

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***THEILERIA ANNULATA*'NİN ENOLAZ ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN
İNTRONSUZ OLARAK KLONLANMASI, ENZİMİN İFADE EDİLMESİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK KARAKTERİZASYONU**

EBRU ÇAYIR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. DİLEK TURGUT BALIK**

İSTANBUL, 2013

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***THEILERIA ANNULATA*'NİN ENOLAZ ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN
İNTRONSUZ OLARAK KLONLANMASI, ENZİMİN İFADE EDİLMESİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK KARAKTERİZASYONU**

Ebru ÇAYIR tarafından hazırlanan tez çalışması 22.05.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Sevnur MANDACI
TÜBİTAK MAM

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2011-0704-KAP03 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Akademik hayattaki ilk tecrübelerimi edinmemi sağlayan, laboratuvar ve tez aşamamda bilgi, deneyim ve tecrübesiyle bana yol gösteren, karşılaştığım tüm sorunlar için sabırla çözüm üreten, akademik çalışma hayatım dışında da her konuda fikir ve desteğini esirgemeyen sevgili Hocam Prof. Dr. Dilek Turgut-Balık'a,

Tez çalışmasının yürütülmesine maddi destek sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Başkanlığı'na ve bölümümdeki tüm hocalarıma, Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Dekanlığı'na,

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde desteklerini esirgemeyen Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölüm Başkanı Prof. Dr. İsa Gökçe'ye ve Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Hüseyin Önen'e,

İlk uygulama ve proje deneyimi kazanmamda değerli katkılar sağlayan Hocam Doç. Dr. Sevnur Mandacı'ya,

Tez çalışmasında kullanılan *E.coli* BL21(DE3) hücrelerinin teminini sağlayan Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Feray Köçkar'a,

Grup içi çalışmaları ile bu tez çalışmasının yürütülmesine katkı sağlayan Biyomühendislik Bölümü, Rekombinant DNA Teknolojileri Laboratuvarı grup arkadaşlarım, Ayberk Akat, Uzman Ayşegül Erdemir, Ebru Özkan, Araştırma Görevlisi Emrah Sarıyer, Zeynep Büşra Bolat, Ekrem Akbulut, Sinem Yakarsönmez, Belma Nural, İlke Güntan, Zehra Ömeroğlu Ulu'ya,

Bölümde yer alan diğer yüksek lisans, doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisansım süresince desteklerini esirgemeyen ve her aşamada yanımda olan sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Mayıs, 2013

Ebru ÇAYIR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT.....	xvi
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.1.1 Tropikal Theileriosis.....	1
1.1.2 <i>Theileria</i> Türlerinin Yaşam Döngüsü ve Patogenezi	2
1.1.3 Tropikal Theileriosis Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	4
1.1.4 Yeni Tedavi Yöntemine Duyulan İhtiyaç	5
1.1.5 Enolaz Enzimi ve İlaç Tasarımında Kullanım Potansiyeli	6
1.1.6 Yönlendirilmiş Mutageniz ve Protein Analizlerinde Kullanımı	10
1.2 Tezin Amacı	11
1.3 Hipotez	11
BÖLÜM 2	
MATERYAL VE YÖNTEM	12
2.1 MATERYAL.....	12
2.1.1 Kimyasal Maddeler, Enzimler ve Kitler	12
2.1.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar	13
2.1.3 Klonlama ve İfade Vektörleri	14
2.1.4 <i>Echerichia coli</i> soyları.....	16
2.1.5 Bakteriyolojik Gelişim İçin Gerekli Besiyerleri	16
2.1.6 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar	17

2.1.7	İntronlu <i>Ta</i> ENO Genini İçeren Plazmid DNA.....	21
2.1.8	Primerler	22
2.2	YÖNTEM	23
2.2.1	Plazmid DNA İzolasyonu	23
2.2.2	İntron Uzaklaştırılmasında Kullanılan PCR Temelli Yönlendirilmiş Mutageniz Yöntemi.....	25
2.2.2.1	PCR Temelli Yönlendirilmiş Mutageniz Yöntemi 1.....	25
2.2.2.2	PCR Temelli Yönlendirilmiş Mutageniz Yöntemi 2	25
2.2.2.3	PCR Temelli Yönlendirilmiş Mutageniz Yöntemi 3.....	26
2.2.3	Etidyum Bromür İle Boyanan AgaroZ Jel Elektrofözezi.....	28
2.2.4	Kristal Viyole ile Boyanan AgaroZ Jel Elektrofözezi	29
2.2.5	DNA'nın Jelden Geri Kazanılması.....	29
2.2.6	DNA Dizi Analizi	29
2.2.7	İntronlarından Arındırılan <i>Ta</i> ENO Geninin Klonlama Vektörüne Aktarılması	30
2.2.8	<i>Ta</i> ENO Geninin Birinci İfade Vektörüne (pKK223-3) Aktarılması	30
2.2.8.1	<i>Ta</i> ENO Geninin Klonlama Vektöründen Amplifikasyonu.....	30
2.2.8.2	İntronsuz <i>Ta</i> ENO Geni ve pKK223-3 İfade Vektörünün Restriksiyon Endonükleaz İle Kesimi.....	31
2.2.8.3	Ligasyon.....	31
2.2.8.4	Kalsiyum Klorür Etkileşimi ile Kompetant <i>E. coli</i> DH5α Hücrelerinin Hazırlanması.....	32
2.2.8.5	Rekombinant DNA Plazmidinin <i>E. coli</i> DH5α Hücrelerine Transformasyonu	32
2.2.8.6	Gen Klonlamasının PCR ile Kontrolü	33
2.2.9	<i>Ta</i> ENO Geninin İkinci İfade Vektörüne (pLATE31) Aktarılması	33
2.2.9.1	PCR Primerlerinin Tasarımı	33
2.2.9.2	<i>Ta</i> ENO'nun Klonlama Vektöründen Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saflaştırılması	34
2.2.9.3	LIC Reaksiyonu ve Rekombinant DNA Plazmidinin <i>E.coli</i> BL21(DE3) Hücrelerine Transformasyonu	34
2.2.9.4	Gen Klonlamasının PCR ile Kontrolü	35
2.2.10	<i>Theileria annulata</i> Enolaz Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması 36	
2.2.10.1	<i>Theileria annulata</i> Enolaz Enziminin Birinci İfade Vektörü (pKK223-3) aracılığıyla <i>E. coli</i> 'de Ekspresyonu ve Enzimin Saflaştırılması ..	36
2.2.10.2	<i>Theileria annulata</i> Enolaz Enziminin İkinci İfade Vektörü (pLATE31) aracılığıyla <i>E. coli</i> 'de Ekspresyonu ve Enzimin Saflaştırılması ...	38
2.2.11	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE) ..	39
2.2.12	Enzimin Molekül Ağırlığının ve Ekstinksiyon Katsayısının Hesaplanması.....	40
2.2.13	Saflaştırılmış Proteinde Spektrofotometrik Yöntemle Konsantrasyon Tayini.....	40
2.2.14	Spektrofotometrik Yöntemle Enzim Aktivitesi Tayini	41
2.2.15	Saflaştırılan Enzimin Kinetik Analizi	42

BÖLÜM 3

SONUÇ VE ÖNERİLER	47
3.1 <i>Ta</i> ENO Geninden İntronun Uzaklaştırılmasında Kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Yönlendirilmiş Mutagenез Yöntemi	47
3.1.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Yönlendirilmiş Mutagenез Yöntemi 1	47
3.1.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Yönlendirilmiş Mutagenез Yöntemi 2	51
3.1.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Yönlendirilmiş Mutagenез Yöntemi 3	56
3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Yönlendirilmiş Mutagenез Yöntemi (Yöntem 3) ile İntrondan Arındırılan <i>Ta</i> ENO'nun pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Aktarılması	63
3.3 <i>Theileria annulata</i> 'nın Enolaz Enziminin Molekül Ağırlığı ve Molar Absorblama Katsayısının Hesaplanması	65
3.4 İntrondan Arındırılan <i>Ta</i> ENO'nun İfade Vektörüne Alt Klonlaması, Enolaz Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	66
3.4.1 <i>Ta</i> ENO'nun Birinci İfade Vektörüne (pKK223-3) Alt Klonlaması, Enolaz Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	66
3.4.1.1 <i>Ta</i> ENO'nun pKK223-3'e Alt Klonlaması ve Enolaz Enziminin Ekspresyonu	66
3.4.1.2 <i>Theileria annulata</i> 'nın Enolaz Enziminin Saflaştırılması	72
3.4.2 <i>Ta</i> ENO'nun İkinci İfade Vektörüne (pLATE31) Alt Klonlaması, Enolaz Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	77
3.4.2.1 <i>Ta</i> ENO'nun pLATE31'e Alt Klonlaması ve Enolaz Enziminin Ekspresyonu	77
3.4.2.2 İkinci İfade Vektörü (pLTAE31) Aracılığıyla <i>E. coli</i> 'de Ekspresyonu Gerçekleştirilen Enolaz Enziminin Saflaştırması ve Saf Enzimde Spesifik Aktivite Tayini	84
3.5 Saflaştırılan Enolaz Enziminin Kinetik Analizinin Yapılması	87
3.6 Tez Çalışmasında Elde Edilen Sonuçların Literatür Işığında Değerlendirilmesi	89
3.7 Öneriler	95
KAYNAKLAR.....	97
ÖZGEÇMİŞ	108

SİMGE LİSTESİ

A	Absorbans
aa	Amino asit
bç	Baz çifti
g	Gram
k_{cat}	Dönüşüm sayısı
kDa	KiloDalton
K_m	Michaelis-Menten sabiti
l	Litre
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
mA	Miliamper
ml	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
ϵ	Molar absorbsiyon katsayısı
MW	Moleküler ağırlık
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
OD	Optik dansite
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
V_{max}	Maksimum hız

KISALTMA LİSTESİ

ATP	Adenozin trifosfat
<i>B. taurus</i>	Bos taurus
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleikasit
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
ENO	Enolaz Enzimi
PEP	Fosfoenolpirüvat
2-PGA	2 fosogliserik asit
LDH	Laktat Dehidrogenaz Enzimi
mRNA	mesajcı RNA
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>Pf</i> LDH	<i>Plasmodium falciparum</i> LDH Enzimi
RNA	Ribonükleikasit
SAB	Sample Amplification Buffer
SDS PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilmit jel
<i>T. annulata</i>	<i>Theileria annulata</i>
<i>T. parva</i>	<i>Theileria parva</i>
<i>Ta</i>	<i>Theileria annulata</i>
TAE	Tris-Asetat-EDTA
<i>Ta</i> ENO	<i>Theileria annulata</i> Enolaz Enzimi
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. 1 <i>Theileria</i> türlerinin coğrafik dağılımı	2
Şekil 1. 2 <i>Theileria annulata</i> 'nın yaşam döngüsü	3
Şekil 1. 3 Buparvaquone (a) ve parvaquone'un (b) kimyasal yapıları	4
Şekil 1. 4 Glikolitik metabolik yolun şematik olarak gösterimi	7
Şekil 1. 5 Enolazın diğer nüklear, sitoplazmik ve membran proteinleri ile olan etkileşimi	8
Şekil 1. 6 Bazı patojenler için konak dokuya geçiş mekanizması	9
Şekil 2. 1 pGEM [®] -T Easy klonlama vektörü	14
Şekil 2. 2 pKK223-3 ifade vektörü	15
Şekil 2. 3 pLATE31 ifade vektörü	15
Şekil 2. 4 Tek substratlı bir enzimatik reaksiyonda substratın ürüne dönüşümü	42
Şekil 2. 5 Tek substratlı bir enzimatik tepkimede substrat konsantrasyonu ve reaksiyon hızı arasındaki ilişkiyi gösteren grafik	43
Şekil 2. 6 Lineweaver-Burk grafiği	45
Şekil 3. 1 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 1 ile amplifikasyonu gerçekleştirilen ürünün jel görüntüsü.....	49
Şekil 3. 2 İntronlu TaENO gen dizisi (1. sıra) ile PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 1 ile elde edilen ürünün TaENO5 primeri ile 3'→5' yönünde okunan DNA dizi analizi sonucunun (2. sıra) karşılaştırılması.....	50
Şekil 3. 3 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 1 ile elde edilen PCR ürününün DNA dizi analizi kromotogramındaki intron bölgesi.....	51
Şekil 3. 4 TaENO'nun polimeraz zincir reaksiyonu temelli yönlendirilmiş mutagenез tekniği 2 ile intronsuz olarak amplifikasyonun şematik gösterimi.....	52
Şekil 3. 5 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3 ile amplifikasyonu gerçekleştirilen birinci (a: 1353 bp), ikinci (b: 1341 bp), üçüncü (c: 1329 bp) basamak ürünlerinin jel görüntüsü.....	54
Şekil 3. 6 İntronlu TaENO gen dizisi (1. sıra) ile PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 2 ile elde edilen ürünün TaENO5 primeri ile 3'→5' yönünde okunan DNA dizi analizi sonucunun (2. sıra) karşılaştırılması.....	55
Şekil 3. 7 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 2 ile elde edilen PCR ürününün DNA dizi analizi kromotogramında intronun çıkarıldığı bölge.....	56
Şekil 3. 8 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3'te farklı enzimlerle amplifikasye edilen birinci ve ikinci gen parçalarının jel görüntüsü.....	58

Şekil 3. 9	Birinci ve ikinci gen parçalarının eşit konsantrasyonda iken birim hacimde içerdikleri gen parçalarının şematik gösterimi.....	59
Şekil 3. 10	PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3 ile elde edilen birinci ve ikinci gen parçalarının farklı enzimlerle gerçekleştirilen birleştirilme reaksiyonu ürünlerinin jel görüntüsü.....	60
Şekil 3. 11	<i>Ta</i> ENO'nun polimeraz zincir reaksiyonu temelli yönlendirilmiş mutagenез tekniği 3 ile intronsuz olarak amplifikasyonun şematik gösterimi.....	61
Şekil 3. 12	İntronlu <i>Ta</i> ENO gen dizisi (1. sıra) ile PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3 ile elde edilen ürünün <i>Ta</i> ENO5 primeri ile 3'->5' yönünde okunan DNA dizi analizi sonucunun (2. sıra) karşılaştırılması.....	62
Şekil 3. 13	PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3 ile elde edilen PCR ürününün DNA dizi analizi kromotogramında intronun çıkarıldığı bölge.....	63
Şekil 3. 14	pGEM-T Easy klonlama vektörü ile gerçekleştirilen transformasyon sonrası LB-BSA petrilerinde gözlenen koloniler.....	64
Şekil 3. 15	pGEM-T Easy klonlama vektörü ile gerçekleştirilen transformasyon sonrasında yapılan PCR taramasının jel görüntüsü.....	65
Şekil 3. 16	İntronsuz <i>Ta</i> ENO geni PCR ürünlerinin kristal viyole ile boyanan agaroz jel görüntüsü.....	66
Şekil 3. 17	<i>Ta</i> ENO geninin ve pKK223-3 plazmid DNA'sının <i>Pst</i> I kesimi yapılmış saf ürünleri.....	66
Şekil 3. 18	pKK223-3 ifade vektörü ile gerçekleştirilen transformasyon sonrası amfisilin içeren LB petrilerde gözlenen koloniler.....	68
Şekil 3. 19	pKK223-3 vektörü ile gerçekleştirilen transformasyon sonrasında yapılan PCR taramasının jel görüntüsü.....	68
Şekil 3. 20	İntronsuz <i>Ta</i> ENO geni (1. sıra) ile dizileme örneğinin pKK223-3 C terminal primeri ile (2.sıra), pKK223-3 N terminal primeri ile gelen okumasının (3.sıra) karşılaştırılması.....	69
Şekil 3. 21	pKK223-3 C terminal primeri ile dizilenen örneğin 6 His-tag ilavesini gösteren kromotogram görüntüsü.....	70
Şekil 3. 22	pKK223-3 vektörü aracılığıyla <i>E.coli</i> 'den elde edilen örneklerin SDS-PAGE görüntüsü.....	71
Şekil 3. 23	Ni-NTA ve 6 His-tag etkileşimi.....	73
Şekil 3. 24	pKK223-3 vektörü aracılığıyla <i>E.coli</i> 'de üretilen enzimin birinci saflaştırma örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü.....	74
Şekil 3. 25	pKK223-3 vektörü aracılığıyla <i>E.coli</i> 'de üretilen enzimin ikinci saflaştırma örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü.....	75
Şekil 3. 26	<i>Ta</i> ENO geninin pLATE31 ifade vektörüne aktarımına uygun olarak çoğaltılan PCR ürünlerinin EtBr ile boyanan agaroz jel görüntüsü.....	77
Şekil 3. 27	<i>Ta</i> ENO geninde T4 DNA polimeraz ve dGTP'ler ile yapışkan uçların oluşturulması.....	78
Şekil 3. 28	pLATE31 ifade vektörü ile gerçekleştirilen transformasyon sonrası amfisilin içeren LB petrilerde gözlenen koloniler.....	79
Şekil 3. 29	pLATE31 ifade vektörü ile gerçekleştirilen transformasyon sonrasında yapılan PCR taramasının jel görüntüsü.....	80
Şekil 3. 30	İntronsuz <i>Ta</i> ENO geni (1. sıra) ile dizilemeye gönderilen örneğin 5' LIC primeri ile gelen okumasının (2.sıra) karşılaştırılması.....	81

Şekil 3. 31	İkinci ifade vektörü aracılığıyla <i>E. coli</i> 'de yapılan ilk ekspresyon örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü.....	82
Şekil 3. 32	İkinci ifade vektörü aracılığıyla <i>E. coli</i> 'de üretilen enzimin saflaştırma örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü.....	85
Şekil 3. 33	Enzimin kararlı hal kinetik davranışı.....	88

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1	<i>Theileria annulata</i> 'nın enolaz enzimini kodlayan genin intronlu nükleotid dizisi.....24
Çizelge 2. 2	PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 1 ile gerçekleştirilen PCR bileşenleri.....25
Çizelge 2. 3	PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3'te birinci ve ikinci gen parçalarının amplifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri.....27
Çizelge 2. 4	PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3 ile gerçekleştirilen birinci ve ikinci gen parçalarının birleştirilme reaksiyonu bileşenleri.....28
Çizelge 2. 5	PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3 ile elde edilen intronsuz <i>Ta</i> ENO geninin tam uzunlukta amplifikasyonu için birleştirilme reaksiyonuna ilave edilen bileşenler.....28
Çizelge 2. 6	<i>Ta</i> ENO geni ve pKK223-3 vektörü için restriksiyon koşulları.....31
Çizelge 2. 7	Ligasyon reaksiyonu.....32
Çizelge 2. 8	<i>Ta</i> ENO geninde yapışkan uçlar oluşturma reaksiyonu.....35
Çizelge 3. 1	PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 1 için tasarlanan primerler.....48
Çizelge 3. 2	PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 2 için tasarlanan primerler.....53
Çizelge 3. 3	PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3 için tasarlanan primerler.....57
Çizelge 3.4	<i>Ta</i> ENO geni içeren ve içermeyen <i>E.coli</i> süpernatatları ile elde edilen $\Delta A_{240}/dk$ değerleri.....71
Çizelge 3. 5	İkinci saflaştırma örnekleri ile alınan $\Delta A_{240}/dk$ değerleri.....76
Çizelge 3. 6	<i>Ta</i> ENO geni içeren ve içermeyen <i>E.coli</i> süpernatatları ile elde edilen $\Delta A_{240}/dk$ değerleri.....83
Çizelge 3. 7	İkinci ekspresyonda <i>Ta</i> ENO geni içeren ve içermeyen <i>E.coli</i> süpernatatları ile elde edilen $\Delta A_{240}/dk$ değerleri.....84
Çizelge 3. 8	Elüsyonlar ile gerçekleştirilen reaksiyonlardan alınan $\Delta A_{240}/dk$ değerleri.....86
Çizelge 3. 9	Elüsyonlarda bulunan protein konsantrasyonları.....87
Çizelge 3.10	Değişen substrat konsantrasyonlarına karşı okunan $\Delta A_{240}/dk$ değerleri.....88
Çizelge 3.11	Enolaz enzimin tanımlanan kinetik özellikleri.....89
Çizelge 3.12	Farklı türlerde bulunan enolaz enzimlerinin 2-PGA için kinetik özelliklerinin karşılaştırılması.....95

***THEILERIA ANNULATA*'NIN ENOLAZ ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN
İNTRONSUZ OLARAK KLONLANMASI, ENZİMİN İFADE EDİLMESİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK KARAKTERİZASYONU**

Ebru ÇAYIR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK

Tropikal theiliosis, Hyalomma cinsi kenelerce taşınan apikompleksan paraziti *Theileria annulata* aracılığıyla yüksek verimli sığırlarda enfeksiyona ve yüksek oranda morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Bu nedenle tropikal theiliosis büyük ekonomik kayıplara neden olan yaygın ve önemli bir hastalıktır. Son yıllarda parazitin hastalığın tedavisinde kullanılan en etkin ilaca karşı direnç geliştirdiği bildirilmiştir. Bu durum, alternatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç doğurmuştur.

Glikolizis, *Theileria annulata*'nın ATP eldesinde, canlılığı ve virülansında çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle bu yolak, antitheilerial ilaçlar için aday olan hedeflerdendir. Enolaz 2-fosfoglisarikasidin (2-PGA) ve fosfoenolpirüvatın (PEP) tersinir dönüşümünü katalizleyen kilit bir glikolitik enzimdir. Ayrıca, son yayınlar ile enolazın, bazı patojenik organizmaların hücre yüzeyinde ifade edildiği belirtilmiştir. Hücre yüzeyindeki enolaz, plazminojen bağlanma reseptörü olarak görev almakta ve dokuya invazyonda önemli bir rol oynamaktadır. Enolaz, *Theileria annulata* için kilit bir glikolitik enzim ve plazminojen bağlanma reseptörü olması olmasından dolayı, tropikal theiliosis tedavisinde makromoleküler bir hedef olarak seçilebilir.

Bu çalışmada *Theileria annulata*'nın enolaz enzimini kodlayan gendeki intron dizisi PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез ile uzaklaştırılmış ve bu gen pGEM-T Easy vektörüne klonlanmıştır. İntronun uzaklaştırılması DNA dizi analizi ile onaylanmıştır. Bu gen daha

sonra C-terminalinde 6 Histag kuyruğu içeren pLATE31 vektörüne altklonlamış ve *Escherichia coli* BL21(DE3) hücrelerinde ifade edilmiştir. İfade edilen enzim Ni-NTA agaroz kolon kullanılarak afinite kromatografisi aracılığıyla saflaştırılmıştır. Enzime ait kararlı hal kinetik verileri GraFit 3.0 ile tanımlanmıştır.

Theileria annulata'ya ait RNA örneğinin yokluğundan dolayı, yapıya dayandırılmış ilaç tasarımı çalışmalarına uygun olacak aktif enzimin üretilmesi için, gendeki intron dizisinin uzaklaştırılmasında PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез kullanılarak bir strateji geliştirilmiştir. Bilgimiz dahilinde, bu çalışma orjinal intron dizisini içeren genden aktif enzimin üretilmesi amacıyla ilk kez uygulanmıştır. Aktif enzimin ifadesi ve saflaştırılması yeni ilaç tasarım çalışmaları ve hastalığın yok edilme stratejileri için önemlidir.

İntron uzaklaştırılmasını takiben saf rekombinant *Theileria annulata* enolazının yüksek miktarda eldesi (30 mg/litre kültür) yüksek saflık derecesinde (>% 95) sağlanmıştır. Saflaştırılan proteinin moleköl ağırlığı SDS-PAGE'te amino asit sekansından hesaplanan kütle doğrulaması ile yaklaşık olarak 48 kDa büyüklüğünde tek bant vermiştir. 2-PGA'nın substrat olarak kullanıldığı enzim aktivite ölçümleri, spesifik aktivite değerini 43 U/mg, $K_m=106 \mu\text{M}$, $V_{\max}=0,132$, $k_{\text{cat}}=37 \text{ s}^{-1}$ ve $k_{\text{cat}}/K_m=3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ olarak vermiştir. Bu değerler bu parazit için ilk defa tanımlanmıştır ve enolaz enziminin büyük miktarlarda eldesi yeni antitheilerial ilaçların tasarımına yönelik daha ileri kinetik ve yapısal karakterizasyon çalışmalarına olanak sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Theileria annulata*, enolaz, PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез, protein mühendisliği ve enzim kinetiği, yapıya dayandırılmış ilaç tasarımı

ABSTRACT

CLONING OF ENOLASE GENE WITHOUT INTRON, EXPRESSION, PURIFICATION AND KINETIC CHARACTERIZATION OF THE ENZYME FROM *THEILERIA ANNULATA*

Ebru ÇAYIR

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK

Tropical theileriosis is caused by infection with the apicomplexan parasite *Theileria annulata* that is spread by ticks of the genus *Hyalomma* and high rate morbidity and mortality in high efficiency cattle. Thus, tropical theileriosis is a common and important disease causing huge economic losses. In recent years, parasite resistance has been reported to most effective antitheilerial drug used for the treatment of this disease. This situation has given rise to the need for alternative methods of treatment.

Glycolysis play crucial roles in the ATP supply, important for the viability and virulence of *Theileria annulata*. This pathway is, therefore, candidate targets for antitheilerial drugs. Enolase is a key glycolytic enzyme that catalyzes the inter conversion of 2-phosphoglycericacid (2-PGA) and phosphoenolpyruvate (PEP). Also, recent reports described that enolase expressed at the cell surface of several pathogenic organisms. The surface enolase acts as a plasminogen-binding receptor and plays an important role in tissue invasion. Since enolase is a key glycolytic enzyme and plasminogen-binding receptor for *Theileria annulata*, enolase can be selected as a macromolecular target of therapy of tropical theileriosis.

In this study, an intron sequence present in *Theileria annulata* enolase enzyme gene was removed by PCR site directed mutagenesis and the gene was cloned into pGEM-T Easy vector. Removal of intron sequence was confirmed by DNA sequencing. The gene was then subcloned into pLATE31 vector, having an C-terminal 6xHistagged sequence, and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells. The enzyme was purified by affinity chromatography using Ni-NTA agarose column. Steady state kinetic parameters of the enzyme was determined using GraFit 3.0.

Because of lack of RNA sample from *Theileria annulata*, a strategy has been designed by using PCR site directed mutagenesis for removal of an intron sequence from a gene with the ultimate aim of producing active enzyme that will be available for structure based drug design studies. To our knowledge, present study is first to be applied with the aim of production of active protein from a gene that originally had an intron sequence. Expression and purification of active enzyme is of importance for novel drug design research and strategies to overcome the diseases.

High quantities (30 mg per liter culture) of pure recombinant *Theileria annulata* enolase has been obtained in a highly purified form (> 95 %) following intron removal. Molecular weight of purified protein gave a single band on SDS-PAGE at about 48 kDa that is in agreement with the mass calculated from the amino acid sequence. Enzyme kinetic measurements using 2-PGA as substrate gave a specific activity of 43 U/mg, $K_m=106 \mu\text{M}$, $V_{\max}=0,132$, $k_{\text{cat}}=37 \text{ s}^{-1}$ and $k_{\text{cat}}/K_m=3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. These values have been determined for the first time from this parasite and availability of large quantities of enolase enzyme will facilitate further kinetic and structural characterization towards design of new antitheilerial drugs.

Keywords: *Theileria annulata*, enolase, PCR site directed mutagenesis, protein engineering and enzyme kinetics, structure based drug design

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Tropikal Theileriosis

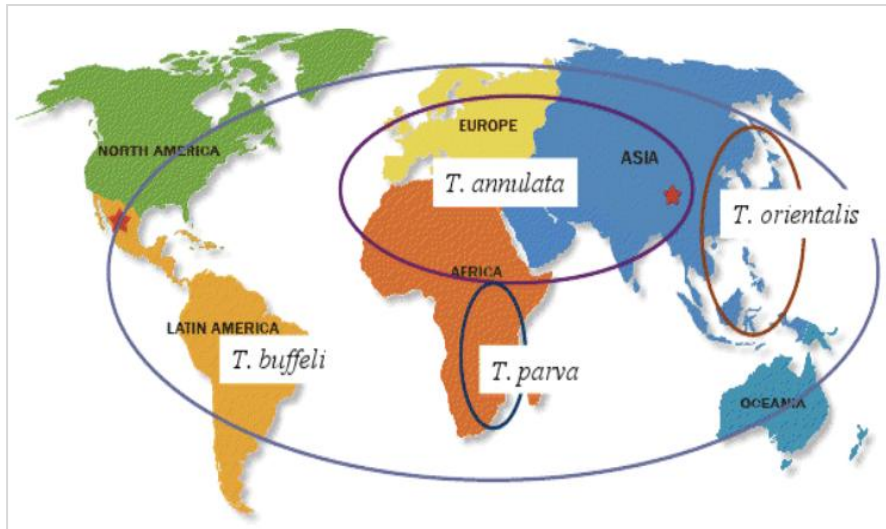
Theileria dünyanın pek çok bölgesinde yabani ya da evcil Bovidae (gevişgetiren bir çift toynaklı familyası) türlerini ve bazı türleri küçük geviş getiren hayvanları da infekte eden zorunlu intraselüler bir protozoon parazittir. Bu parazitler, Ixodidae ailesine ait Hyalomma cinsi keneler tarafından bulaştırılır ve hem omurgalı hem de omurgasız konakta karmaşık bir hayat döngüsü vardır [1]. Theileriosis, Piroplasmorina alt takımındaki *Theileria* cinsine ait protozoonlar ile meydana gelen enfeksiyonlardan kaynaklanan bir hastalıktır [2].

Sığırlarda, *Theileria parva* (*T. parva*), *T. annulata*, *T. mutans*, *T. taurotragi*, *T. velifera*, *T. sergenti/buffeli/orientalis* olmak üzere altı *Theileria* türü bulunmaktadır. Bu türler arasında patojenite, morfolojik, biyolojik ve genetik yönlerden önemli farklılıklar vardır. Bunlardan *T. parva* ve *T. annulata* en patojen iki tür olup, sığırlarda lenfoproliferatif karakterde, yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden hastalıklara neden olurlar [3], [4], [5], [6].

Tropikal theileriosis sığırlarda *Theileria annulata*'nın neden olduğu yaygın ve önemli bir hastalıktır [7], [8]. Hastalık özellikle verim oranı yüksek sığır ırklarında morbidite ve mortaliteye neden olarak büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu hastalığa bağlı olarak konakçıda yüksek ateş, anemi ve lenf bezlerinde büyüme gibi klinik bulguların yanında konakçının kanında ve kanın biyokimyasında önemli değişimler meydana gelir

[9], [10], [11], [12], [13], [14], [15]. Theileriosisli sığırlarda parazitlerin lenfositlerde çoğalması ile lenfositler parçalanmakta ve immün sistem bozulmaktadır [9].

Türkiye’de theileriosis ile ilgili araştırmalar, uzun yıllar lenf ve perifer kan frotilerinin mikroskopik bakısına göre, son yıllarda ise serolojik ve moleküler yöntemler ile yapılmıştır. Bu çalışmalar, Türkiye’de sığırlarda patojen *Theileria* türlerinden *T.annulata*’nın yüksek oranda bulunduğunu göstermiştir (Şekil 1.1) [3]. *T. annulata*; Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Orta Doğu, Hindistan, Çin, Asya’nın bir bölümü ile Nil Vadisi’nden Sudan’a kadar uzanan geniş bir coğrafyada sığır, manda ve zebularda görülen bir türdür [3], [16], [17]. Bu parazit Akdeniz yöresi, Ortadoğu, Kafkasya, Orta Asya, Güneydoğu Asya’da yaygın olarak gözlenmiştir. Türkiye’de Orta Anadolu, Doğu Anadolu, Karadeniz, Marmara, Ege, Akdeniz, Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yaygındır [18].



Şekil 1. 1 *Theileria* türlerinin coğrafik dağılımı [19]

1.1.2 *Theileria* Türlerinin Yaşam Döngüsü ve Patogenezi

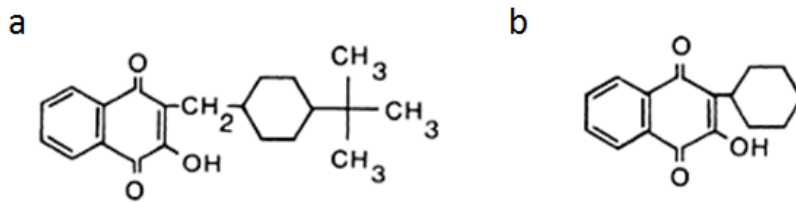
Theileria türlerinin hayat siklusu *Ixodidae* ailesinde yer alan keneler ile sığır, koyun, keçi, manda, zebu ve geyik gibi ruminantlar ve equideler arasında geçer [20], [21]. Memeli hayvanlarda parazitlerin hayat siklusu, arakonak kenenin nimf ve erişkin safhada kan emme esnasında sporozoitleri vermesiyle başlar [3]. Lenfoid hücrelere giren sporozoitler şizontları oluşturmak üzere gelişirler. Buna paralel olarak konak hücrede transformasyon ve bölünme başlar. Şizont içerisinde meydana gelen

yavaşlar ve sonra hastalık tablosu ağırlaştıkça durur [18], [20], [24]. Bu tahribatın oluşmasında *T. parva*'da şizontlar; *Theileria mutans* ve bazı non-transformik türlerde (*T. sergenti/buffeli/orientalis*) lenf yumruları, dalak ve karaciğerde şizontlar geçici olarak saptanmakla birlikte, piroplazmlar; *T. annulata*'da ise hem şizontlar hem de piroplazmlar etkin rol oynar [3], [6], [25], [26], [27], [28].

1.1.3 Tropikal Theileriosis Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Hastalığa karşı çeşitli kontrol metotları uygulanmaktadır. Bunlar vektör kene ile mücadele, kemoterapi ve aşılama. Vektör kene mücadelesinde kullanılan akarisitlerin pahalı olması, ilaçların sığırlarda et ve süte geçmesi, çevreyi kirletmesi ve uzun süre kullanılmalarına bağlı olarak bunlara karşı bağışıklık gelişmesi hastalıkla mücadelede karşılaşılan sorunlardan bazılarıdır [7], [29], [30].

Yine aşılamanın olmadığı pek çok ülkede hastalığa karşı tedavi kemoterapi (Parvaquone, Buparvaquone) ile yapılmaktadır [7] (Şekil 1.3).



Şekil 1. 3 Buparvaquone (a) ve parvaquone'un (b) kimyasal yapıları [29]

Ancak ilaçla tedavi çok pahalı olup erken dönemde başlanılmadığında iyi sonuç vermemektedir [7], [8], [31]. Tropikal theileriosis'e karşı 1990'lı yıllara kadar arsenik preparatları, antimon ve bizmut bileşikler, gümüş bileşikler, acridin grubu bileşikler, üree-quinoleine biguanide deriveleri, 4 ve 8-amino qinoleine deriveleri, diazo-aminobenzol deriveleri, sulfonamitler, antibiyotikler ve biyolojik maddeler kullanılmıştır [32], [33], [34], [35]. 1990'lı yılların ortalarına kadar tropikal theileriosisin tedavisinde, manoctone, parvaquone ve buparvaquone gibi hydroxynaphthaquinone'lar ve halofugione gibi quinazolinone'lar kullanılmıştır [32], [36], [37]. Günümüzde söz konusu ilaçlara ilave olacak güçlü bir alternatif mevcut

değildir. Buparvaquone'un yapılan *in vitro* ve *in vivo* denemeler sonucunda en etkili anti-theilerial ilaç olduğu bildirilmiştir [36], [38].

Tek başına kenelerle mücadele veya kemoterapi hastalığa karşı etkin bir koruma sağlayamamaktadır [8], [39]. Tropikal theileriosis'e karşı makroşizont ile enfekte hücre kültürü (canlı-atenüye) kullanılarak aşılama korunmada önemli bir yer tutmaktadır. Canlı atenüye aşılar Türkiye de dahil pek çok ülkede kullanılmaktadır [7]. Türkiye'de uygulanmakta olan aşı *T. annulata*'nın Ankara suşundan hazırlanmakta ve her hayvana 10^7 enfekte hücre dozunda verilmektedir [40]. Bugün çok sayıda ülkede kullanılan ve etkin bir koruma sağladığı ifade edilen canlı attenuye aşılarda bazı dezavantajları vardır. Bunların başında, aşının hazırlanmasının zor ve zaman alıcı olması, her aşı serisinin kontrolünün pahalı olması, endemik stabil olmayan bölgelerde aşının tekrarının gerekmesi sayılabilir. Rekombinant subunit aşılarda geliştirilmesiyle bu olumsuzlukların giderilmesi amaçlanmaktadır [39].

1.1.4 Yeni Tedavi Yöntemine Duyulan İhtiyaç

Geliştirildikleri yıldan itibaren parvaquone [31] ve buparvaquone [41] bu ilaçlara hiçbir direnç gelişimi olmadan yıllarca sığırlardaki Theileria infeksiyonlarının tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmıştır. Dünyada bu hastalığın yaygın olarak görüldüğü bölgelerde, buparvaquone'ın 2010 yılına kadar tropikal theileriosis tedavisinde kullanılan en etkili ilaç olduğu bildirilmiştir [42].

Diğer protozoonlardan *P. falciparum* [43] ve *T. gondii* [44] için naphtoquinone, atovaquone ilaçlarına karşı direnç geliştiği daha önce rapor edilmiştir. Bununla birlikte literatürde ilk kez buparvaquonea karşı direnç gelişiminin olduğu 2010 yılında yapılan bir çalışmada bildirilmiştir [42] ve bunu 2012'de yapılan bir başka çalışma takip etmiştir [45].

