

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***PLASMODIUM FALCIPARUM*'UN LAKTAT
DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
ANALİZİ**

Moleküler Biyolog Aslıhan Huri BALCIOĞLU

**FBE Biyomühendislik Anabilim Dalında
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Dilek TURGUT BALIK (YTÜ)

İSTANBUL, 2011

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	v
KISALTMA LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Sıtma	1
1.2 Sıtma Parazitleri ve Yaşam Döngüsü	4
1.2.1 Omurgasız Canlıdaki Yaşam Döngüsü	5
1.2.1.1 Döllenme	5
1.2.1.2 Sporogoni	6
1.2.2 Omurgalı Canlıda Karaciğerdeki Yaşam Döngüsü	6
1.2.2.1 Ekzoeritrositik (Hepatik) Şizogoni:	6
1.2.3 Omurgalı Canlıda Kan Döngüsü	6
1.2.3.1 Eritrositik Şizogoni	6
1.3 Sıtma Parazitlerinin Genom Projesi, Genetik Özellikleri ve Biyokimyası	7
1.3.1.1 <i>Plasmodium</i> 'ların Nükleer Genomu	7
1.3.1.2 Apikoplast Genomu	8
1.3.2 <i>Plasmodium</i> 'daki Metabolik Yollar	10
1.3.2.1 Enerji Kaynağı.....	10
1.3.2.2 Protein Sentezi.....	10
1.3.2.3 Lipidler.....	11
1.3.2.4 Folik asit.....	12
1.4 Sıtmanın Tedavisinde Kullanılan Antimalarial İlaçlar	12
1.4.1 Kinin	13
1.4.2 Klorokin	13
1.4.3 Amodiakın	14
1.4.4 Primakin	14
1.4.5 Meflokin	14
1.4.6 Proguanil ve Chlorproguanil	14
1.4.7 Antifolat Kombine İlaçlar	14
1.4.8 Primethamine.....	15
1.4.9 Primetamin/Sülfadoksin.....	15
1.4.10 Sıtma Aşı Çalışmaları	15
1.5 Laktat dehidrogenaz.....	16
1.6 <i>Plasmodium falciparum</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimi.....	18
2. MATERYAL VE METOD	21

2.1	Materyal	21
2.1.1	Kimyasal Maddeler, Enzimler ve Kitler	21
2.1.2	Deneylerde Kullanılan Cihazlar	21
2.1.3	<i>Echerichia coli</i> Soyu.....	22
2.1.4	Klonlama Vektörü	22
2.1.5	Bakteriyolojik Gelişim İçin Besiyerleri ve Solüsyonlar	23
2.1.6	Stok Solüsyonlar ve Tamponlar	23
2.1.7	Primerler.....	27
2.2	Metod	27
2.2.1	Plazmid DNA İzolasyonu	27
2.2.2	Proteinin C Terminaline Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile His-tag Eklenmesi	27
2.2.3	Agaroz Jel Elektroforezi	28
2.2.3.1	Etidyum Bromür İle Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi.....	28
2.2.3.2	Kristal Viyole ile Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi	29
2.2.4	DNA'nın Jelden Geri Kazanılması.....	29
2.2.5	Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile DNA'nın Kesilmesi (Digest)	29
2.2.6	Klonlanacak olan <i>PfLDH</i> Geni İle İfade Vektörünün Birleştirilmesi (Ligasyon) 30	
2.2.7	Kalsiyum Klorür Etkileşimi ile Kompetant <i>E. coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması ...	31
2.2.8	Transformasyon.....	31
2.2.9	PCR Taraması.....	31
2.2.10	Dizi Analizi	32
2.2.12	<i>PfLDH</i> Proteinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Analizi.....	32
2.2.13	<i>PfLDH</i> 'ın İfadesi	33
2.2.14	Ni-NTA Agaroz Kullanılarak <i>PfLDH</i> Enziminin Saflaştırılması	33
2.2.15	Saflaştırılmış Proteinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Analizi	34
2.2.16	Saf <i>PfLDH</i> Proteinin SDS-PAGE ve Western Blot analizi	34
2.2.17	Saflaştırılmış <i>PfLDH</i> Proteininin Konsantrasyonlarının Hesaplanması.....	35
2.2.18	Saflaştırılan Proteinin Kinetik Analizi.....	35
3.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	37
3.1	His-tag İlave Edilmemiş Olan <i>PfLDH</i> 'ın Dizi Analizi.....	37
3.2	<i>PfLDH</i> Proteininin C Terminaline 6 Histidin Amino Asidinin İlave Edilmesi	40
3.2.1	Primer Tasarımı	41
3.2.2	<i>PfLDH</i> 'ın 3' Ucuna Altı Adet Histidin İlave Etmek Üzere Amplifikasyonu	41
3.2.3	His-tag İlaveli <i>PfLDH</i> 'ın Amplifikasyonu	41
3.2.4	<i>PfLDH</i> Geninin CV ile Boyanan Jelde Analizi.....	42
3.2.5	His-tag İlaveli <i>PfLDH</i> 'ın ve Vektörünün Enzim ile Kesimi (Digest).....	43
3.2.6	Rekombinant DNA Molekülünün Oluşturulması (Ligasyon)	43
3.2.7	Rekombinant DNA Molekülünün <i>E. coli</i> JM105 Hücrelerine Transformasyonu. 44	
3.2.8	Gen Klonlanmasının PCR Taraması ile Kontrolü	46
3.1	<i>PfLDH</i> Proteinin İfadesinin Yapılması.....	48
3.2	<i>PfLDH</i> 'ın Aktivitesinin Tespiti.....	50
3.3	<i>PfLDH</i> 'ın Saflaştırılması	52
3.3.1	Hücrelerinin Hazırlanması	52
3.3.2	Saflaştırma İşlemleri	52
3.3.3	Saflaştırma İşlemleri Sırasında Elde Edilen Fraksiyonların Aktivite Ölçümleri ..	54
3.3.4	<i>PfLDH</i> Proteinin SDS-PAGE İle Analizi	54

3.3.5	Saf <i>Pf</i> LDH Proteinin Western Blot Analizi	55
3.4	Kinetik Analiz	55
4.	SONUÇ	58
KAYNAKLAR		60
ÖZGEÇMİŞ		68

SİMGE LİSTESİ

aa	Aminoasit
Å	Angstrom
bp	Baz çifti
Da	Dalton
å	Extinction Coefficient
g	Gram
kDa	Kilodalton
kcat	Kinetik -Katalizleme
Km	Kinetik- Michaelis-Menten
l	Litre
mA	Miliamper
ml	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
MW	Moleküler Ağırlık
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
<i>OD</i>	<i>Optik dansite</i>
°C	Santigrat
Vmax	Maksimum hız

