-Vos, S.V., Spreeuwenberg, K., Kuiper, C.M., Beek-Verhoeven, N.V.D., Kok, J.J., Knegt, R.M.A., Vermeulen, A.N., 2004, An *Eimeria* Vaccine Candidate Appears to be Lactate Dehydrogenase; Characterization and Comparative Analysis, Parasitology, 128, 603-616.
39. Read, J.A., Wilkinson, K.W., Tranter, R., Sessions, R.B., Brady, R.L., 1999, Chloroquine Binds in the Cofactor Binding Site of *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase, The Journal of Biological Chemistry, 274, 10213-10218.
40. Cameron, A., Read, J., Tranter, R., Winter, W.J., Sessions, R.B., Brady, R.L., Vivas, L., Easton, A., Kendrick, H., Croft, S.L., Barros, D., Lavandera, J.L., Martin, J.J., Risco, F., García-Ochoa, S., Gamo, F.J., Sanz, L., Leon, L., Ruiz, J.R., Gabarró, R., Mallo, A., Gómez de Las Heras, F., 2004, Identification and Activity of A Series of Azole-based Compounds With Lactate dehydrogenase-directed Anti-malarial Activity, The Journal of Biological Chemistry, 279(30), 31429- 31439.
41. Sessions, R.B., Dewar, V., Clarke, A.R., Holbrook, J.J., 1997, A model of *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase and its Implications for The Design of Improved Antimalarials and The Enhanced Detection of Parasitaemia, Protein Engineering, 10, 4, 301-306.

42. www.mwg-biotech.com
43. www.iontek.com.tr
44. QIAGEN, QIAprep[®] Miniprep Handbook, 2003, Cat. No: 27104, Germany, 46p.
45. Sambrook, J. and Russell, D.W., 2001, *Molecular Cloning A Laboratory Manual I-II-III*, Third Edit., CSHL Press, New York.
46. Rand, K.N., 1996, Crystal Violet Can Be Used To Visualize DNA Bands During Gel Electrophoresis and To Improve Cloning Efficiency, Technical Tips Online.
47. Turgut-Balik D., Celik, V., Moreton, K., Brady, L., 2005, Overcoming Cloning Problems by Staining Agarose Gels with Crystal Violet Instead of Ethidium Bromide in Lactate Dehydrogenase Gene From *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*, *Acta Biologica Hungarica*, 56, 3-4, 389-397.
48. QIAGEN, QIAquick[®] Spin Handbook, 2002, Cat. No: 28704, Germany, 34p.
49. Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 5259, 680-685.
50. Turgut-Balik D, Sadak D, Celik V. 2006 “Analysis of active site loop amino acids of enzyme lactate dehydrogenase from *Plasmodium vivax* by site-directed mutagenesis studies”, *Drug Development Research*, (67), 175-180.

ÖZGEÇMİŞ

Bünyamin ATMIŞ

Doğum Yeri: Kırıkhan

Tarihi: 07.08.1972

Adresi: Fırat Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji
Anabilim Dalı, Elazığ

Tel: 0 424 237 00 00/ 37 33

Fax: 0 424 233 00 62

e-posta: batmis@firat.edu.tr

batmis@gmail.com

2004-2007: Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda

Yüksek Lisans Eğitimi

Yüksek Lisans Tez Konusu: *Plasmodium vivax*' ın LDH enziminin aktif bölge halkasının
amino terminal ucunun analizi

Danışman: Doç. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

1991-2004: Fırat Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde Lisans Eğitimi

1984-1989: Orta ve Lise Eğitimi

1979-1984: İlkokul Eğitimi