Birinci çalışma Tunus'ta yer alan bir çiftlikte yapılmıştır. Bu çalışmada, yedi sığırdan dört tanesi tropikal theileriosis hastalığından dolayı buparvaquone ile iki konvensiyonel dozda veya çift doz ilacın tek seferde enjeksiyonundan sonra ölmüşlerdir. Bu çalışma *T. annulata*'da buparvaquone'a karşı direnç gelişiminin ilk *in vivo* kanıtını göstermiştir [42]. İkinci direnç vakası, İran'ın güneyinde yer alan Fars Province'de kaydedilmiştir. Bu

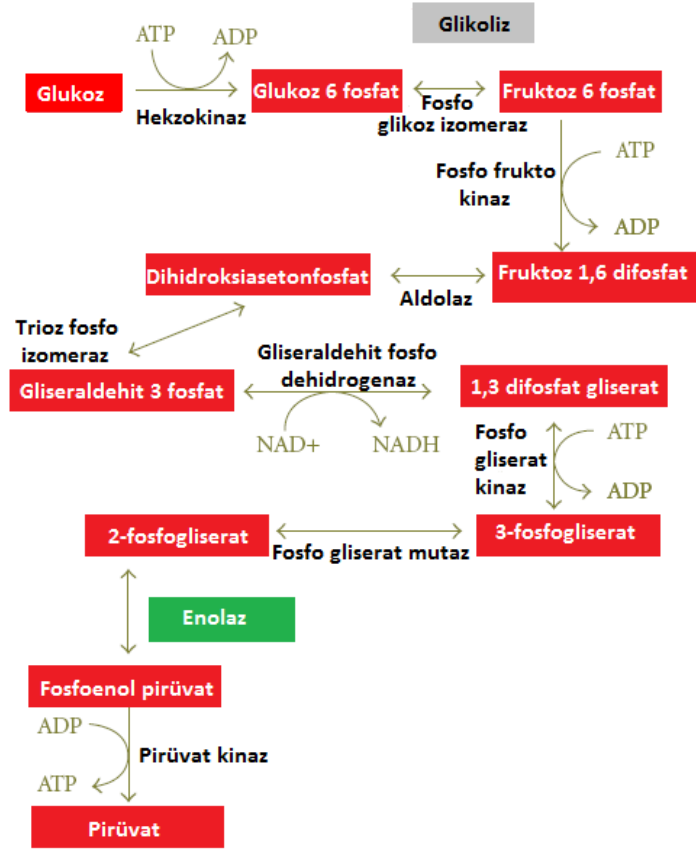
çalışmada, sekiz hayvandan yedi tanesinin tek (5 vaka) ve çift (2 vaka) dozda buparvaquone (2.5 mg/kg) ile enjeksiyonundan sonra bu ilaca karşı gelişen direncin bir sonucu olarak öldükleri bildirilmiştir. Aynı çalışmada, parazite ait mitokondrideki sitokrom b'de bulunan bir nokta mutasyonu olduğu gösterilmiştir ve parazitin buparvaquone tedavisine karşı göstermiş olduğu direncin bu mutasyondan kaynaklanabileceği öne sürülmüştür [45].

Tunus'ta ilaç direncinin yaygınlaşıp yaygınlaşmadığı henüz bilinmemektedir; bununla birlikte dünyanın bazı bölgelerinde tedavideki başarısızlıkların daha yaygın hale geldiği veterinerler tarafından bildirilmektedir [42].

Bu durum farklı şekilde etki gösteren ve sürekli kullanılabilecek olan yeni anti-theilerial ilaçların tasarımına olan ihtiyacın önemini vurgulamaktadır ve bu nedenle direnç gelişimi yaygınlaşmadan ilaç tasarım çalışmaları yapılmalıdır. Genom çalışmaları ve genlerin karakterizasyonu anti-parazitik ilaçların dizaynı için yeni potansiyel hedefler olan elzem metabolik enzimler üzerine yoğunlaşan çalışmaların önünü açacaktır [46], [47].

1.1.5 Enolaz Enzimi ve İlaç Tasarımında Kullanım Potansiyeli

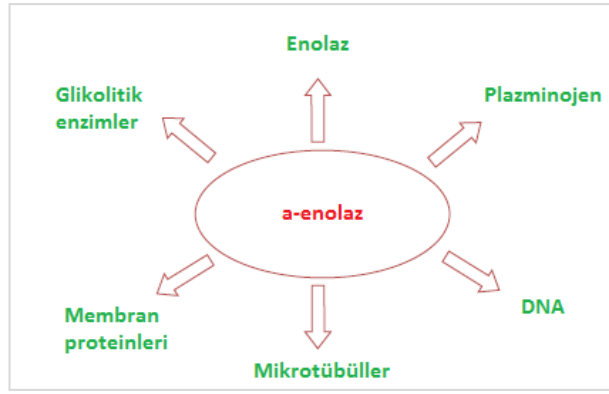
Fosfopirüvat hidrataz olarak da bilinen enolaz, 1934 yılında Lohman ve Mayerhof tarafından bulunmuştur [48]. Enolaz, hücre fonksiyonu için hayati önem taşıyan iki metabolik yol olan glikoliz ve glikoneogenezde D-2-fosfoglisaratın (2PGA) ve fosfoenolpirüvatın (PEP) tersinir bir şekilde birbirine dönüşümünü gerçekleştirmekle sorumlu olan bir enzimdir. İleriye doğru olan reaksiyon glikolizin dokuzuncu basamağı, geriye doğru olan reaksiyon ise glikoneogenezin ilk basamağıdır [49], [50] (Şekil 1.4). Enolaz katalizörlüğünde oluşan ileri reaksiyon ürünü PEP, glikoliz ile ATP eldesindeki ikinci en yüksek enerjili ara üründür [51].



Şekil 1. 4 Glikolitik metabolik yolun şematik olarak gösterimi [48]

Bu enzim, katalitik aktivitesi için metal iyonu magnezyuma (Mg^{+2}) gereksinim duyan bir metalloenzimdir. Enolaz arkebakterilerden memelilere kadar pek çok organizmada bulunur ve enolazı kodlayan genin dizisi yüksek oranda korunmuştur [48], [52]. Omurgalılarda, enzim üç izoform halinde bulunur: α -enolaz (Eno1) insan dokularının neredeyse tamamında, β -enolaz (Eno3) genellikle kas dokularında ve γ -enolaz (Eno2) sadece nöron ve nöroendokrin dokularda bulunur [48], [53]. Her bir enolaz izoformu sekans ve kinetik özellikler açısından yüksek oranda benzerlik gösterir [48], [54], [55], [56]. Enzimatik olarak aktif olan enolaz enzimi dimerik (homo- ya da heterodimer) formda bulunur ve birbirlerine antiparalel olan iki alt ünitelerden oluşur [48], [56], [57].

α -enolaz enzimatik olarak aktif dimerler oluşturmak için diğer enolaz izoformları ile (α , β , ve γ) ve pirüvat kinaz, fosfogliserat mutaz ve aldolaz gibi diğer glikolitik enzimlerle direkt olarak etkileşebilir. Enzim aynı zamanda F-aktin ve tubulin gibi mikrotübül ağ proteinlerine bağlanabilir; hücre yüzeyinde bulunabilir; plazminojen ve plazmine bağlanabilir ve diğer membran proteinleri ile etkileşebilir [48] (Şekil 1.5).



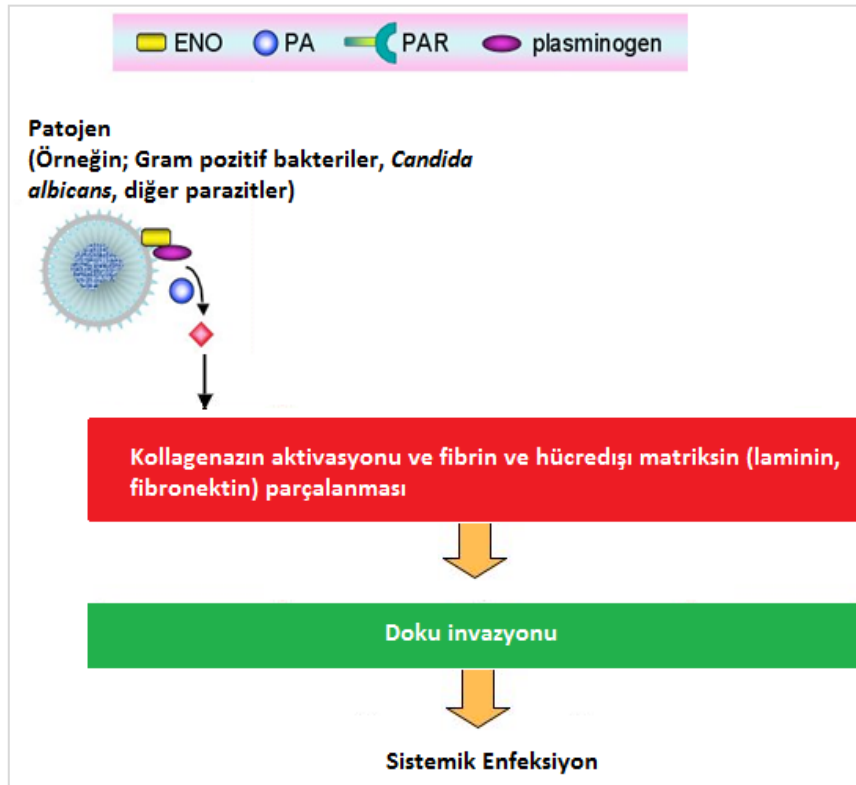
Şekil 1. 5 Enolazın diğer nüklear, sitoplazmik ve membran proteinleri ile olan etkileşimi [48]

İlaç tasarım çalışmalarının ilk aşaması parazitin yaşaması için elzem olan makromoleküler bir hedefin belirlenmesidir. Bu bağlamda glikolitik enzimler umut vaat eden adaylardır [58]. Yapılan çalışmalarda, herhangi bir glikolitik enzimin inhibisyonunun parazit yaşamının da inhibe olmasına sebep olacağı öne sürülmüştür [59], [60]. Bir protein molekülünü ilaç hedefi haline getirebilmek için konaktaki homologundan ayırt edilebilir bir şekilde farklı olması ve bu proteinin parazitin yaşamı için elzem bir metabolik basamakta yer alması gerektiği vurgulanmıştır. Bu gibi moleküllerin veya yapısal domainlerin aşı dizaynı için üstün aday antijenler olabileceği bildirilmiştir [59].

Metabolik potansiyellerini belirlemek için yapılan *Theileria* ve *Plasmodium* parazitlerinin karşılaştırmalı genom dizisi analizleri her iki parazitte de eksiksiz bir TCA döngüsünün tam olarak fonksiyonel olmadığını göstermektedir [61]. Yapılan çalışmalar glikolizin, *Plasmodium*'da olduğu gibi *Theileria*'da da enerji üretimi için temel yol olduğu öne sürülmüştür [62]. Akat [63], *Theileria annulata* Elazığ ve Ankara soylarının enolaz nükleotid dizisini karşılaştırdığı zaman, aralarında 37 bazlık farklılığın 3 amino asit değişikliğine sebep olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca *T. annulata* enolazı (*TaENO*) ile konak *Bos taurus*'taki eşdeğeri olan kas enolazını amino asit düzeyinde karşılaştırdığı zaman, *T. annulata* enolazında konak *Bos taurus*'ta bulunmayan, biri pentapeptid diğeri dipeptid olmak üzere iki insersiyon bölgesinin varlığını tespit etmiştir. Bu iki insersiyonun yapılan modelleme çalışmaları sonucunda konak *Bos taurus* enolazında

bulunmayan birer halka oluşturduğunu ve oluşan bu halkaların spesifik enzim inhibitörleri için birer bağlanma bölgesi olabileceğini önermiştir.

Enolazın enerji eldesi için gerekli glikolitik bir enzim olmasının yanında, hücre yüzeyinde bulunmasının parazitin enfeksiyon sürecine katkı sağladığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda glikolitik bir enzim olan enolazın birçok prokaryotik ve ökaryotik hücre sitoplazmasında ve hücre yüzeyinde yer aldığı saptanmış ve birçok fizyolojik ve patofizyolojik durumda rol aldığı belirtilmiştir [64]. Enolazın, insan [65, 66], *Schistosoma bovis* [67], *Streptococcus pneumoniae* [68], *Schistosoma japonicum* [69], A grubu streptococci [70], *Leishmania mexicana* [71, 72], *Trypanosoma cruzi* [73], *Trichomonas vaginalis* [74], *Candida albicans* [75] ve *Plasmodium falciparum* [76] gibi birçok canlının hücre yüzeyinde plazminojen reseptörü olarak görev aldığı belirtilmiştir.



Şekil 1. 6 Bazı patojenler için konak dokuya geçiş mekanizması (ENO: enolaz, PA: plazminojen aktivatörü, PAR: plazminojen (aktivatör) reseptörü) [64]

Plazminojen reseptörü enolaz ile hücre yüzeyindeki plazminojen seviyesindeki artışı, patojene hızlı bir şekilde proteolitik enzim kaynağı sağlamaktadır. Bu enzimler, konaktaki hücre dışı matriksin geçirgenliğini arttırmakta ve parazitin dokuya geçişini

hızlandırmaktadır. Enolazın birçok invazif patojenin yüzeyinde bulunması ve dokuya invazyonda önemli bir rol alması da belirli enfeksiyonlarda tanı aracı olmasını ya da tedavi süreci için hedef molekül olarak seçilmesini uygun hale getirmektedir [64].

Tüm bu bilgiler ışığında, *T. annulata*'nın temel enerji eldesi kaynağı olan glikolitik yolda önemli bir rol alan ve yapılan son çalışmalarla hücre yüzeyinde plazminojen reseptörü olarak da, parazitin konak hücreye invazyonuna katkı sağlayan enolaz enzimi, konak *Bos taurus* enolazı ile aminoasit düzeyinde belirli farklılıklar içermesi nedeniyle inhibitör çalışmaları için uygun bir hedef niteliğindedir.

1.1.6 Yönlendirilmiş Mutagenез ve Protein Analizlerinde Kullanımı

Genlerin fonksiyonunu anlayabilmek için DNA dizisini değiştirmek ve bu değişikliğin yapısal ve fonksiyonel olarak etkisini incelemek önem taşımaktadır [77]. Bu amaçla, hücrelerin ya da organizmaların radyasyon veya kimyasal mutajenler ile mutasyona uğratıldıktan sonra, hayatta kalan popülasyonda istenen mutasyonların tespiti için analizleri gerekmektedir. Rekombinant DNA teknolojisi sayesinde, bu analizler ve manipülasyonlar için gen klonlamak ve yeterli miktarda DNA ürünü üretmek mümkündür. Bu, test tüpleri içinde DNA'da mutasyonlar oluşturabilmek, bu DNA'yı hücreye transformasyon veya enfeksiyon ile geri koyabilmek ve mutasyonun etkilerini gözlemleyebilmek anlamına gelmektedir. Bu işlem, yönlendirilmiş (site-specific) in vitro mutagenез olarak adlandırılır [78].

Yönlendirilmiş mutagenез, istenilen bölgeye tam olarak mutasyonun yerleştirilmesidir. Bu yöntem ile spesifik DNA dizilerin rolü tam olarak tanımlanabilmektedir. Yönlendirilmiş mutagenез, protein yapı-işlev ilişkilerinin incelenmesi ve protein mühendisliğinde kullanılan güçlü bir araçtır. Yeni özellikteki bir enzimin oluşturulmasında da bu yöntem sıklıkla kullanılmaktadır. Yönlendirilmiş mutagenезe, protein-yapı işlev ilişkisinin incelenmesinden başka gen ekspresyonunu etkileyen faktörlerin anlaşılmasında, vektör modifikasyonlarında ve bulaşıcı hastalıklar, kanser gibi bazı kompleks mekanizmalar hakkında bilgiye ulaşmada başvurulmaktadır [79], [80], [81], [82].

Yönlendirilmiş mutagenез ile nokta mutasyonları, küçük delesyonlar ve insersiyonlar oluşturulabilir [78]. İn vitro mutagenез prosedürlerinin birçoğu temelde aynı basit planı izler; (i) Plazmit DNA'da ilgilenilen bölgede mutasyon, (ii) Mutasyona uğratılmış plazmitin kompetant hücreye transformasyonu, (iii) Mutant plazmiti içeren kolonilerin ayrılması [79], [83].

Bir DNA fragmanında bir iki baz değişikliği oluşturmak için en sık kullanılan yönlendirilmiş mutagenез yöntemi ise, istenilen değişikliği içeren PCR primerleri sentezleme yoludur. Bu yöntemde, örneğin AAG CCG GAG GCC CCA dizisinde, ortadaki A'nın T'ye değişmesi isteniyor ise, PCR primeri bu baz değişimini içerecek şekilde tasarlanır, AAG CCG GTG GCG CCA. Bu mutant primer, yabancı DNA'yı kalıp olarak kullanarak istenilen DNA fragmanını amplifiye etmek üzere PCR primerleri çiftinden biri olarak kullanılır ve istenilen mutasyonu içeren PCR ürünleri elde edilir. Ancak mutasyon, primerlerin her iki taraftan da doğru yerlere bağlanabileceği kadar uçlara yakın olduğu sürece DNA ürünü primerde yapılan değişikliğe bağlanacaktır. Daha sonra mutant PCR ürünü orijinal genin doğru yerine geri yerleştirilir [78].

Bu tez çalışmasında PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi *Theileria annulata*'nın enolaz enzimin kodlayan genden intronun uzaklaştırılması (delesyonu) amacıyla kullanılmıştır.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, tropikal theilorisise karşı alternatif tedavi yöntemlerinde hedef molekül olarak çalışılması için, *Theileria annulata*'nın enolaz enziminin introndan arındırılarak ifadesinin yapılması, enzimin aktif olarak üretilmesi ve yüksek miktarlarda saflaştırılarak kinetik karakterizasyonunun yapılmasıdır.

1.3 Hipotez

Yönlendirilmiş mutagenез yöntemi ile *TaENO* geninden intronun çıkarılması durumunda, genin uygun bir ekspresyon sistemine aktararak, ileride ticari amaçlarla kullanılacak bir proteinin aktif ve yüksek miktarda sentezlenmesinin önünün açılacağı öngörülmektedir.

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 MATERYAL

2.1.1 Kimyasal Maddeler, Enzimler ve Kitler

Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılan *Pfu* DNA Polimeraz enzimi ve tampon çözeltisi, ligasyon için kullanılan T4 DNA Ligaz enzimi ve tampon çözeltisi Promega'dan (ABD), *Taq* DNA polimeraz enzimi, tampon çözelti ve $MgCl_2$ çözeltisi, Long PCR Enzyme Mix DNA Polimeraz enzimi ve tampon çözeltisi, genin restriksiyonu için kullanılan *PstI* enzimi Fermentas'tan (ABD) temin edilmiştir.

Plazmid DNA izolasyonunda kullanılan QIAprep Spin Miniprep Kit QIAGEN'den (Almanya), PCR ürünlerinin jelde yürütüldükten sonra saflaştırılmasında kullanılan Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Promega (ABD)'den temin edilmiştir.

Agaroz jel elektroforezi sırasında DNA bantlarının büyüklük tayininde kullanılan O'GeneRuler DNA Ladder Mix (markera ait DNA bantlarının büyüklükleri baz çifti (bç) olarak sırasıyla verilmiştir: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100) Fermentas'tan (ABD), DNA bantlarının konsantrasyonunun tayininde kullanılan Lambda DNA Hind III Digest (markera ait DNA bantlarının büyüklükleri ve DNA bantlarının konsantrasyonu sırasıyla verilmiştir: 23130 bç (238,4ng/0,5µg), 9416 bç (97,1ng/0,5µg), 6557 bç (67,6ng/0,5µg), 4361 bç (45ng/0,5µg), 2322 bç (23,9ng/0,5µg), 2027 bç (20,9ng/0,5µg), 564 bç (5,8ng/0,5µg), 125 bç (1,3ng/0,5µg)) Amersham Pharmacia Biotech (ABD)'den temin

edilmiştir. SDS-PAGE analizi sırasında protein bantlarının moleküler ağırlıklarının belirlenmesi için kullanılan Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (markera ait protein bantlarının molekül ağırlıkları kDa cinsinden sırasıyla verilmiştir: 260, 140, 100, 70, 50, 40, 35, 25, 15, 10) Thermo Scientific'ten (ABD) sağlanmıştır.

İfade edilen proteinin saflaştırılmasında kullanılan açılımı nikel nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) Agaroza QIAGEN'den (Almanya) temin edilmiştir.

Deneyisel çalışmalarda kullanılan diğer bütün kimyasallar BDH, Sigma, Bio-Rad, Roche ve Merck'ten sağlanmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonlarında ve DNA dizi analizinde kullanılan primerler Lontek (Türkiye) ve Biogen firmaları tarafından sentezlenmiştir. PCR temelli mutagenizasyon tekniğiyle elde edilen PCR ürünlerinin ve ifade vektörüne klonlama sonrasında elde edilen plazmid DNA'ların dizi analizi Lontek ve Biogen firmasına yaptırılmıştır.

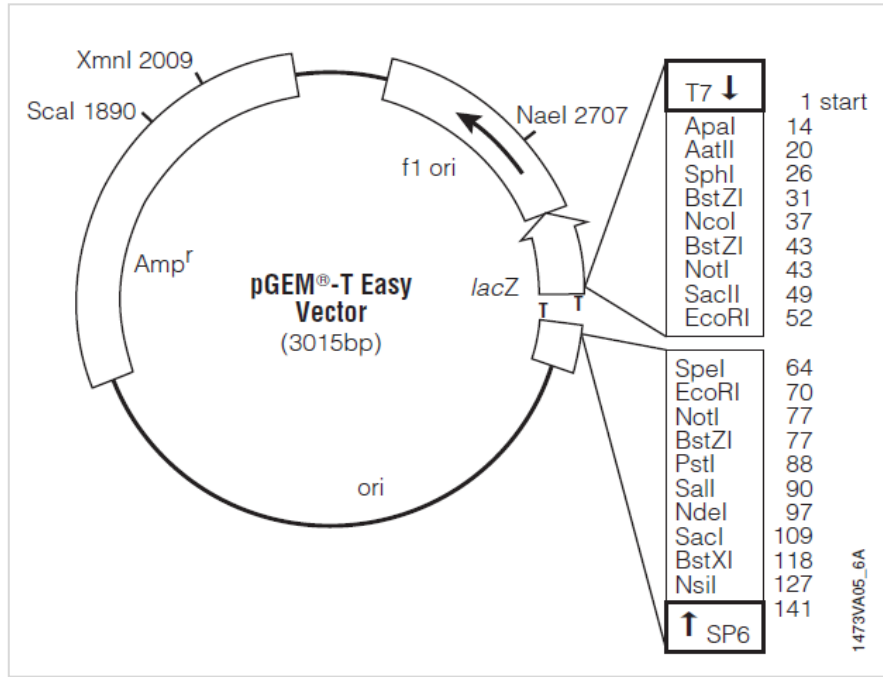
2.1.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar

- Soğutmalı Santrifüj- Sigma
- Mikrosantrifüj- Sigma
- UV -Visible Spectrophotometre- Thermo
- Otoklav- Systec
- Çalkalamalı İnkübatör- GFL
- Etüv- Binder
- Vorteks- Heidolph
- Hassas Terazisi- Ohaus
- Saf Su Cihazı- GFL
- Jel Görüntüleme sistemi- Biorad
- Termal Döndürücü- Eppendorf
- Şarjlı Pipet Ünitesi- Hirschmann
- pH Metre- Eutech
- Su Banyosu- Kerman
- Manyetik Karıştırıcı- Heidolph
- Yatay Elektroforez Sistemi- Biorad

- PCR Çalışma Kabini- Esco
- Dikey Elektroforez Sistemi-Biorad
- Sonikatör- Blandelin
- Jel Kurutma Ünitesi- Biorad

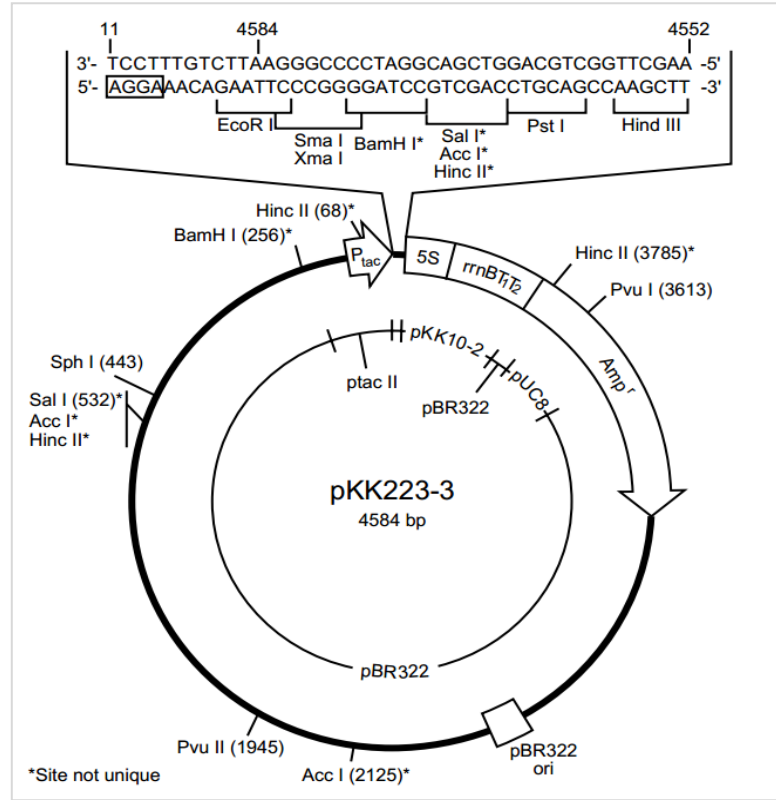
2.1.3 Klonlama ve İfade Vektörleri

pGEM[®]-T Easy vektör sistemi PCR ürünlerinin klonlanmasında elverişli ve her iki ucunda da 3'-terminal timidin içeren lineer bir vektördür. Klonlama bölgesindeki T-kuyruğu vektörün yeniden sirküler hale dönmesini engelleyerek ve belli termostabil polimeraz enzimleriyle üretilmiş uyumlu kuyruğa sahip PCR örnekleri sayesinde ligasyon örneklerinin etkinliğini yüksek derecede artırır. pGEM[®]-T Easy vektör sistemi Promega (ABD)'den temin edilmiştir (Şekil 2.1) [84].



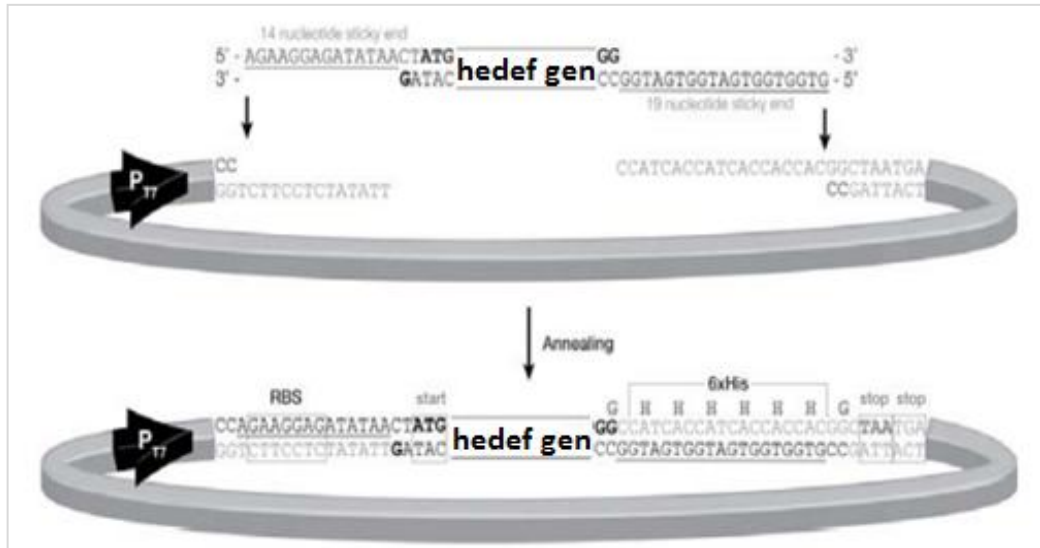
Şekil 2. 1 pGEM[®]-T Easy klonlama vektörü [84]

Protein ekspresyonu için kullanılan birinci ifade vektörü pKK223-3, PharmaciaLKB Biotechnology (İsveç)'den temin edilmiştir (Şekil 2.2) [85].



Şekil 2. 2 pKK223-3 ifade vektörü [85]

Protein ekspresyonu için kullanılan ikinci ifade vektörü ise aLICator™ LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) sistemi ile birlikte kullanılan pLATE31 vektörü Thermo Scientific, ABD'den temin edilmiştir (Şekil 2.3) [86].



Şekil 2. 3 pLATE31 ifade vektörü [86]

2.1.4 *Escherichia coli* soyları

DH5 α : {F- *endA* *hsdR*J7 (*r*-, *mit*) *supE*44 *thi*-J *ArecA* *gyrA*96 *relA* *deoR* Δ (*lacZ*YA-*argF*)-U169 480d/*lacZ*AM15}

BL21 (DE3): *fhuA*2 [*lon*] *ompT* *gal* (λ DE3) [*dcm*] Δ *hsdS*

λ DE3 = λ *sBam*H10 Δ *EcoRI*-B *int*::(*lacI*::*PlacUV5*::T7 *gene1*) *i21* Δ *nin5*

2.1.5 Bakteriyolojik Gelişim İçin Gerekli Besiyerleri

Çift Kuvvetli Yeast-Trypton (2xYT) Agar

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

Çift Kuvvetli Yeast-Trypton (2xYT) Buyyon

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

LB (Luria-Bertani) Buyyon

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

LB (Luria-Bertani) Agar

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

SOC Buyyon (100 ml için)

Maya Ekstraktı	0,5 g
Trypton	2 g
1 M NaCl stok solüsyonundan	1 ml
1 M KCl stok solüsyonundan	0,25 ml
2 M Mg ⁺² stok solüsyonundan (Filtre ile sterilize edilir)	1 ml
2 M Glikoz stok solüsyonundan (Filtre ile sterilize edilir)	1 ml

Trypton, maya ekstraktı, 1 M NaCl ve 1 M KCl solüsyonlarından gerekli miktarlar eklenerek distile su ile 97 ml'ye tamamlanır. Karışımın pH'sı 7,0 olarak ayarlanır. Otoklavda sterilize edilir. Oda sıcaklığına getirilir. 2 M Mg⁺² ve 2 M Glikoz solüsyonları son konsantrasyonları 20 mM olacak şekilde karışıma ilave edilir. Son hacim steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2.1.6 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar

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 ile 1x TAE'ye seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlanır.

Agaroz Jel İçin Örnek Uygulama Tamponu (EtBr-SAB, Sample Application Buffer)

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

Kristal Viyole (CV) Solüsyonu

dH₂O ile 5 mg/ml stok solüsyonu hazırlanır. Karanlık bir ortamda muhafaza edilir.

Kristal Viyole Jel İçin Örnek Uygulama Tamponu (Cv-SAB)

Gliserol 500 µl/ml

1xTAE 500 µl/ml

Kristal viyole (stok 5 mg/ml) 10 µl/ml

Karanlık bir ortamda muhafaza edilir.

CaCl₂ Solüsyonu

100 mM CaCl₂.6H₂O 21,9 g/l

5 mM MgCl₂.6H₂O 1,02 g/l

5 mM Tris-HCl (pH:7.6) 5 ml/l (1 M pH'sı 7,6 olan stok Tris-HCl çözeltisinden)

Solüsyon hazırlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilir.

Amfisilin

100 mg/ml stok solüsyon hazırlanır ve filtre ile sterilize edilir.

IPTG (Isopropyl-B-D-thiogaltopyranoside)

20 mg/ml stok solüsyon hazırlanır ve filtre ile sterilize edilir.

X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactopyranoside)

20 mg/ml konsantrasyona ulaşmak için 0,02 g X-Gal tartılır, N,N-dimetilformamid (DMF) ile 1 ml'ye tamamlanır. Filtre ile sterilize edilir.

Mg⁺² Stok Solüsyonu (100 ml)

MgCl₂.6H₂O 20,33 g

MgSO₄.7H₂O 24,65 g

Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Filtre ile sterilize edilir.

SDS-PAGE İçin rnek Uygulama Tamponu (SDS-SAB)

%10 SDS	1 g/10 ml
0,5 M Tris HCl (pH: 6.8)	0,6 g/10 ml
% 5 Gliserol	0,5 ml/10 ml
% 25 β -Merkaptoethanol	0,25 ml/10 ml
% 0,05 Bromfenol mavisi	0,005 g/10 ml

5x SDS-PAGE Tank Tamponu

0,025 M Trizma Base	15 g/l
0,192 M Glisin	72 g/l
% 0,1 SDS	5 g/l

dH₂O ile 1x'e seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlanır ve 5 defa aynı tampon kullanılabilir.

% 30 Akrilamid/Bis alışma Solüsyonu

Akrilamid	29 gr/100 ml
N, N'-Metilen-Bis-Akrilamid	1 gr/100 ml

Protein Boyama Solüsyonu

% 0,1 Coomassie Brilliant Mavisi
% 40 Metanol
% 10 Glasiyal Asetik Asit

Boya Uzaklaştırıcı (Destaining) Solüsyon

% 5 Metanol
% 7 Asetik Asit

Boya uzaklaştırıcı solüsyon kullanıldıktan sonra aktif kömür tozu ilave edilerek Coomassie Brilliant Mavisi keltirir. Solüsyon filtre kağıdından süzülerek tekrar kullanılabilir.

0,5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH: 7.5) Tampon Çözeltisi

0,5 M Na_2HPO_4 (pH: 7.5)

0,5 M KH_2PO_4 ile pH ayarlanır.

Bu tampon birinci ifade vektörü (pKK223-3) aracılığıyla elde edilen proteinin saflaştırılmasında kullanılmıştır.

Hücre Lizisi ve Kolon Yıkama Tamponu 1

% 10 0,5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH: 7.5)

% 10 Gliserol

300 mM NaCl

20 mM İmidazol

Bu tampon birinci ifade vektörü (pKK223-3) aracılığıyla elde edilen proteinin saflaştırılmasında kullanılmıştır.

Protein Elüsyon Tamponu 1

% 10 0,5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH: 7.5)

% 10 Gliserol

300 mM NaCl

250 mM İmidazol

Bu tampon birinci ifade vektörü (pKK223-3) aracılığıyla elde edilen proteinin saflaştırılmasında kullanılmıştır.

Lizis tamponu 2 (1 litre)

50 mM NaH_2PO_4 6,90 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW 137.99 g/mol)

300 mM NaCl 17,54 g NaCl

10 mM imidazole 0,68 g imidazole

NaOH kullanılarak pH : 8,0'a ayarlanır.

Bu tampon ikinci ifade vektörü (pLATE31) aracılığıyla elde edilen proteinin

saflaştırılmasında kullanılmıştır.

Yıkama tamponu 2 (1 litre)

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,90 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (MW 137.99 g/mol)
300 mM NaCl	17,54 g NaCl
20 mM imidazole	1,36 g imidazole

NaOH kullanılarak pH : 8,0'a ayarlanır.

Bu tampon ikinci ifade vektörü (pLATE31) aracılığıyla elde edilen proteinin saflaştırılmasında kullanılmıştır.

Elüsyon Tamponu 2 (1 litre)

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,90 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (MW 137.99 g/mol)
300 mM NaCl	17,54 g NaCl
250 mM imidazole	17,00 g imidazole

NaOH kullanılarak pH : 8,0'a ayarlanır.

Bu tampon ikinci ifade vektörü (pLATE31) aracılığıyla elde edilen proteinin saflaştırılmasında kullanılmıştır.

Enzim Aktivite Ölçümü İçin Tampon Solüsyonu

50 mM Tris/HCl (pH :7,4)

1,5 mM MgCl₂

Enzim Aktivite Ölçümü İçin Substrat Solüsyonu

1,5 mM 2-PGA

Taze Milipore saf su ile hazırlanır.

2.1.7 İntronlu *Ta*ENO Genini İçeren Plazmid DNA

İntron içeren *Therileria annulata* enolaz enzim geninin bulunduğu pGEM-T Easy plazmid DNA'sı, grup elemanlarından Ayberk Akat'ın yapmış olduğu yüksek lisans tez çalışmasından sağlanmıştır [63].

2.1.8 Primerler

Theileria annulata ENO enzimini kodlayan genin introndan arındırılması ve ifadesinin sağlanması çalışmalarında kullanılmak üzere aşağıda verilen 8 adet spesifik primer tasarlanmıştır.

TaENO2:

5' TTTTCTGCAGTTAGTGATGGTGATGGTGATGGTGGGACAAGTTTCTG 3'

GC içeriği: % 45 T_m: 68,9°C

TaENO4:

5' TTTTCTGCAGATGTCTGTTGTTAAGTCTCTTAAAGCCCGGGAAATTCTTGATTCCAGAGG 3'

GC içeriği: % 42 T_m: 70,9°C

TaENO6:

5' TTTTCTGCAGATGTCTGTTGTTAAGTCTCTTAAAGCCCGGGAAATTCTTGTTTTGTGTTAATAA
CAATTTT TAG 3'

GC içeriği: % 33 T_m: 69,2°C

TaENO7:

5' TTTTCTGCAGATGTCTGTTGTTAAGTCTCTTAAAGCCCGGGAAATTCTTGAACAATTTT TAGAT
TCCAGAGG 3'

GC içeriği: % 38 T_m: 71°C

TaENO8:

5' GGAAATTCTTGATTCCAGAGGAAATCC 3'

GC içeriği: % 41 T_m: 56,7°C

TaENO9:

5' GGATTCCTCTGGAATCAAGAATTCC 3'

GC içeriği: % 41 T_m: 56,7 °C

TaENO pLATE31F:

5'-AGAAGGAGATATAACTATGTCTGTTGTTAAGTCTC 3'

GC içeriği: % 34 **T_m:** 59,7 °C

TaENO pLATE31R:

5'-GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGTGGGACAAGTTTCTG 3'

GC içeriği: % 57 **T_m:** 70 °C

Ayrıca PCR ürünü ve plazmid DNA örneklerinin dizilemeleri için 4 adet primer kullanılmıştır;

TaENO5:

5' CATTCTGCGTGCCG 3'

GC içeriği: % 64 **T_m:** 46 °C

pKK223-3 N terminal:

5' CGACATCATACCGTTCTGG 3'

GC içeriği: % 55 **T_m:** 53,8 °C

pKK223-3 C terminal:

5' GTATCAGGCTGAAAATCTTC 3'

GC içeriği: % 40 **T_m:** 47,7 °C

5' LIC primeri:

5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3'

GC içeriği: % 40 **T_m:** 47,7 °C

2.2 YÖNTEM**2.2.1 Plazmid DNA İzolasyonu**

İntronlu *Theileria annulata* Elazığ soyu enolaz enzim geninin bulunduğu pGEM®-T Easy klonlama vektörünü içeren *E. coli* bakteri soyu, – 80 °C'deki gliserol stok kültürden

alınarak 100 µg/ml ampicilin içeren çift kuvvetli (2xYT) agar besiyerine sürme ekimi yapılır ve 37 °C'de bir gece inkübe edilerek geliştirilir. Seçilen kolonilerden bir tanesi steril bir kürdan yardımıyla alınarak 100 µg/ml ampicilin içeren 5 ml 2xYT buyyona aktarılır, bir gece 37 °C ve 150 rpm'de çalkalamalı etüvde inkübe edilir. Bir gecelik kültürden 1,4 ml alınarak 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınır ve plazmid DNA QIAprep®Miniprep (QIAGEN) kit aracılığıyla izole edilir [87]. GenBank erişim numarası HQ646253 olan 1365 baz çifti (bç) büyüklüğündeki intronlu *TaENO* gen dizisi Çizelge 2.1'de verilmiştir. *TaENO* geninin içerdiği intronun büyüklüğü 36 bç'dir ve intronsuz *TaENO* geni 1329 bç büyüklüğündedir.