KISALTMA LİSTESİ

A	Adenin
AIDS	Kazanılmış immün yetmezlik sendromu
ATP	Adenozin trifosfat
DNA	Deoksiribonükleikasit.
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
dH ₂ O	Distile su
eH ₂ O	Elgastat H ₂ O
EDTA	Ethilendiamintetra-asetik asit
IPTG	Isopropil-B-D-thiogaltopiranosid
CV	Kristal viyole
CS	Circumsporozoite
LDH	Laktat dehidrogenaz
LMW	Low Molecular Weight
mRNA	Mesajcı RNA
NAD ⁺	Nikotiamid adenin dinükleotid
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid (indirgenmiş)
PABA	Para-aminobenzoik asit
PBS	Phosphate buffered saline
pLDH	Plasmodial LDH.
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Pk</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>Pm</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>Po</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>Pv</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>Pf</i> LDH	<i>Plasmodium falciparum</i> laktat dehidrogenaz enzimi
<i>Pv</i> LDH	<i>Plasmodium vivax</i> laktat dehidrogenaz enzimi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleikasit
SAB	Sample Amplification Buffer
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TEMED	NNN'N'-Tetramethilenethilendiamin
WT	Yabanıl tip
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Türkiye’de 1925–2008 yılları arası sıtma vakalarının şematik gösterilmesi	3
Şekil 1.2 Türkiye’de mevsimlere göre sıtmanın dağılım şeması	3
Şekil 1.3 <i>Plasmodium</i> ’un hayat döngüsü	5
Şekil 1.4 Dört <i>Plasmodium</i> türünün nükleer genom özelliklerinin karşılaştırması	9
Şekil 1.5 <i>Plasmodium</i> ’daki bilinen temel metabolik yolların bir planı	11
Şekil 1.6 Pirüvatın laktata dönüşümü	16
Şekil 1.7 Glikoliz döngüsü	17
Şekil 1.8 <i>PfLDH</i> ve memeli <i>LDH</i> ’nda substrat bağlanma bölgesi ve substrat spesifik halkaya bitişik yarığın varlığının gösterilmesi	20
Şekil 2.1 pKK223-3 klonlama vektör haritası	22
Şekil 3.1 <i>PfLDH</i> ’ın amplifikasyon sonrası görüntüsü	42
Şekil 3.2 His-tag ilave <i>PfLDH</i> ’ın DNA fragmentlerinin elde edilmesi	43
Şekil 3.3 <i>PfLDH</i> geninin organizasyonu ve pKK223-3 klonlama vektörünün haritası	44
Şekil 3.4 Transformasyon sonrası petriyelerin görüntülenmesi	45
Şekil 3.5 Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak yapılan çalışmanın görsel anlatılması	46
Şekil 3.6 PCR taraması sonrası pozitif sonuçların jelde görüntülenmesi	47
Şekil 3.7 Total proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü	48
Şekil 3.8 Total proteinlerin ve <i>PvLDH</i> protein SDS-PAGE görüntüsü	49
Şekil 3.9 SDK1, <i>PfLDH</i> ve <i>E.coli</i> süpernatant ve pelletleri ayrılarak ve <i>PvLDH</i> SDS-PAGE görüntüleri	49
Şekil 3.10 SDK1, <i>PfLDH</i> ve <i>E.coli</i> süpernatant ve pelletleri ayrılarak SDS-PAGE görüntüleri	50
Şekil 3.11 <i>E. coli</i> kromozomunda kültür ortamına IPTG ilavesi ile enzim üretiminin indüklenmesi	51
Şekil 3.12 6xHis-tag’ın Ni-NTA agarozla bağlanması	53
Şekil 3.13 Saflaştırılmış <i>PfLDH</i> örneklerinin SDS-PAGE görüntüleri	54
Şekil 3.14 Saflaştırılmış olan <i>PfLDH</i> elüsyon 7, ve 8 protein Western Blot görüntüsü	55
Şekil 3.15 <i>PfLDH</i> ’ın Steady-State kinetik davranışı	57

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 <i>Pfu</i> DNA polimeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirilen PCR.....	28
Çizelge 2.2 Digest reaksiyonları ve bileşenleri.....	30
Çizelge 2.3 Ligasyon reaksiyonları ve bileşenleri.	30
Çizelge 3.1 <i>Plasmodium falciparum</i> 'un SDK1 LDH geninin (SDK1) nükleotid ve aminoasit dizisi.	38
Çizelge 3.2 <i>Pf</i> LDH amplifikasyonunu gerçekleştirmek amacıyla tasarlanan oligonükleotidler.....	41
Çizelge 3.3 <i>Pf</i> LDH proteininin aktivitesinin ölçülmesi.	51
Çizelge 3.4 <i>Pf</i> LDH'ın Hücre lizati	54
Çizelge 3.5 <i>Pf</i> LDH enziminin aktivitesinin NADH'ın NAD ⁺ 'a çevrilmesi ile 340 nm' deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranının takip edilerek ölçülmesi.	56
Çizelge 3.6 <i>Pf</i> LDH'ın Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar ..	56

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasını yapmamda bana her türlü fırsatı vererek ufkumu genişleten, deneyim ve tecrübesiyle yol gösteren ve çok şey öğrendiğim değerli hocam Sn. Doç. Dr. Dilek Turgut-Balık'a çok teşekkür ederim. Tez çalışmasının yürütülmesine maddi destek sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi'ne, Yıldız Teknik Üniversitesi BAP koordinatörlüğü'ne ve Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ne, ve bölümdeki hocalarıma teşekkür ederim.

Grup içi çalışmaları ile tez çalışmasının yürütülmesine katkıda bulunan Biyomühendislik Bölümü, Moleküler Genetik Laboratuvarı grup arkadaşlarım Arş. Gör. Özal Mutlu, Arş. Gör. Mustafa Çiçek, Ayşegül Erdemir, Ayberk Akat, Ebru Özkan ve Ebru Çayır'a teşekkür ederim. Dostluklarıyla her zaman yanımda olan Zeynep, Gürhan, Ayşe, Olga, Rabia, Serhat, Serap Arş. Gör. Emrah ve diğer yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma ve bütün Biyomühendislik Bölümü personeline teşekkür ederim.