Çizelge 2. 1 *Theileria annulata* enolaz enzimini kodlayan genin intronlu nükleotid dizisi, GenBank erişim numarası: HQ646253 (intron dizisi kırmızı ile gösterilmiştir) [63]

1	atgtctgttg	ttaagtctct	taaagcccg	gaaattcttg	gtaagtagat	ccttttgtgt
61	taataacaat	tttttag	attc	cagaggaaat	cccaccgttg	aagtcgatct
121	gccggcctgt	ttagagcagc	ctgtccatca	ggagcctcaa	ctggaattta	tgaagcccta
181	gaattgcgag	atggagacaa	aagccgttat	ttgggttaaag	gtgtactgaa	agcagttgaa
241	aatgttaaca	cagttgtgaa	aaatgcagtt	gtaggattcg	atacgttgaa	tcagaaggaa
301	ttagatacct	tgatggtaca	gaaattggac	ggcacgcaga	atgaatgggg	atactgtaag
361	tcaaaacttg	gagcaaacgc	aatcttggt	gtatcaatgg	cagcagccag	agcagcagca
421	gccaaaagg	gagtaccact	ttatgttcat	ctagctcaac	tggcaggaaa	accgacagac
481	aaatttgtgt	tgccagtccc	atgcttgaac	gtcattaacg	gtggatcaca	cgccggaaac
541	agcctggcta	tgcaagagtt	tatgattctg	ccaactggag	ccaacacggt	tagagaagca
601	ttacaaatgg	gggcagaagt	ttatcacacc	ctgaaatcgg	tcataaagaa	gaagtacggc
661	caagacacaa	caaacgtggg	agatgaagga	ggctttgcac	ccaatatcaa	atcagcagaa
721	gaggcactag	atctcctagt	tgatgcagta	aaaaaggctg	gatttgaagg	gaaagtcaat
781	tttgccatgg	atgtcgcagc	atcagaattc	tatgtgaaag	agaagtcac	atacaacctc
841	ggattcaaat	gtgaaaagga	actcctcaaa	actggagacg	aaatggttga	atattacaca
901	aacctgtgtg	aaaagtatcc	aattgtttcc	atagaggatc	ctttcgacca	agatgactgg
961	gagtgtctaca	ataagcttac	gtcaaagctt	ggacaaaagg	tccagattgt	aggagacgat
1021	cttctcgtta	caaaccctca	gaggattcaa	acagcattgg	aaaagaaggc	ttgcaacgca
1081	cttttgcctca	aagtaaacca	gattggatca	gtgactgagt	cagttgaagc	ctgcttactg
1141	gccacaaaa	acaattgggg	agtcattggt	tcacatagat	caggtgaaac	tgaggacaca
1201	tttattgcag	atttggttgt	gggactttca	acaggtcaaa	tcaaaacagg	agcaccttgc
1261	aggagtgaag	ggaacgcaa	gtataaccag	cttttgcgca	tcgaagaaga	gcttggaccc
1321	aaggccacct	acgcaggagt	taacttcaga	aacttgtccc	actaa	

2.2.2 İntron Uzaklaştırılmasında Kullanılan PCR Temelli Yönlendirilmiş Mutagenез Yöntemi

2.2.2.1 PCR Temelli Yönlendirilmiş Mutagenез Yöntemi 1

İntron bölgesinin, *Ta*ENO geninde 5' ucundaki 40. bazdan başlaması ve 36 bç'lik kısa bir DNA dizisi olması nedeniyle, genin 5' ucuna komplementer ve intronlu bölgeyi atlayarak geni tek aşamada intronsuz olarak amplifiye edecek olan mutajenik *Ta*ENO4 primeri ve genin 3' ucuna komplementer olarak tasarlanan *Ta*ENO2 primerleri kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir. Kalıp olarak 2.1.7'de belirtilen plazmid DNA kullanılmıştır. PCR bileşenleri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Amplifikasyon 95°C'de 5 dakika ön denatürasyon, 95°C'de 1,5 dakika denatürasyon, 55 °C'de 2 dakika bağlanma, 72 °C'de 2 dakika uzama ile 25 döngü ve 72 °C'de 10 dakika son uzama olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2. 2 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 1 ile gerçekleştirilen PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
10X <i>Pfu</i> tamponu	5 µl
dNTP karışımı	5 µl (Her bir nükleotid için 2mM içeren stoktan)
<i>Ta</i> ENO4 primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
<i>Ta</i> ENO2 primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
Kalıp DNA	1 µl
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	1 µl (2,5 U/µl stoktan)
Steril dH ₂ O	33 µl (Son hacim 50 µl olacak şekilde)

2.2.2.2 PCR Temelli Yönlendirilmiş Mutagenез Yöntemi 2

Bu yöntemde genin 5' ucundaki intron dizisi 12 bç'lik 3 eşit parçaya ayrılmış ve her bir PCR mutagenезi basamağında introndaki 12 bç'lik intron parçaları sırasıyla uzaklaştırılarak son PCR aşamasında *Ta*ENO geninin intronsuz amplifikasyonu hedeflenmiştir. İlk basamak PCR temelli mutagenез için kalıp olarak 2.1.7'de belirtilen plazmid DNA ile 5' primeri olarak *Ta*ENO6 ve 3' primeri olarak *Ta*ENO2 kullanılmıştır.

İkinci basamakta kalıp olarak, jelde koşturulmaksızın doğrudan saflaştırılan ilk basamak PCR mutagenezi ürünü ile 5' primeri olarak TaENO7 ve 3' primeri olarak TaENO2 kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir. Son aşamada ise kalıp olarak, saflaştırılan ikinci basamak PCR mutagenezi ürünü ile 5' primeri olarak TaENO4 ve 3' primeri olarak TaENO2 kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir. Her PCR basamağında yöntemine uygun 5' ve 3' primerleri kullanılmak koşuluyla yapılan PCR bileşenleri Çizelge 2.2'de verildiği gibidir. Amplifikasyon koşulları 2.2.2.1'de verilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.3 PCR Temelli Yönlendirilmiş Mutagenez Yöntemi 3

Bu çalışmada *TaENO* geni ilk olarak, her ikisinde de introndan önceki ve sonraki belirli diziler bulunan iki ayrı gen parçası halinde amplifiye edilmiştir. İlk gen parçasının amplifikasyonu için kalıp olarak 2.1.7'de belirtilen plazmid DNA, 5' primeri olarak TaENO4, 3' primeri olarak TaENO9 ve amplifikasyon için *Pfu* DNA polimeraz enzimi kullanılmıştır. İkinci gen parçasının amplifikasyonu için de 2.1.7'de belirtilen plazmid DNA kalıp olarak ve 5' primeri olarak TaENO8 ve 3' primeri olarak TaENO2 ve enzim olarak Long PCR Enzyme Mix kullanılmıştır. Yukarıda anlatıldığı şekilde birinci ve ikinci gen parçalarının amplifikasyonuna uygun olarak tasarlanan 5' ve 3' primerleri kullanılmak koşuluyla, gerçekleştirilen reaksiyonun bileşenleri Çizelge 2.3'de verildiği gibidir. Amplifikasyon 94°C'de 1,5 dakika, 58°C'de 2 dakika, 72°C'de 2 dakika ve 20 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2. 3 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3'te birinci ve ikinci gen parçalarının amplifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri

Bileşenler	Birinci gen parçası	İkinci gen parçası
10X tampon	5 µl	5 µl
dNTP karışımı	5 µl (Her bir nükleotid için 2mM içeren stoktan)	5 µl (Her bir nükleotid için 2mM içeren stoktan)
TaENO4 primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)	-
TaENO9 primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)	-
TaENO8 primeri	-	2,5 µl (20 µM stoktan)
TaENO2 primeri	-	2,5 µl (20 µM stoktan)
Kalıp DNA	1 µl	1 µl
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	1 µl (2,5 U/µl stoktan)	-
Long PCR Enzyme Mix	-	1 µl (2,5 U/µl stoktan)
Steril dH ₂ O	33 µl (Son hacim 50 µl olacak şekilde)	33 µl (Son hacim 50 µl olacak şekilde)

Amplifikasyonu sağlanan bu iki gen parçası PCR'larında kullanılan primerler vasıtasıyla birbirine komplementer diziler içerecek biçimde çoğaltılmıştır. İkinci aşamada ise bu komplementer bölgeler vasıtasıyla introndan arındırılmış olarak üretilen iki gen parçası birleştirilmiş ve intronsuz *TaENO* geni bütün olarak amplifiye edilmiştir.

İlk aşamada elde edilen iki PCR ürünü doğrudan saflaştırılmış ve birleştirmek amacıyla yapılan PCR'da bu saf birinci ve ikinci gen parçalarını kullanılmıştır. Konsantrasyon esasına dayalı olarak reaksiyona sokulan birinci ve ikinci gen parçaları için yapılan birleştirilme reaksiyonu bileşenleri Çizelge 2.4'te verilmiştir. PCR koşulları 94°C'de 2 dakika, 50°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika ve 7 döngü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu adımdaki PCR bileşenleri; 10X tampon, dNTP'ler, birinci gen parçası, ikinci gen parçası, *Pfu* DNA Polimeraz ve dH₂O'dur.

Çizelge 2. 4 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3 ile gerçekleştirilen birinci ve ikinci gen parçalarının birleştirilme reaksiyonu bileşenleri

Bileşenler	Miktar
10X <i>Pfu</i> tamponu	3 µl
dNTP karışımı	3 µl (Her bir nükleotid için 2mM içeren stoktan)
Birinci gen parçası	1 µl
İkinci gen parçası	20 µl
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	0,6 µl (2,5 U/µl stoktan)
Steril dH ₂ O	2,4 µl (Son hacim 30 µl olacak şekilde)

Daha sonra bu reaksiyon karışımına geni intronsuz ve tam uzunlukta amplifiye etmek için, TaENO4 5' primeri olarak ve TaENO2 3' primeri olarak ve Çizelge 2.5'te verilen diğer PCR bileşenleri ilave edilmiş ve reaksiyon hacmi 50 µl'ye tamamlanmıştır. Intronsuz *TaENO* genini tam uzunlukta elde etmek için 94°C'de 1.5 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 2,5 dakika ve 20 döngü olarak amplifikasyon yapılmıştır. Birleştirme reaksiyonuna ilave edilen bileşenler; 10X tampon, dNTP'ler, TaENO4 primeri, TaENO2 primeri, *Pfu* DNA Polimeraz ve steril dH₂O'dur [88].

Çizelge 2. 5 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3 ile elde edilen intronsuz *TaENO* geninin tam uzunlukta amplifikasyonu için birleştirilme reaksiyonuna ilave edilen bileşenler

Bileşenler	Miktar
10X <i>Pfu</i> tamponu	2 µl
dNTP karışımı	2 µl (Her bir nükleotid için 2mM içeren stoktan)
TaENO4 primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
TaENO2 primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	0,4 µl (2,5 U/µl stoktan)
Steril dH ₂ O	10,6 µl (ekleme sonrası son hacim 50 µl olacak şekilde)

2.2.3 Etidyum Bromür İle Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi

% 1 agaroz içeren 1x TAE tampon çözeltisi kaynatılır. Oda sıcaklığında 55-65°C'ye kadar

soğutulur ve jel tepsisi hazırlanır. Jel tepsiye dökülmeden önce kaynatılmış olan çözeltiye EtBr ilave edilir. Jel tepsiye dökülür, taraklar yerleştirilir ve katılaşması beklenir. Katılaştıktan sonra tarak çıkartılır. Konsantrasyon tayininde 7 µl steril dH₂O, 2 µl SAB ve 1 µl DNA örneğinin karışımı jele yüklenir. Elektroforez, 40-60 mA'de sürdürülür. Jel ortamında DNA'lar moleküler ağırlıklarına bağlı olarak bir ayırma tabi tutulurlar. Elektroforez sonrası DNA bantları 254-312 nm dalga boyunda UV (ultraviyole) transilluminatöründe görüntülenir [89].

2.2.4 Kristal Viyole ile Boyanan Agaroze Jel Elektroforezi

Kristal viyole ile boyanmış agaroz jel elektroforezi yapılarak *Ta*ENO geninin PCR sonrası saflaştırılması ve jelden geri kazanımı sağlanmıştır. Elektroforez için % 1 agaroz içeren 1x TAE tampon çözeltisi mikrodalga fırında kaynatılır. Oda sıcaklığında 55-65 °C'ye kadar soğutulur. Aynı zamanda jelin döküleceği jel tepsisi hazırlanır. Jeli tepsiye dökmeden önce son konsantrasyon 2 µg/ml olacak şekilde kristal viyole (CV) ilave edilir. Jel tepsiye dökülüp taraklar uygun şekilde yerleştirilip jel kurumaya bırakılır. Jel kuruduktan sonra taraklar çıkarılır. Jel tepsisi 2 µg/ml kristal viyole içeren 1x TAE tampon çözeltisi bulunan elektroforez sistemine yerleştirilir. DNA örneklerine 2 µl CV-SAB tamponu ilave edilerek kuyucuklara yerleştirilip 25-30 mA' de elektroforez yapılır. Elektroforez, DNA bantları jelin 2/3'lük kısmına gelinceye kadar yürütülür. DNA bantları beyaz ışık kutusunda görüntülenir [89].

2.2.5 DNA'nın Jelden Geri Kazanılması

Elektroforez sonrası DNA bantları dilimler halinde jelden kesilerek 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine bırakılır ve DNA, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kullanılarak saflaştırılır [90].

2.2.6 DNA Dizi Analizi

PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез sonrası saflaştırılan PCR ürünlerinin dizi analizleri Iontek (Türkiye) ve Biogen (Türkiye) tarafından gerçekleştirilmiştir. İfade vektörüne aktarım sonrası elde edilen rekombinant DNA plazmidinin dizi analizleri de Iontek (Türkiye) ve Biogen (Türkiye) tarafından gerçekleştirilmiştir.

2.2.7 İtronlarından Arındırılan *Ta*ENO Geninin Klonlama Vektörüne Aktarılması

İntrondan arındırılan *Ta*ENO geninin ifade vektörüne aktarımında yaşanabilecek herhangi bir sorun karşısında tüm mutagenез işlemlerinin tekrarlanmasını önlemek için intronsuz olarak elde edilen gen klonlama vektörüne aktarılmıştır. Bu amaçla pGEM®-T Easy vektör sistemi kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda intronsuz *Ta*ENO geninin klonlama vektörüne aktarımı gerçekleştirilmiştir [84].

pGEM®-T Easy vektör sistemine aktarımı için, DNA dizi analizi ile introndan arındırıldığı ispatlanan PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3 ile elde edilen PCR ürünü kullanılmıştır.

Gen klonlama başarısı, transformasyon sonrasında seçilen kolonilerden izole edilen plazmid DNA'ların kalıp DNA olarak kullanıldığı ve Çizelge 2.2'de verilen bileşenler ile gerçekleştirilen PCR aracılığıyla kontrol edilmiştir. Amplifikasyon koşulları 2.2.2.1'de verilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.2.8 *Ta*ENO Geninin Birinci İfade Vektörüne (pKK223-3) Aktarılması

2.2.8.1 *Ta*ENO Geninin Klonlama Vektöründen Amplifikasyonu

*Ta*ENO geninin ifadesi için ilk seçilen ifade vektörü pKK223-3 vektörüdür. Genin seçilen vektöre uygun şekilde aktarılabilmesi için restriksiyon analizi yapılmış, geni ve vektörü kesmeyen restriksiyon enzimleri belirlenerek uygun primerler tasarlanmıştır. Bu amaçla *Pst*I enzim kesim bölgesini içeren 5' *Ta*ENO4 ve 3' *Ta*ENO2 primerleri sentezlenmiştir. Klonlama işleminin ardından protein ürününün saflaştırılması amacıyla 3' primerine histidin amino asidine ait 6 adet kodon (6 His-tag) sentez sırasında eklenmiştir. Klonlama işleminin ilk basamağında kalıp olarak 2.2.7'de verilen intronsuz *Ta*ENO genini içeren pGEM®-T Easy plazmid DNA'sı kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir. PCR'da 5' primeri olarak *Ta*ENO4 ve 3' primeri olarak *Ta*ENO2 ve Çizelge 2.2'de verilen diğer bileşenler kullanılarak intronsuz genin amplifikasyonu sağlanmıştır. Amplifikasyon koşulları 2.2.2.1'de verilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.2.8.2 İntronsuz *Ta*ENO Geni ve pKK223-3 İfade Vektörünün Restriksiyon Endonükleaz İle Kesimi

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucu elde edilen ürün Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kullanılarak jelde koşturulmaksızın doğrudan saflaştırılmıştır [90]. Saflaştırılan ürün ve plazmid izolasyonu yapılan vektör *Pst*I restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak kesilmiş ve yapışkan uçlar elde edilmiştir (Çizelge 2.6).

Çizelge 2. 6 *Ta*ENO geni ve pKK223-3 vektörü için restriksiyon koşulları

Bileşenler	<i>Ta</i> ENO	pKK223-3
DNA	20 µl	20 µl
10x Tampon O	3 µl	3 µl
<i>Pst</i> I (stok; 10 U/µl)	2 µl	2 µl
Steril dH ₂ O	5 µl	5 µl
Toplam	30 µl	30 µl

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile DNA'nın kesilmesi işlemi 37°C'de 2 saatte gerçekleştirilir. Kesim sonrası örnekler, kristal viyole ile boyanmış agaroz jelde koşturulur ve DNA örnekleri Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kullanılarak jelden geri kazanılır [90].

2.2.8.3 Ligasyon

*Ta*ENO geni pKK223-3 vektörü içerisine T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak aktarılır. Jelden geri kazanılan *Ta*ENO ve pKK223-3 DNA örneklerinin ligasyonu, insert DNA'dan 3, vektör DNA'dan 1 birim oranında Çizelge 2.7'de verilen reaksiyon şartlarında gerçekleştirilir. Ligasyon, örneklerin 4°C'de bir gece bekletilmesiyle tamamlanır.

Çizelge 2. 7 Ligasyon reaksiyonu

Bileşenler	3:1 oranı
10x Ligasyon Tamponu	2 µl
İnsert (<i>Ta</i> ENO)	300 ng
Vektör (pKK223-3)	100 ng
T4 DNA ligaz (3U/µl)	2 µl
Steril dH ₂ O	X µl
Toplam	20 µl

2.2.8.4 Kalsiyum Klorür Etkileşimi ile Kompetant *E. coli* DH5α Hücrelerinin Hazırlanması

E. coli DH5α soyu hücrelerinin -80 °C'deki stok kültüründen uygulanacak metoda uygun LB-agara ekimi yapılır ve bir gece 37 °C' de inkübe edilir. Gelişen bakteri hücrelerinden steril bir kürdan yardımıyla tek koloniye dokunularak 5 ml LB buyyona bırakılır ve 37 °C, 120 rpm'de bir gece inkübasyona bırakılır. Bir gecelik kültürden 500 µl alınarak 50 ml buyyona aktarılır ve 37 °C, 120 rpm'de OD₆₀₀'deki hücre yoğunluğu 0,3–0,4 arasında bir değere ulaşıncaya kadar inkübe edilir. 50 ml'lik kültür 2 adet Oakridge tüpüne, her birine 25 ml olmak üzere eşit oranda bölünür. 25 ml'lik iki tüp 5000 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüjlenerek hücrelerin çökmesi sağlanır. Üstte kalan sıvı faz dökülür (süpernatant), altta kalan çökelti (pelet) üzerine 25 ml CaCl₂ solüsyonu ilave edilir ve hücreler iyice çözülür. 30 dakika boyunca buzda bekletilir ve 5000 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edilir. Üstte kalan sıvı kısım dökülüp her bir tüpteki pelet 1ml CaCl₂ solüsyonunda çözülür. Tüpler 2 saat buzda bekletilir. Bu aşamadan sonra kompetan hücreler ya hemen transformasyonda kullanılır ya da daha sonra kullanılmak üzere gliserol stoku hazırlanarak -80°C'de saklanır [89].

2.2.8.5 Rekombinant DNA Plazmidinin *E. coli* DH5α Hücrelerine Transformasyonu

Ligasyonu yapılmış örnek üzerine kompetant *E. coli* DH5α hücrelerinden 200 µl ilave edilir ve karıştırılır. 30 dakika buzun içerisinde bekletilir ve bu aşamadan sonra 42 °C'deki su banyosunda 90 saniye boyunca sıcak şok uygulanır. Örnekler ısı şoku sonrasında 2 dakika buzda bekletilir. Ardından örnekler sarsılmadan üzerine 100 µl/ml

ampisilin içeren SOC buyyondan 800 µl ilave edilir. Ters-düz edilerek karıştırılır ve 37 °C de 30 dakika etüvde bekletilir. İnkübasyon sonrası 100 µl/ml ampisilin içeren LB-agara ekim yapılır ve 37 °C'deki etüvde bir gece beklemeye alınır [89].

2.2.8.6 Gen Klonlamasının PCR ile Kontrolü

Transformasyon sonrasında seçilen kolonilerin sıvı kültürlerinden 2.2.1'de belirtilen şekilde izole edilen plazmid DNA'lar, yapılan PCR'da kalıp olarak kullanılır. *Ta*ENO geninin pKK223-3 ifade vektöründeki promotor ile aynı yönde klonlanıp klonlanmadığının belirlenmesi için 3' primeri olarak pKK223-3 C terminal primeri kullanılmıştır. 5' primeri olarak *Ta*ENO4 primeri kullanılmıştır. PCR koşulları Çizelge 2.2'de belirtildiği gibidir. Amplifikasyon koşulları 2.2.2.1'de verilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyonu gerçekleştirilen gen ürününün tamamı EtBr ile boyanan agaroz jel elektroforezinde yürütülerek gen klonlamasının ön kontrolü yapılır.

2.2.9 *Ta*ENO Geninin İkinci İfade Vektörüne (pLATE31) Aktarılması

aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) sistemi ile ligasyon ve restriksiyon enzim kesimine bağımlı olmadan klonlama ve ifade çalışmaları yapılabilmektedir. Bu sistemin protokolü kısa bir şekilde özetlenirse, öncelikle kitte bulunan vektöre uygun primerlerin tasarlanması ve ilgili genin bu primerler aracılığıyla amplifiye edilmesi gerekmektedir. Daha sonra saflaştırılan PCR ürününün kitte önerilen şekilde konsantrasyonu ayarlanarak ve aşağıda açıklandığı şekilde LIC reaksiyonu adı altında verilen, lineer pLATE31 vektörü ile birleşme reaksiyonu sağlanmaktadır. Klonlama protokolü aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) üretici firmasının talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir [86]. Transformasyon, kompetan hale getirilen *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine gerçekleştirilmiştir.

2.2.9.1 PCR Primerlerinin Tasarımı

Kit kitapçığında belirtilen primer tasarımında, 5' ucu primeri pLATE31 vektörüne spesifik diziler içermekte ve ilgili gen ile çakışan yeterli bir 3' ucu içermektedir.

Kit kitapçığında önerilen 5' primeri tasarımı:

5'-AGAAGGAGATATAACTATG – inserte özgü dizi 3'

Kit kitapçığında önerilen 3' primeri tasarımı:

5'-GTGGTGGTGATGGTGATGGCC – inserte özgü dizi 3'

5' primerinde (TaENO pLATE31F) başlama kodonu (altı çizili) bulunmakta ve primerin devamı için gendeki ATG'den sonra gelen diziler dikkate alınarak tasarım yapılmıştır. Sonlanma kodonu ise vektörün kendisinde yer aldığı için 3' primeri (TaENO pLATE31R) tasarımı yapılırken sonlanma kodonu primere eklenmemiştir. Ayrıca protein saflaştırılmasında kullanılan 6 His-tag ilavesi de vektörün kendisinde yer aldığı için primer tasarımlarında ek olarak ilavesi gerekmemektedir. Bu bilgilere dayanarak sisteme özgü primerler tasarlanmıştır.

2.2.9.2 TaENO'nun Klonlama Vektöründen Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saflaştırılması

TaENO'nun amplifikasyonunda, TaENO pLATE31F ve TaENO pLATE31R primerleri ve kalıp DNA olarak 2.2.7'de belirtilen plazmid DNA kullanılarak yapılan PCR'in diğer bileşenleri Çizelge 2.2'de verilmiştir. Amplifikasyon koşulları 2.2.2.1'de verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen PCR ürünü Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kullanılarak jelde koşturulmaksızın doğrudan saflaştırılmıştır.

2.2.9.3 LIC Reaksiyonu ve Rekombinant DNA Plazmidinin E.coli BL21(DE3) Hücrelerine Transformasyonu

1. aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) kitapçığında verilen, gen büyüklüğüne göre reaksiyona girmesi gereken insert DNA miktarı hesaplama tablosu esas alınarak, intronsuz 1329 bç'lik PCR ürününün konsantrasyonu 90 ng/μl olarak ayarlanmıştır.

2. Vektör ile birleşmeyi sağlayacak gerekli 5' ve 3' yapışkan uçların oluşturulması için saflaştırılan PCR ürünü Çizelge 2.8'deki reaksiyona tabi tutulur. Tüp kısa bir süre

vortekslenir ve 3-5 saniye santrifüj edilir. Reaksiyon oda sıcaklığında (20-25 °C) 5 dakika süre ile inküb edilir. İnkübasyon 5 dakikayı geçmemelidir.

Çizelge 2. 8 *Ta*ENO geninde yapışkan uçlar oluşturma reaksiyonu

Bileşenler	Hacim
5X LIC tamponu	2 µl
Saf PCR ürünü	90 ng
Steril distile su	9 µl'ye kadar
T4 DNA polimeraz	1 µl (1 U/ µl stoktan)
Toplam	10 µl

3. Reaksiyon, T4 DNA polimeraz kofaktörü Mg^{+2} iyonlarını şelatlayan 0,6 µl 0,5 M EDTA ile iyice karıştırılarak durdurulur.

4. Birleştirme reaksiyonu için lineer pLATE31 vektöründen 1 µl (60 ng) ve T4 DNA polimeraz ile muamele edilmiş PCR ürünü kısaca vortekslenir ve 3-5 saniye santrifüj edilir. Birleştirme karışımı oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir. Birleştirilen karışım transformasyona uygun hale gelmiştir.

5. *E.coli* BL21(DE3) hücreleri kompetan hale getirilir ve transformasyon gerçekleştirilir.

2.2.9.4 Gen Klonlamasının PCR ile Kontrolü

Transformasyon sonucu muhtemel pozitif kolonilerden 2.2.1'de belirtilen yöntem ile izole edilen plazmid DNA, yapılan PCR'da kalıp olarak kullanılır. 5' primeri olarak *Ta*ENO pLATE31F ve 3' primeri olarak *Ta*ENO pLATE31R kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir. Diğer PCR bileşenleri Çizelge 2.2'te belirtildiği gibidir. Amplifikasyon koşulları 2.2.2.1'de verilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyonu gerçekleştirilen gen ürününün tamamı EtBr ile boyanan agaroz jel elektroforezinde yürütülerek gen klonlamasının ön kontrolü yapılır.

2.2.10 *Theileria annulata* Enolaz Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

2.2.10.1 *Theileria annulata* Enolaz Enziminin Birinci İfade Vektörü (pKK223-3) aracılığıyla *E. coli*'de Ekspresyonu ve Enzimin Saflaştırılması

pKK223-3 ifade vektörü ile gerçekleştirilen transformasyonu ardından, enzimin ekspresyonu için *TaENO* genini içeren *E. coli* DH5 α hücreleri 100 μ g/ml ampisilin içeren 2xYT buyyon içerisinde 37 °C'de ve 180 rpm'de bir gece inkübe edilir. Yapılan tüm işlemler aynı koşullar altında negatif kontrol olarak, *TaENO* genini içermeyen *E. coli* DH5 α hücrelerine de uygulanır. 100 μ g/ml ampisilin içeren 50 ml 2xYT buyyon içerisine bir gecelik kültürden 500 μ l inoküle edilir. OD₆₀₀'deki hücre yoğunluğu 0,6'ya ulaşıncaya kadar inkübe edilir. Kültür belirtilen hücre yoğunluğuna ulaştığında son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG ilave edilir. IPTG ile indüklenmiş kültür 37 °C'de ve 180 rpm'de bir gece inkübe edilir. Bir gecelik indüklenmiş kültür örnekleri 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant dökülür. Pellet, 1 ml hücre lizisi ve kolon yıkama tamponu 1'de çözülür. Hücreler, sonikatör ile güç % 40'da 10 saniye açık 10 saniye kapalı yapılan dokuz döngüde parçalanır. 14.000 rpm'de 1 saat 4 °C'de santrifüj edilir. SDS-PAGE analizi için süpernatant (L; hücre lizatı) alınır.

Bu ifade vektörü ile yapılan ilk saflaştırma yönteminde *TaENO* genini içeren *E.coli* hücreleri 100 μ g/ml ampisilin içeren 2xYT buyyon içerisinde 37 °C'de ve 180 rpm'de bir gece inkübe edilir. 100 μ g/ml ampisilin içeren 500 ml 2xYT buyyon içerisine bir gecelik kültürden 1 ml inoküle edilir. OD₆₀₀'deki hücre yoğunluğu 0,6'ya ulaşıncaya kadar inkübe edilir. Kültür belirtilen hücre yoğunluğuna ulaştığında son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG ilave edilir. IPTG ile indüklenmiş kültür 37 °C'de ve 180 rpm'de bir gece inkübe edilir. Bir gecelik indüklenmiş kültür örnekleri 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant dökülür. Pelet, 3 ml hücre lizisi ve kolon yıkama tamponu 1'de çözülür. Hücreler, sonikatör ile güç % 60'da 10 saniye açık 10 saniye olarak dokuz döngüde parçalanır. 14.000 rpm'de 1 sat 4 °C'de santrifüj edilir.

Süpernatant (L; hücre lizatı) alınır ve SDS-PAGE analizi için bir miktar ayrılır. Enzim ile Ni-NTA agarozun etkileşimini arttırmak için, elde edilen süpernatant 1 ml Ni-NTA agaroz ile +4 °C'de 120 rpm hızla karıştırılır. 1 saatin sonrasında pistonu çıkarılmış 5 ml'lik bir şırıngaya cam yünü yerleştirilir ve uç kısmına bir tubing geçirilir. Bu şekilde

hazırlanan kolon sert bir yüzeye sabitlenir. Kolona süpernatant ile 1 saat süresince karıştırılan Ni-NTA agaroz resin yüklenir. Kolondan akan ilk süzüntü fraksiyonundan (İS) SDS-PAGE analizi için örnek alınır. Kolon, iki defa 4 ml hücre lizisi ve kolon yıkama tamponu 1 ile yıkanır. Yıkama fraksiyonları (Y1; yıkama 1, Y2; yıkama 2) SDS-PAGE analizi için saklanır. Yıkama sonrası 6 defa 500'er µl protein elüsyon (E) tamponu 1 ile saf protein örneği kolondan toplanır [91], [92].

Birinci ifade vektörü için yapılan son saflaştırma yönteminde, *Ta*ENO genini içeren *E.coli* hücreleri 100 µg/ml ampicilin içeren 2xYT buyyon içerisinde 37 °C'de ve 180 rpm'de bir gece inkübe edilir. 100 µg/ml ampicilin içeren 500 ml 2xYT buyyon içerisine bir gecelik kültürden 1 ml inoküle edilir. OD₆₀₀'deki hücre yoğunluğu 0,6'ya ulaşınca kadar inkübe edilir. Kültür belirtilen hücre yoğunluğuna ulaştığında son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG ilave edilir. IPTG ile indüklenmiş kültür 37 °C'de ve 180 rpm'de bir gece inkübe edilir. Bir gecelik indüklenmiş kültür örnekleri 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant dökülür. Pelet, 3 ml diğer yöntemle göre imidazol miktarı 4 kat azaltılmış hücre lizisi ve kolon yıkama tamponu 1 ile çözülür. Hücreler, sonikatör ile güç % 60'da 10 saniye açık 10 saniye kapalı olarak dokuz döngüde parçalanır. 14.000 rpm'de 1 saat 4 °C'de santrifüj edilir.

Süpernatant (L; hücre lizati) alınır ve SDS-PAGE analizi için bir miktar ayrılır. Enzim ile Ni-NTA agarozun etkileşimini arttırmak için, elde edilen süpernatant 1 ml Ni-NTA agaroz ile +4 °C'de 120 rpm hızla karıştırılır. 1 saatin sonrasında pistonu çıkarılmış 5 ml'lik bir şırıngaya cam yünü yerleştirilir ve uç kısmına bir tubing geçirilir. Bu şekilde hazırlanan kolon sert bir yüzeye sabitlenir. Kolona süpernatant ile 1 saat süresince karıştırılan Ni-NTA agaroz resin yüklenir. Kolondan akan ilk süzüntü fraksiyonundan (İS) SDS-PAGE analizi için örnek alınır. Kolon, iki defa 4 ml hücre lizisi ve kolon yıkama tamponu 1 ile yıkanır. Yıkama fraksiyonları (Y1; yıkama 1, Y2; yıkama 2) SDS-PAGE analizi için saklanır. Yıkama sonrası 6 defa 500'er µl protein elüsyon (E) tamponu 1 ile saf protein örneği kolondan toplanır [91], [92].

2.2.10.2 *Theileria annulata* Enolaz Enziminin İkinci İfade Vektörü (pLATE31) aracılığıyla *E. coli*'de Ekspresyonu ve Enzimin Saflaştırılması

Protein eldesi için kullanılan ikinci ifade vektörü ile yapılan ilk ekspresyon denemesinde, *Ta*ENO genini içeren *E.coli* BL21(DE3) hücreleri 100 µg/ml ampisilin içeren 2xYT buyyon içerisinde 37 °C'de ve 200 rpm'de bir gece inkübe edilerek ön kültürü yapılmıştır. Aynı zamanda negatif kontrol olarak, *Ta*ENO genini içermeyen *E. coli* BL21(DE3) soyunun da aynı şartlarda ön kültürü yapılmıştır. İlk ekspresyon denemesinde uygulanan her adım, geni içerdiği bilenen pozitif örnek ve geni içermeyen *E. coli* BL21(DE3) soyunda paralel olarak çalışılmıştır.

100 µg/ml ampisilin içeren 100 ml 2xYT buyyon içerisine bir gecelik ön kültürden 0,5 ml inoküle edilir ve kültür 37 °C'de ve 200 rpm'de OD₆₀₀'deki hücre yoğunluğu 0,5-0,6'ya ulaşıncaya kadar inkübe edilir. Kültür, belirtilen hücre yoğunluğuna ulaştığında son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG ilave edilir. IPTG ile indüklenmiş kültür 37 °C'de ve 200 rpm'de 3 saat inkübe edilir. 3 saat indüklenmiş kültür örnekleri 4 °C'de 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant dökülür. Pellet, 3 ml lizis tamponu 2 ile resüspanse edilir ve sonikatör ile güç % 40'ta 10 saniye açık 10 saniye kapalı olarak altı döngüde parçalanır. Sonike karışım 14.000 rpm'de 30 dakika 4 °C'de santrifüj edilir [91].

İkinci ifade vektörü ile yapılan çözünür protein eldesi denemesinde, yukarıda anlatılan indükleme koşulları; sıcaklık 25 °C, IPTG konsantrasyonu 0,5 mM ve indükleme süresi 6 saat olarak değiştirilmiş, inkübasyon hızı aynı tutulmuş ve indükleme öncesi basamaklar pozitif geni içeren ve içermeyen hücre kültüründe aynen uygulanmıştır.

İndüklenmiş kültürler 5000 rpm'de 15 dakika 4 °C'de santrifüj edilir. Süpernatant dökülür. Pellet, materyal bölümünde verilen 3 ml lizis tamponu 2 ile resüspanse edilir. Resüspanse pellet, sonikatör ile güç % 40'ta 10 saniye açık 10 saniye kapalı olarak altı döngüde parçalanır. Sonike karışım 14.000 rpm'de 30 dakika 4 °C'de santrifüj edilir. Saflaştırma işlemine girmemiş süpernatanttan (L; hücre lizati) SDS-PAGE analizi ve enzim aktivite tayini için örnek alınır [91].

Çözünür protein eldesi denemesindeki koşullar geni içeren hücrede aynen uygulanarak elde edilen hücre lizatı ile üretici firmanın kitapçığında verilen doğal şartlar altında saflaştırma protokolüne göre saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir [92].