Tez çalışması süresince sabır ve desteklerini esirgemeyen aileme ve dostlarım Handan Çelik ve Serpil Özgür Kaya'ya çok teşekkür ederim.

Ocak, 2011

ÖZET

Sıtma, dişi anofel cinsi sivrisineklerinin kan emerken konak canlıya bulaştırdıkları, *Plasmodium* parazitlerinin sebep olduğu ateşli bir parazit hastalığıdır. Günümüzde kullanılmakta olan antimalaryal ilaçlara karşı parazit direnç kazanmış ve sıtmanın kontrol altına alınmasını zorlaştırmıştır. Bu nedenle alternatif ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Genetik mühendisliğindeki hızlı gelişmeler, *Plasmodium falciparum*'un glikolitik yolunda görevli olan laktat dehidrogenaz enziminin yeni antimalaryalların tasarımında hedef olarak belirlenmesine yön vermiştir. Ancak bu alandaki çalışmalar hücrelerde gerçekteşen moleküler olayları keşfetmemizi ve anlamamızı sağlamakla birlikte, protein aktivitesi ve fonksiyonu hakkında bilgi vermemektedir. Bu nedenden dolayı tanı ve tedavi amaçlı kullanılacak olan bir proteinin fonksiyonunun ve yapısının anlaşılması için izole edilmesi ve saflaştırılmasını gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında *Plasmodium falciparum*'un laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen, 3'ucuna 6 histidin amino asidi ilave edilerek polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmış ve standart metodlar kullanılarak pKK223-3 vektörüne aktarılarak genin *E. coli*'de ifadesi gerçekteşirilmifitir. Enzimatik aktivitesi onaylanan protein Ni-NTA agaroz içeren kolonlar hazırlanarak saflaştırılmış ve analiz edilmiştir.

Klonlama sonrasında elde edilen ve His-tag içeren PfLDH total proteinin SDS-PAGE ile analizi His-tag içermeyen kontrol proteini ile karşılaştırmalı olarak yapılmış ve bantlaşma profillerinin aynı olduğu dolayısıyla His-tag ilavesinin proteinin ifadesine bir etkisinin olmadığını gösterilmiştir. Protein indüklenmesi ise protein üretimini dört kat artırmıştır. SDS-PAGE ve Western blot analizleri uygulanan saflaştırma protokolü sonucunda PfLDH proteininin yaklaşık % 95 saflıkta elde edilmiş olduğunu göstermiştir. Bu tez çalışması sonucunda PfLDH proteininin; yüksek saflıkta, ihtiyaç duyulan miktarda ve kolay uygulanabilir bir protokol ile elde edilmiş olmasıyla; protein, inhibitör tespiti çalışmalarında kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sıtma, *Plasmodium falciparum*, laktat dehidrogenaz, protein saflaştırma, ifade.

ABSTRACT

Malaria is a fevered disease caused by *Plasmodium* parasites which infect the host organism through female anopheles while sucking blood. The parasites have developed resistance against antimalarial drugs used nowadays and complicated the control of malaria. For this reason, developing alternative drugs is necessary. Rapid improvements in genetic engineering have pointed lactate dehydrogenase enzyme of *Plasmodium falciparum*, which has a role in glycolytic pathway, as a target for developing new antimalarial drugs. Although, studies on this field provided us to discover and understand the molecular mechanisms happening in the cell, they do not inform about the protein activity and functions. Because of this reason, isolation and purification of this protein, which will be used for diagnosis and treatment, is required to understand its function and structure.

In this study, the gene encoding lactate dehydrogenase enzyme of *Plasmodium falciparum* was amplified by polymerase chain reaction with 6 histidine amino acids added to 3' end of the gene, transferred to pKK223-3 vector by using standart methods and expressed in *E. coli*. The protein with a confirmed enzymatic activity was then purified in Ni-NTA agarose containing columns and analyzed.

The SDS-PAGE analysis of the total His-tag containing *Pf*LDH protein obtained from cloning was made comparatively to the His-tag free control protein and the banding profiles were determined as the same, so it was shown that the His-tag addition does not have any effect on protein expression. But the protein induction has increased the protein production for four times. The SDS-PAGE and Western blot analyses showed that the *Pf*LDH protein was obtained approximately at 95% purity through the purification method performed. As a result of this study, the needed amount of *Pf*LDH protein was acquired in high purity by an easy applicable protocol for inhibitor determining studies.

Keywords: Malaria, *Plasmodium falciparum*, laktate dehydrogenase, protein prufication, expression

1. GİRİŞ

1.1 Sıtma

Sıtma, dişi anofel cinsi sivrisineklerin kan emerken konak canlıya taşıdıkları sporozitleri transfer etmeleri ile bulaşan tropikal parazit hastalığıdır (Knell, 1991).

Sıtma'ya neden olan *Plasmodium*'lar, tek hücreli parazitler olup üremeleri iki aşamada gerçekleşmektedir. Bunlar döllenme safhası (sivrisineklerde) ve çoğalma safhasıdır (insan alyuvarlarında). *Plasmodium*'lar başta kuşlar olmak üzere kaplumbağa, kertenkele, yılan gibi sürüngenleri ve primat, kemirgen gibi memelileri enfekte etmektedirler (Knell, 1991).

Sıtma, günümüzde insanları tehdit eden önemli bir sağlık sorunudur. Bu nedenle sıtmanın geniş bir alana yayılmış olması ve her geçen gün hastalığın yayılıp ölen kişi sayısının artması tehlikenin ne denli ciddi olduğunu göstermektedir (WHO, 2009).

Yakın zamana kadar bilinen, insan sağlığını tehdit eden dört *Plasmodium* türü bulunmaktaydı. Bunlar; *Plasmodium vivax* (Pv), *Plasmodium falciparum* (Pf), *Plasmodium ovale* (Po), *Plasmodium malariae* (Pm)'di. Ancak yapılan güncel araştırmalar sonucu insanı infekte ettiği kesinlik kazanmış beşinci tür olarak *Plasmodium knowlesi* (Pk) keşfedilmiştir (Cox-Singh vd., 2008, Özcel, 1999).