His-tag ilaveli enzim ile Ni-NTA agarozun etkileşimini sağlamak için, elde edilen süpernatant 1 ml Ni-NTA agaroz ile 1 saat boyunca +4 °C'de 120 rpm hızla karıştırılır. 1 saatin sonunda pistonu çıkarılmış 5 ml'lik bir şırıngaya alt yüzeyini kaplayacak şekilde kurutma kağıdı geçirilir. Kurutma kağıdının üzerine şırınganın 2 ml seviyesine kadar cam yünü yerleştirilir ve uç kısmına bir tubing geçirilir. Bu şekilde hazırlanan kolon sert bir yüzeye sabitlenir. Kolona 1 saat boyunca çalkalanan Ni-NTA agaroz ve protein karışımı yüklenir. Kolondan akan ilk süzüntü fraksiyonundan (İS) SDS-PAGE analizi için örnek alınır. Kolon, iki defa 4 ml yıkama tamponu 2 ile yıkanır. Yıkama fraksiyonları (Y1; yıkama 1, Y2; yıkama 2) SDS-PAGE analizi için saklanır. Yıkama sonrası 8 defa 500'er µl elüsyon (E) tamponu 2 ile saf protein örneği kolondan toplanır [92].

2.2.11 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE yapımında BIO-RAD Mini-PROTEAN® 3 Cell jel elektroforez sistemi kullanılmıştır. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi için kullanılan jel aşağıdaki gibi hazırlanmıştır [93]:

Ayrırma jeli (% 12)

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

Yükleme jeli (% 4)

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

Örnekler jele yüklenmeden önce eşit miktarda SDS-PAGE SAB boyası ilave edilerek 5 dakika kaynatılır. Elektroforez için 1X Tank tamponu kullanılır. Bromfenol mavisi jelin sonuna gelinceye kadar 20 mA'da yürütülür. Elektroforez yapılmasından sonra protein boyama solüsyonu kullanılarak jel, 37°C'de 1 saat süreyle boyanır ve sonrasında protein bantları görünür hale gelinceye kadar boya uzaklaştırıcı (Destaining) solüsyon ile yıkanır. Jeller, fotoğrafları alındıktan sonra jel kurutma sistemi ile kurutularak saklanır [93].

2.2.12 Enzimin Molekül Ağırlığının ve Ekstinksiyon Katsayısının Hesaplanması

Saflaştırılan proteinin konsantrasyonunun hesaplanması için, molekül ağırlığının ve molar absorpsiyon katsayısı (ϵ ; Extinction Coefficient) bilinmesi gerekmektedir. Bu iki değerlerin hesaplanması web tabanlı "Peptide Property Calculator" isimli program ile yapılmıştır [94]. Hesaplamalar, programa veri olarak girilen aminoasit dizisini temel alarak yapılmıştır [63].

2.2.13 Saflaştırılmış Proteinde Spektrofotometrik Yöntemle Konsantrasyon Tayini

Saflaştırılmış enolaz proteininin molar absorpsiyon katsayısı ve molekül ağırlığı kullanılarak absorbans spektroskopisi ile konsantrasyonunun hesaplanmasında Beer-Lambert Kanunu esas alınmıştır. Bunun için saf protein solüsyonunun 280 nm'deki absorbans değeri (A_{280}) okunmuştur. Elde edilen bu değerle birlikte saflaştırılmış molar ekstinksiyon katsayıları (ϵ) ve molekül ağırlıkları (MW) kullanılarak aşağıdaki formüllerle protein konsantrasyonu (c) hesaplanmıştır:

$$c \text{ (mol/l)} = A_{280} / (\epsilon \times L) \quad (2.1)$$

$$c \text{ (mg/ml)} = (A_{280} \times MW) / (\epsilon \times L) \quad (2.2)$$

Yukarıdaki formüllerde verilen L değeri ışık yolu uzunluğu olup birimi cm'dir. Bununla birlikte standart spektrofotometreler 1 cm genişliğinde örnek küvetlerinin kullanımı için uygun olduğundan L değeri genellikle 1 cm'dir.

Yapılan çalışmalarda A_{280} değerinin spektrofotometre ile ölçümünde 1 cm genişliğinde kuvartz küvet kullanıldığı için protein konsantrasyonu (2.4)'te verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır [95]:

$$c \text{ (mol/l)} = A_{280} / \epsilon \quad (2.3)$$

$$c \text{ (mg/ml)} = (A_{280} \times MW) / \epsilon \quad (2.4)$$

2.2.14 Spektrofotometrik Yöntemle Enzim Aktivitesi Tayini

Theileria annulata enolaz enziminin aktivite ölçümü, UNICAM UV-Visible spektrofotometre kullanılarak 2-PGA'nın PEP'e dönüşümünün 240 nm'deki (ΔA_{240} /dakika) absorbans artışı takip edilerek yapılmıştır. Reaksiyon hacmi 1 ml ve reaksiyon süresi 2 dakika olarak kabul edilmiştir. Bütün reaksiyonlar 1,5 mM $MgCl_2$ içeren 50 mM Tris/HCl (pH:7,4) tamponunda 25°C'de gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda substrat olarak 1,5 mM 2-PGA kullanılmıştır. Ölçüm alınırken 1 ml'lik kuvartz küvete tampon ve substrat ilavesinden sonra, en son enzim ilave edilerek reaksiyon başlatılır [58], [96]. Safılaştırılan enolaz enzimi için spesifik aktivite tayini yapılmıştır. Bir enzim için spesifik aktivite, 1 mg enzim proteini başına düşen enzim ünitesidir. Spesifik aktivite hesabı için öncelikle saf enzimin aktivite değeri elde edilmelidir. Enzim aktivitesi, 1 dakikada 1 μ mol substratı değiştiren enzim etkinliğidir. 1 ml reaksiyon hacmi ve küvetteki 1 cm ışık yolu uzunluğu için $\Delta A_{240}/dk$ değeri spektrofotometre aracılığıyla elde edilir. Reaksiyonda PEP oluşumu ile gözlenen absorbans artışı temel alındığı için, PEP'in molar absorpsiyon katsayısı (ϵ_{PEP}) hesaba katılmalıdır. Toplam reaksiyon hacmi (V_t) ve reaksiyona giren enzim hacmi (V_e) de hesaba katılmaktadır. Enzim aktivitesi Ünite/ml (U/ml) cinsinden (2.5) eşitliğine göre hesaplanmıştır [58].

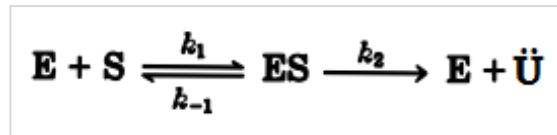
$$U/ml = (\Delta A_{240}/dk) \times V_t / (\epsilon_{PEP} \times V_e) \quad (2.5)$$

Daha sonra aktivite tayini için kullanılan enzim çözeltisinin konsantrasyonu hesaba katılarak 1 mg enzim proteini başına düşen enzim ünitesi bulunur.

2.2.15 Safılaştırılan Enzimin Kinetik Analizi

Enzimler, biyolojik tepkimeleri hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin katalizledikleri reaksiyonlardaki reaktantlar, her bir enzime özgü olan, substratlar ve reaksiyon sonucu ortaya çıkanlar da ürünler olarak adlandırılmaktadır.

Enzimatik reaksiyonların hızlarının deneysel parametrelerdeki değişmelerle nasıl değiştiklerinin incelenmesi, enzim kinetikleri olarak bilinir. Tek substratlı enzimatik bir reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekilde verilen denklemle özetlenmektedir.



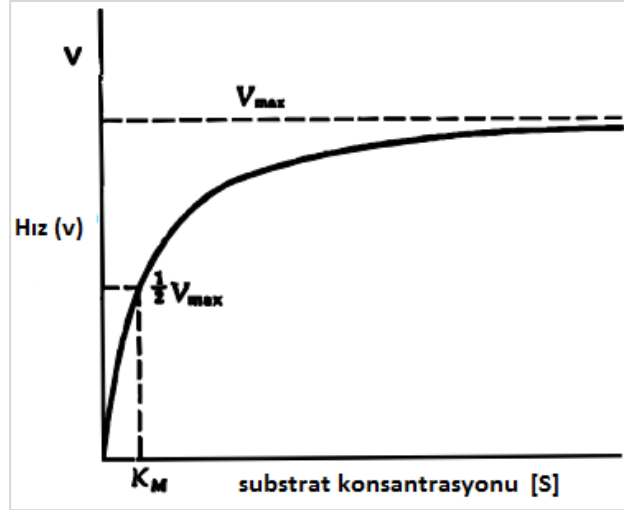
Şekil 2. 4 Tek substratlı bir enzimatik reaksiyonda substratın ürüne dönüşümü (E: enzim, S: substrat, Ü: ürün, k_1 , k_{-1} , k_2 : hız sabitleri)

Şekil 2.4'te verildiği gibi enzim ve substrat k_1 hız sabiti ile enzim-substrat kompleksini oluşturmakta, oluşan ES kompleksi k_2 hız sabiti ile geri dönüşümsüz olarak ürün oluşturmakta ya da k_{-1} hız sabiti ile enzim ve substrata ayrılmaktadır [97].

Bir enzimatik reaksiyonun hızı, enzim etkisiyle zaman birimi başına (1 dakikada veya 1 saniyede) oluşan ürünün veya ürüne dönüşen substratın miktarına göre ifade edilmektedir. Bir enzimin aktivitesi, o enzim tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyonun hızının, enzim etkisiyle optimal koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir.

Enzim konsantrasyonu ve diğer bütün şartların sabit olduğu bir ortamda çok küçük bir substrat konsantrasyonunda, enzim moleküllerinin çoğu serbest kalır, ES kompleksi az miktarda oluşur ve dolayısıyla ürüne dönüşen substrat miktarı veya reaksiyonun hızı küçüktür. Substrat konsantrasyonunun belirli artışları ile enzim moleküllerinin yarısının serbest kalıp yarısının ES kompleksi oluşturduğu yarı maksimal hız ($1/2 V_{\max}$) noktasına ulaşılır. Substrat konsantrasyonunun belirli artışlarının devamında enzim moleküllerinin hepsinin ES kompleksi oluşturduğu bir noktada reaksiyon hızı maksimumdur ($V_{\max}$) ve

bu noktadan sonra substrat konsantrasyonunun artışı ile reaksiyon hızı artmaz. Tek substratlı bir enzimatik tepkimede substrat konsantrasyonu ve reaksiyon hızı arasındaki ilişkiyi gösteren grafik Şekil 2. 7'te verilmiştir [97, 98].



Şekil 2. 5 Tek substratlı bir enzimatik tepkimede substrat konsantrasyonu ve reaksiyon hızı arasındaki ilişkiyi gösteren grafik [97]

Enzim konsantrasyonu ve diğer bütün şartların sabit olduğu bir ortamda enzimatik tepkimenin hızı, substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla başlangıçta doğrusal bir artış gösterir; fakat substrat ilave edildikçe hız giderek daha az artar ve belirli bir V_{max} düzeyinde sabit kalmaktadır.

V_{max} noktasındaki substrat konsantrasyonu enzimi doyuran ve bunun üzerinde herhangi bir değer olabileceğinden bunun ölçülmesi pratik olarak zordur. Buna karşılık enzimatik bir reaksiyonda enzim moleküllerinin yarısının substrata doyduğu ve böylece yarı maksimal hızın ($\frac{1}{2} V_{max}$) gözleendiği noktadaki substrat konsantrasyonu ölçülebilir. Bir enzimatik reaksiyonda enzim moleküllerinin yarısının substrata doyduğu ve böylece yarı maksimal hızın gözleendiği noktadaki substrat konsantrasyonuna “Michaelis-Menten sabiti” denir ve K_m ile gösterilmektedir. Michaelis–Menten kinetiği, enzim kinetiğinin en basit ve en iyi modellerinden biridir ve model, Alman biyokimyacı Leonor Michaelis ve Kanadalı doktor Maud Menten'e atfen adlandırılmıştır.

Bir enzim için K_m (Michaelis-Menten sabiti), enzim ile verilen substratın karşılıklı etkileşimlerini karakterize eden bir sabit sayıdır; enzim konsantrasyonundan bağımsız

bir değerdir; maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonunu göstermektedir. Enzimatik bir reaksiyon için K_m , başlangıç hızını (V_o) substrat konsantrasyonunun $[S]$ bir fonksiyonu kabul ederek grafik çizmek suretiyle deneysel olarak saptanabilmektedir.

Enzimatik bir reaksiyon için V_o , V_{max} , K_m ve $[S]$ arasındaki ilişki, “Michaelis-Menten denklemi” denilen (2.6) eşitliğiyle ifade edilmektedir;

$$V_o = (V_{max} [S]) / (K_m + [S]) \quad (2.6)$$

Michaelis-Menten denklemi, enzimatik bir reaksiyon için başlangıç hızını (V_o) substrat konsantrasyonunun $[S]$ bir fonksiyonu kabul ederek çizilen hiperbolik eğrinin matematiksel ifadesidir.

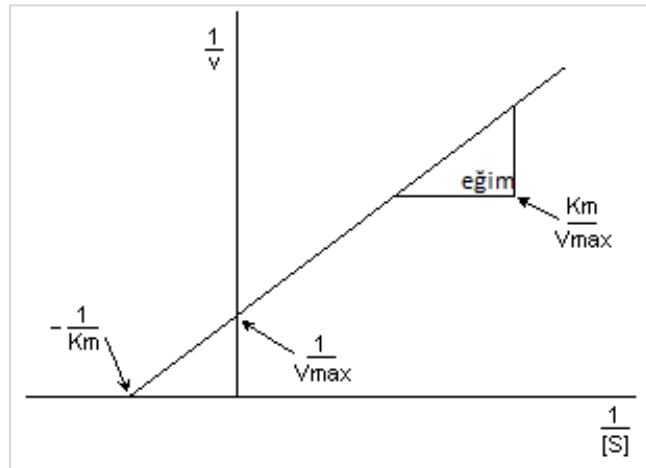
Michaelis-Menten denklemi, bir enzimin etkili olduğu reaksiyonda, substrat konsantrasyonuna göre ne şekilde davranacağını tanımlamaktadır:

- 1) K_m çok büyük ($[S]$, K_m 'den çok çok küçük) ise, enzimatik reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonuna bağlıdır. Böyle reaksiyonlar, birinci dereceden reaksiyon olarak tanımlanırlar.
- 2) K_m çok küçük ($[S]$, K_m 'den çok çok büyük) ise, enzimatik reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonuna bağlı değildir; V_{max} değerine eşittir. Böyle reaksiyonlar sıfırıncı dereceden reaksiyon olarak tanımlanır.
- 3) K_m , $[S]$ 'ye eşit ise, enzimatik reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonuna bağlı değildir; $1/2 V_{max}$ değerine eşittir.

Michaelis-Menten denklemine göre; K_m , enzimin substratına karşı olan ilgisini göstermektedir. K_m değeri küçük olan enzim, substratı için yüksek bir affinite gösterir; enzim düşük bir substrat konsantrasyonunda doyararak maksimal hız sağlar. K_m değeri 10^{-6} M (10^{-3} mM) ve daha düşük olan enzimler yüksek affiniteli enzimlerdir ki bunların metabolizmada büyük önemi vardır. K_m değeri büyük olan enzim, substratı için düşük bir affinite gösterir; enzimin yarı doygunluğa ulaşması için daha fazla substrat konsantrasyonu gerekmektedir. Bir enzim için K_m değeri, enzim ile verilen substratın karşılıklı etkileşimini karakterize eden bir sabit sayıdır [97], [99].

Michaelis-Menten denklemi bir hiperbolik eğrinin denklemi olduğundan ve hiperbolik eğrinin karakteristik noktalarını belirlemek zor olduğundan bir enzime ait V_{max} ve K_m 'yi deneysel olarak incelemeyi kolaylaştırmak için grafiği doğrusal olan (Şekil 2.8) başka denklemler de önerilmiştir. Bunlardan Michaelis-Menten denklemini tersine çevirip çarpanlarına ayırmakla elde edilen, (2.7)'te verilen Lineweaver-Burk denklemi, en sık kullanılanıdır [97], [100];

$$(1/V_o) = [(K_m/V_{max} [S])] + (1/V_{max}) \quad (2.7)$$



Şekil 2. 6 Lineweaver-Burk grafiği [97]

Bu tez çalışmasında pLATE31 vektörü ile yürütülen çalışmalar sonucunda saf olarak elde edilen enzimin, seçilen farklı substrat konsantrasyonlarındaki reaksiyon değerlerine göre kinetik özellikleri tayin edilmiştir. Yapılan kinetik ölçümler, üç tekrarlı olarak alınmıştır. Ölçümler sonucunda elde edilen değerler aracılığıyla enzimin kararlı hal kinetik grafiği eldesi ve K_m , V_{max} , değerlerinin hesaplanmasında GraFit 3.0 [101] isimli programdan faydalanılmıştır.

Optimal pH, sıcaklık ve doyurucu substrat konsantrasyonunda bir tek enzim molekülü tarafından birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısına, enzime ait dönüşüm sayısı denir ve kısaca k_{cat} sembolü ile gösterilmektedir. k_{cat} değeri, program ile elde edilen V_{max} ve enzim konsantrasyonu hesaba katılarak bulunur. Öncelikle reaksiyona giren enzim konsantrasyonu molar (M) cinsinden hesaplanmaktadır. Daha sonra (2.8) eşitliğinden hesaplanan değer (a), enzim konsantrasyonuna oranı k_{cat} değerini vermektedir [91].

$$a=(V_{\max}/\epsilon_{\text{PEP}})/60 \quad (2.8)$$

(2.7) eşitliğindeki 60 değeri, 1 dakikanın saniyeye çevrimi için kullanılmaktadır.

Katalitik etkinlik anlamına gelen k_{cat}/K_m sabiti ise bir enzimin substratını ürüne dönüştürmekte ne kadar verimli olduğunun bir göstergesidir [91].

BÖLÜM 3

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuçlar ve öneriler bölümünde, *Ta*ENO geninden intron çıkarılması ile başlayıp, saflaştırılan aktif enzimin kinetik analizi ile sonlanan deneyler temel olarak 5 ana başlık altında (3.1 - 3.5) anlatılmış olup, her bir çalışma ile ilgili optimizasyon denemeleri, ilgili ana başlığın kendi içerisinde alt başlıklandırılarak verilmiştir.

3.1 *Ta*ENO Geninden İntronun Uzaklaştırılmasında Kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Yönlendirilmiş Mutagenез Yöntemi

İntronsuz genin komplementer DNA aracılığıyla eldesini sağlayacak *Theileria annulata* RNA örneği, çalışılan hastalığın mevsimsel olması nedeniyle temin edilememiştir. Bu nedenle enolaz enzimini kodlayan geni intronlu olarak içeren stok plazmid DNA'sı başlangıç materyali olarak kabul edilmiştir. Çalışmanın bu bölümünde, *Ta*ENO geninde bulunan intronun, PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi kullanılarak uzaklaştırılması hedeflenmiştir.

Üç farklı yaklaşımla gerçekleştirilen PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemlerindeki primerlerin tümü, 2.1.7'de belirtilen intronlu *T. annulata* enolaz enzimini kodlayan gen dizisi referans alınarak tasarlanmıştır.

3.1.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Yönlendirilmiş Mutagenез Yöntemi 1

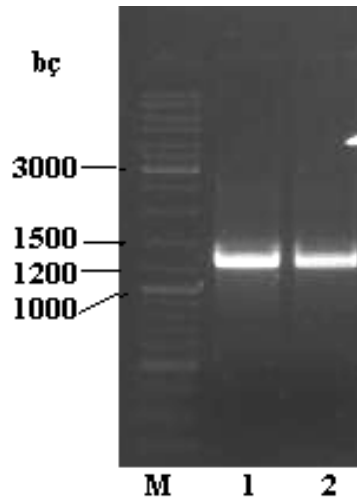
Bu yöntem ile *T. annulata*'nın enolaz enzimini kodlayan genin intronsuz olarak amplifiye edilmesini sağlamak için, mutajenik 5' primeri ve enzim saflaştırma işlemine

uygun 3' primeri tasarlanmıştır. İntron bölgesinin, *Ta*ENO geninin 5' ucundaki 40. bazdan başlaması ve 36 bç'lik kısa bir DNA dizisi olması nedeniyle, genin 5' ucuna komplementer ve intronlu bölgeyi atlayarak geni amplifiye edecek olan mutajenik *Ta*ENO4 primeri tasarlanmıştır. 5' ucuna yakın bir intronun uzaklaştırılması için yapılan bu deney tasarımı, bilgimiz dahilinde, ilk kez bu tez çalışmasında geliştirilmiştir. Genin 3' ucuna komplementer ve üretilecek olan enolaz enziminin, ileride anlatılacağı gibi, Ni-NTA agaroz kullanılarak saflaştırılmasında faydalanılacak 6 His-tag kodonu içeren *Ta*ENO2 primeri tasarlanmıştır. Genin ifade vektörüne aktarılmasını sağlamak amacıyla, tasarlanan primer dizilerine ek olarak uygun restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri ilave edilmiştir. İntonsuz enolaz genini kesen ve kesmeyen enzimler Restriction Mapper isimli web tabanlı bir program aracılığı ile tespit edilmiştir [102]. *Ta*ENO'yu kesmeyen restriksiyon enzim listesi, ifade vektörünün çoklu klonlama bölgesindeki restriksiyon enzim listesi ile karşılaştırılmış ve sadece *Pst*I (CTGCAG) kullanıma uygun enzim olarak seçilebilmiştir. *Pst*I enzim kesim dizisi, *Ta*ENO4 primerindeki başlama kodonu ATG'den hemen önce kullanılmıştır. Ayrıca *Ta*ENO4, amplifikasyon sırasında kalıp DNA'ya bağlanma gücünü arttırmak için, introndan sonra gelen ve genin 5' ucuna komplementer 10 nükleotidlik DNA dizisini de içermektedir. *Pst*I enzim kesim dizisi 3' primerinde de kullanılmıştır ve bu bölgenin hemen ardından sonlanma kodonu, 6 His-tag bölgesi ve genin 3' ucuna komplementer dizi gelmektedir. Yöntemde kullanılan primerler Çizelge 3.1'de verilmiştir. Primerlere ait Tm değerleri değerleri web tabanlı bir program kullanılarak hesaplanmıştır [103].

Çizelge 3. 1 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenez yöntemi 1 için tasarlanan primerler (Restriksiyon endonükleaz kesim dizisi mavi, başlama kodonu kırmızı, sonlanma kodonu yeşil, 6 His-tag dizisi turuncu renk ve intronun uzaklaştırıldığı bölge kırmızı düz çizgi ile gösterilmiştir)

Primer Adı	Primer Dizisi	Uzunluk (bç)	Tm (°C)
TaENO4	5'TTTCTGCAGATGCTCTGTTGTTAAGTCTCTTAAAGCCCGGGA AATTCTTGATTCCAGAGG 3'	59	70,9
TaENO2	5'TTTTCTGCAGTTAGTGATGGTGGTGGTGGTGGGACAA GTTTCTG 3'	47	68,9

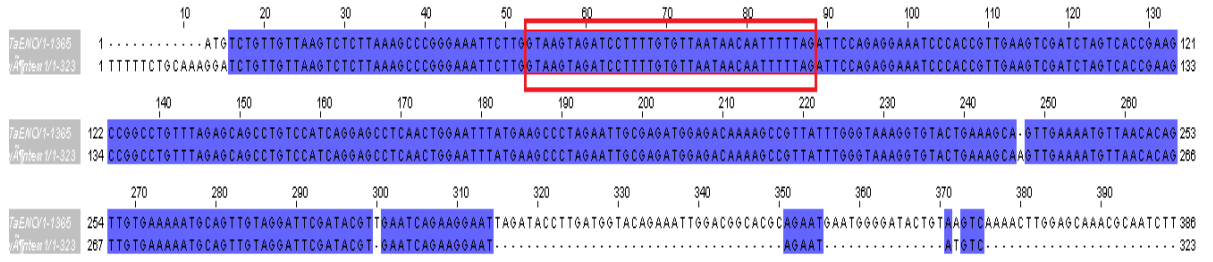
*Ta*ENO genini intronsuz olarak amplifiye etmesi beklenen 5' ucuna komplementer olan *Ta*ENO4 ve 3' ucuna komplementer olan *Ta*ENO2 primerleri ile gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu ile genin amplifikasyonu sağlanmıştır. Ancak intronun 36 bç büyüklüğünde olması nedeniyle EtBr ile boyanmış %1'lik agaroz jelde, intronlu ve intronsuz genin ayrımı yapılamamıştır (Şekil 3. 1).



Şekil 3. 1 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 1 ile amplifikasyonu gerçekleştirilen ürünün jel görüntüsü M: GeneRuler DNA Marker, 1: Yöntem 1 ile elde edilen saf polimeraz zincir reaksiyonu ürünü (beklenen büyüklük: 1329 bç), 2: İtronlu saf *Ta*ENO geni (1365 bç)

Bu yöntem ile intronun uzaklaştırılmasında başarı sağlanıp sağlanamadığı DNA dizi analizi sonucuna göre belirlenmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 1 ile elde edilen PCR ürünü, *Ta*ENO geninde intronun olduğu 5' ucunu düzgün okuyabilmesini sağlamak amacıyla genin 345. bazından başlayarak 3'←5' yönünde okuma yapan *Ta*ENO5 primeri ile dizilenmiştir.

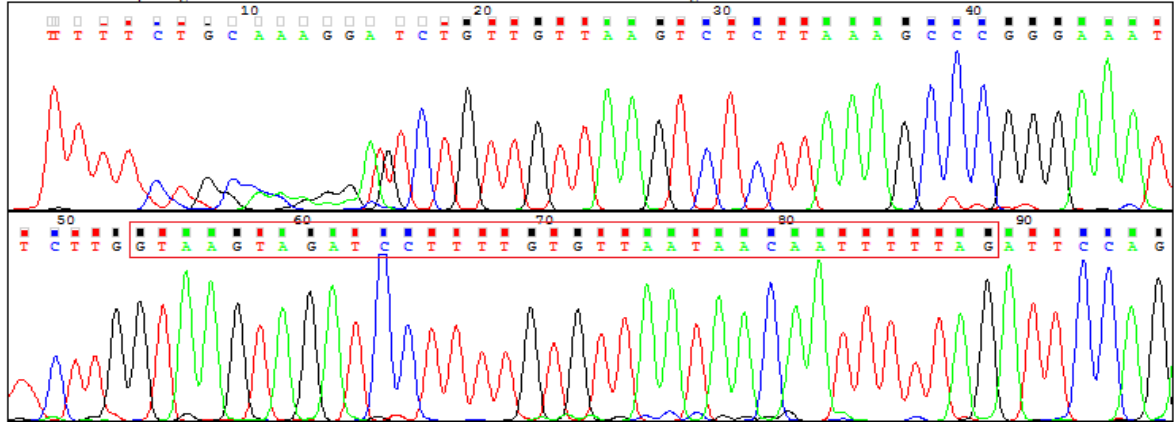
İtronlu *Ta*ENO gen dizisi ile bu yöntem ile elde edilen PCR ürününün dizileme sonucunun karşılaştırması Şekil 3.2'de verilmiştir. Bu karşılaştırmalı dizi analizi web tabanlı bir program kullanılarak yapılmıştır [104].



Şekil 3. 2. Intronlu *TaENO* gen dizisi (1. sıra) ile PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 1 ile elde edilen ürünün *TaENO5* primeri ile 3'→5' yönünde okunan DNA dizi analizi sonucunun (2. sıra) karşılaştırılması (kırmızı kutu içine alınan bölge intronu temsil etmektedir)

TaENO4 primeri, kalıp DNA ile mutasyonu planlanan bölgeden önceki DNA dizisinde belirli bir oranda düzgün bağlanma gerçekleştirdiğinden Yöntem 1'de genin intronlu olarak doğru büyüklükte amplifikasyonunu sağladığı ancak intronu uzaklaştırmada başarısız olduğu görülmektedir. Ancak primere, mutasyon yapılması tasarlanan bölgeden sonra gelen 10 nükleotidlik dizinin eklenmiş olması ve çıkarılması hedeflenen intron büyüklüğünün *TaENO4* primerinin kendi büyüklüğüne yakın olması, primerin introndan sonraki kalıp DNA ile doğru bir şekilde bağlanamama nedenleri olabilir.

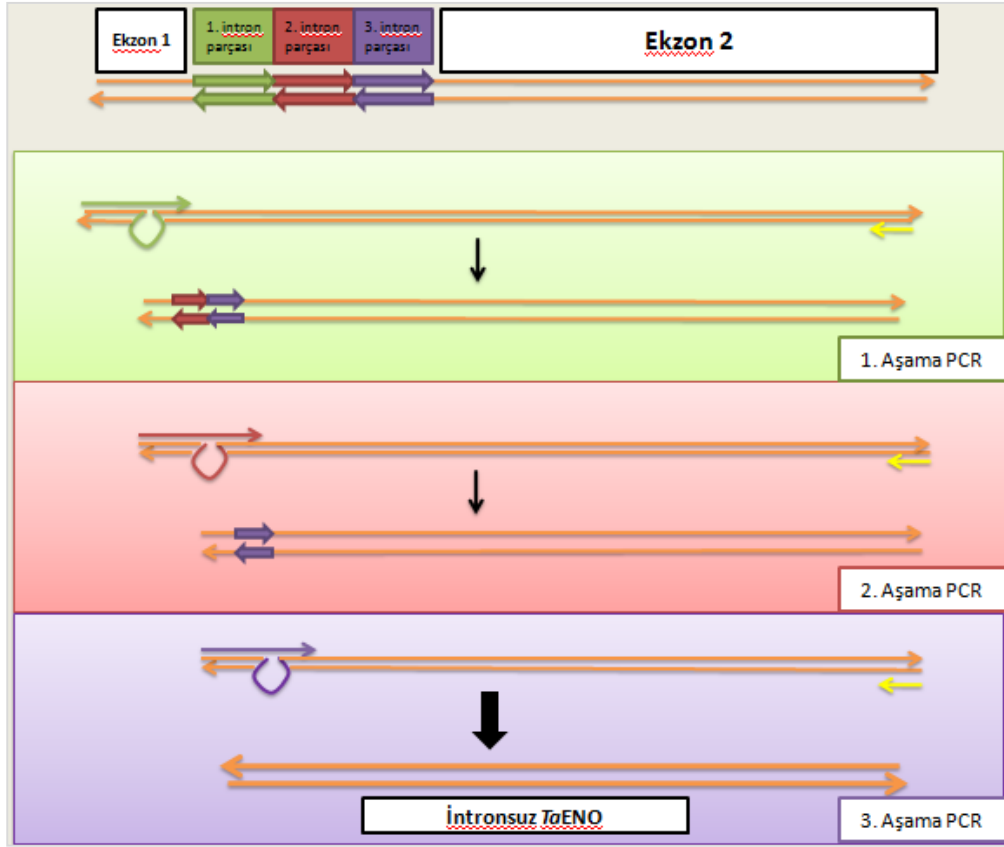
TaENO4 primeri kalıp DNA ile tam olarak güçlü bir bağlanma gerçekleştiremediği için, intronu atlamada ve introndan sonraki dizi ile eşleşmede başarısız olmuştur. Ayrıca uzun bir primer olduğu için genin 5' ucu ile bağlanmasının ardından kendi üstünde muhtemel katlanmalar gerçekleşmiş ve genin sadece belirli bir kısmına bağlanan küçük bir primer görevi görmüş olabilir [105]. Yöntem 1 ile gerçekleştirilen PCR temelli mutagenез ürününün dizileme kromatogramında intron içeren bölge Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3. 3 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 1 ile elde edilen PCR ürününün DNA dizi analizi kromotogramındaki intron bölgesi (kırmızı kutu intron dizisini temsil etmektedir)

3.1.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Yönlendirilmiş Mutagenез Yöntemi 2

Yöntem 2 ile *T. annulata*'nın enolaz enzimini kodlayan genin intronsuz olarak amplifiye edilmesini sağlamak için yeni mutajenik 5' primerleri tasarlanmıştır. 3' primeri olarak yöntem 1'de belirtilen TaENO2 primeri kullanılmıştır. Yöntem 1 ile TaENO4 primeri kullanılarak 36 bç'lik intron bölgesinin tek seferde uzaklaştırılmasında başarı sağlanamadığı için, genin 5' ucundaki intron dizisi 12 bç'lik 3 eşit parçaya ayrılmış ve her bir basamakta introndaki diziliş sırasına göre 12 bç'lik intron parçalarını uzaklaştıracak yeni mutajenik primerler tasarlanmıştır. *TaENO* geninin başlama kodonu ile başlayan ve introndaki ilk 12 bç'lik DNA dizisini atlayarak intronun son 24 bç'ni içeren 5' primeri TaENO6, *TaENO* geninin başlama kodonu ile başlayan ve introndaki ikinci 12 bç'lik parçayı atlayarak intronun son 12 bç'ni ve intronun devamındaki 5' ucuna komplementer DNA dizisinden 10 nükleotid daha içeren 5' primeri TaENO7 tasarlanmıştır. İntrondaki son 12 bç'lik parçayı uzaklaştırmak için yöntem 1'de belirtilen TaENO4 primeri kullanılmıştır. Bu yöntemin şematik gösterimi Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3. 4 TaENO'nun polimeraz zincir reaksiyonu temelli yönlendirilmiş mutageniz tekniği 2 ile intronsuz olarak amplifikasyonun şematik gösterimi

Genin pKK223-3 vektörüne klonlanmasını sağlayacak *Pst*I (CTGCAG) enzim kesim bölgesi TaENO6 ve TaENO7 5' mutajenik primerlerine, başlama kodonunun hemen öncesinde ilave edilmiştir. Yöntemde kullanılan primerler Çizelge 3.2'de verilmiştir. Yeni tasarlanan mutajenik primerlere ait Tm değerleri değerleri web tabanlı bir program kullanılarak hesaplanmıştır [103].

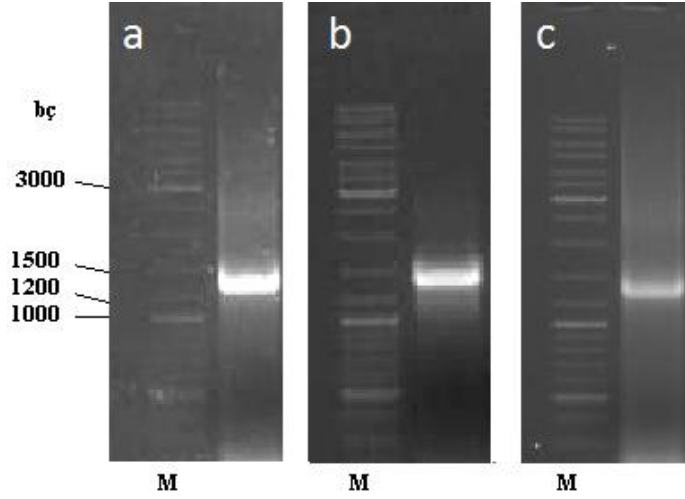
Çizelge 3. 2 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 2 için tasarlanan primerler (Restriksiyon endonükleaz kesim dizisi mavi, başlama kodonu kırmızı, sonlanma kodonu yeşil ve 6 His-tag dizisi turuncu renk ile gösterilmiştir)

Primer Adı	Primer Dizisi	Uzunluk (bç)	T _m (°C)
TaENO6	5'TTTCTGCAGATGTCTGTTGTTAAGTCTCTTAAAGCCCGGG AAATTCTTGTGTTTGTGTTAATAACAATTTTGTAG 3'	73	69,2
TaENO7	5'TTTCTGCAGATGTCTGTTGTTAAGTCTCTTAAAGCCCGGG AAATTCTGAACAATTTTGTAGATTCCAGAGG 3'	71	71
TaENO4	5'TTTCTGCAGATGTCTGTTGTTAAGTCTCTTAAAGCCCGGG AAATTCTTGIAATTCCAGAGG 3'	59	70,9
TaENO2	5'TTTTCTGCAGTTAGTGATGGTGATGGTGATGGTGGGAC AAGTTTCTG 3'	47	68,9

Bu yöntem ile geliştirilen üç aşamalı polimeraz zincir reaksiyonu ile intronun çıkarılması tasarımı, bilginiz dahilinde, ilk kez bu tez çalışmasında uygulanmıştır. İlk aşama polimeraz zincir reaksiyonunda introndaki ilk 12 bç'lik dizinin uzaklaştırılması için 5' primeri TaENO6 ve 3' primeri TaENO2 ile gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu ile genin amplifikasyonu sağlanmıştır (Şekil 3.5a).

İkinci aşama polimeraz zincir reaksiyonunda kalıp olarak ilk aşamadaki PCR ürünü kullanılmış ve introndaki ikinci 12 bç'lik dizinin uzaklaştırılması için 5' primeri TaENO7 ve 3' primeri TaENO2 kullanılarak genin amplifikasyonu sağlanmıştır (Şekil 3.5b).

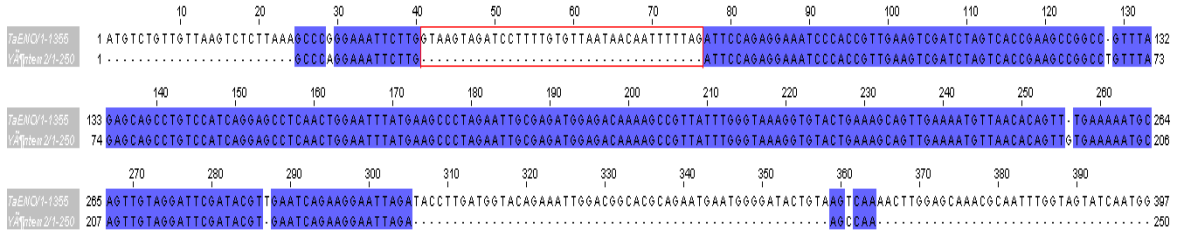
Üçüncü aşama polimeraz zincir reaksiyonu temelli yönlendirilmiş mutagenезinde kalıp olarak ikinci aşamadaki PCR ürünü kullanılmış ve introndaki son 12 bç'lik dizinin uzaklaştırılması için 5' primeri TaENO4 ve 3' primeri TaENO2 kullanılarak TaENO'nun intronsuz amplifikasyonu hedeflenmiştir (Şekil 3.5c).