Asıl sıtma ölümlerinin sebebi olan *Plasmodium* türü *Plasmodium falciparum*'dur ve bu nedenle *falciparum* sıtması malign yani kötü huylu sıtma olarak adlandırılmaktadır. Tropikal bölgelerde ve Güneydoğu Asya'da görülmektedir. Ateşler daha uzun sürmekte, nöbetler ortalama olarak gün aşırı ortaya çıkmaktadır. *P. falciparum*'a enfeksiyonlarının immünolojik olarak yetersiz ya da baskılanmış kişilerde çok çabuk ilerlemekte ve bazı durumlarda belirtilerin ortaya çıkışından 24 saat sonra ölümler görülmektedir. (Özcel, 1999). Bu sıtma türünde ateşli ve kötü nöbetler görülmektedir. *P. vivax* sıtması *P. falciparum* sıtmasına göre daha iyi seyirli ve nadir olarak ölümlerle sonuçlanmaktadır. Türkiye'de de yerli olarak görülen tür *P. vivax*'dır. Ortalama kuluçka süresi 12-14 gün sürmektedir. Tedavi edilmezse nüks etmektedir. (Akdur, 1997, Özcel, 1999).

1918'de Doğu Afrikalı bir askerde sıtma parazit bulunduğunda bunun *P. vivax*'a benzer fakat ayrı bir tür olduğu gözlemlenmiş ve *P. ovale* adı verilmiştir (Özcel, 1999). Batı Afrika ve Pasifik yerlilerinde *P. ovale* yalnızca hastalık oluşturmakta ve bu türün bulaşmış olduğu

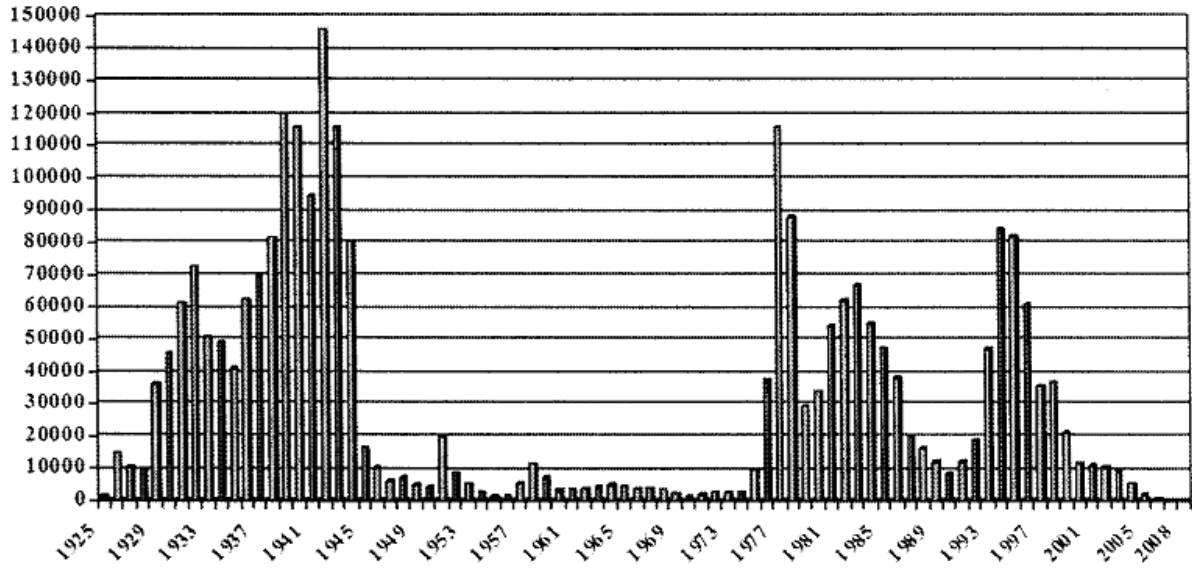
kişilerde hastalık hafif seyretmektedir. Diğer ırklar bu türe doğal olarak bağışıklık kazanmışlardır. *P. malariae* olgusuna ise bu bölgelerde pek rastlanmamaktadır. *P. malariae* tropikal Afrika'da Burma, Srilanka ve Hindistan'ın bir bölümünde yaygındır. Malezya ve Endonezya'nın bazı bölgelerinde de görülmektedir. Kuzey Amerika'da sporadik olarak görülmesine rağmen Güney Amerika'da oldukça az görülmektedir (Akdur, 1997).

İnsanlara bulaşan beşinci tür sıtma paraziti olarak literatüre geçen *Plasmodium knowlesi*, daha çok Doğu ve Güney Asya boyunca dağılım göstermektedir. Yakın zamana kadar *Plasmodium knowlesi*'ye yakalanan kişilere *P. malariae* teşhisi konulmaktaydı. 2001–2006 yılları arasında Malezya Borneo'da yapılan araştırmada, *Plasmodium knowlesi*'nin insanları enfekte ettiği ve mikroskopik tanı aşamasında *P. malariae* ile karıştırıldığından dolayı bu güne kadar teşhisinin kesin bir biçimde yapılamadığı ortaya çıkmıştır (Cox-Singh vd., 2008, Mutlu, 2009).

Sıtma kelimesi parazit ile enfekte olmuş canlılarda yüksek ateş görüldüğünden ısıtma kelimesinden türemiştir. Anadolu'da sıtma, tarihler boyunca salgına neden olmuş ve sadece insanların ölümüne yol açmakla kalmamış birçok Ege ve Akdeniz medeniyetlerinin çökmesinde de büyük rol oynamıştır (Akdur, 2004).