Şekil 3. 5 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3 ile amplifikasyonu gerçekleştirilen birinci (a: 1353 bç), ikinci (b: 1341 bç), üçüncü (c: 1329 bç) basamak ürünlerinin jel görüntüsü. M: GeneRuler DNA Marker

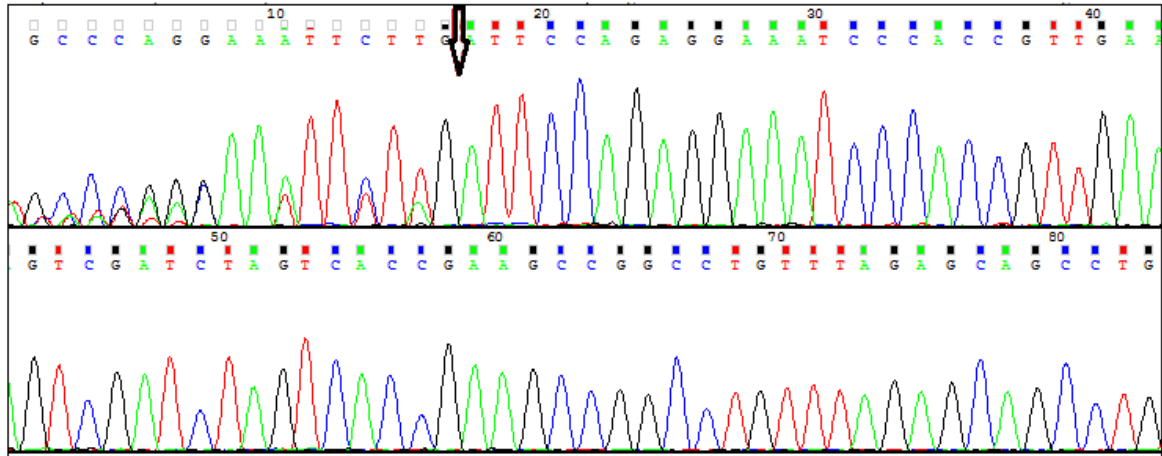
PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 1'de belirtildiği gibi intronun 36 bç büyüklüğünde olması nedeniyle EtBr ile boyanmış %1'lik agaroz jelde, intronlu ve intronsuz genin ayrımı yapılamadığı için üç aşaması tamamlanmış PCR ürünü DNA dizi analizine gönderilmiştir. Bu yöntem ile intronun uzaklaştırılmasında başarı sağlanıp sağlanmadığı DNA dizi analizi sonucuna göre belirlenmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 2 ile elde edilen PCR ürünü, TaENO geninde intronun olduğu 5' ucunu düzgün okuyabilmesini sağlamak amacıyla genin 345. bazından başlayarak 3'←5' yönünde okuma yapan TaENO5 primeri ile dizilenmiştir.

İntronlu TaENO gen dizisi ile Yöntem 2 ile elde edilen PCR ürününün dizileme sonucu karşılaştırması Şekil 3.6'da verilmiştir. Bu karşılaştırmalı dizi analizi web tabanlı bir program kullanılarak yapılmıştır [104]. Şekil 3.6'da görüldüğü gibi intronu 12 bç'lik küçük parçalar halinde uzaklaştırma stratejisi başarı sağlamıştır. Bu sonuç ile, mutasyon yapılması tasarlanan DNA uzunluğunun, mutasyonu sağlayacak primer uzunluğu ile orantılı olması gerektiği ve ayrıca primerin kalıp DNA'da mutasyonu tasarlanan bölgeden önce ve sonraki bağlanma uzunluklarının da önemli olduğu yargısına varılmaktadır.



Şekil 3. 6 İntronlu *TaENO* gen dizisi (1. sıra) ile PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 2 ile elde edilen ürünün *TaENO5* primeri ile 3'→5' yönünde okunan DNA dizi analizi sonucunun (2. sıra) karşılaştırılması (kırmızı kutu içine alınan bölge intronun çıkarıldığı bölgeyi temsil etmektedir)

Yöntem 1'de kullanılan ve tek aşamalı polimeraz zincir reaksiyonuyla 36 bç'lik intronu uzaklaştırmada başarısız olan *TaENO4* primerinin, Yöntem 2'de introndaki son 12 bç'lik diziyi uzaklaştırmada başarılı olması bu yargıların doğruluğunu göstermektedir. Yöntem 2'de *TaENO4* primeri mutasyonu hedeflenen dizinin üçte bir oranında daha küçük bir dizi olması nedeniyle intron bölgesini atlayarak, introndan sonraki dizi ile doğru bir şekilde bağlanabilmiş ve intronun son parçasını uzaklaştırarak *TaENO*'yu intronsuz olarak amplifiye edebilmiştir. Mutasyon yapılacak bölgenin Yöntem 1'e göre kısa tutulması sonucunda primer ve kalıp DNA arasında oluşması istenilen hidrojen bağları, moleküller arası etkileşim mesafesi doğru bir şekilde sağlandığından dolayı kurulabilmiştir. Yöntem 2'de kullanılan diğer *TaENO6* ve *TaENO7* primerlerinin başarılı olmasında da aynı nedenler etkili olmuştur. Bu sonuçlarla tek bir primer ile mutasyon yapılırken, mutasyon yapılacak DNA uzunluğunun ve primerin mutasyon bölgesinden önceki ve sonraki dizi uzunluğunun, primerin kalıp DNA ile doğru bir şekilde bağlanması için dikkat edilmesi gereken unsurlar olduğu söylenebilir. PCR temelli mutagenез tekniği 2 ile elde edilen PCR ürününün kromatogramında intronun çıkarıldığı bölge Şekil 3.7'de verilmiştir.

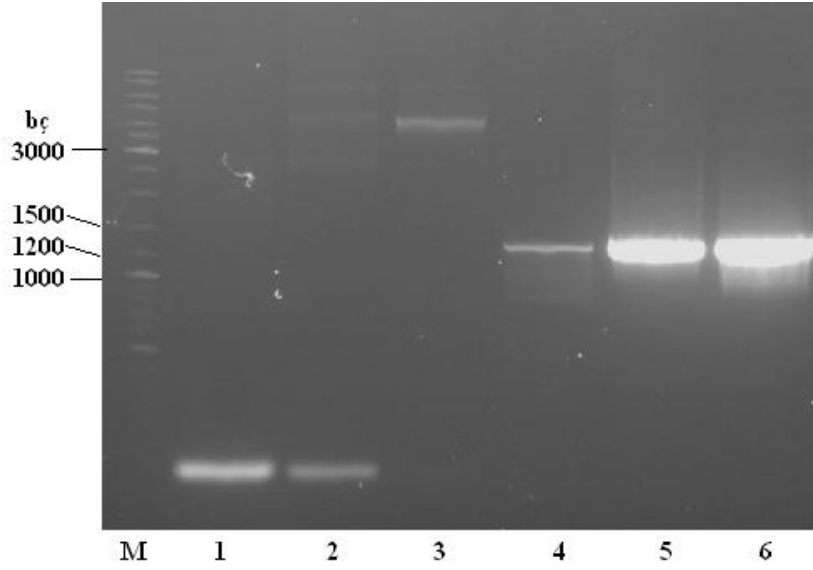


Çizelge 3. 3 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3 için tasarlanan primerler (Restriksiyon endonükleaz kesim dizisi mavi, başlama kodonu kırmızı, sonlanma kodonu yeşil, 6 His-tag dizisi turuncu renk ve intronun uzaklaştırıldığı bölge kırmızı çizgi ile gösterilmiştir)

Primer Adı	Primer Dizisi	Uzunluk (bç)	Tm (°C)
TaENO8	5' GGAAATTCTTG I ATTCCAGAGGAAATCC 3'	27	56,7
TaENO9	5' GGATTCCTC I TGGAATCAAGAATTTCC 3'	27	56,7
TaENO4	5'TTTCTGCAGATGTCTGTTGTTAAGTCTCTTAAAGCCCGGG AAATTCTTG I ATTCCAGAGG 3'	59	70,9
TaENO2	5'TTTTCTGCAGTGA GTGATGGT GATGGTGGGACA AGTTTCTG 3'	47	68,9

Introndan önceki gen dizisinin oldukça kısa olması ve bu nedenle gerekli DNA parçasının elde edilememesi ihtimali göz önünde bulundurularak, öncelikli olarak tercih edilmeyen bu yöntem, Yöntem 2'de başarılı bir sonuca ulaşamaması nedeniyle Yöntem 2 denemeleri ile eş zamanlı olarak yürütülmüştür.

Bu yöntemde *TaENO* genini introndan arındırmak için ilk polimeraz zincir reaksiyonuyla gende, introndan önce ve sonra gelen DNA parçalarının, TaENO8 ve TaENO9 primerleri aracılığıyla birbirlerine komplementer diziler içerecek şekilde amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. TaENO4 ve TaENO9 primerleri ile birinci gen parçası, intronu atlayarak ve TaENO9 primerine eklenmiş olan ve gen parçasının, introndan sonra gelen 3' ucuna komplementer olacak dizi ile birlikte 68 bç büyüklüğünde amplifiye edilmiştir. Aynı reaksiyon koşullarında ve aynı kalıp DNA ile TaENO8 ve TaENO2 primerleri kullanılarak ikinci gen parçası, TaENO8 primerine eklenmiş olan ve ikinci gen parçasının introndan önce gelen 5' ucuna komplementer dizi ile birlikte 1311 bç büyüklüğünde amplifiye edilmiştir. Her iki DNA parçasının amplifikasyonunda uygun olan DNA polimeraz enzim seçimi için 3 farklı DNA polimeraz ile polimeraz zincir reaksiyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.8).

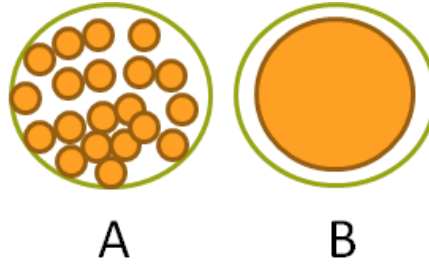


Şekil 3. 8 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3'te farklı enzimlerle amplifikasyon edilen birinci ve ikinci gen parçalarının jel görüntüsü M: GeneRuler DNA Marker, 1, 2, 3 nolu hatlar: birinci gen parçası amplifikasyon ürünleri, 4, 5, 6 nolu hatlar: ikinci gen parçası amplifikasyon ürünleri. 1, 4 nolu hatlar *Pfu* DNA Polimeraz ile, 2 ve 5 nolu hatlar *Taq* polimeraz ile, 3 ve 6 nolu hatlar Long PCR Enzyme Mix ile amplifiye edilmiştir.

Long PCR Enzyme Mix enzimi, *Taq* polimeraz ile ısı kararlılığı yüksek ve hata okuma (proofreading) aktivitesine sahip bir diğer enzimin karışımından oluşan bir enzimdir. Bu iki enzimin işbirliği, uzun PCR ürünlerinin çoğaltılmasında *Taq* polimeraz'dan daha fazla verim sağlamaktadır [106]. Bu nedenle 68 bç'lik kısa birinci gen parçasının amplifikasyonunda başarısız olmuş olabilir. Aynı zamanda *Pfu* DNA polimeraz da hata okuma özelliğine sahiptir. Amplifikasyon sırasında oluşabilecek enzim kaynaklı olası mutasyonları engellemek için *Pfu* DNA Polimeraz ve Long PCR Enzyme Mix ile elde edilen ürünler ile çalışmaya devam edilmiştir. Hata okuma özelliği olmadığı için *Taq* DNA Polimeraz enzimi ile elde edilen ürünlerin kullanımı güvenli bulunmamıştır. Şekil 3.8'de görülen sonuca göre birinci gen parçasının amplifikasyonu için en uygun enzim *Pfu* DNA Polimeraz ve ikinci gen parçasının amplifikasyonu için en uygun enzim Long PCR Enzyme Mix olarak seçilmiştir.

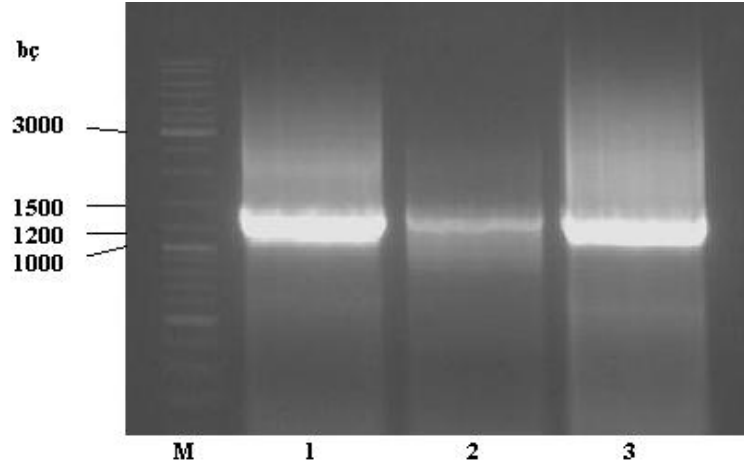
Elde edilen birinci ve ikinci gen parçaları introndan arındırılmış olmalıdır ve birbirine komplementer diziler içermektedir. *TaENO* genini intronsuz ve tam uzunlukta elde etmek için iki basamaklı bir polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu

reaksiyonun ilk basamağında, elde edilen birinci ve ikinci gen parçalarının komplementer olan dizilerinin eşleşmesi için DNA polimeraz enzimi içeren, primersiz bir polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. DNA parçaları arasındaki eşleşmeyi doğru oranda sağlayabilmek için, öncelikle üretilen iki gen parçasının konsantrasyonları eşit olan stokları hazırlanmıştır. 68 bç büyüklüğündeki birinci gen parçasını içeren stoktan 1 birim, 1311 bç büyüklüğündeki ikinci gen parçasını içeren stoktan ise 20 birim olacak şekilde polimeraz zincir reaksiyonunun birinci basamağı gerçekleştirilmiştir. Çünkü konsantrasyonlarının eşit olduğu durumda, ikinci gen parçasının baz sayısı birinci gen parçasının baz sayısına oranı yaklaşık olarak 20'dir. Bu eşitlemenin amacı reaksiyonda eşleşmesi beklenen birinci ve ikinci gen parçaları arasında parçacık eşitlemesini sağlamaktır. Küçük olan 68 bç'lik birinci gen parçası, ikinci gen parçası ile aynı konsantrasyondaki stoğunda birim hacmi doldurmak için daha fazla parçacık bulundurulmalıdır. Büyük olan 1311 bç'lik ikinci gen parçası ise konsantrasyon eşitliği durumunda birim hacmi doldurmak için 20 kat daha az sayıda parçacık bulundurulmalıdır (Şekil 3.9). Bu nedenle konsantrasyonlarının eşit olduğu durumda, parçacık eşitlemesi için 1311 bç'lik ikinci gen parçasından 20 birim alınırken, 68bç'lik birinci gen parçasından 1 birim alınarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.



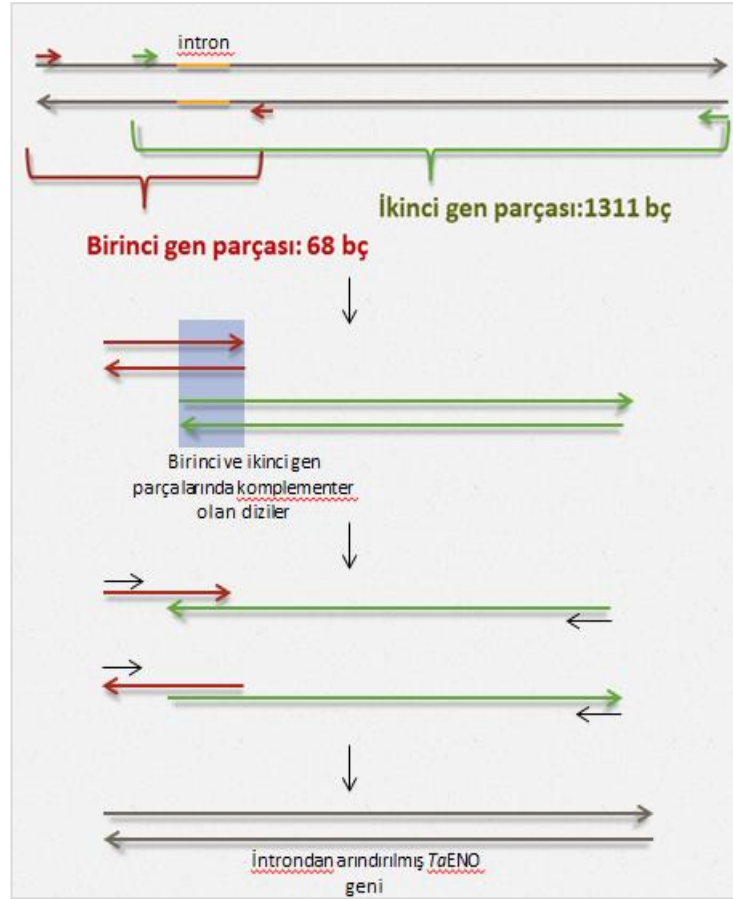
Şekil 3. 9 Birinci ve ikinci gen parçalarının eşit konsantrasyonda iken birim hacimde içerdikleri gen parçalarının şematik gösterimi A: 68 bç büyüklüğündeki birinci gen parçası, B: 1311 bç büyüklüğündeki ikinci gen parçası

İkinci basamakta ise ilk basamakta üretilen birleştirilmiş DNA'ları içeren reaksiyona, geni bütün olarak çoğaltabilecek olan 5' primeri TaENO4 ve 3' primeri TaENO2 ve DNA polimeraz eklenerek genin intronsuz amplifikasyonu sağlanmıştır [88]. Gen parçalarının birleştirilmesini ve amplifikasyonunu sağlayacak en uygun DNA polimerazı tespit etmek için aynı reaksiyon, 3 farklı DNA polimeraz ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3. 10 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3 ile elde edilen birinci ve ikinci gen parçalarının farklı enzimlerle gerçekleştirilen birleştirilme reaksiyonu ürünlerinin jel görüntüsü M: GeneRuler DNA Marker, 1: *Pfu* DNA Polimeraz enzimi ile, 2: Long PCR Enzyme Mix ile, 3: *Taq* DNA Polimeraz enzimi ile gerçekleştirilen birleştirme reaksiyonu ürünleri

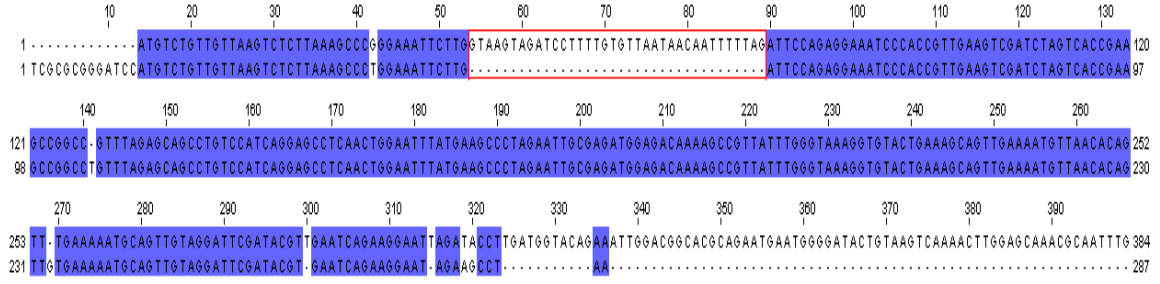
Şekil 3.10'da görüldüğü gibi birinci ve ikinci gen parçaları ile yapılan birleştirme reaksiyonu tüm enzimlerle başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir ve *Pfu* ve *Taq* DNA polimeraz ile yaklaşık olarak aynı amplifikasyon verimi elde edilmiştir. Ancak *Pfu* DNA polimeraz enzimi, hata okuma aktivitesine sahip olduğundan olayı birleştirme reaksiyonu için en uygun enzim olarak seçilmiştir. *Ta*ENO'nun polimeraz zincir reaksiyonu temelli yönlendirilmiş mutagenез tekniği 3 ile intronsuz olarak amplifikasyonun bir bütün olarak şematik gösterimi Şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3. 11 *TaENO*'nun polimeraz zincir reaksiyonu temelli yönlendirilmiş mutageniz tekniği 3 ile intronsuz olarak amplifikasyonun şematik gösterimi

Bu yöntem ile intronun uzaklaştırılmasında başarı sağlanıp sağlanmadığı DNA dizi analizi sonucuna göre belirlenmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu temelli yönlendirilmiş mutageniz yöntemi 3 ile elde edilen PCR ürünü, *TaENO* geninde intronun olduğu 5' ucunu düzgün okuyabilmesini sağlamak amacıyla genin 345. bazından başlayarak 3'←5' yönünde okuma yapan *TaENO5* primeri ile dizilenmiştir.

İntronlu *TaENO* gen dizisi ile Yöntem 3 ile elde edilen PCR ürününün dizileme sonucu karşılaştırması Şekil 3.12'de verilmiştir. Bu karşılaştırmalı dizi analizi web tabanlı bir program kullanılarak yapılmıştır [104].



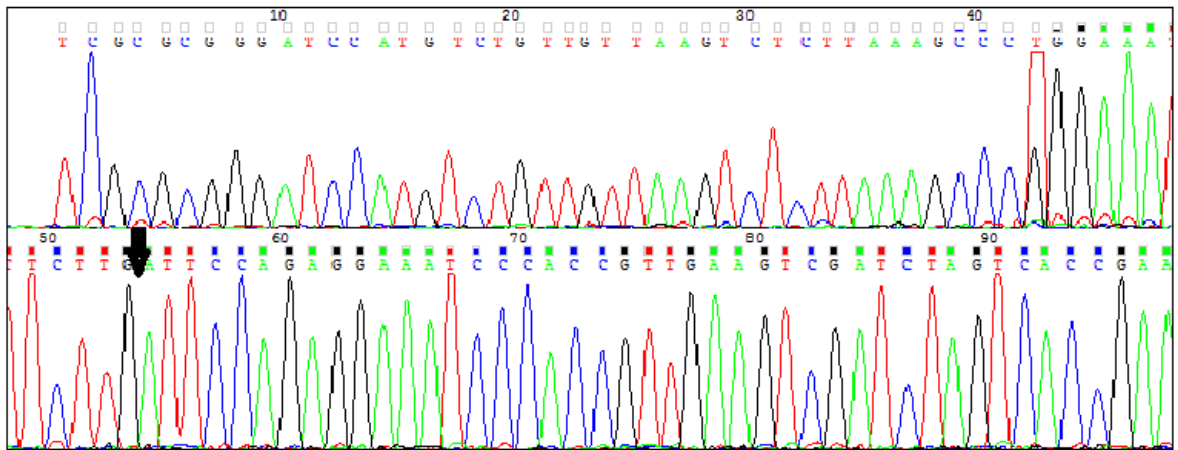
Şekil 3.12 İntronlu *TaENO* gen dizisi (1. sıra) ile PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3 ile elde edilen ürünün *TaENO5* primeri ile 3'→5' yönünde okunan DNA dizi analizi sonucunun (2. sıra) karşılaştırılması (kızıl kutu içine alınan bölge intronun çıkarıldığı bölgeyi temsil etmektedir)

Yöntem 3'te birinci ve ikinci gen parçalarını oluştururken intronlu bölgeyi atlayan *TaENO8* ve *TaENO9* primerleri introndan önceki 11 bç'lik ve introndan sonra gelen 16 bç'lik diziye içermekte ve bu şekilde delesyon yapılacak intron bölgesini hemen hemen ortalarak, primer ve kalıp DNA arasındaki hidrojen bağı oluşumunu ve doğru bağlanma şartlarını gerçekleştirmişlerdir. Diğer yöntemlere göre başarı sağlamanın nedenleri şöyle sıralanabilir:

Yöntem 1'deki *TaENO4* primeri genin başlama kodonu (ATG) ndan itibaren introna kadar gelen oldukça uzun bir DNA dizisini içermektedir. Uzun bir primer olduğu için, intronlu bölgeye ulaşana kadar kendi içinde katlanmaların oluşma ihtimali oldukça yüksektir. Ayrıca bu katlanmalardan herhangi birinin oluşmadığı durumda bile, intronun öncesi ve sonrasında içerdiği baz sayısı farkı kalıp DNA ile bağlanmayı hedeflenen şekilde gerçekleştirememiş olabilir. Yöntem 3'te ise primer uzunluğu 27 bazda tutularak primerin kendi içinde oluşacak katlanma ihtimalleri azaltılmıştır. Ayrıca intronun öncesi ve sonrasında içerdiği baz sayısı yakınlığı ile kalıp DNA ile bağlanma hedeflenen biçimde gerçekleştirilmiştir.

Yöntem 2'de üç farklı uzun primerle sağlanabilen intronun çıkarılması, burada farklı bir yaklaşımla iki mutajenik primer yardımıyla sağlanmıştır. İntron *TaENO* geninde 5' ucunun 40. bazından başladığı ve introndan önceki birinci gen parçasının oldukça küçük olmasından dolayı amplifikasyonunda sorun yaşanabileceği düşünüldüğü için intron çıkarma deneyinde öncelikli olarak intronu üç aşamada uzaklaştıracak olan Yöntem 2'de başarı sağlanacağı öngörülmekteydi ancak, Yöntem 3'teki olası herhangi bir soruna karşı Yöntem 2 denemeleri de eş zamanlı olarak yapılmıştır. Yöntem 2'de üç aşamalı

olarak gerçekleştirilen mutagenез ile, son 12 bç'lik intron parçası uzaklaştırıldığında gen intronsuz olarak tam uzunlukta amplifiye edilmiştir. Yöntem 3'te ise gen, introndan önceki ve sonraki dizileri içeren ve birbirine komplementer diziler içeren iki farklı gen parçası halinde üretilmiş ve bu parçaların birleştirilmesi ile genin tam uzunlukta amplifikasyonu sağlanmıştır. Yöntem 3'ün Yöntem 2'ye kıyasla daha kısa sürede gerçekleştirilebilmesi ve Yöntem 2'deki her bir polimeraz zincir reaksiyonu basamağında bir önceki reaksiyon ürününün kalıp olarak kullanılması nedeniyle düşük verimde ürün oluşturmaları nedeniyle son yöntemin üstün olduğu söylenebilir. Ancak intronun gen içerisinde 5' ya da 3' ucuna daha yakın olması ve Yöntem 3'teki yaklaşımla daha küçük bir gen parçası oluşumu gereken durumlarda, bu parçanın sentezinde oluşabilecek sorunlar nedeniyle Yöntem 2 alternatif bir yöntem olarak kullanılabilir. Yöntem 3 ile edilen PCR ürününün kromatogramında intronun çıkarıldığı bölge Şekil 3.13'te verilmiştir.

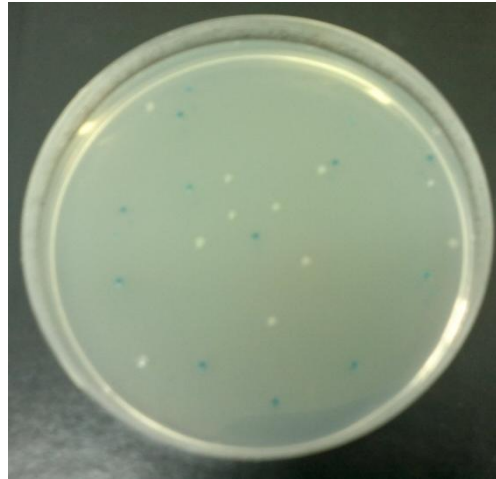


Şekil 3. 13 PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3 ile elde edilen PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramında intronun çıkarıldığı bölge (intronun uzaklaştırıldığı bölge siyah ok ile gösterilmiştir)

3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Yönlendirilmiş Mutagenез Yöntemi (Yöntem 3) ile İntondan Arındırılan *Ta*ENO'nun pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Aktarılması

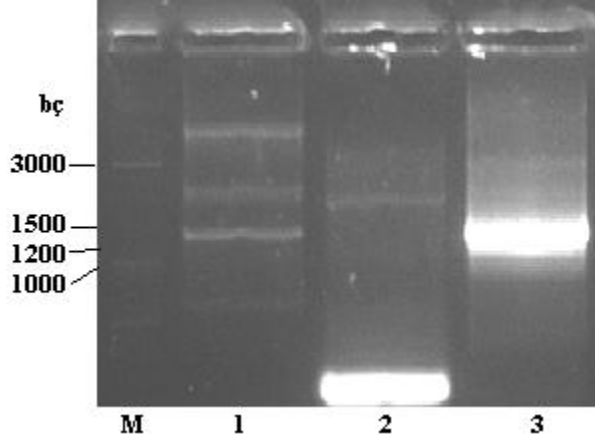
*Ta*ENO'nun ifade vektörüne aktarılmasında yaşanabilecek herhangi bir sorun karşısında uzun süren mutagenез aşamalarını tekrarlamamak için, PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi 3 ile amplifiye edilmiş introndan arındırılan *Ta*ENO, pGEM-T Easy

klonlama vektörüne aktarılmıştır. Ayrıca uzun süren mutagenез çalışmalarına ek olarak, pKK223-3 ifade vektörüne aktarımda genin her iki ucunda da aynı enzim kesim bölgesinin bulundurulması gerekliliği, genin vektöre promotor ile ters yönde girme olasılığını oluşturmuş ve genin ifadesinin yapılamaması sećeneđini doğurmuştur. Bu nedenle ifade vektörüne yapılacak olası başarısız bir transformasyonda intron çıkarma işlemlerinin baştan tekrarlanmasını engellemek amacıyla DNA dizi analizi sonucu intronsuz olduğu kanıtlanmış gen, klonlama vektörüne aktarılmıştır. Klonlama basamakları pGEM[®]-T Easy vektör sistemi kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerćekleřtirilmiştir [84]. Transformasyon sonrasında amfisilin ićeren LB-BSA petrilerde negatif mavi ve pozitif beyaz koloniler gözlemlenmiştir (şekil 3.14). Elde edilen beyaz kolonilerden 3 adedi sıvı besiyerine alınıp çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübe edilmiştir.



řekil 3. 14 pGEM[®]-T Easy klonlama vektörü ile gerćekleřtirilen transformasyon sonrası LB-BSA petrilerinde gözlenen koloniler

Sıvı besiyerinde geliştirilen kolonilerden miniprep plazmid DNA izalasyonu yapılmış ve transformasyon başarısı, elde edilen plazmid DNA kalıp olarak kullanılarak ve TaENO4 ve TaENO2 primerleri ile gerćekleřtirilen PCR taraması ile belirlenmiştir. Bu PCR örneklere de EtBr ile boyanmış %1'lik agaroz jelde koşturulmuş ve 3 numaralı koloniye ait olan PCR ürünlerinde beklenen büyüklükte bantlar gözlemlenmiştir (şekil 3.15). *TaENO* geninin ifadesi aşaması ićin 3 nolu koloniden elde edilen plazmid DNA örneği kalıp DNA olarak alınmış ve intronsuz *TaENO*'nun ifade vektörüne aktarılmasında kullanılmıştır.



Şekil 3. 15 pGEM®-T Easy klonlama vektörü ile gerçekleştirilen transformasyon sonrasında yapılan PCR taramasının jel görüntüsü M: GeneRuler DNA Marker, 1, 2: Negatif sonuçlar, 3 : Pozitif sonuç

3.3 *Theileria annulata*'nın Enolaz Enziminin Molekül Ağırlığı ve Molar Absorblama Katsayısının Hesaplanması

Theileria annulata'nın enolaz enziminin molekül ağırlığı ve molar absorblama katsayısı (extinction coefficient) 'Peptide Property Calculator' isimli web tabanlı bir program ile hesaplanmıştır [94]. Program ile yapılan çalışmanın basamakları şu şekilde özetlenebilir;

İntronsuz *TaENO*'nun 442 amino asitlik dizisi programa veri olarak girilmiştir.

Program tarafından proteinin molekül ağırlığı ve molar absorblama katsayısı hesaplanmıştır.

İntronsuz *TaENO*'nun molekül ağırlığı 48072 g/mol ve molar absorblama katsayısı ise $36070 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

Yapılan hesaplamalara göre;

280 nm'de 1 M *TaENO* = 48072 g/l = 48072 g/mol (yaklaşık olarak 48 kDa) olarak optimize edilmiştir.

Enolaz enziminin molekül ağırlığı ve molar absorblama katsayısı, protein konsantrasyonunu tayin etmek ve SDS-PAGE analizlerinde enzim ekspresyonunun molekül ağırlığına bakılarak tayini için gerekli olduğundan, bu parametrelerin hesabı ifade vektörü ile yapılan işlemlerden önce verilmiştir.

3.4 İntrondan Arındırılan *Ta*ENO'nun İfade Vektörüne Alt Klonlaması, Enolaz Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

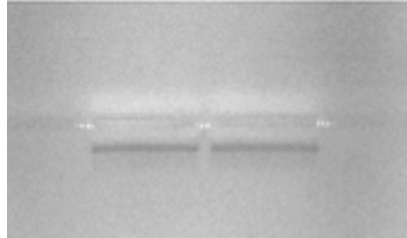
pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlaması yapılan intronsuz *Ta*ENO geninin iki farklı ifade vektöründe ekspresyonu denenmiştir. İlk ifade vektörü pKK223-3 ile yapılan ekspresyon çalışmalarında (alt bölüm 3.4.1) enolaz enziminin yeterli seviyede ekspresyonu sağlanamamış ve uygun saflık derecesinde elde edilememiştir. Bu nedenle ekspresyon çalışmaları için farklı bir ifade vektörü olan pLATE31 vektörüne geçilmiştir (alt bölüm 3.4.2). Bu vektör ile enzimin yeterli miktarda ve saflıkta eldesi sağlanmış ve kinetik analizi yapılabilmektedir.

3.4.1 *Ta*ENO'nun Birinci İfade Vektörüne (pKK223-3) Alt Klonlaması, Enolaz Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

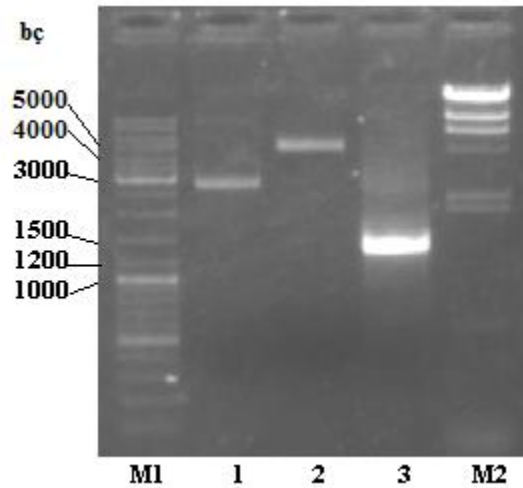
3.4.1.1 *Ta*ENO'nun pKK223-3'e Alt Klonlaması ve Enolaz Enziminin Ekspresyonu

pGEM-T Easy klonlama vektörüne aktarılan ve PCR taraması sonucunda pozitif sonuç veren 8 nolu koloniden elde edilen plazmid DNA kalıp olarak kullanılarak ve ifade vektörüne aktarıma uygun enzim kesim bölgelerini içeren *Ta*ENO4 ve *Ta*ENO2 primerleri ile PCR gerçekleştirilmiş ve gen ifade vektörüne aktarıma uygun halde çoğaltılmıştır. Çoğaltılan ürünler kristal viyole ile boyanan agaroz jelde yürütülmüş (Şekil 3.16) ve diğer PCR artıklarından ayrılmanması sağlanarak, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kullanılarak jelden saflaştırılmıştır [90]. -80 °C derin dondurucuda *E. coli* hücrelerine aktarılmış halde bulunan pKK223-3 ifade vektörü plazmid DNA izolasyon metodu ile elde edilmiştir. Yöntem 2.2.8.2'de belirtildiği gibi intronsuz *Ta*ENO geni ve pKK223-3 ifade vektörü *Pst*I restriksiyon enzimiyle kesilmiş (Şekil 3.17) ve ligasyonları gerçekleştirilmiştir. İntroonsuz *Ta*ENO geninin pKK223-3 ifade vektörüne aktarılması ve aktarılan genin PCR ile kontrolü işlemleri 2.2.8'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. pKK223-3 vektörünün tek enzimle kesimi nedeniyle tekrar kendi üstüne katlanma ihtimali bulunmaktadır. Bu nedenle plazmid DNA'nın 5' ucunda bulunan fosfat gruplarını uzaklaştırarak enzim kesimi yapılmış lineer plazmid DNA'nın, tekrar sirküler hale gelmesini engellemek amacıyla alkalin fosfataz enzimi sipariş edilmiş, ancak enzim temininin uzun bir süreyi kapsayacak olması nedeniyle

transformasyon deneyine devam edilmiştir. Transformasyon sonucunda, alkalin fosfataz muamelesi olmadan pozitif sonuç alınabilmiş ve bundan dolayı alkalin fosfataz enzim temininin ardından deney tekrar edilmemiştir.



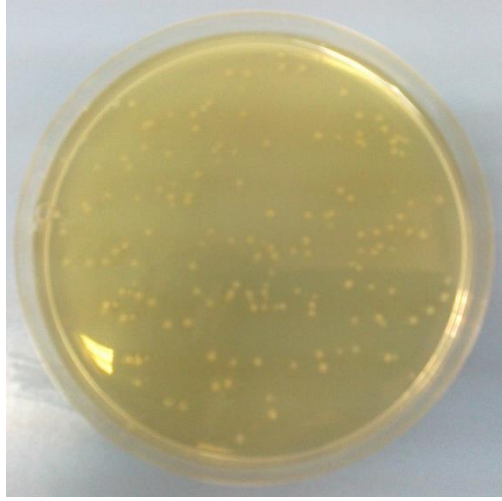
Şekil 3. 16 İntronsuz *Ta*ENO geni PCR ürünlerinin kristal viyole ile boyanan agaroz jel görüntüsü 1, 2: *Ta*ENO PCR ürünleri



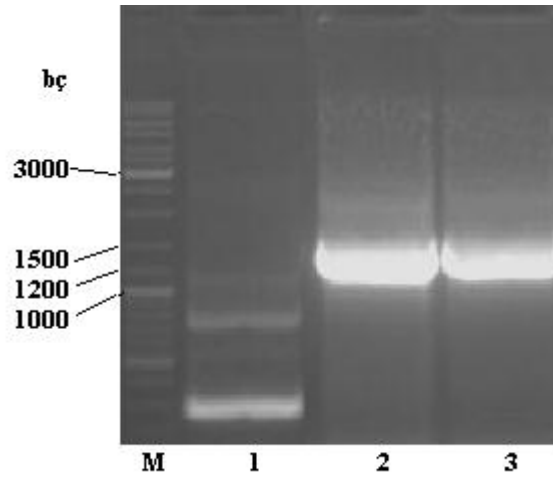
Şekil 3. 17 *Ta*ENO geninin ve pKK223-3 plazmid DNA'sının *Pst*I kesimi yapılmış saf ürünleri M1: GeneRuler DNA Marker, 1: Enzim kesimi yapılmamış pKK223-3 plazmid DNA, 2: *Pst*I kesimi yapılmış saf pKK223-3 plazmid DNA, 3: *Pst*I kesimi yapılmış saf *Ta*ENO geni, M2: Lambda DNA/*Hind*III Marker

Transformasyon sonrasında LB-amfisilin içeren petrilerde koloni oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.18). pKK223-3 vektörü mavi-beyaz koloni ayrımı sağlamadığı için rastgele seçilen 2 koloni sıvı besiyerine alınıp çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübe edilmiştir. Sıvı besiyerinde geliştirilen kolonilerden miniprep plazmid DNA izolasyonu yapılmış ve transformasyon başarısı, elde edilen plazmid DNA kalıp olarak kullanılarak ve *Ta*ENO4 ve pKK223-3 C terminal primerleri ile gerçekleştirilen PCR taraması ile belirlenmiştir. Negatif kontrol reaksiyonunda aynı primerler ile kalıp olarak gen aktarımı yapılmamış pKK223-3 plazmid DNA'sı kullanılmıştır. Bu PCR örnekleri EtBr ile boyanmış %1'lik

agaroz jelde koşturulmuş ve kolonilere ait olan PCR ürünlerinde beklenen büyüklükte bantlar gözlemlenmiştir (Şekil 3.19).



Şekil 3. 18 pKK223-3 ifade vektörü ile gerçekleştirilen transformasyon sonrası amfisilin içeren LB petrilerde gözlenen koloniler

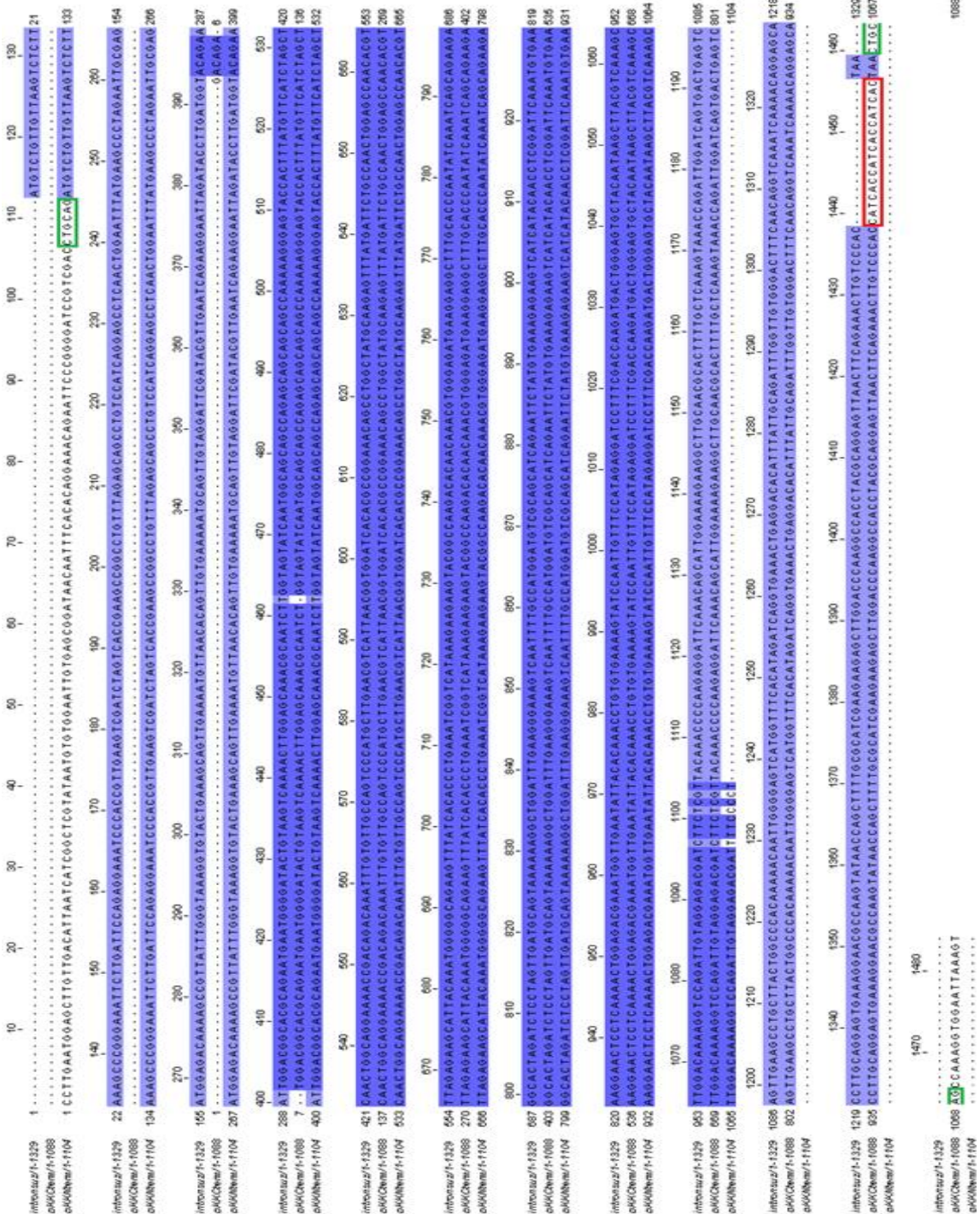


Şekil 3. 19 pKK223-3 vektörü ile gerçekleştirilen transformasyon sonrasında yapılan PCR taramasının jel görüntüsü M: GeneRuler DNA Marker, 1: Negatif kontrol, 2 ve 3: 1 ve 2 nolu kolonilere ait pozitif sonuçlar

1 numaralı örnekten elde edilen plazmid DNA dizilemeye gönderilmiştir. Genin ifade vektörüne promotor ile aynı yönde klonlandığını ve saflaştırma işlemlerinde gerekli olan 6 His-tag ilavesinin varlığını göstermek amacıyla dizileme pKK223-3 N ve pKK223-3 C terminal primerleri ile yapılmıştır. Örneğin DNA dizi analizi sonucu pozitifdir. 1 numaralı örnekten elde edilen plazmid DNA örneğinin 2 primerle okunan DNA dizi

analizi sonuçları ile intronsuz *Ta*ENO geninin karşılaştırılması Şekil 3.20'de verilmiştir.

Bu karşılaştırmalı dizi analizi web tabanlı bir program kullanılarak yapılmıştır [104].

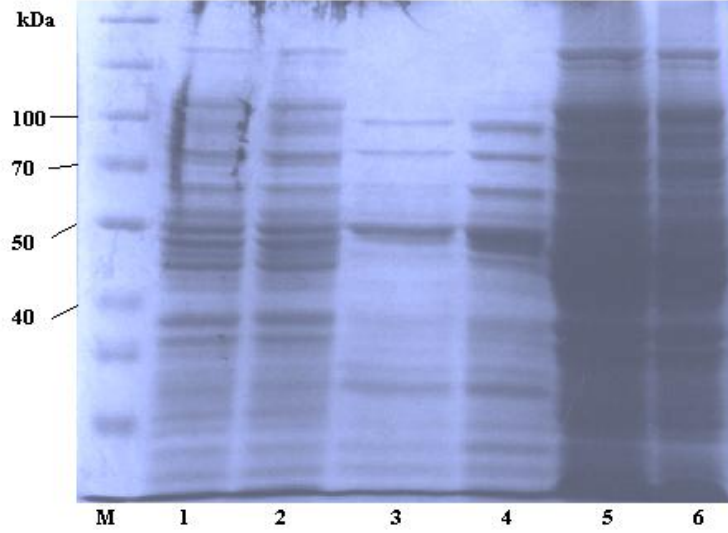


Şekil 3. 20 İntronsuz *Ta*ENO geni (1. sıra) ile dizileme örneğinin pKK223-3 C terminal primeri ile (2.sıra), pKK223-3 N terminal primeri ile gelen okumasının (3.sıra) karşılaştırılması (kırmızı kutu 6 His-tag ilavesini, yeşil kutular ise *Pst*I enzim kesim bölgesini göstermektedir)

Her bir primer tek başına, 1329 bp büyüklüğündeki intronsuz *TaENO* genini bütünüyle olarak okumakta başarı sağlayamamıştır. Bu nedenle iki zıt yönlü primerle yapılan DNA dizi analizleri ile genin tamamının okunması sağlanmıştır. Dizi analizi sonucunda *TaENO*'nun intronsuz bir şekilde promotor ile aynı yönde ve saflaştırma işlemleri için gerekli 6 His-tag ilavesiyle pKK223-3 ifade vektörüne aktarıldığı tespit edilmiştir. Enzim ifadesi için seçilen 1 nolu örneğin plazmid DNA'sının (MP1) pKK223-3 C terminal primeri kullanılarak elde edilen kromatogram görüntüsündeki 6 his-tag ilavesi Şekil 3.21'de verilmiştir.

Şekil 3. 21 pKK223-3 C terminal primeri ile dizilenen örneğin 6 His-tag ilavesini gösteren kromotogram görüntüsü (kırmızı kutu 6 His-tag dizisini göstermektedir)

*Ta*ENO genini, doğru bir şekilde ifade edilmesini sağlayacak promotor ile aynı yönde klonlandığı DNA dizi analizi ile ispatlanan 1 nolu koloninin ve *Ta*ENO genini içermeyen *E.coli* DH5 α soyunun 50 ml kültürlerinden elde edilen örnekler ile yapılan SDS-PAGE analizi Şekil 3.22’de verilmektedir. *Theileria annulata* enolaz enziminin molekül ağırlığı bölüm 3.3’te hesaplandığı gibi yaklaşık olarak 48 kDa’dur. SDS-PAGE görüntüsüne göre *Ta*ENO genini içeren ve içermeyen hücre kültürlerinden elde edilen süpernatant, toplam hücre ve pellet proteinleri arasında belirgin bir fark gözlenmemektedir.



Şekil 3. 22 pKK223-3 vektörü aracılığıyla *E.coli*'den elde edilen örneklerin SDS-PAGE görüntüsü M: Protein Marker, 1, 3, 5 nolu hatlar sırasıyla; *Ta*ENO genini içermeyen *E.coli* toplam hücre proteini, süpernatantı, pelleti, 2, 4, 6 nolu hatlar sırasıyla: *Ta*ENO genini içeren 1 nolu koloni hücre proteini, süpernatantı, pelleti

Aynı zamanda Çizelge 3.4'te verilen aktivite tayin metodu ile elde edilen $\Delta A_{240}/dk$ değerleri de geni içeren ve içermeyen kültürlerden elde edilen süpernatantlar arasında belirgin bir fark olmadığını ispatlamaktadır. Çizelge 3.4'te verilen $\Delta A_{240}/dk$ değerleri 40 μ l süpernatant ile yapılan iki ölçümün ortalaması alınarak verilmiştir.

Çizelge 3.4 *Ta*ENO geni içeren ve içermeyen *E.coli* süpernatantları ile elde edilen $\Delta A_{240}/dk$ değerleri

Örnek Adı	$\Delta A_{240}/dk$ değeri
<i>Ta</i> ENO genini içermeyen <i>E.coli</i> süpernatantı ile	0,013
<i>Ta</i> ENO genini içeren 1 nolu koloni süpernatantı ile	0,019

Daha önce aynı vektör sistemi ile yapılan benzer bir çalışmada, *Plasmodium falciparum* laktat dehidrogenaz enziminin ifadesinde küçük hacimli kültürden elde edilen ince protein bandının, büyük hacimli kültürde yapılan ifade çalışmalarında belirginleştiği ve elde edilen enzimin aktivite tayininin yapılarak, karakterizasyon ve kristalografi çalışmalarına gidildiği bildirilmiştir [107]. Bu nedenle, her ne kadar Çizelge 3.4'te

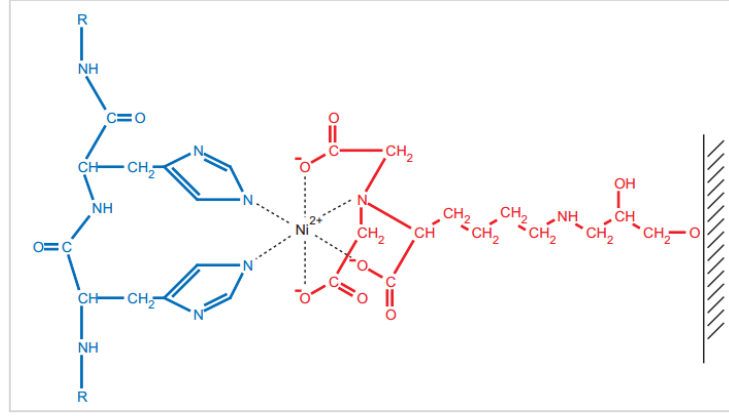
verilen kinetik değerler inaktif enzim üretimini göstermiş olsa da, Şekil 3.22'de verilen jel görüntüsüyle süpernatantta doğru büyüklükte belirgin bir bant görüldüğü için, çalışmamızda farklı bir ekspresyon sistemine geçilmeden önce aynı ifade vektörü aracılığıyla büyük hacimli kültürde enzim üretimi ve saflaştırma denemeleri yapılmıştır.

SDS-PAGE analizinde süpernatantlar arasında belirgin bir fark gözlenmemesinin nedenleri ise şu şekilde sıralanabilir;

*Ta*ENO geninin ekspresyon seviyesinin çok düşük olabileceği düşünöldüğü için, yapılan 50 ml kültürler ile elde edilen enzim miktarı gözlem yapmak için yeterli olmayabilir. Ayrıca orijinal soyda ifade edilen, enolaz ile yakın büyüklükteki diğer proteinler, düşük miktarda ifadesi yapılan enzimin jel üzerindeki ayrımını zorlaştırmış olabilir. Bu nedenle ifadesi yapılmış olabilecek muhtemel enolaz enziminin eldesi için 500 ml'lik kültür yapılmış ve kültürden elde edilen protein karışımına saflaştırma işlemi uygulanarak, enolaz enziminin fazla miktarda eldesi hedeflenmiştir.

3.4.1.2 *Theileria annulata*'nın Enolaz Enziminin Saflaştırması

E.coli vasıtasıyla üretilen rekombinant polihistidin ilaveli proteinlerin saflaştırılmasında metal-şelat afinite kromatografisi yaygın kullanılan bir tekniktir. Bu afinite kromatografisinin çok yaygın olarak kullanılan bir çeşidi nikel nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) agaroz kolon ile yapılmaktadır [108]. Nitrilotriasetik asit (NTA) resinine güçlü bir şekilde tutunan immobilize nikel (Ni) metal iyonları ve bu iyonlar ile proteindeki histidin amino asitleri arasındaki etkileşimin spesifikliği, Ni-NTA resinlerinin His-tag ilaveli protein ya da peptidlere yüksek afinite göstermesini sağlamaktadır. NTA, Ni iyonu küresel koordinasyonundaki altı bölgenin dördünü kaplayan bir dörtlü şelatlama bölgesine sahiptir (Şekil 3.23). Bu güçlü dörtlü şelatlama bölgesi ile nikel iyonları NTA'ya sıkıca bağlanmaktadır ve dolayısıyla Ni afinitesine sahip protein, Ni-NTA agarozu çok güçlü bir şekilde tutunmaktadır [92].



Şekil 3. 23 Ni-NTA ve 6 His-tag etkileşimi [92]

Kullanılan Ni-NTA afinite kromatografisinde ilk olarak, kolon maddesi ve 6 His-tag ilaveli enzim karışımı etkileştirilerek hedef proteinin kolona tutunması sağlanır. Daha sonra nikel iyonlarına afinitesi bulunan imidazolü düşük konsantrasyonda içeren yıkama tamponu ile spesifik olmayan proteinler kolondan yıkanmaktadır. Son olarak, yüksek imidazol konsantrasyonlu elüsyonlar ile 6 His-tag ilaveli proteinin kolondan eldesi sağlanmaktadır [92].

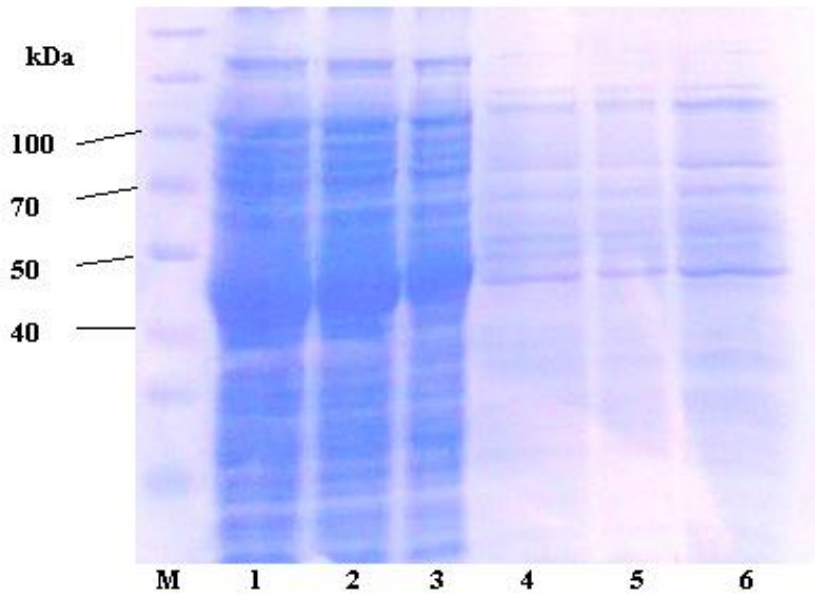
Saflaştırma aşamasında enolaz enzimini mümkün olan en yüksek saflıkta ve miktarda elde etmek için Ni-NTA agaroz ile afinite kromatografisi yapılmıştır.

Laboratuvarımızda daha önce yürütülmüş olan çalışmada bu vektör ve saflaştırma yöntemi aracılığıyla *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenaz enziminin ifadesi ve saflaştırılması başarıyla gerçekleştirilmiştir [109]. Bu nedenle *Theileria annulata* enolaz enzimi için yapılan ilk ifade ve saflaştırma çalışmasında, daha önce başarılı sonuç vermiş olan pKK223-3 ifade vektörü ve saflaştırma yöntemi kullanılmıştır.

pKK223-3 vektörü aracılığıyla *E. coli*'de ekspresyonu sağlanan enolaz enziminin ilk saflaştırma denemesinden ayrılan örnekler ile SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Hücrelerin sonikasyonu sonrasında elde edilen lizat (L), kolondan alınan ilk süzüntü (İS), yıkama sırasındaki süzüntüler (YS) ve saf proteinin hedeflendiği elüsyon (E) örnekleri SDS-PAGE jelde yürütülmüş ve elde edilen proteinin saflık oranı belirlenmeye çalışılmıştır.

Bu jelde kolondan alınan ilk süzüntü ve yıkamada, *Theileria annulata*'nın enolazı ile beklenen büyüklükte oldukça kalın bir bantlaşma gözlenmektedir. Şekil 3.24'te görüldüğü gibi üretilen enzimin büyük bir kısmı bu aşamalarda kaybedilmiştir.

Elüsyonlarda ise tek bant halinde eldesi hedeflenen enzim dışında, istenmeyen farklı proteinlere ait bantlar gözlenmiştir. SDS-PAGE analizinde enzimden küçük molekül ağırlıklı proteinlerin, enolaz enziminden büyük molekül ağırlıklı proteinlere oranla, daha iyi ölçüde uzaklaştırıldığı gözlenmiştir. Ancak enzimin, kolon süzüntülerinden gerçekleşen büyük kaybı engellenememiştir. Buna rağmen, enolaz enziminin elüsyonlarda çok ince bir bant halinde ve belirli bir oranda saf halde elde edildiği söylenebilir.



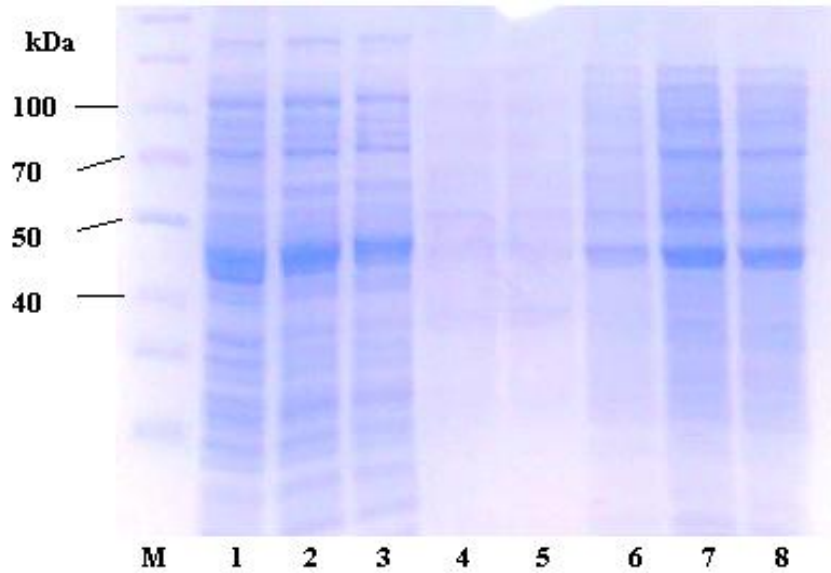
Şekil 3.24 pKK223-3 vektörü aracılığıyla *E.coli*'de üretilen enzimin birinci saflaştırma örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü M: Protein Markır, 1: Hücre lizati, 2: İlk süzüntü, 3: Yıkama süzüntüsü 1, 4: Elüsyon 3, 5: Elüsyon 4, 6: Elüsyon 5

Kolondan alınan süzüntü ve yıkamalardaki kayıplar ve elüsyonlardaki çoklu protein bantları bu saflaştırma yaklaşımının hedeflenen miktar ve saflıktaki enolaz enzim eldesi için yetersiz olduğunu göstermiştir.

İlk saflaştırmada kolondan alınan ilk ve yıkama süzüntülerindeki büyük enzim kaybı sorununu düzeltebilmek amacıyla, ilk saflaştırma örneklerinde enzim aktivite tayini yapılmaksızın, lizis ve yıkama tamponlarındaki imidazol konsantrasyonu 4 kat azaltılarak ikinci bir saflaştırma denemesi yapılmıştır [92]. Lizis ve yıkama tamponundaki imidazolün nikel iyonlarına afinitesi olduğu için, lizis tamponunda bulunan 20 mM imidazol, 6 His-tag ilaveli enolaz enziminin kolon ile istenilen düzeyde etkileşimine engel olabilir. Aynı zamanda yıkama tamponundaki 20 mM imidazol, Ni-

NTA ile tam olarak güçlü bağ kuramamış 6 His-tag ilaveli enzimin yıkama yoluyla kaybına neden olabilir. Bu nedenle istenmeyen proteinler ile kolon etkileşimini elemine edebilecek ancak, hedef enzimin düşük seviyeli ekspresyonu ve kolon ile zayıf etkileşimi nedeniyle yıkama yoluyla kaybına neden olmayacak asgari ölçüde 5 mM imidazol ile lizis ve yıkama işlemleri yapılmıştır. Diğer tüm şartlar ilk saflaştırma işlemi ile aynı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Saflaştırma işlemi sırasında ayrılan örnekler ile SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Hücrelerin sonikasyonu sonrasında elde edilen lizat (L), kolondan alınan ilk süzüntü (İS), yıkama sırasındaki süzüntüler (YS) ve saf proteinin hedeflendiği elüsyon (E) örnekleri SDS-PAGE jelde yürütülmüş ve proteinin saflık oranı belirlenmeye çalışılmıştır (Şekil 3.25).



Şekil 3.25 pKK223-3 vektörü aracılığıyla *E.coli*'de üretilen enzimin ikinci saflaştırma örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü M: Protein Markır, 1: Hücre lizatı, 2: İlk süzüntü, 3: Yıkama süzüntüsü 1, 4: Elüsyon 1, 5: Elüsyon 2, 6: Elüsyon 3, 7: Elüsyon 4, 8: Elüsyon 5

Bu deneme ile kolondan alınan ilk süzüntüdeki yüksek enzim kaybı diğer denemeye göre önemli oranda azaltılmış, ancak tamamen engellenememiştir. Lizis ve yıkama tamponlarında bulunan imidazol miktarındaki düşüş, hedef enolaz enziminin Ni-NTA kolon ile daha uygun şartlarda etkileşimini sağlamış ve diğer yöntemin süzüntülerinde kayıp olarak ortaya çıkan geniş bantların azalmasını sağlamıştır. İlk iki elüsyonda protein bandı gözlenmemesi, yıkamalardan sonra kolonda tutulu kalan proteinlerin Ni-NTA ile iyi bir şekilde etkileştiğini göstermektedir. 3. elüsyondan itibaren gözlenen

protein bantları ile hedef enzimin, ilk denemeye göre yüksek bir oranda elde edildiği gözlenmektedir. İlk yöntemde kolondan süzüntü ve yıkamalar ile kaybedilen protein miktarı ile yine aynı yöntemdeki elüsyonlarda elde edilen protein miktarı arasındaki büyük fark, bu deneme ile kayda değer ölçüde azaltılmıştır. Elde edilen örneklerden 20 µl kullanılarak yapılan enzim aktivite tayini elde edilen $\Delta A_{240}/dk$ değerleri de SDS-PAGE analizi ile örtüşmektedir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3. 5 İkinci saflaştırma örnekleri ile alınan $\Delta A_{240}/dk$ değerleri

Örnek Adı	L	İS	YS1	E2	E3	E4	E5
$\Delta A_{240}/dk$ değeri	0,182	0,162	0,078	0,008	0,028	0,056	0,049

İlk yöntemde göre önemli ölçüde iyileştirmeler yapılmış olmasına rağmen, elüsyonlarda oluşan spesifik olmayan protein etkileşimi tam olarak engellenememiştir. Şekil 3.25'te görüldüğü gibi, diğer hücrel proteinlerin ilk iki elüsyonda gözlenmemesi ve hedef enzimin kolondan alınmaya başlandığı elüsyonlarla birlikte elde edilmesi iki farklı şekilde açıklanabilir;

E. coli'ye ait doğal hücrel proteinlerdeki birbirini takip etmeyen histidin amino asitleri [110], [111] ile Ni-NTA agarozla hedef enzim gibi bir bağ kurarak kolonda kalmayı başarmış ya da hedef enolaz enzimi ile diğer hücrel proteinler arasında oluşan protein-protein etkileşimleri ile istenmeyen proteinler hedef enzime güçlü bir şekilde tutunarak yıkamalar ile uzaklaştırılamamış olabilir [92].

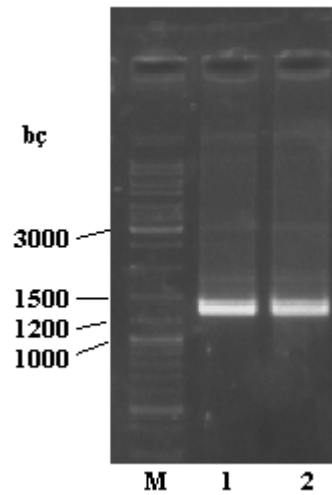
Ayrıca bu denemede ve laboratuvarımızda eş zamanlı olarak yürütülen farklı enzim ekspresyonu denemelerinde kullanılan pKK223-3 vektörünü içeren *E. coli* hücrelerinin laboratuvarında çok uzun süreli bulunan stokları kullanılmıştır. pKK223-3 ifade vektörü aracılığıyla gerçekleştirilen tüm ekspresyon denemelerinde, enzim türünden bağımsız olarak, hedeflenen sonuçlar alınamamıştır. Bu durumun, uzun süreli saklama koşullarında yaşanmış olabilecek sorunların bir sonucu olarak, vektörün promotor gibi protein ekspresyonuna etki eden genetik bileşenlerinde meydana gelebilecek olası mutasyonlar nedeniyle, enolaz enziminin ekspresyonunda hedeflenen sonuçların alınamadığı ihtimali de bulunmaktadır.

İleride yapılması planlanan kinetik analizler, inhibisyon çalışmaları ve kristalografi çalışmaları için enolaz enziminin daha yüksek miktarda ve daha saf halde eldesi gerekmektedir. Birinci ifade vektörü pKK223-3 ile gerçekleştirilen denemelerde hedeflenen sonuç alınamadığı için daha ileri optimizasyonlar yapmak yerine, laboratuvarımızda yeni temin edilen daha modern bir sistemde ekspresyon ve saflaştırma işlemlerine geçilmiştir.

3.4.2 *Ta*ENO'nun İkinci İfade Vektörüne (pLATE31) Alt Klonlaması, Enolaz Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

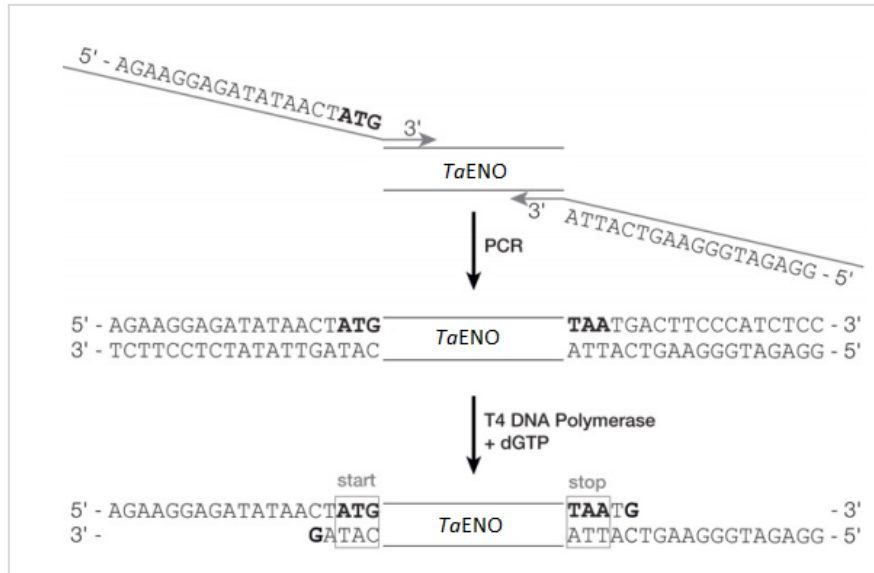
3.4.2.1 *Ta*ENO'nun pLATE31'e Alt Klonlaması ve Enolaz Enziminin Ekspresyonu

Kalıp olarak intronsuz *Ta*ENO genini içerdiği DNA dizi analizi ile ispatlanmış pGEM-T Easy plazmid DNA'sı ve ikinci ifade vektörü ile *Ta*ENO geninin birleştirme reaksiyonuna uygun olarak tasarlanan *Ta*ENO pLATE31 forward ve *Ta*ENO pLATE31 reverse primerleri ile PCR gerçekleştirilmiş ve *Ta*ENO doğru büyüklükte çoğaltılmıştır (Şekil 3.26). Çoğaltılan ürünler Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kullanılarak saflaştırılmıştır [90].



Şekil 3.26 *Ta*ENO geninin pLATE31 ifade vektörüne aktarımına uygun olarak çoğaltılan PCR ürünlerinin EtBr ile boyanan agaroz jel görüntüsü M1: GeneRuler DNA Marker, 1, 2: *Ta*ENO PCR ürünleri

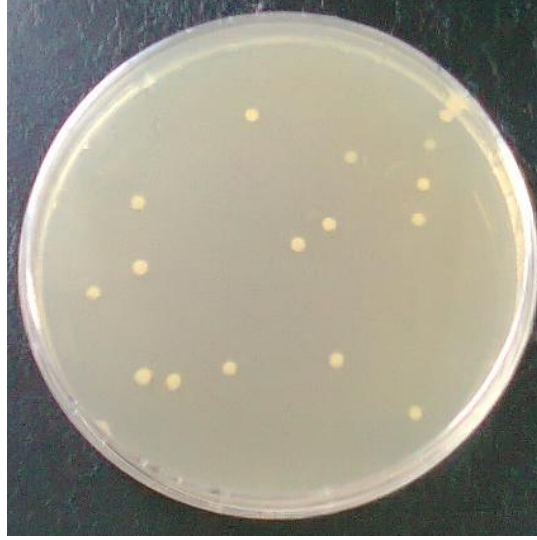
2.2.9 bölümünde açıklanan basamaklar izlenerek, *Ta*ENO geninin aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) sistemindeki pLATE31 ifade vektörüne aktarımı sağlanmıştır. İncert DNA ve vektörün birleştirilmesi işleminden önce, insert DNA'da 14-21 bç'lik tek zincirli çıkıntı DNA dizileri oluşturan T4 DNA polimeraz enzimi kullanılmıştır. T4 DNA polimeraz enziminin 2 tür özelliği vardır; birincisi 5'→3' polimeraz aktivitesi ve ikincisi 3'→5' ekzonükleaz aktivitesidir. Ekzonükleaz aktivitesi ile 3' ucundan nükleotidler uzaklaştırılırken, polimeraz aktivitesi ile komplementer DNA kalıp olarak kullanılarak dNTP'ler aracılığıyla zinciri tamamlar. LIC reaksiyonunda enzimin bu özelliklerinden faydalanılarak, ortama yalnızca dGTP eklendiği için ekzonükleaz ve polimeraz aktiviteleri ilk sitozin bazında dengelenmektedir [112]. Bu basamağın şematik gösterimi Şekil 3.27'de verilmiştir.



Şekil 3. 27 *Ta*ENO geninde T4 DNA polimeraz ve dGTP'ler ile yapışkan uçların oluşturulması [86]

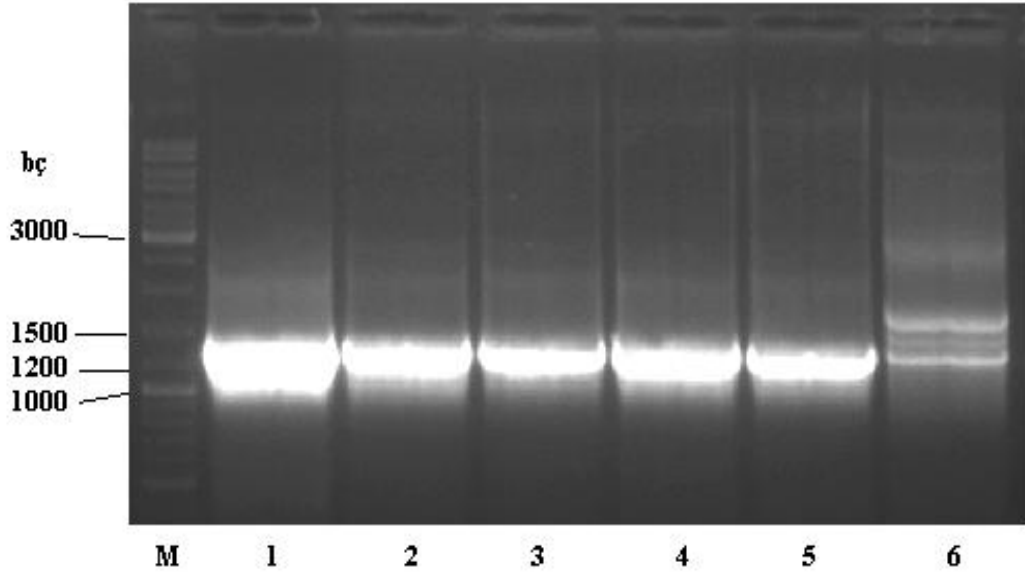
pLATE31 ifade vektörleri *E. coli*'deki heterolog genlerin kontrollü ekspresyonu için T7 bakteriyofajındaki öğeleri kullanmaktadır. İlgili genin ifadesi T7 RNA polimeraz tarafından spesifik olarak tanınan güçlü bir T7 bakteriyofaj promotoru tarafından yönlendirilir. T7 RNA polimeraz geninin ifadesi, *lacUV5* gibi indüklenebilen bir promotorun kontrolünde gerçekleşebildiği için, ilgili genin ekspresyonu BL21 (DE3), HMS 174 (DE3) gibi *E. coli* soylarının kullanılmasını gerektirmektedir. IPTG indüklemesini ardından T7 RNA polimeraz hücre ile birlikte eksprese olur ve T7 promotorunun kontrolünde genlerin transkripsiyonu başlatılır [113].

Bu sistem ile gerçekleştirilen transformasyon sonrasında LB-amfisilin içeren petrilerde koloni oluşumu gözlenmiştir (şekil 3.28). pLATE31 vektörü mavi-beyaz koloni ayırımı sağlamadığı için rastgele seçilen 6 koloni sıvı besiyerine alınıp çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübe edilmiştir.