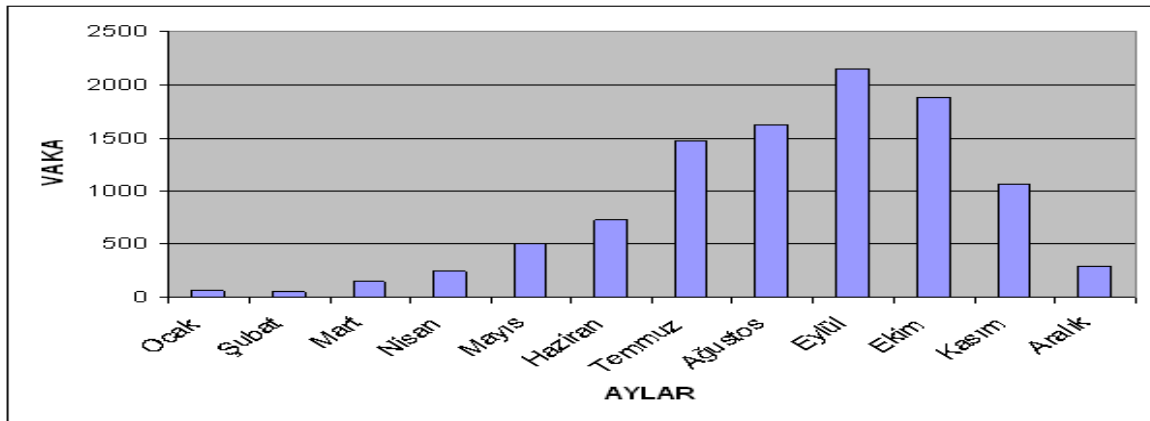
Türkiye'de sıtma eradikasyon çalışmaları ciddi surette ele alınmış ve başarı elde edilmiştir. 1950 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve UNICEF ile yapılan iş birliği ile, yurdumuzda sıtma ile mücadele amacıyla 'Sıtma Eradikasyonu Kampanyası' başlamış ve Sağlık Bakanlığı Sıtma Savaş Personeli'nin de gayretiyle enfeksiyon önemli ölçüde kontrol altına alınmış ve ülke genelindeki sıtma sayısı 1200'lü rakamlara düşmüştür. Fakat sıtma kontrol çalışmaları Türkiye'de belli bir disiplinde yürütülememiş, bunu sonucu olarak, 1970'li yıllarda sıtma vaka oranında bir artış kaydedilmiştir. Eldeki veriler, yürütülen programlar ve anlayışlar sonunda belirlenen ya da diğer bir ifade ile resmi bildiri yapılan sayılarla sınırlı kalmıştır. Bu nedenden dolayı bilinen sayısal değerler çok eskilere dayanmamaktadır. (Akdur,1997).

Türkiye'de 1925-2008 yılları arasında görülen sıtma vaka sayıları şekil 1.1'de görülmektedir.



Şekil 1.1 Türkiye'de 1925–2008 yılları arası sıtma vakalarının şematik gösterilmesi (İnan vd., 2010)

Türkiye'de sıtmanın görüldüğü dönemler mevsimlere göre değişmektedir. Sıtma vakaları Mart ayından itibaren görülmeye başlayıp Temmuz, Ağustos ve Eylül aylarında en yüksek sayıya ulaşmaktadır (Şekil 1.2). Bunu takip eden aylarda sıtma görülme sıklığı düşüşe geçmektedir. Buna paralel olarak mevsim sıcaklarının değişmesi, sivrisinek popülasyonundaki düşüşle bağlantılıdır.



Şekil 1.2 Türkiye'de mevsimlere göre sıtmanın dağılım şeması [1]

Türkiye'de sıtmanın en yaygın bulunduğu bölge Güney-Doğu'dur. Ülkemizde görülen sıtma türünün *P. vivax*'ın yol açtığı tersiyer sıtması olduğu, fakat diğer sıtma çeşitlerinin nadir de olsa görüldüğü kaydedilmiştir. 2006 yılında Türkiye dışından (emporte) olduğu düşünülen 29

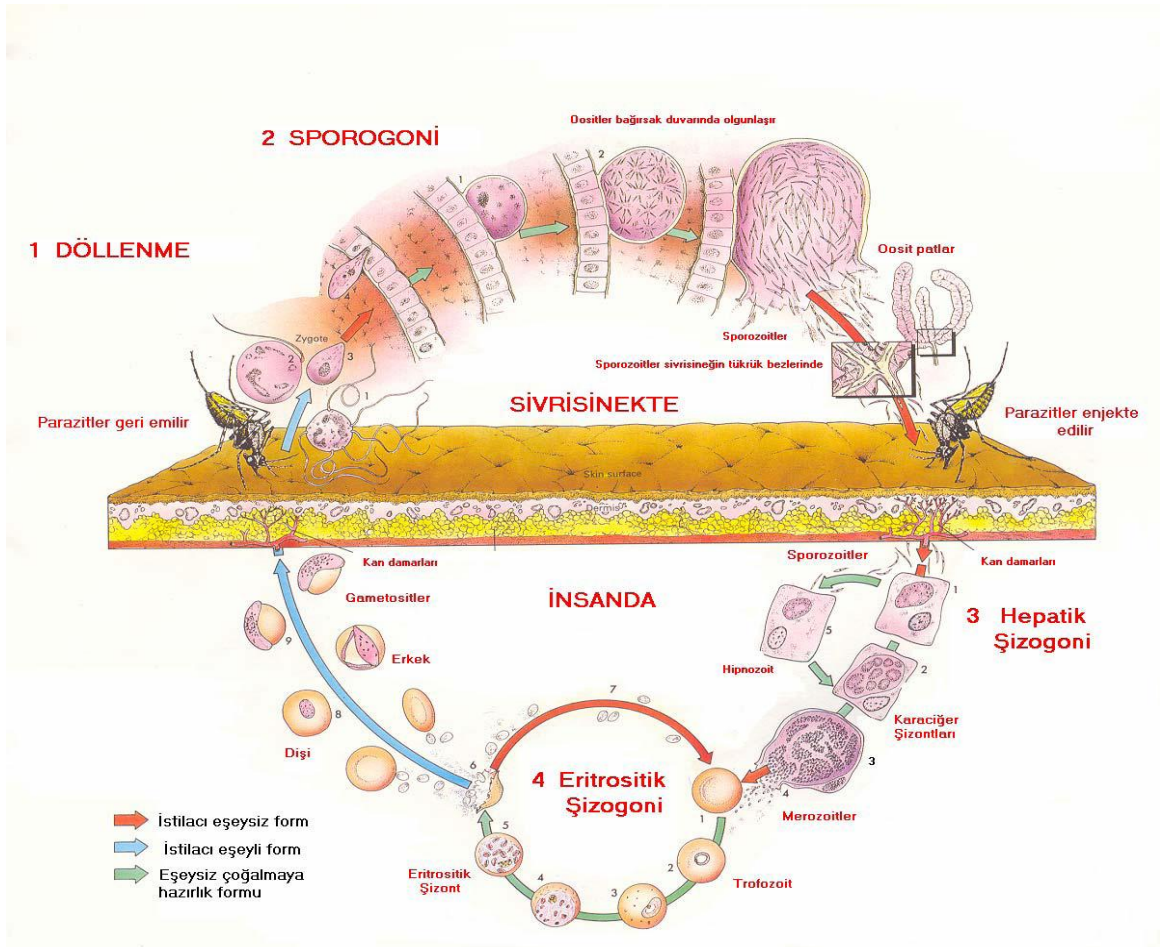
P. falciparum kaynaklı sıtma olgusuna rastlanmıştır (WHO, 2008).