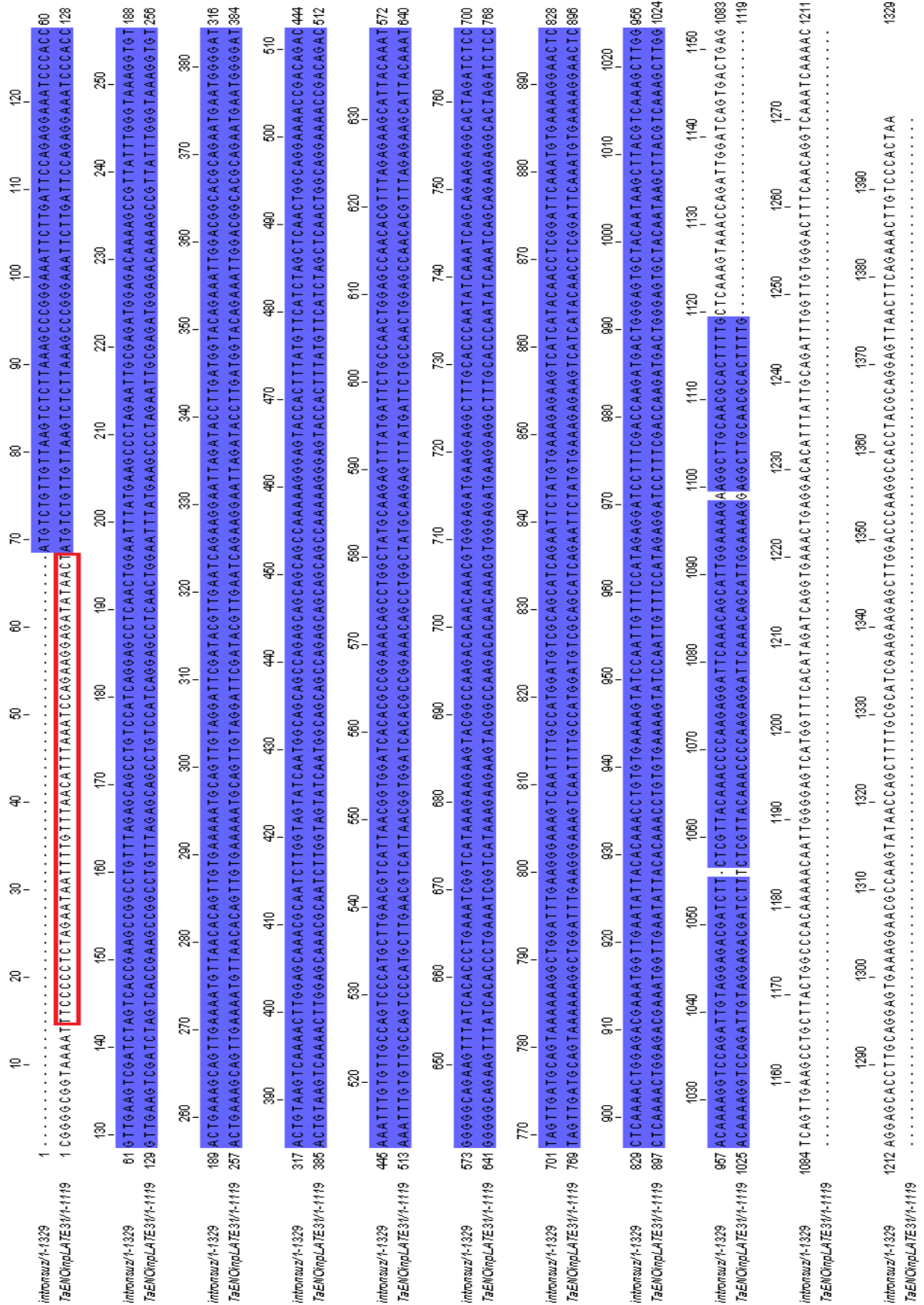
şekil 3. 28 pLATE31 ifade vektörü ile gerçekleştirilen transformasyon sonrası amfisilin içeren LB petrilerde gözlenen koloniler

Sıvı besiyerinde geliştirilen kolonilerden miniprep plazmid DNA izalasyonu yapılmış ve transformasyon başarısı, elde edilen plazmid DNA kalıp olarak kullanılarak ve TaENO pLATE31 forward ve TaENO pLATE31 reverse primerleri ile gerçekleştirilen PCR taraması ile belirlenmiştir. Bu PCR rnekleri EtBr ile boyanmış %1'lik agaroz jelde koşturulmuş ve 6 numaralı koloni dışında tüm kolonilere ait PCR rnlerinde beklenen büyüklükte bantlar gözlemlenmiştir (şekil 3.29).



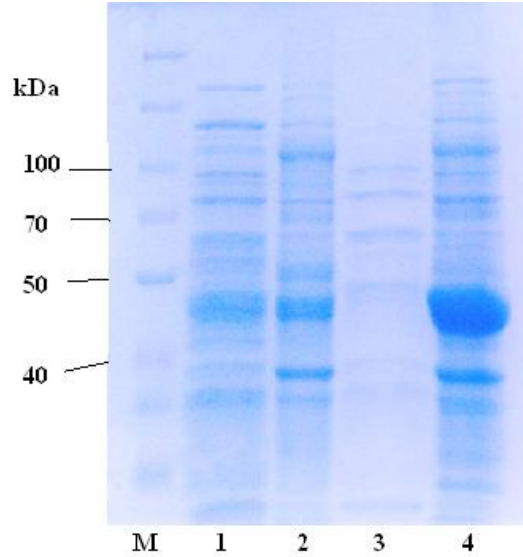
Şekil 3. 29 pLATE31 ifade vektörü ile gerçekleştirilen transformasyon sonrasında yapılan PCR taramasının jel görüntüsü M: GeneRuler DNA Marker, 1, 2, 3, 4, 5: pozitif sonuçlar, 6: Negatif sonuç

4 numaralı örnekten elde edilen plazmid DNA, kit ile gönderilen 5' LIC primeri ile dizilemeye gönderilmiştir. DNA dizi analizi sonucu ile intronsuz *TaENO* geninin karşılaştırılması Şekil 3.30'da verilmiştir. Bu karşılaştırmalı dizi analizi web tabanlı bir program kullanılarak yapılmıştır [104].



Şekil 3. 30 İntronsuz *TaENO* geni (1. sıra) ile dizilemeye gönderilen örneğin 5' LIC primeri ile gelen okumasının (2.sıra) karşılaştırılması (vektörden okunan dizi kırmızı kutu ile gösterilmiştir)

pLATE31'e aktarılan *Ta*ENO genini içerdiği DNA dizi analizi ile ispatlanan 4 nolu koloni ile ilk ekspresyon denemesi yapılmış ve enolaz enziminin üretildiği, ancak inaktif protein agregatları olarak nitelendirilen inklüzyon cisimcikleri halinde biriktiği gözlenmiştir (Şekil 3.31).



Şekil 3. 31 İkinci ifade vektörü aracılığıyla *E. coli*'de yapılan ilk ekspresyon örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü M: Protein Marker, 1, 2: *Ta*ENO genini içermeyen hücre süpernatantı, pelleti, 3, 4: *Ta*ENO genini içeren hücre süpernatantı, pelleti

Inklüzyon cisimciklerin oluşumu özellikle büyük ölçekli protein çalışmalarında proteinin etkinliği için esas olan çözünürlükte sorunlara neden olmaktadır. Bu sorun özellikle *E. coli*'nin üretici mikroorganizma olarak kullanıldığı araştırma ve endüstriyel boyuttaki çözünür rekombinant protein üretimlerinde oldukça sık rastlanan istenmeyen bir durumdur. Promotorun gücü, mRNA stabilitesi, kodon kullanımı, besiyeri bileşimi, indükleyici konsantrasyonu, plazmid kopya sayısı, kültür sıcaklığı gibi nedenlerin inklüzyon cisimciği oluşumunda etkili parametreler olduğu bilinmektedir [114], [115]. Proteinlerdeki hidrofobik domainler arasındaki moleküller arası etkileşimlerinin inklüzyon cisimciği oluşumunda rol oynadığına inanılmaktadır. *E. coli* sitoplazmasındaki indirgeyici çevre, proteinlerdeki sistein rezidülerine etki ederek yanlış disülfid bağı oluşumuna neden olarak, yanlış katlanmalara ve inklüzyon cisimciği oluşumuna katkı sağlayabilir [86]. Ribozomlarda sentezlenen yeni polipeptid zincirlerin yüksek lokal konsantrasyonu ve şaperonların, bu yüksek rekombinant ekspresyon sürecindeki yetersizliği agregasyonu engellemekte başarısız olmaktadır [116].

Bu gibi durumlarda indüklenme sıcaklığının düşürülmesi, IPTG konsantrasyonunun düşürülmesi ve indüklenme zamanını artırılması gibi değişimler hedeflenen protein ekspresyonunu azaltır ancak daha fazla çözünür formda protein üretimi sağlayarak, inklüzyon cisimciği sorununa çözüm olabilmektedir [86] .

Jeldeki protein bantlarından *Ta*ENO genini içeren hücredeki protein ekspresyonunun gerçekleştiği, ancak enzimin aktif halde bulunduğu sitoplazma yani süpernatantta değil, inaktif form olarak pellet kısmında kaldığı açık bir şekilde gözlenmektedir. Bu sorunun çözülmesi için proteinin tekrar sitoplazmada çözünür forma dönüştürülmesi gerekmektedir. Negatif kontrol geni içermeyen *E. coli* BL21 (DE3)'ün süpernatant ve pellet protein profilinde enolaz ile aynı büyüklükte farklı proteinler gözlenmektedir. Bu durum hücrenin doğal şartlarda, hedeflenen enolaz enzimi ile aynı büyüklükte başka proteinler ürettiği olabileceğini göstermektedir. Ancak jele aynı koşullar ve hacimde yapılan protein yükleme ile geni içeren hücre pelletindeki kalın bantlaşmanın büyük oranda enolaz ile ilişkili olduğu söylenebilir. Geni içermeyen BL21 (DE3) süpernatantında enolaz ile aynı yerde farklı proteinlere ait bant gözlenmesi, protein çözünür hale geçirilse dahi geni içermeyen hücre protein profiliyle yapılacak kıyaslamaların çok doğru olmadığını ve hedef geni içermeyen BL21 (DE3) soyunun tam bir negatif kontrol olamayacağını göstermektedir.

Bu ekspresyon denemesinde elde edilen, SDS-PAGE analizi ile eş zamanlı olarak, geni içeren ve içermeyen hücrelerden elde edilen süpernatantla yapılan enzim aktivitesi değerlerinden (Çizelge 3.6) de enzimin aktif olarak üretilmesinde başarısız olduğu açıkça gözlenebilmektedir. Çizelge 3.6'da verilen $\Delta A_{240}/dk$ değerleri 40 μ l süpernatant ile yapılan iki ölçümün ortalaması alınarak verilmiştir.

Çizelge 3. 6 *Ta*ENO geni içeren ve içermeyen *E.coli* süpernatantları ile elde edilen $\Delta A_{240}/dk$ değerleri

Örnek Adı	$\Delta A_{240}/dk$ değerleri
<i>Ta</i> ENO genini içermeyen <i>E.coli</i> süpernatantı ile	0,012
<i>Ta</i> ENO genini içeren 4 nolu koloni süpernatantı ile	0,021

Çizelge 3.6'daki değerler ve SDS-PAGE analizi ile ikinci ifade vektörü kullanılarak yapılan ilk ekspresyon denemesinde enolaz enzimi inaktif olarak üretilmiştir. Enzimin aktif olarak yani hücre sitoplazmasında çözünür formda üretilmesi için koşulları 2.2.10.2'de açıklanan ikinci ekspresyon denemesi yapılmıştır. Hücre yoğunluğu istenen düzeye geldikten sonra indükleme koşulları 25 °C, 200 rpm, 0,5 mM IPTG ile 6 saat olarak gerçekleştirilmiştir [92]. Aynı koşullar geni içermeyen hücrede de uygulanmıştır.

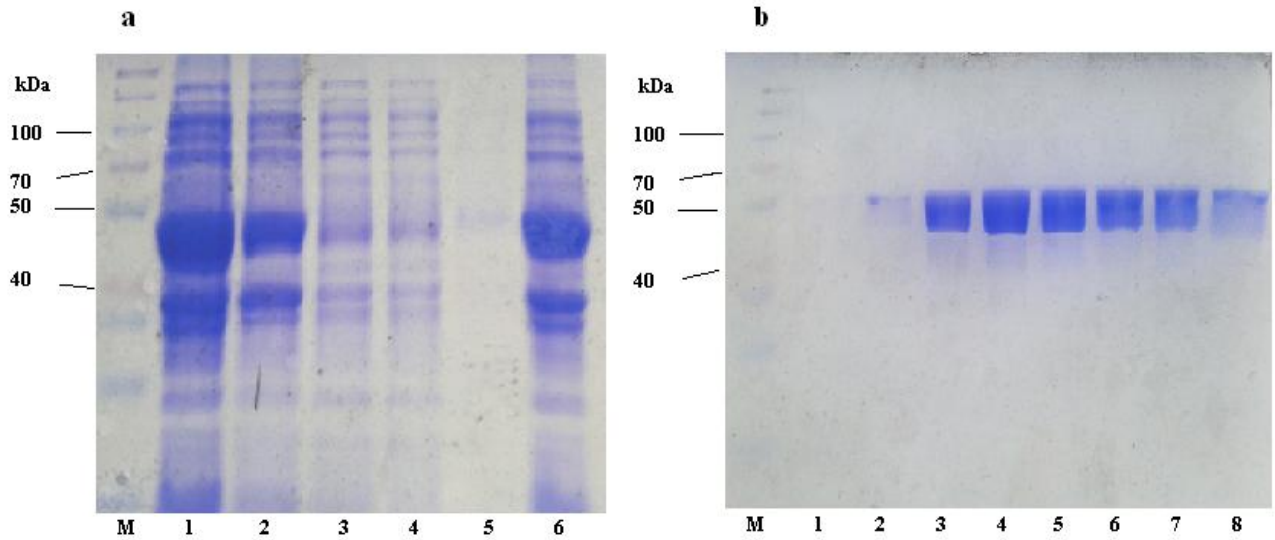
Bu denemede elde edilen saflaştırılmamış süpernantantlar ile yapılan enzim aktivite tayinlerinden alınan değerler Çizelge 3.7'de verilmiştir. Çizelgedeki değerlerden de anlaşıldığı gibi enolaz enzimi ilk denemeye göre hücrede çözünür bir forma geçirilebilmiştir. Çizelge 3.7'deki $\Delta A_{240}/dk$ değerleri, 40 μ l süpernatant ile yapılan iki ölçümün ortalaması alınarak verilmiştir. Enzim aktivite tayini sonuçlarına göre, aktif forma geçirildiği gözlenen 4 nolu kültür süpernatantı ile doğrudan saflaştırma işlemine geçilmiştir.

Çizelge 3. 7 İkinci ekspresyonda *Ta*ENO geni içeren ve içermeyen *E.coli* süpernatantları ile elde edilen $\Delta A_{240}/dk$ değerleri

Örnek Adı	$\Delta A_{240}/dk$ değerleri
<i>Ta</i> ENO genini içermeyen <i>E.coli</i> süpernatantı ile	0,039
<i>Ta</i> ENO genini içeren 4 nolu koloni süpernatantı ile	0,304

3.4.2.2 İkinci İfade Vektörü (pLTAE31) Aracılığıyla *E. coli*'de Ekspresyonu Gerçekleştirilen Enolaz Enziminin Saflaştırması ve Saf Enzimde Spesifik Aktivite Tayini

İkinci ifade vektörü aracılığıyla *E. coli* BL21(DE3)'te aktif olarak ekspresyonu sağlanan enolaz enziminin saflaştırılması için Ni-NTA agaroz kolonu kullanılmıştır. Saflaştırma işleminden ayrılan örnekler ile SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Hücrelerin sonikasyonu sonrasında santifüjleme ile elde edilen lizat (L), kolondan alınan ilk süzöntü (İS), yıkama sırasındaki süzöntüler (YS) ve saf proteinin hedeflendiği elüsyon (E) örnekleri SDS-PAGE jelde yürütülmüş ve proteinin saflık oranı belirlenmeye çalışılmıştır (Şekil 3.32).



Şekil 3. 32 İkinci ifade vektörü aracılığıyla *E. coli*'de üretilen enzimün saflaştırma örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü **a)** M: Protein Markır, 1: Sonike karışım, 2: Hücre lizati, 3: İlk süzöntü, 4: Yıkama süzöntüsü 1, 5: Yıkama süzöntüsü 2, 6: Pellet, **b)** M: Protein Markır, 1: Elüsyon 1, 2: Elüsyon 2, 3: Elüsyon 3, 4: Elüsyon 4, 5: Elüsyon 5, 6: Elüsyon 6, 7: Elüsyon 7, 8: Elüsyon 8

Şekil 3.32 a jelinde verilen sonike karışım ile enolazın yüksek seviyede üretildiği gözlenmektedir. Ancak bu karışımın içinde bulunan aktif enolazın göstergesi, sonikasyondan sonra santrifüjleme ile elde edilen süpernatant kısmı yani hücre lizatıdır. Bu jelde hücre lizatı ve pellet arasında, ikinci ifade vektörü ile yapılan ilk denemede gözlenen belirgin farkın yok olduğu gözlenmektedir. İkinci ekspresyon denemesi ile elde edilen aktif ve inaktif protein miktarının, gözlenen yakın bant yoğunluğu ile eşitlendiği söylenebilir. Sonike karışım, hücre lizatı ve pelletindeki toplam enolazı içerdiği için her iki örnekten daha kalın bir bant vermiştir. Ancak bu deneme ile hala pellette belirli bir oranda bulunan enolazın, hücre sitoplazmasında daha yüksek oranda çözünür formda üretilmesi için optimizasyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Ayrıca inklüzyon cisimciği jel görüntüsünü veren Şekil 3.31'de verilen geni içermeyen hücre pelletinde görülen enolaz ile yakın büyüklükteki doğal hücresel proteinler de, geni içeren hücrede inaktif formda kalmış (pellette) enolaz miktarı tespiti için yanlış bir arka plan görüntüsü oluşturduğu göz ardı edilmemelidir.

Ayrıca saflaştırma işlemi sırasında alınan ilk süzöntü ve yıkamaların SDS-PAGE analizi ile önemsiz sayılabilecek bir miktarda enolaz kaybı olduğu ya da ilk süzöntü ve yıkama ile gelen proteinin *TaENO* genini içermeyen hücre süpernatatında bulunan, enolaz ile aynı büyüklükteki, diğer hücresel doğal proteinler olduğu yargılarına varılabilir. Ancak

Çizelge 3.8'de verilen, süzüntü ve yıkama ile yapılan enzim aktivite tayini değerlerindeki negatif sonuçlar, söz konusu bantın hücreye ait diğer doğal proteinlerden kaynaklandığı ve SDS-PAGE analizindeki enolaz kaybı varsayımın doğru olmadığını göstermektedir.

Saflaştırma ile elde edilen elüsyonlar ve alınan süzüntülerle enzim aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen örneklerden 20 µl kullanılarak gerçekleştirilen enzim aktivite tayini ile elde edilen $\Delta A_{240}/dk$ değerleri yapılan üçlü ölçümlerin ortalamasıdır (Çizelge 3.8).

Çizelge 3. 8 Elüsyonlar ile gerçekleştirilen reaksiyonlardan alınan $\Delta A_{240}/dk$ değerleri

Örnek Adı	İS	Y2	E2	E3	E4	E5	E6
$\Delta A_{240}/dk$ değeri	-0,289	-0,16	0,085	0,534	0,685	0,540	0,347

Yapılan saflaştırma işlemi ile enolazın oldukça yüksek saflık derecesinde elde edildiği Şekil 3.32'de elüsyonların analiz edildiği b jeliyle açıkça gözlenmektedir. Ni-NTA agaroz ile sonikasyon sonrası hücre lizatının +4 °C'de bir saat karıştırılması, enolaz ile kolonun etkileşimine katkı sağlamıştır. Ayrıca birinci ifade vektörü aşamasında yapılan saflaştırma kolonu yapısına ek olarak kolonun en alt yüzeyine konan kurutma kağıdı ile akışa karşı bir direnç eklenmesi saflaştırma işleminin başarısına etki etmiştir. +4 °C'de bir saat karıştırma işlemi, enolazın kolona ile güçlü bir şekilde tutunması sağlanmış ve ek bir direnç konarak yer çekimi ile gerçekleşebilecek enzim kayıplarına engel olunmuştur. Ni-NTA agaroz üretici firmasının doğal şartlar altında önerilen saflaştırma metodu aynen uygulanmıştır. Burada kullanılan tampon çözeltiler ve işlem süreci de başarıdaki diğer etmenler olarak sıralanabilir. Saflaştırma sonrası elde edilen elüsyonlardaki protein konsantrasyonları mg/ml cinsinden Çizelge 3.9'da verilmiştir.

En yüksek enzim miktarının elde edildiği elüsyon 4 örneği ile enzimin spesifik aktivite tayini yapılmıştır. Elüsyon 4'ün doğrudan kullanımı ile yüksek absorbans değeri alındığı ve daha doğru bir aralıkta ölçüm almak için aktivite tayininde ve kinetik çalışmalarda kullanılmak üzere elüsyon 4 örneğinin 1:15 seyreltilmiş stoğu hazırlanmıştır. Hazırlanan stoktaki protein konsantrasyonu 0,2 mg/ml'dir. Spesifik aktivite tayinine geçebilmek için öncelikle eşitlik (2.1)'e yerleştirilen veriler ile aktivite değeri U/ml cinsinden

hesaplanmıştır. Yapılan üç ölçümün ortalama $\Delta A_{240}/dk$ değeri 0,120 olarak alınmıştır. Literatürden alınan bilgiye göre 240 nm'de $\epsilon_{PEP}=1.4 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ 'dir [58]. Toplam reaksiyon hacmi 1 ml ve reaksiyona giren enzim hacmi 1:15 seyreltilen örnekten alınan 0,01 ml'dir. Reaksiyona giren Eşitlik (2.1)'e girilen bu değerler ile enzim aktivitesi 8,6 U/ml olarak hesaplanmıştır. U/ml değerinin, reaksiyona giren enzim örneği konsantrasyonuna oranı ile spesifik aktivite değeri 43 U/mg olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3. 9 Elüsyonlarda bulunan protein konsantrasyonları

Örnek Adı	E2	E3	E4	E5	E6
Protein konsantrasyonu (mg/ml)	1,3	2,7	2,9	2,8	2,1

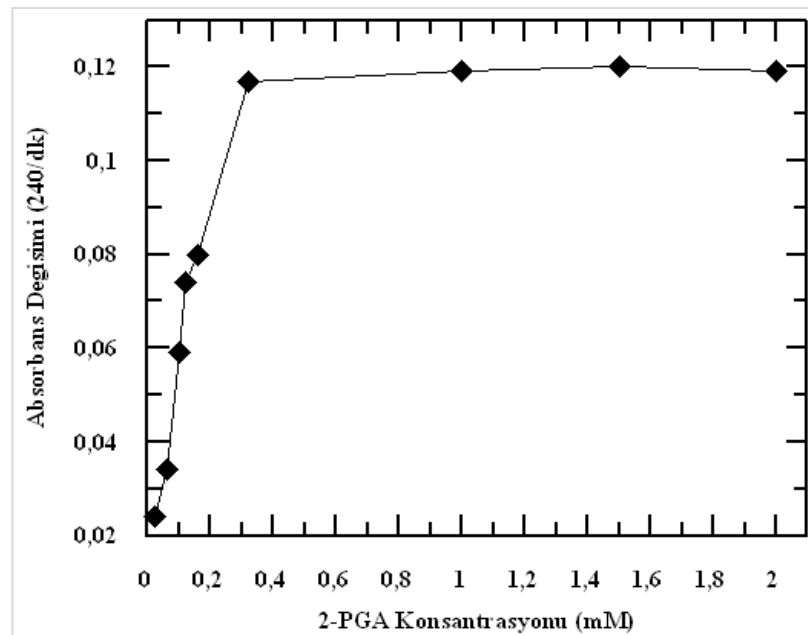
3.5 Saflaştırılan Enolaz Enziminin Kinetik Analizinin Yapılması

Enolaz enziminin kinetik analizi için, pLATE31 ifade vektörüne aktarım sonrasında *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinde eksprese edilen ve saflaştırılan enolaz enzimi kullanılmıştır. Elüsyon 4 örneğinden alınan 2 µg saf enolaz enzimi ile farklı konsantrasyonlardaki 2-PGA substratı reaksiyona tabi tutulmuştur. Substrat konsantrasyonları 20 µM ile 2 mM arasında değişmektedir. Değişen substrat konsantrasyonlarına karşı gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda elde edilen absorbans değişimleri Çizelge 3.10'da verilmiştir. Her substrat konsantrasyona karşı alınan $\Delta A_{240}/dk$ değeri, üç ölçüm tekrarı ile alınan değerlerin ortalamasıdır.

Çizelge 3.10 Değişen substrat konsantrasyonlarına karşı okunan $\Delta A_{240}/dk$ değerleri

Substrat konsantrasyonu (mM)	$\Delta A_{240}/dk$ değeri
0,02	0,024
0,06	0,034
0,1	0,059
0,12	0,074
0,16	0,080
0,32	0,117
1	0,119
1,5	0,120
2	0,119

Elde edilen veriler GraFit 3.0 programına girilerek, Şekil 3.33'te verilen enzimin kararlı hal kinetik grafiği çizilmiş ve enzime ait K_m , V_{max} değerleri hesaplanmıştır. k_{cat} hesabı için eşitlik (2.8)'de belirtilen a değeri; program çıktısı olarak verilen V_{max} değeri ve $\epsilon_{PEP}=1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ile $1,57 \times 10^{-6}$ olarak hesaplanmış ve kinetik çalışmasında kullanılan $2 \mu\text{g}$ enzim konsantrasyonu $4,2 \times 10^{-8} \text{ M}$ olarak elde edilmiştir. Bu iki değer oranından k_{cat} bulunmuştur [91]. İlk kez bu tez çalışması ile literatüre sunulan, *Theileria annulata* enolaz enzimine ait K_m , V_{max} , k_{cat} ve k_{cat}/K_m kinetik değerler Çizelge 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3. 33 Enzimin kararlı hal kinetik davranışı

Çizelge 3.11 Enolaz enzimin tanımlanan kinetik özellikleri

Özellik	Değer	Standart Hata
$V_{\max}$	0,132	0,0067
K_m (μM)	106	0,0198
k_{cat} (s^{-1})	37	-
k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)	$3,5 \times 10^5$	-

3.6 Tez Çalışmasında Elde Edilen Sonuçların Literatür Işığında Değerlendirilmesi

Glikolitik bir enzimin inhibisyonunun, parazit yaşamının inhibe olmasına sebep olacağını öne süren birçok çalışma bulunmaktadır [59], [60]. *P. falciparum* hekzokinazı, aldolazı, trioz fosfat izomerazı ve laktat dehidrogenazı ile yapılan çalışmalar bu proteinlerin diagnostik araçlar, ilaç hedefleri ve/veya aşı adayları olarak kullanılabilirliğini ispat etmiştir [59]. Glikoliz yolundaki anahtar bir diğer enzim olan enolazın da parazit yaşamını inhibe etmek amacıyla üretildiği ve analiz edildiği çalışmalar bulunmaktadır [58], [59], [96], [117]. *Theileria annulata* enolaz enziminin bu potansiyeli ilk defa bu tez çalışmasında *TaENO*'nun intronsuz olarak klonlanması, ekspresyonu, saflaştırılması ve kinetik analizleri kapsamında detaylı olarak araştırılmıştır.

Enolaz, canlılar arasında oldukça korunmuş bir yapıda yer almaktadır [48], [51]. Bu nedenle bu enzimin ilaç ve aşı tasarımlarına uygunluğu için, konak ve parazit arasında belirgin bazı farklar bulunması gereklidir. Grubumuzda daha önce yapılan çalışmada, *TaENO* ile konak *Bos taurus*'taki eşdeğer enolazının amino asit düzeyinde biyoinformatik karşılaştırılması yapılmış ve *T. annulata* enolazında konak *Bos taurus*'ta bulunmayan, biri pentapeptid ($_{103}\text{EWGYC}_{107}$) diğeri dipeptid ($\text{E}_{262}\text{K}_{263}$) olmak üzere iki insersiyon bölgesinin varlığı tespit edilmiştir [63]. Grubumuz tarafından enolazın tropikal theilerioside kullanılabilecek alternatif tedavi yöntemleri için uygunluğunun tespiti sonucunda, enolaz enzimi hedef molekül olarak belirlenmiş ve bu tez çalışmasında ise enzimin aktif ve saf eldesi sağlanarak kinetik karakterizasyonu yapılmış, ileri inhibitör tasarım çalışmaları için bir ürün olarak sunulmuştur.

Theileria annulata gibi bir apikompleksan paraziti olan *P. falciparum* ile yapılan bir çalışmada, parazit ile enfekte olmuş hücrelerdeki glikolitik akışın enfekte olmamış hücrelere kıyasla yaklaşık olarak 100 kat fazla olduğu söylenmiştir [118]. Aynı parazit ile yapılan bir diğer çalışmada ise parazit ile enfekte olmuş kırmızı kan hücrelerinde, enolaz aktivitesinin yaklaşık olarak 15 kat fazla çıktığı belirtilmiştir [119]. Bu değerler, glikoliz yolunun ve enolazın etkinliğini açıklamak için oldukça önemlidir.

P. falciparum ile yapılan bir diğer çalışmada [59], parazit enolazı rekombinat olarak üretilmiş ve bu enzimin parazitin konağı olan insandaki eş değerine göre, aktif bölgenin uzağında yer alan, ¹⁰⁴EWGWS₁₀₈ pentapeptid ilavesinin çıkarılmasıyla enzim aktivitesinde önemli bir düşüş gözlenmiştir. Bu rekombinant mutant enzimin 80 ila 100 kat arasında katalitik aktivite kaybı gösterdiği ve delesyon ile enzimin dimerik formunun monomerlerine ayrıştırdığı belirtilmiştir. Bu bilgiler ile, parazit enolazında belirtilen pentapeptid ilavesinin, enolazın tam olarak aktivite göstermesi için gerekli olduğu söylenmiştir. Çalışmada yapılan kinetik ölçümler, mutant tip rekombinant enzimin Mg^{+2} aktivasyon sabitlerinin, yabanıl tip rekombinant enzime göre düşük olduğunu göstermiştir. Gerçekleştirilen delesyonun, enzimin alt üniteler arasında ayrışma oluşturan dimerik ara yüzey yapısında destabilizasyon yarattığı ve bunun katalitik aktivite düşüşüne yol açtığı savunulmaktadır [59].

Başka bir apikompleksan paraziti olan *Toxoplasma gondii* ile yapılan bir çalışmada [117] enolazın, enolaz 1 (ENO1) ve enolaz 2 (ENO2) olmak üzere iki farklı izoformu bulunduğunu ve ENO1 ve ENO2'nin %73,65 oranında amino asit dizisi benzerliği gösterdiği belirtilmiştir. *Toxoplasma gondii* parazitinin glikozlizinde görevli üç anahtar enzimden biri olan enolazın, bu parazitin konakları olan insan ve hayvan enolazları ile farklı ilave bölgelere (¹⁰³EWGYS₁₀₇ pentapeptid ve ²⁶³EK₂₆₄ dipeptid ilavesi) sahip olması nedeniyle bu bölgelerin enzimin aktivitesine olan etkisi araştırılmıştır. *Toxoplasma gondii* parazitinin enolaz enziminde bulunan bu ilave bölgeler ile yapılan mutagenез çalışmaları ile parazitin enolaz enzimine karşı inhibitör tasarımlarına ışık tutacak biyokimyasal denemeler yapılmıştır. Üretilen rekombinant yabanıl tip *Toxoplasma gondii* enolaz enziminde ¹⁰³EWGYS₁₀₇ olarak belirtilen beş amino asitlik ve ²⁶³EK₂₆₄ olarak belirtilen iki aminoasitlik ilave bölgelerinde tek başına ve ikisini birlikte içeren delesyon çalışmaları sonucunda yabanıl tip ve mutant tip rekombinant enzimlerin

kinetik parametreleri karşılaştırılmıştır. Yapılan mutasyonlar ile enzimin V_{max} değerinin yarı yarıya kadar düştüğü, K_m değerini ise yaklaşık olarak 15 kat arttığı, yani enzimin substrata olan ilgisinin 15 kat azaldığı tespit edilmiştir. Bu veriler ile belirtilen ilave bölgelerinin bu parazitin enolaz aktivitesi için gerekli olduğu gözlenmiştir [117].

Aynı zamanda *Neospora caninum*, *Neospora hughesi* gibi apikompleksanlar ve *Trypanosoma cruzi*'de de EWGYS pentapeptid insersiyonu tespit edilmiştir [120].

Gerçekleştirmiş olduğumuz tez çalışması ile yabanıl tip *TaENO*'nun kinetik karakterizasyonu yapıldığından, ileri çalışmalar ile *TaENO*'nu sahip olduğu ve literatür bilgileriyle eşleşen ilave bölgelerde mutasyonlar gerçekleştirilerek elde edilen mutant proteinlerin inhibitör tasarımı yönünde yapısal ve kinetik karakterizasyonunun yapılmasının önü açılmıştır.

Enolazın hücre sitoplazmasında bulunan glikolitik bir enzim olması dışında, birçok patojenik ökaryot ve prokaryotun ve virüslerin dahi hücre yüzeyinde eksprese olduğuna dair dikkate değer sayıda yayın bulunmaktadır [49], [64], [121]. Bu enzimin patojen canlılarda bulunuşu, patojenlerin konaklarına invazyonları sürecinin bir parçası olduğuna işaret etmektedir [49]. Hücre yüzeyindeki enolaz, plazminojen reseptörü (plazminojen bağlanma proteini) olarak görev almaktadır [49].

Çok hücreli organizmalarda hücre dışı proteoliz olayı, hücre dışı proteazların en önemlisi olan plazminojen aktivasyon sisteminden, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin dinamik olarak yeniden düzenlenmesine kadar birçok biyolojik süreç için oldukça önemlidir (48). Plazminojen, plazminojen aktivatörü tarafından kesildiğinde, kollajenazı aktive eden plazmine dönüşmekte ve bu şekilde fibrin ve bazı hücre dışı matriks proteinlerini parçalamaktadır. Bunlar, bulunulan fibröz dokunun çözülmesi ve hücre içine invazyon için kritik basamaklardır [64].

Plazminojen-patojen etkileşimlerinin enfeksiyondaki fizyolojik rolü ve önemine kanıt olarak *Streptococcus pneumoniae* [122], A gurubu streptococci [123], *Borrelia spp.* [124], *Yersinia pestis* [125] ile enfekte edilmiş hayvan denemeleri bulunmaktadır. Plazminojen reseptörleri aracılığıyla gerçekleşen plazminojen bağlanması ve aktivasyonu ile patojen, konağın fibrinolitik sisteminden kaçarak, güçlü bir proteaz etkisi elde etmiştir [122], [123], [124], [125].

Leishmania mexicana, *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas vaginalis*, *Schistosoma bovis*, ve *Schistosoma japonicum* gibi bazı parazitlerde en çok önerilen plazminojen reseptörü enolazdır [49]. *Leishmania mexicana* ile yapılan bir denemede, plazminojen yoksun farelerde oluşan lezyon daha sınırlı bir alanda odaklanırken, plazminojen içeren farelerdeki lezyon daha yaygın bir şekilde oluşmuştur. Bu parazitler plazminojen yoksun farelerde daha az enfeksiyona neden olmuştur. Plazminojen yoksun farelerin bazı organlarında fibrin birikiminde artış gözlenmiştir. Doğal koşullarda fibrin, konak savunma mekanizmasında parazitin invazyonu ve yayılımını bir bariyer görevi görerek sınırlamaktadır. *İn vivo* şartlarda plazminin en önemli hedefi ise fibrindir. Enfeksiyon ile hücre yüzeyinde aktiflenen plazminojen ya da hücre yüzeyinde salınan plazminojen reseptörleri fibrin matriksin parçalanmasına yardımcı olmaktadır. Bu bilgiler ışığında, enolaz gibi plazminojen reseptörlerinin virulans etki oluşumuna katkı sağladığı önerilmiştir [126], [127].

Yapılan başka çalışmalarda apikompleksan parazitlerinden *Plasmodium falciparum* hücre yüzeyinde bulunması immünofloresans çalışmalarla kanıtlanan enolazın, parazit konağı olan insan plazminojenine bağlanarak parazitin dokuya invazyonu sürecine katkı sağladığı öne sürülmüştür [76]. Aynı şekilde bir başka apicomplexan paraziti olan *Eimeria tenella* enolazının mikroskopik gözlemlerle belirlenen yüzey lokasyonu ile invazyon sürecinin ilişkili olduğu rapor edilmiştir [128].

Enolazın diğer apikompleksanlarda tespit edilen plazminojen reseptörü görevi ve parazitin dokuya geçişine katkı sağlaması özelliği, enolazın *Theileria* parazitinde de plazminojen reseptörü olarak bulunması olasılığı ve bu parazit için kullanım alanları ileri çalışmalarla değerlendirilmelidir.

Tropikal theileriosis'e karşı geliştirilmiş aşılar ise üç tiptir. İlk aşı Zhang vd. tarafından 1964 yılında kan pasajlama yoluyla elde edilmiştir. Beş jenerasyon sonunda parazitin daha az virulent olduğunu gösterilmiştir [129]. İkinci aşı ise radyasyon ile atenüe edilmiş parazitlerden elde edilmiş ve theileriosis tedavisinde başarı sağlanmıştır [130]. Son aşı tipi ise, *T. annulata*'nın intraselüler makroşizont formunun *in vitro*da çoğaltımı ve pasajlaması ile üretilmiştir. Bu aşılar ile laboratuvar ortamında ve kene yokluğunda en az 6 aylık immunité sağlanmaktadır [131].

Tropikal theileriosis'e karşı geliştirilecek yeni aşı tasarımı için enolaz enzimin uygunluğunun araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır [58]. 2004 yılında yapılan bir çalışmada üretilen rekombinant *P. falciparum* enolazının oldukça immünojenik olduğu belirtilmiştir. Rekombinant enolazın, anti-rekombinant enolaz antikoruna karşı reaktivite ve spesifikliğin ölçümü için üretilen poliklonal antikor miktarının serum için oldukça fazla olduğu gözlenmiştir. Yapılan yalnızca iki doz aşılama sayesinde antijenle yapılacak spesifik reaktivite için 1:64000 dilüsyon titresinde yeterli miktarda poliklonal antikor elde edilmiştir [58].