2009 yılı Dünya sağlık örgütü raporuna göre; 2006 yılında, *P. falciparum*'dan dolayı meydana gelen toplam 247 milyon sıtma olgusu görülmüş ve dünya genelinde görülen sıtmaya neden olan türlerin arasında %91'lik bir orana karşılık geldiği bildirilmiştir. Vakaların büyük bir bölümü Afrika bölgesinde diğer kısmı ise Güney-Doğu Asya ve Doğu Akdeniz'de görülmektedir. 2006 yılında, 247 milyon olgudan 880 000 kişi sıtmadan hayatını kaybetmiştir. Bunların %90'ı Afrika bölgesinde, %4'ü Güney-Asya ve %6'ı Batı Akdeniz'e gerçekleşmiştir (WHO, 2009).

1.2 Sıtma Parazitleri ve Yaşam Döngüsü

Sıtma parazitleri, hayvanlar aleminin bir alt evreni olan Protozoon'ların Apicomplexa şubesi, Eucoccidiida takımı, Plasmodiidae ailesi ve *Plasmodium* cinsi içerisinde yer almaktadır (Ozcel, 1999). Sıtma parazitlerinde, hücreleri işgal ettiği formları olan ookinet, sporozoit ve merozoitlerin uç kısmında yer alan, alyuvar ve karaciğer hücrelerinin özel antijenik bölgelerini tanıyarak, onları istila etmeye yardımcı olan apikal kompleksin bulunması, bu parazitlerin Apicomplexan şubesi içerisinde yer almalarına neden olmuştur (Yotoko ve Elisei, 2006). *Plasmodium* cinsi içinde 200 tür tanımlanmıştır ve yeni türlerin keşfi devam etmektedir (Perkins ve Austin, 2009).

Sıtma parazitlerinin yaşam döngüleri, omurgasız anofel cinsi sivrisineklerdeki eşeyli üreme ile, sporozoitlerin oluşturulduğu ve omurgalı konak canlıda eşeysiz üremenin görüldüğü dönem olmak üzere iki kısımda gerçekleşmektedir (Şekil 1.3), (Kayser, 2005).



Şekil 1.3 *Plasmodium*'un hayat döngüsü (Knell, 1991).

1.2.1 Omurgasız Canlıdaki Yaşam Döngüsü

Sıtma neden olan parazitin, dişi bir anofel sivrisinekteki döngüsü döllenme ve sporogoninin görüldüğü iki evreden meydana gelmektedir.

1.2.1.1 Döllenme

Paraziti taşıyan sivrisinekte makrogamet ve mikrogamet birbirinden bağımsız olarak oluşmaktadır. Sivrisinek, parazit ile infekte olmuş konak canlıdan kan emerek mikrogametosit (erkek) ve makrogametosit (dişi) almaktadır. Bir mikrogametositten, sivrisinek midesinde, yaklaşık 8 tane kamçılı mikrogamet meydana gelmektedir. Makrogametositler ise makrogametlere dönüşmektedir. Bu iki formun döllenmesi ile zigot oluşmakta ve zigot yaklaşık 20 dakika sonra yalancı ayak çıkararak fuziform şekline dönerek hareketli ookinet dönüşmektedir. Ookinet gelişimini sürdürüp mide epitelyum hücrelerine penetre olmakta ve

ookist adı verilen ince duvarlı yuvarlak şekilli bir yapı haline dönüşmektedir (Özcel,1999).

1.2.1.2 Sporogoni

Ookistler olgunlaşarak bölünmekte ve binlerce sporozoit meydana gelmektedir. Sporozoit sivrisineğin vücuduna dağılarak tükürük bezlerine yerleşmektedir. Dişi sivrisinek kan emerken tükürük bezlerinde bulunan sporozoitleri canlıya geçirip konak canlıdaki yaşam döngüsünü başlatmaktadır (Özcel 1999).

1.2.2 Omurgalı Canlıda Karaciğerdeki Yaşam Döngüsü

Plasmodium'ların omurgalı canlıda yaşam döngüsünü iki şekilde sürdürmektedir. İlki karaciğerdeki (ekzoeritrositik şizogoni) dönem, ikincisi ise alyuvardaki (eritrositik şizogoni) dönemdir.

1.2.2.1 Ekzoeritrositik (Hepatik) Şizogoni:

Sivrisineklerin kan emerken omurgalı canlı vücuduna verdikleri sporozoitler 1 saat içerisinde kandan eşeysiz üremenin olduğu karaciğer parankim hücrelerine penetre olmaktadır. Sporozoitler yuvarlak ve oval yapıya dönüşerek çekirdekli bir yapı olan ekzoeritrosit şizogoni formuna dönüşmektedir. Şizontların pigmenti bulunmamaktadır. Ekzoeritrosit şizogoni sonucu, çok sayıda merozoit oluşmaktadır (Özcel, 1999). Merozoitlerin oluşumu 1-2 hafta içerisinde gerçekleşmektedir. Merozoitler oluşuktan sonra karaciğer hücresi patlamakta ve merozoitler kan dolaşımına katılmaktadırlar. Merozoitlerin alyuvarlara girmesiyle birlikte eritrositik şizogoni dönemi başlamaktadır (Kayser, 2005).

1.2.3 Omurgalı Canlıda Kan Döngüsü

1.2.3.1 Eritrositik Şizogoni

Bir merozoit bir eritrosite girip eşeysiz üremenin gerçekleşeceği bu evreyi başlatmaktadır. Bu olayla birlikte bazı türlerde merozoitin dış tabakası kaybolmaktadır (Özcel 1999). Bu durumda trofozoit halini alır, yapı halka (ring) şeklindedir ve hemoglobinle beslenmektedir. Trofozoit büyüdükçe pigment geliştirmeye başlamakta, sitoplazma boyutu artmaktadır. Pigment, hematin ve protein birleşiminden oluşmaktadır. Mitoz bölünme ile genç şizontlara dönüşmektedir (Özcel 1999). Daha sonra olgun şizont oluşmakta ve merozoitlere

bölünmektedir. Merozoitlerin kana dökülmesi ile eritrosit parçalanmakta ve merozoitler tekrar bir şizogonik evreyi başlatmaktadırlar.