2007 ve 2009 yıllarında yapılan diğer çalışmalarda da elektron mikroskobu gibi immünofloresans çalışmaları ile *P. falciparum* enolaz proteininin hücre yüzeyinde bulunduğu gösterilmiştir [76], [132]. Aynı zamanda tavşanda üretilen anti rekombinant *P. falciparum* enolaz antikorlarının *in vitro* *P. falciparum* kültürünün gelişimini inhibe ettiği belirtilmiştir [132]. Ayrıca rekombinant enzim ile yapılan fare immünizasyon çalışmalarında proteinin, farelerde malaryal parazitlere karşı koruma sağladığı ve bundan dolayı immünojenik bir etkisi olduğu söylenmiş ve dolayısıyla enzimin malaryal aşı antijeni için uygun bir aday olduğu savunulmuştur [59], [132].

P. falciparum enolazına özgü beş amino asitlik ilave bölgenin (₁₀₄EWGWS₁₀₈) çıkarıldığı ve mutant rekombinant *P. falciparum* enolazının (r-Pfen) üretildiği bir çalışmada [59], mutant r-Pfen'in yabanıl tip r-Pfen'e karşı üretilmiş antikorlar ile reaksiyonu incelenmiş ve fare serumunda mutant r-Pfen ve ilave bölgeyi içermeyen tavşan kas enolazında reaktivite gözlenmezken, yabanıl tip r-Pfen'e karşı güçlü bir reaktivite gözlenmiştir. Yüksek dilüsyonlar için antikorlarda gözlenen reaktivite artışı, serumdaki antikorların çalışmada belirtilen beş amino asitlik ilave bölgesine karşı yüksek afinite gösterdiğini sunmaktadır. Çalışmada, antikorların büyük oranda yabanıl tip r-Pfen ile aşılaman fare ve tavşan serumundaki beş amino asitlik insersiyon bölgesine yöneldiğini gösterilmektedir [59]. Bu çalışma ile enolazın, yüksek miktarda antikor üretiminde hangi bölgesinin etkili olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar, yapılan diğer çalışmalar ile örtüşmekte ve enolaz enziminin antijenik bir protein olduğu görüşünü öne sürmektedir [58], [59], [132].

Bu durum da enolazın *Theileria annulata*'da plazminojen reseptörü olarak bulunması durumundaki gibi değerlendirilmesi gereken bir başka yönüdür.

Bu tez çalışmasında, *Theileria annulata* enolaz enziminin ileriki kinetik çalışmalarda kullanılmak üzere, PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemiyle introndan arındırılarak aktif olarak üretilmesi, saflaştırılması hedeflenmiştir. Literatürde, PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yönteminin intron uzaklaştırılmasında kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalar, intron/lar uzaklaştırılarak aktif bir enzim üretimi için değil, ya bazı hastalıklarda etkili olan genlerdeki intron segmentlerinin farklı kombinasyonlarda uzaklaştırılarak hastalığa etkisinin araştırılması ya da hücrenin bazı genlerde hangi intron segmentinin uzaklaştırılmasına daha yatkın olduğunun tespiti için yapılmıştır [133], [134], [135]. Bu nedenle bilğimiz dahilinde, PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi, bir enzimin aktif olarak, bir ürün eldesi hedefiyle introndan arındırılması için, ilk defa bu tez çalışmasında kullanılmıştır.

Elde edilen % 95'ten fazla saflık derecesindeki aktif enolaz enziminin spesifik aktivite değeri 43 U/mg'dır. Bu değerler, enzimin yüksek bir oranda üretildiği (30 mg/litre kültür) ve saflaştırıldığı ve aktivitesinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.

Ayrıca saf enolaz enzimi ile yapılan kinetik karakterizasyon çalışmaları ile enzime ait K_m değeri 106 μM , $V_{\max}$ değeri 132 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, k_{cat} değeri 37 s^{-1} ve k_{cat}/K_m değeri $3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ olarak elde edilmiştir. Çizelge 3.12'de verilen farklı türlere ait enolaz enzimlerinin, substrat olarak 2-PGA için belirlenen bazı kinetik özellikleri, ilk kez bu çalışmada literatüre sunulan *Theileria annulata* enolaz enziminin kinetik özellikleriyle birlikte incelendiğinde, K_m değerlerinde türler arasında çok büyük sapmalar olmadığı, ancak $V_{\max}$ değerleri arasında 1000 kat fazla ve 100 kat düşük olarak değişen değerler rapor edildiği saptanmıştır.

Çizelge 3.12 Farklı türlerde bulunan enolaz enzimlerinin 2-PGA için kinetik özelliklerinin karşılaştırılması

Enzim kaynağı	K_m (μM)	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	Kaynak
<i>Theileria annulata</i>	106	132	Bu çalışmada
<i>Plasmodium falciparum</i>	40 ± 6	24.5 ± 3.0	[59]
<i>Toxoplasma gondii</i> ENO1	$76,8 \pm 6,4$	$(34,1 \pm 0,7) \times 10^3$	[117]
<i>Toxoplasma gondii</i> ENO2	$77,7 \pm 4,9$	$(89,2 \pm 4,8) \times 10^3$	[117]
<i>Trypanosoma brucei</i>	49	63	[136]
<i>Trypanosoma cruzi</i>	50	0,87	[49]
<i>Leishmania mexicana</i>	51	80	[137]
Tavşan kas hücresi	16	31	[49]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57	65	[49]

Bu tez çalışmasında, literatürde yer alan tüm bu bilgiler ışığında, tropikal theileriosis tedavisi için *Theileria annulata*'nın enolaz enziminin, yapıya dayandırılmış ilaç tasarımı ve aşı tasarım çalışmalarında hedef molekül olarak kullanımına uygun halde, aktif ve saf olarak eldesi sağlanmış ve kinetik karakterizasyonu yapılmıştır.

3.7 Öneriler

PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез ile introndan arındırılan genin klonlama vektörüne alt klonlaması yapılmış ve intronsuz genin pLATE31 ifade vektörüne aktarımı sonrasında, *E. coli*'de gerçekleştirilen ekspresyon denemeleri ile aktif enzim yüksek miktarlarda ve yüksek saflık derecesinde elde edilmiş ve kinetik karakterizasyonu yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında elde edilen protein kullanılarak;

1. Proteinin gerçek üç boyutlu yapısını tanımlanması,
2. Mutajenik analizler yapılarak, *Ta*ENO'da bulunup, konaktaki eşdeğer enzimde bulunmayan ilave amino asitlerin enzim aktivitesindeki rolü ve inhibitör tasarımında hedef bölge olarak kullanılabilirliğini tespit edilmesi,
3. Moleküler docking çalışmalarıyla inhibitör tasarım deneylerine yönlendirmesi,

4. *Ta*ENO'nun docking sonucunda elde edilen muhtemel inhibitörler ile kinetik karakterizasyonunun yapılması,
5. Üç boyutlu yapısı tanımlanan proteini docking sonucunda belirlenen inhibitörlerle etkileştirilmesi,
6. Tespit edilen inhibitörler ile *in vivo* çalışmaları yapılması,
7. Enolazın *Theileria annulata*'da plazminojen reseptörü olarak bulunabilmesinin ve yapıya dayandırılmış ilaç tasarımında hedef molekül olarak seçilmesine olanak sağladığı gibi çalışmalarla kanıtlanan immünojenik bir protein olması özelliğiyle de aşı tasarım çalışmaları için uygunluğunun araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] OIE, A., (2008). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Sixth edition, Office International des Epizooties, Paris.
- [2] Aktaş, M., Dumanli, N. ve Angin, M., (2004). "Cattle infestation by *Hyalomma* ticks and prevalence of *Theileria* in *Hyalomma* species in the east of Turkey", *Veterinary Parasitology*, 119: 1-8.
- [3] Altay, K. ve Aktaş, M. (2004). "Sığır Theileriosisi", *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 18(2): 79-86.
- [4] Göksu, K., (1985). Theileriosis'in klinik sendromlarıyla ilgili gelişmeler, 5. baskı, Türk. Parasitol. Dern. Yay., Bilgehan Basımevi, İzmir.
- [5] Mimioğlu, M., Göksu, K. ve Sayın, F., (1969). Veteriner ve Tıbbi protozooloji, Birinci baskı, Ank. Üniv. Vet. Fak. Yay., Ank. Üniv. Basımevi, Ankara.
- [6] Troncy, P., Itard, J. ve Morel, P., (1989). Manual of tropical veterinary parasitology, First edition, CAB International, Wallingford.
- [7] Preston, P. Brown, C. Bell-Sakyi, L. Richardson, W. ve Sanderson, A., (1992). "Tropical theileriosis in *Bos taurus* and *Bos taurus* cross *Bos indicus* calves: response to infection with graded doses of sporozoites of *Theileria annulata*", *Research in Veterinary Science*, 53: 230-243.
- [8] Brown, C., (1990). "Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle", *Parassitologia*, 32: 23-31.
- [9] Değer, S., Biçek, S. ve Değer, Y., (2005). "Theileriosis'li Sığırlarda Bazı Biyokimyasal Parametrelerdeki (Demir, Bakır, Vitamin C ve Vitamin E) Değişiklikler", *YYÜ Vet. Fak. Derg.*, 16 (1):49-50.
- [10] Dinçer, Ş., Sayın, F., Karaer, Z., Çakmak, A., Friedhoff, K.T., İnci, A., Müller, I., Yukarı, B.A. ve Eren, H., (1991). "Karadeniz bölgesi sığırlarında bulunan kan parazitlerinin seroinsidensi üzerine araştırmalar", *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 38: 206-226.
- [11] Eren, H. ve Tanyüksel, M., (1996). "İnsan ve hayvan protozoer hastalıklarının naklinde rol oynayan vektörler", *Türk Vet. Hek. Derg.*, 8:42-44.

- [12] Kreier, J.P. ve Baker J.R., (1987). Parasitic Protozoa, First Edition, Allen and Unwin Pres, London.
- [13] Sayın, F., Dinçer, Ş., Karaer, Z., Çakmak, A., İnci, A., Yukarı, B.A. ve Eren, H., (1991). "Epidemiological study on tropical theileriosis around Ankara", In: Orientation and coordination of research on tropical theileriosis, March 18-22, India.
- [14] Sayın, F., Dinçer, Ş., Karaer, Z., Çakmak, A., İnci, A., Yukarı, B.A., Eren, H., Brown, C.G.D. ve Melrose, M.T.R., (1999). "Ankara yöresinden elde edilen *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs, 1904) izolatları üzerinde araştırmalar", A. Ü. Vet. Fak. Derg., 46: 127-135.
- [15] Yılmaz, K., Özer, E. ve Erkal, N., (1993). "Parazitsiz ve parazitli buzağılarda demir yetersizliği anemisi yönünden araştırmalar", F.Ü. Sağ. Bil. Enst. Derg., 7: 102-111.
- [16] Levine, N.D., (1985). Veterinary Protozoology, First Edition, Iowa State University Press, Ames.
- [17] Soulsby, J.L., (1986). Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals, Seventh edition, Bailliere Tindal, London.
- [18] Sayın, F., Dinçer, S., Karaer, Z., Çakmak, A., İnci, A., Yukarı, B., Eren, H., Nalbantoğlu, S. ve Vatansever, Z., (2000). "Studies on tropical theileriosis in Turkey. 1. Experimental studies on virulence of *Theileria annulata* isolates in Turkey", Veteriner Fakültesi Dergisi, 47: 1-11.
- [19] U. of K. Web Classes, Theileria, <http://classes.uofk.edu/file.php/700/Undergrads/Theilerialecturenote.pdf>, 20 Mart 2011.
- [20] İnci, A., Yavuz, A., Yıldırım, A., Düzlü, Ö. ve Bişkin, Z., (2012). "Sığır Theileriosis'inde Metastaz", Erciyes Üniv Vet Fak Derg., 9:113-122.
- [21] Robinson, P.M., (1982). "*Theileria annulata* and its transmission-a review". Trop Anim Health Prod, 14: 3-12.
- [22] Shaw, M.K., (2002). Theileria development and host cell invasion, Kluwer Academic Publishers, Boston.
- [23] Saruhan, B., (2007), Theileriosisli sığırlarda buparvaquone (Buparvon)un terapötik etkinliği, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menders Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- [24] Sayın, F., Dinçer, Ş., Karaer, Z., Çakmak, A., Nalbantoğlu, S., Vatansever, Z., İnci, A., Yukarı, B.A., Eren, H., Brown, C.G.D. ve Melrose, R., (2001), "Türkiye'de tropikal theileriosis üzerinde araştırmalar: *Theileria annulata* ile deneysel olarak enfekte edilmiş buzağılar üzerinde beslenen Hyalomma (Ixodidae) türünün enfeksiyon oranları üzerinde karşılaştırmalı çalışmalar", Türkiye Parazitol Derg., 25: 258-64.
- [25] Mehlhorn, H. ve Armstrong, P.M., (2001). Encyclopedic reference of parasitology: Biology, Structure, Function, Second edition, Springer, Berlin.

- [26] Mehlhorn, H. ve Armstrong, P.M., (2001). Encyclopedic reference of parasitology: Disease, Treatment, Therapy, Second edition, Springer, Berlin.
- [27] Sugimoto, C. ve Fujisaki, K., (2002). "Non-transforming *Theileria* parasites of ruminants", World Class Parasites, 3:93-106.
- [28] Sugimoto, C., Kawazu, S., Sato, M., Kamio, T. ve Fujisaki, K., (1992). "Preliminary biochemical characterization of "veil" structure purified from *Theileria sergenti*, *T. buffeli* and *T. orientalis* infected bovine erithrocytes", Parasitol. 104(2): 207-213.
- [29] Norval, R.A.I. Perry, B.D. ve Young, A., (1992). The epidemiology of theileriosis in Africa, First edition, Academic Pr., London.
- [30] Singh, DK., (1990). "Recent developments in research and control of *Theileria annulata*", The International Laboratory For Research On Animal Diseases Workshop, 17-19 September, Kenya.
- [31] McHardy, N. ve Morgan, DWT., (1985). "Treatment of *Theileria annulata* infection in calves with parvaquone", Res. Vet. Sci., 39: 1-4.
- [32] Gül, Y., Aksoy, G. ve Özdemir, H., (1991). "Elazığ ve çevresinde *Theileria annulata* ile enfekte sığırların buparvaquone (Butalex)'la tedavisi üzerine araştırmalar", Y.Y.Ü. Vet.Fak. Derg., 2: 97-116.
- [33] Güler, S., (1989). "Tropikal theileriosisin tedavisinde kullanılan preparatlar", Uluslararası Mycoplasmosis ve Theileriosis Sempoiumu, 11 -13 Ekim, Pendik, İstanbul.
- [34] Mimioğlu, M.M., Ulutaş, M. ve Güler, S., (1971). Yurdumuz sığırlarında theileriosis etkenleri ve diğer kan parazitleri, 1. baskı, Ajans -Türk Matbaacılık Sanayi, Ankara.
- [35] Sayin, F. Dincer, S. Karaer, Z. Cakmak, A. Inci, A. Yukari, B. Eren, H. Vatansever, Z. ve Nalbantoglu, S., (2003). "Studies on the epidemiology of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) in cattle in Central Anatolia, Turkey", Tropical animal health and production, 35: 521-539.
- [36] Girişken, O., (2008). Bazı bitki ekstraktlarının *Theileria annulata*'ya karşı *in vitro* etkisi, Doktora tezi, Uludağ Üni., Sağlık Bilimleri Ens., Bursa.
- [37] Mehlhorn, H., (1988). Parasitology in Focus: Facts and Trends, First edition, Springer, Verlag.
- [38] Wilkie, GM., Brown, CGD., Kirvar, E., Thomas, M., Williamson, SM., Bell-Sakyi, LJ. ve Sparagano, O., (1998). "Chemoprophylaxis of *Theileria annulata* and *Theileria parva* infections of calves with buparvaquone", Veterinary Parasitology, 78:1-2.
- [39] Altay, K., Aktaş, M. ve Dumanlı, N., (2007). "*Theileria annulata* Tams1 Geninin PCR-RFLP Analizi", Türkiye Parazitoloji Dergisi, 31 (3): 173-175.
- [40] Aysul, N., Karagenç, T., Eren, H., Aypak, S. ve Bakırcı, S., (2008). " Aydın İli Sığırlarında Tropikal Theileriosisin Yaygınlığı ve *Theileria annulata* Şizont

Aşısının Sahada Etkinliğinin Değerlendirilmesi", Türkiye Parazitoloji Dergisi, 4: 322-327.

- [41] McHardy, N., Wekesa, L.S., Hudson, AT. ve Randall, AW., (1985). "Antitheilerial activity of BW720C (buparvaquone): a comparison with parvaquone", Research in Veterinary Science, 39 (1): 29-33.
- [42] Mhadhbi, M., Naouach, A., Boumiza, A., Chaabani, MF., BenAbderazzak, S. ve Darghouth, MA., (2010), "In vivo evidence for the resistance of *Theileria annulata* to buparvaquone", Veterinary Parasitology, 169: 241–247.
- [43] Srivastava, I., Morriaey, J.M., Darrouzet, E., Daldal, F. ve Vaidya, A.B., (1999). "Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites", Mol. Microbiol., 33: 704–711.
- [44] McFadden, D.C., Tomavo, S., Berry, E.A. ve Boothroyd, J.C., (2000). "Characterisation of cytochrome b from *Toxoplasma gondii* and Q0 domain mutations as a mechanism of atovaquone-resistance", Mol. Biochem. Parasitol., 108: 1–12.
- [45] Sharifiyazdi, H., Namazi, F., Oryan, A. ve Shahriari, R. (2012). "Point mutations in the *Theileria annulata* cytochrome b gene is associated with buparvaquone treatment failure", Veterinary Parasitology, 187: 431–435.
- [46] Erdemir, A., Aktaş, M., Dumanlı, N. ve Turgut-Balık, D., (2012). "Isolation, cloning and sequence analysis of the lactate dehydrogenase gene from *Theileria annulata* may lead to design of new antitheilerial drugs", Veterinarni Medicina, 57 (10): 559–567.
- [47] Fernandez-Robledo, JA. ve Vasta, GR., (2010). "Production of recombinant proteins from protozoan parasites", Trends in Parasitology, 26: 244–254.
- [48] Diaz-Ramos, A., Roig-Borrellas, A., Garcia-Melero, A. ve Lopez-Aleman, R., (2012). "α-Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations", Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012: 1-12.
- [49] Avilan, L., Gualdron-Lopez, M., Quinones, W., Gonzalez-Gonzales, L., Hannaer, V., Michels ve P., Concepcion, J.L., (2011). "Enolase: A key player in the metabolism and a probable virulence Factor of Trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target", Enzyme Research, 2011: 1-14.
- [50] Pancholi, V., (2001). "Multifunctional α-enolase: its role in diseases," Cellular and Molecular Life Sciences, 58 (7): 902-920.
- [51] Subramanian, A. ve Miller, D.M., (2000). "Structural Analysis of α-Enolase MAPPING The Functional Domains Involved in Down-Regulation of The C-Myc Protooncogene", Journal of Biological Chemistry, 275: 5958-5965.
- [52] Piast, M., Kustrzeba-Wojcicka, I., Matusiewicz, M., ve Bana's, T., (2005). "Molecular evolution of enolase," Acta Biochimica Polonica, 52 (2): 507-513.
- [53] Marangos, P. J., Parma, A. M. ve Goodwin, F. K., (1978). "Functional properties of neuronal and glial isoenzymes of brain enolase," Journal of Neurochemistry, 31 (3): 727-732.

- [54] Feo, S., Oliva, D., Barbieri, G., Xu, W., Fried, M. ve Giallongo, A., (1990). "The gene for the muscle-specific enolase is on the short arm of human chromosome 17", *Genomics*, 6 (1): 192-194.
- [55] Giallongo, A. Feo, S. Moore, R. Croce, C.M. ve Showe, L.C., (1986). "Molecular cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human alpha enolase", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 6741-6745.
- [56] Fletcher, L. Rider, C. ve Taylor, C., (1976). "Enolase isoenzymes: III. Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase", *Biochimica et Biophysica Acta-Enzymology*, 452: 245-252.
- [57] Kato, K., Okagawa, Y., Suzuki, F., Shimizu, A., Mokuno, K. ve Takahashi, Y., (1983). "Immunoassay of human muscle enolase subunit in serum: a novel marker antigen for muscle diseases", *Clinica Chimica Acta*, 131: 75-85.
- [58] Pal-Bhowmick I., Sadagopan K., Vora HK., Sehgal A., Sharma S. ve Jarori GK., (2004). "Cloning, Over-Expression, Purification and Characterization of *Plasmodium falciparum* Enolase", *Eur. J. Biochem.*, 271: 4845-4854.
- [59] Vora, H.K. Shaik, F.R. Pal-Bhowmick, I. Mout, R. ve Jarori, G.K., (2009). "Effect of deletion of a plant like pentapeptide insert on kinetic, structural and immunological properties of enolase from *Plasmodium falciparum*", *Archives of biochemistry and biophysics*, 485: 128-138.
- [60] Raman, J. Mehrotra, S. Anand, R.P. ve Balaram, H., (2004). "Unique kinetic mechanism of *Plasmodium falciparum* adenylosuccinate synthetase", *Molecular and biochemical parasitology*, 138: 1-8.
- [61] Gardner, M.J. Bishop, R. Shah, T. de Villiers, E.P. Carlton, J.M. Hall, N. Ren, Q. Paulsen, I.T. Pain, A. ve Berriman, M., (2005). "Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes", *Science*, 309: 134-137.
- [62] Kiama, T.N., Kiara, J.K., Konji, V.N. ve Musoke, A.J., (1999). "Enzymes of glucose and glycerol catabolism in in vitro-propagated *Theileria parva* schizonts", *The Veterinary Journal*, 158: 221-227.
- [63] Akat, A., (2010). *Theileria annulata*'nın enolaz enzimini kodlayan genin ilaç ve aşı tasarımı çalışmalarında kullanılmak üzere izolasyonu, klonlanması ve analiz edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, YTÜ, Fen Bilimleri Ens., İstanbul.
- [64] Liu, K., J. ve Shih, N., Y., (2007). "The role of enolase in tissue invasion and metastasis of pathogens and tumor cells", *J. Cancer Mol.*, 3: 45-48.
- [65] Redlitz, A. Fowler, B.J. Plow, E.F. ve Miles, L.A., (1995). "The Role of an Enolase-Related Molecule in Plasminogen Binding to Cells", *European Journal of Biochemistry*, 227: 407-415.
- [66] Lopez-Aleman, R. Correc, P. Camoin, L. ve Burtin, P., (1994). "Purification of the plasmin receptor from human carcinoma cells and comparison to α -enolase", *Thrombosis research*, 75: 371-381.

- [67] de la Torre-Escudero, E. Manzano-Román, R. Pérez-Sánchez, R. Siles-Lucas, M. ve Oleaga, A., (2010). "Cloning and characterization of a plasminogen-binding surface-associated enolase from *Schistosoma bovis*", Veterinary parasitology, 173: 76-84.
- [68] Bergmann, S. Rohde, M. Chhatwal, G.S. ve Hammerschmidt, S., (2001). " α -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface", Molecular microbiology, 40: 1273-1287.
- [69] Yang, J. Qiu, C. Xia, Y. Yao, L. Fu, Z. Yuan, C. Feng, X. ve Lin, J., (2010). "Molecular cloning and functional characterization of *Schistosoma japonicum* enolase which is highly expressed at the schistosomulum stage", Parasitology research, 107: 667-677.
- [70] Pancholi, V. ve Fischetti, V.A., (1998). " α -Enolase, a novel strong plasmin (ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci", Journal of Biological Chemistry, 273: 14503-14515.
- [71] Swenerton, R.K., Zhang, S. Sajid, M. Medzihradsky, K.F. Craik, C.S. Kelly, B.L. ve McKerrow, J.H., (2011). "The oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion", Journal of Biological Chemistry, 286: 429-440.
- [72] Vanegas, G. Quiñones, W. Carrasco-López, C. Concepción, J.L. Albericio, F. ve Avilán, L., (2007). "Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*", Parasitology research, 101: 1511-1516.
- [73] Almeida, L. Vanegas, G. Calcagno, M. Concepción, J.L. ve Avilan, L., (2004). "Plasminogen interaction with *Trypanosoma cruzi*", Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 99: 63-67.
- [74] Mundodi, V. Kucknoor, A. ve Alderete, J., (2008). "Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated α -enolase of *Trichomonas vaginalis*", Infection and immunity, 76: 523-531.
- [75] Jong, A.Y. Chen, S.H. Stins, M.F. Kim, K.S. Tuan, T., L. ve Huang, S., H., (2003). "Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells", Journal of medical microbiology, 52: 615-622.
- [76] Bhowmick, I.P., Kumar, N., Sharma, S., Coppens, I. ve Jarori, G.K., (2009). "*Plasmodium falciparum* enolase: stage-specific expression and sub-cellular localization", Malar J., 8: 1475-2875.
- [77] Dey, P., M., ve Harborne, J., B., (1997). Plant biochemistry, First Edition, Academic Press, USA.
- [78] Karataş, M., (2012). Moleküler Biyoloji, 1. Baskı, Nobel Yayınları, Ankara.
- [79] Aydoğan, S. (2006). Yönlendirilmiş mutagenез ile mutant HCAII geninin eldesi ve mutant proteinlerin inhibitörlere karşı ilgisinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Ens., Balıkesir.

- [80] Ho, S.N. Hunt, H.D. Horton, R.M. Pullen, J.K. ve Pease, L.R., (1989). "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction", *Gene*, 77: 51-59.
- [81] Svendsen, A., (2003). *Enzyme Functionality: Design, Engineering and Screening*, First edition, CRC Press, New York.
- [82] Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, M., (2011). *Moleküler Biyoloji*, 2. baskı, Nobel Yay., Ankara.
- [83] SDSU College of Sciences: Archives, Site directed mutagenesis, <http://www.sci.sdsu.edu/classes/biology/bio551/mardahl/invitromut.html>, 21 Haziran 2011.
- [84] Promega, Technical Manual: pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, <http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/pGEM-T%20and%20pGEM-T%20Easy%20Vector%20Systems%20Protocol.pdf>, 8 Haziran 2012.
- [85] Helmholtz-muenchen, pKK223-3 Expression Vector, http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/Other_vectors/pKK223_3_map-MCS.pdf, 8 Haziran 2012.
- [86] Thermo Scientific, aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System, http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/coa_k1291.pdf, 12 Ocak 2013.
- [87] Qiagen, QIAprep Miniprep Handbook, http://public.wsu.edu/~kahn_sci/Flow/E2-QIAprep_Miniprep_Handbook.pdf, 20 Mart 2011.
- [88] Turgut-Balik, D. Shoemark, D.K. Sessions, R.B. Moreton, K.M. ve Holbrook, J.J., (2001). "Mutagenic exploration of the active site of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*", *Biotechnology letters*, 23: 923-927.
- [89] Sambrook, J. ve Russell, D.W., (2001). *Molecular Cloning A Laboratory Manual I-II-III*, Third Edit., CSHL Press, New York.
- [90] Promega, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System: Technical Bulletin, <https://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/101/Wizard%20SV%20Gel%20and%20PCR%20Clean-Up%20System%20Protocol.pdf>, 12 Haziran 2012.
- [91] Shoemark, DK., (2000). The kinetic characterization of the lactate dehydrogenase enzyme from *Plasmodium falciparum*, Doctor of philosophy thesis, Department of biochemistry, University of Bristol, Bristol.
- [92] Qiagen, QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xhis-tagged proteins, http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAexpressionist_EN.pdf, 3 Mart 2011.

- [93] Laemmli, U.K., (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 227: 680-685.
- [94] Peptide Properties Calculator- Northwestern University, Peptide property calculator, <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html>, 15 Mayıs 2012.
- [95] Grimsley, G.R. ve Pace, C.N., (2003). *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley and Sons. Inc., New Jersey.
- [96] Han, K. Xu, L. Yan, R. Song, X. ve Li, X., (2012). "Molecular cloning, expression and characterization of enolase from adult *Haemonchus contortus*", *Research in Veterinary Science*, 92: 259-265.
- [97] Palmer, T., (2007). *Enzymes: biochemistry, biotechnology and clinical chemistry*, Second edition, Horwood Publishing Limited, Chichester.
- [98] Cornish-Bowden, A., (1976). *Principles of enzyme kinetics*, Butterworths, London.
- [99] Marangoni, A.G., (2003). *Enzyme kinetics: a modern approach*, John Wiley and Sons. Inc., New Jersey.
- [100] Cleland, W., (1970). "Steady State Kinetics", *The enzymes*, 2: 1-65.
- [101] Leatherbarrow, R.J., (1992). "GraFit Version 3.0", Erithacus Software Ltd., Staines, UK.
- [102] RestrictionMapper version 3, Maps sites for restriction enzymes, <http://www.restrictionmapper.org/>, 20 Mart 2011.
- [103] Oligo Calc:Oligonucleotide Properties Calculator, Oligonucleotide Properties Calculator, <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>, 20 Mart 2011.
- [104] Align Sequences using ClustalW2 EBI, Multiple Sequence Alignment, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, 20 Mart 2011.
- [105] Innis, M.A. ve Gelfand, D.H., (1990). In *PCR Protocols*, Academic Press, San Diego.
- [106] Long PCR Enzyme Mix #K0181 Thermo Scientific, Product Information: Long PCR Enzyme Mix, <http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/prod-info-k0181-long-pcr-enzyme-mix.pdf>, 8 Haziran 2012.
- [107] Bzik, D. J., Fox, B. A. ve Gonyer, K., (1993). "Expression of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase in *Escherichia coli*", *Molecular and biochemical parasitology*, 59: 155-166.
- [108] Mihic, S. J. ve Adron, R., (1996). "Single-Step Purification/Solubilization of Recombinant Proteins: Application to Surfactant Protein B", *Trends Neuroscience*, 11: 250-256.

- [109] Mutlu, Ö. ve Balık, D.T., (2012). "Kinetic Analysis of the Amino Terminal End of Active Site Loop of Lactate Deyhydrogenase from *Plasmodium Vivax*", Balkan Medical Journal, 4: 364-368.
- [110] Robichon, C. Luo, J. Causey, T.B. Benner, J.S. ve Samuelson, J.C., (2011). "Engineering *Escherichia coli* BL21 (DE3) derivative strains to minimize E. coli protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography", Applied and environmental microbiology, 77: 4634-4646.
- [111] Gräslund, S. Nordlund, P. Weigelt, J. Bray, J. Gileadi, O. Knapp, S. Oppermann, U. Arrowsmith, C. Hui, R. ve Ming, J., (2008). "Protein production and purification", Nature methods, 5: 135-146.
- [112] Aslanidis, C. ve de Jong, P.J., (1990). "Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR)", Nucleic acids research, 18: 6069-6074.
- [113] Studier, F.W. ve Moffatt, B.A., (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes", Journal of molecular biology, 189: 113-130.
- [114] García-Fruitós, E., (2010). "Inclusion bodies: a new concept", Microbial cell factories, 9: 80.
- [115] Wurm, F.M., (2004). "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells", Nature biotechnology, 22: 1393-1398.
- [116] Wang, L. Maji, S.K. Sawaya, M.R. Eisenberg, D. ve Riek, R., (2008). "Bacterial inclusion bodies contain amyloid-like structure", PLoS biology, 6: 195.
- [117] Dzierszinski, F., Mortuaire, M. Dendouga, N. Popescu, O. ve Tomavo, S., (2001). "Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*", Journal of molecular biology, 309: 1017-1027.
- [118] Roth Jr, E.F., Raventos-Suarez, C. Perkins, M. ve Nagel, R.L., (1982). "Glutathione stability and oxidative stress in *P. falciparum* infection in vitro: responses of normal and G6PD deficient cells", Biochemical and biophysical research communications, 109: 355-362.
- [119] Roth, E.J., Calvin, M.C., Max-Audit, I. i Rosa, J. ve Rosa, R., (1988). "The enzymes of the glycolytic pathway in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites", Blood, 72: 1922-1925.
- [120] Bolten, K., Marsh, A., Reed, S., Dubey, J., Toribio, R. ve Saville, W., (2008). "Sarcocystis neurona: molecular characterization of enolase domain I region and a comparison to other protozoa", Experimental parasitology, 120: 108-112.
- [121] López-Villar, E. Monteoliva, L. Larsen, M.R. Sachon, E. Shabaz, M. Pardo, M. Pla, J. Gil, C. Roepstorff, P. ve Nombela, C., (2006). "Genetic and proteomic evidences support the localization of yeast enolase in the cell surface", Proteomics, 6: 107-118.

- [122] Bergmann, S., Wild, D., Diekmann, O., Frank, R., Bracht, D., Chhatwal, G.S. ve Hammerschmidt, S., (2003). "Identification of a novel plasmin (ogen)-binding motif in surface displayed α -enolase of *Streptococcus pneumoniae*", *Molecular microbiology*, 49: 411-423.
- [123] Sun, H. Ringdahl, U. Homeister, J.W. Fay, W.P. Engleberg, N.C. Yang, A.Y. Rozek, L.S. Wang, X. Sjöbring, U. ve Ginsburg, D., (2004). "Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection", *Science*, 305: 1283-1286.
- [124] Nordstrand, A., Shamaei-Tousi, A. Ny, A. ve Bergström, S., (2001). "Delayed Invasion of the Kidney and Brain by *Borrelia crocidurae* in Plasminogen-Deficient Mice", *Infection and immunity*, 69: 5832-5839.
- [125] Degen, J. Bugge, T. ve Goguen, J., (2007). "Fibrin and fibrinolysis in infection and host defense", *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5: 24-31.
- [126] Sun, H., (2006). "The interaction between pathogens and the host coagulation system", *Physiology*, 21: 281-288.
- [127] Bugge, T.H., Kombrinck, K.W., Flick, M.J., Daugherty, C.C., Danton, M.J.S. ve Degen, J.L., (1996). "Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency", *Cell*, 87: 709-719.
- [128] Labbé, M. Péroval, M. Bourdieu, C. Girard-Misguich, F. ve Péry, P., (2006). "*Eimeria tenella* enolase and pyruvate kinase: A likely role in glycolysis and in others functions", *International journal for parasitology*, 36: 1443-1452.
- [129] Pipano, E., (1981). "Schizonts and tick stages in immunization against *Theileria annulata* infection", *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, 14: 242-252.
- [130] Yin, H., Luo, J. ve Lu, W., (2008). "Control of tropical theileriosis with attenuated schizont vaccine in China", *Vaccine*, 26: 11-13.
- [131] Singh, S., Khatri, N., Manuja, A., Sharma, R., Malhotra, D. ve Nichani, A., (2001). "Impact of field vaccination with a *Theileria annulata* schizont cell culture vaccine on the epidemiology of tropical theileriosis", *Veterinary parasitology*, 101: 91-100.
- [132] Pal-Bhowmick, I. Mehta, M. Coppens, I. Sharma, S. ve Jarori, G.K., (2007). "Protective properties and surface localization of *Plasmodium falciparum* enolase", *Infection and immunity*, 75: 5500-5508.
- [133] Kessler, O., Jiang, Y. ve Chasin, L., (1993). "Order of intron removal during splicing of endogenous adenine phosphoribosyltransferase and dihydrofolate reductase pre-mRNA", *Molecular and cellular biology*, 13: 6211-6222.
- [134] Kriangkum, J., Warkinton, A., Belch, A.R. ve Pilarski, L.M., (2013). "Alteration of Introns in a Hyaluronan Synthase 1 (HAS1) Minigene Convert Pre-mRNA Splicing to the Aberrant Pattern in Multiple Myeloma (MM): MM Patients Harbor Similar Changes", *PloS one*, 8: 53469.

- [135] Attanasio, C., David, A. ve Neerman-Arbez, M., (2003). "Outcome of donor splice site mutations accounting for congenital afibrinogenemia reflects order of intron removal in the fibrinogen alpha gene (FGA)", *Blood*, 101: 1851-1856.
- [136] Hannaert, V., Albert, M.A., Rigden, D.J., Theresa da S. G., M. Thiemann, O. Garratt, R.C., Van Roy, J., Opperdoes, F.R. ve Michels, P.A., (2003). "Kinetic characterization, structure modelling studies and crystallization of *Trypanosoma brucei* enolase", *European Journal of Biochemistry*, 270: 3205-3213.
- [137] Quiñones, W., Peña, P., Domingo-Sananes, M., Cáceres, A., Michels, P., Avilan, L. ve Concepción, J.L., (2007). "*Leishmania mexicana*: molecular cloning and characterization of enolase", *Experimental parasitology*, 116: 241.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ebru ÇAYIR
Doğum Tarihi ve Yeri : 23/11/1987 - Bakırköy
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : ebru.cayir87@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyomühendislik	Ege Üniversitesi	2010
Lise	Fen	Barbaros	2004

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2013-Devam ediyor	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Bildiri

1. Sogut M., S., Gokce A., Ozturk Y., Mandaci S., **Çayır E.**, Karasu D., Pinar O., Ozturk H. U., Ozturk N. C., Denizci A. A., Ozturk D. C., " Cloning, Overexpression and Characterization of the *Bacillus* Phytase Encoding Gene, YMNphyA, in *E.coli*", 16th European Biotechnology Congress, Bratislava, Slovakia, 16-18 May 2013.

2. **Çayır E.**, Akat A., Erdemir A., Özkan E., Turgut-Balık D., "Removal of an intron from *Theileria annulata* enolase gene by PCR site directed mutagenesis", II. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, 15-18 Kasım 2012.
3. Sogut M. S., Ozturk, N. C., Ozturk, H. U., Pinar O., Ipek F. M., **Çayır E.**, Gokce A., Karasu D., Ozturk D. C., Ozturk Y., Denizci A. A., Ozturk B., Bahar B., Avcı N. G., Ayan B., Kazan D., Duman A. D., Sargin S., Karacanli S., Mizrak C., Catli A. U., Kucukyilmaz K., Guvenmez H. K., Arikan B., Bozkurt A., Seyhan F., Akbulut B. S., Erarslan A. A., Ongen G., Dincer S., Yenice E., Mandaci S., " Production of industrial enzymes for feed industry", 15th European Congress on Biotechnology, Istanbul, 23–26 September 2012.