P. vivax, *P. falciparum* ve *P. ovale*'de döngüler 48 saat, *P. malaria*' da ise 72 saat halinde gerçekleşmekte ve alyuvarların parçalandığı her dönemde konak canlıda ateş nöbetleri meydana gelmektedir. Birkaç döngü sonrasında bazı merozoitler eşey hücreleri olan mikrogametosit ve makrogametositlere dönüşmektedirler. (Kayser, 2005). Temelde *Plasmodium* türlerinin hayat döngüleri yukarıda anlatıldığı gibi meydana gelse de, türler arasında döngü süresi, ookinit, sporozoit, merozoit ve gametlerin büyüklüğü ve hücre içindeki şekilleri bakımından farklılıklar görülmektedir (Özcel, 1999).

1.3 Sıtma Parazitlerinin Genom Projesi, Genetik Özellikleri ve Biyokimyası

Plasmodium'lar ile ilgili olarak yürütülmekte olan genom projeleri, sıtma parazitinin genomik yapılarının tanımlanması ve kendilerine has özelliklerinin belirlenmesi üzerinde yapılan çalışmalara hız kazandırmıştır. Bu çalışmalar Turgut-Balik 2010'da özetlenmiştir (Turgut-Balik 2010).

Ökaryotik bir patojenin genom dizisinin belirlenmesi *Plasmodium falciparum* genom projesi ile ilgili çalışma olarak başlatılmıştır. 14 kromozomdan iki tanesi olan 2. (Gardner vd., 1998) ve 3. (Bowman vd., 1999) kromozomların tam nükleotid dizileri açıklanmış olup nükleer genomun %8'ini temsil eden, daha sonra da 1, 3-9 ve 13. kromozomlar (Hall vd., 2002), 2, 10, 11, ve 14. kromozomlar (Gardner vd., 2002) ile 12. kromozomun (Hyman vd., 2002) dizisi rapor edilmiştir. *Anopheles gambiae* sivrisineğinin genomunun çözülmesi, *P. falciparum*'un genom dizisinin açıklandığı ile ilgili makalelerin yayınlanması ile sağlanmıştır (Holt vd., 2005). Parazitin kompleks hayat devrini tamamlayabilmek ve bir konaktan diğerine taşınabilmesi için sivrisineğe ihtiyaç duymaktadır. Bu nedende dolayı *Plasmodium* ve *Anopheles* arasındaki bağlantı oldukça açıktır.

1.3.1.1 *Plasmodium*'ların Nükleer Genomu

22.8 megabazdan (Mb) oluşmuş olan *P. falciparum*'un nükleer genom dizisinin büyüklükleri yaklaşık olarak 0.643-3.29 Mb arasında değişen 14 kromozoma dağılmıştır. Protein kodlayan genlerin yapıları, gen tespit eden programlar yardımı ile tahmin edilmiş ve manuel olarak yardımcı düzenlemeler yapılmıştır (Carlton vd., 2002).

Şekil. 1.4’de dizisi bilinen dört *Plasmodium* türünün nükleer genomları karşılaştırılmıştır. Görüldüğü gibi memelilerde sıtmaya neden olan dört *Plasmodium* türünün genomları birçok açıdan büyük farklılıklar göstermekte ve 14 kromozoma toplanmış olan nükleer genomun büyüklüğü 23 megabazdan 27 megabaza kadar değişim göstermektedir (Carlton vd., 2008a)

1.3.1.2 Apikoplast Genomu

Sıtma parazitinin yaşamını sürdürebilmesi için mutlaka gerekli olan apikoplastın işlevi tam olarak bilinmemektedir (Gardner vd., 2002). Apikoplastın yağ asitleri, izoprenoidler ve hemin anabolik sentezinde fonksiyonlarının olduğu bilinmektedir (Gardner vd., 2002; Ralph vd., 2004). Ancak mitokondri ve kloroplastta olduğu gibi, apikoplast proteomu nükleer genomda kodlanan ve translasyon sonrası bu organelle hedeflenen proteinlerle desteklenmektedir (Gardner vd., 2002).

Özellik	Değer			
	<i>P. vivax</i>	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. yoelii yoelii</i>
Genom				
Büyükük (Mb)	26.8	23.5	23.3	23.1
Kromozom sayısı	14	14	14	14
Coverage (fold)	10	8	14.5	5
G+C içeriği (%)	42.3	37.5	19.4	22.6
Genler				
Gen sayısı	5,433*	5,188*	5,403*	5,878 †
Asıl gen uzunluğu †	2,164 §	2,180 II	2,283	1,298 †
Gen yoğunluğu (bç /her bir gen)	4,462.9 §	4,593 II	4,312	2,566 †
Ortalama kodlama †	48.5 §	47.4 II	52.6	50.6 †
Intronu olan genler (%)	52.1 §	51.6 II	53.9	54.2 †
Eksonlar				
Herbir gendeki asıl sayı	2.5 §	2.6 II	2.4	2.0 †
G+C içeriği (%)	46.5 §	40.2 II	23.7	24.8 †
Asıl uzunluk (bç)	957 §	836.8 II	935	641 †
İntronlar				
G+C içeriği (%)	49.8 §	38.6 II	13.6	21.1 †
Asıl uzunluk (bç)	192 §	224.4 II	179	209 †
İnterjenik bölgeler				
G+C içeriği (%)	42.5 §	34.56 II	13.7	21.1 †
Asıl uzunluk (bç)	1,994 §	2,049.4 II	179	209 †
RNA'lar				
tRNA genlerinin sayısı	44	41	43	39
5S rRNA genlerinin sayısı	3	0	3	3
5.8S/18S/28S rRNA birimlerinin sayısı	7	5 ¶	7	4

* Pseudogen ve kısmı gen içerir, kodlanmayan RNA içermez; † Kısmı gen içermez; ‡ İtron içermez; § 2.745(A+T)-zengin kontigden küçük gen içermez; II 511 kontigden küçük gen içermez; ¶ *P. knowlesi* 4.0 birleştirme versiyonunda bulunmaz. bç: Baz çifti.

Şekil 1.4 Dört *Plasmodium* türünün nükleer genom özelliklerinin karşılaştırması (Carlton vd., 2008a)

1.3.2 *Plasmodium*'daki Metabolik Yollar

Parazitin eritrositteki trofozoit metabolizması ayrıntılarıyla bilinmektedir. Bu safhada parazitler kültürlerden toplanabilmekte, eritrositlerden uzaklaştırılabilmekte ve diğer hücrelerden ayrılabilir. Bunun gibi preparasyonlarda parazitin metabolik aktivitesi eritrositlerin ve beyaz hücrelerin metabolizmasından ayırt edilmektedir. Hayat döngüsündeki diğer safhaların metabolizması hakkında çok az şey bilinmektedir. Özellikle parazit ve konak hücrede metabolik aktivitelerin olduğu noktalar hakkında daha fazla bilgiye şiddetle ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlar seçici (selektif) ilaçların olası hedefleridir ve yaşayan konak hücreler zarar görmeden parazite hasar verilmesi amaçlanmıştır (Şekil 1.5) (Knell, 1991).

Parazitler plazmadan eritrosit membranı, bir hemoglobin tabakası ve parazitofor (parasitophorous) vakuölü ile ayrılmaktadır. Bu engeller besinlerin parazitin içine difüzyonunu ve atık ürünlerin dışarı çıkışını yavaşlatarak, büyüme hızını sınırlandırmaktadır. Difüzyon en az iki yolla artırılabilir. *Plasmodium falciparum*'un formlarında olduğu gibi parazit kendisini eritrosit membranına yaklaştırabilen veya *Plasmodium vivax*'ta olduğu gibi ameboid hareket yapabilmektedir (Knell, 1991).

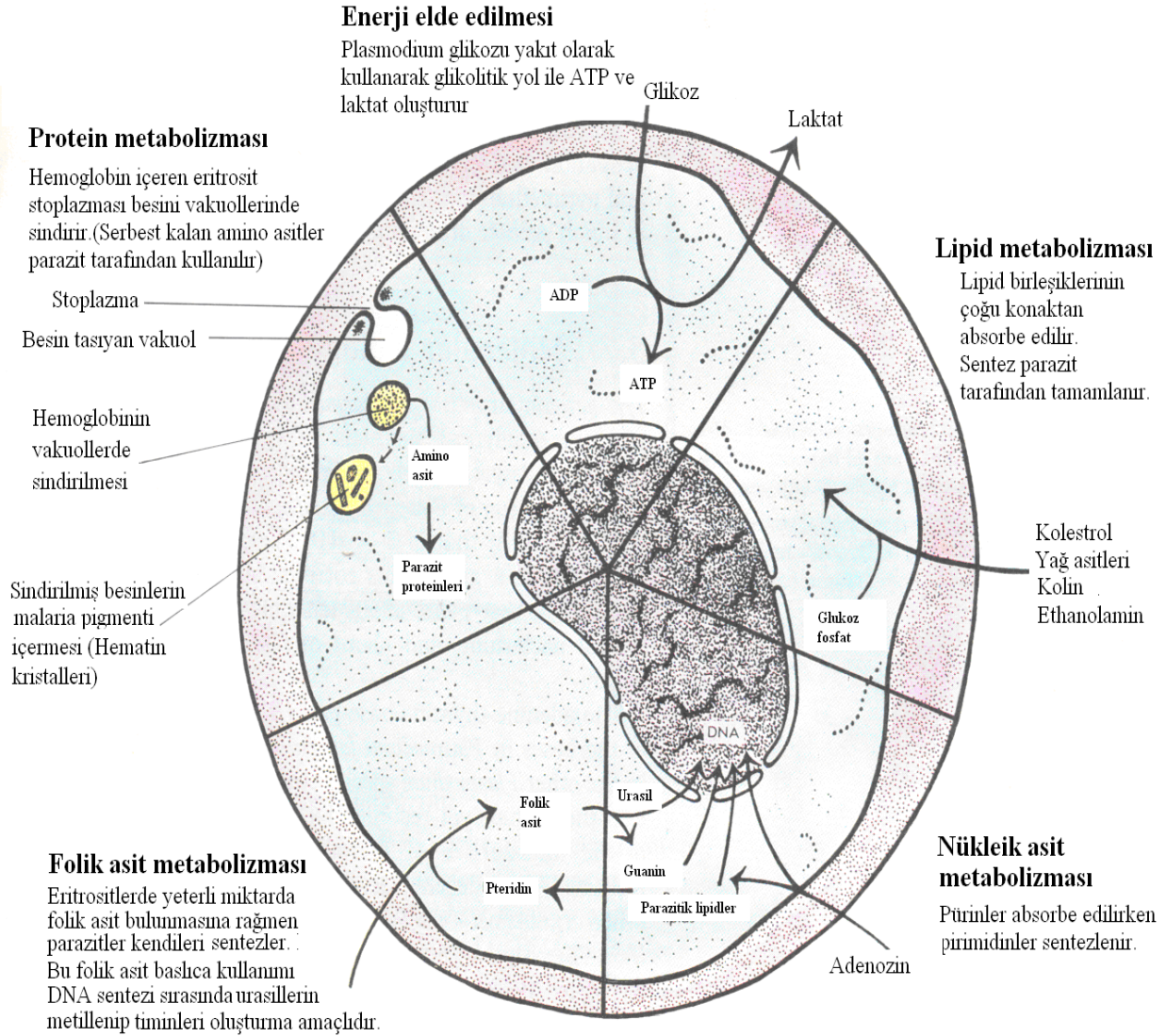
1.3.2.1 Enerji Kaynağı

Glukoz, eritrositte *Plasmodium* metabolizmasına enerji sağlamaktadır. Anaerobik yol olan glikoliz döngüsünde, enerji üretmek için glukoz parçalayarak son ürün olarak laktik aside dönüşmekte ve ATP ihtiyacını sağlamaktadır. Anaerobik bir yol olduğundan oksijen kullanılmamaktadır. Eritrositlerin içinde bulunan hemoglobin, kanda dolaşırken sırayla oksijen almakta ve oksijenini bırakmaktadır. Fakat parazitler bu iniş çıkıştan etkilenmemektedir. Parazit yaşam döngüsünü sürdürebilmesi için kandan çok fazla glukoz almaktadır. Ağır infeksiyonlarda hastanın kan glukoz konsantrasyonu tehlikeli bir şekilde düşebilmekte (hipoglisemi) ki bu proses tedavi boyunca kötüleştirilebilmektedir çünkü tedavi sırasında kullanılan kinin, insülin salgılanmasını uyarmaktadır (Knell, 1991).

1.3.2.2 Protein Sentezi

Protein sentezi için gerekli amino asitler yaygın olarak sindirilmiş hemoglobinden gelmektedir. Sindirilen her hemoglobin molekülü 4 molekül demir içeren kırmızı pigment olan hem açığa çıkarmaktadır. Bunlar besin vakuollerinde birikir, oksitlenmiş kahverengi

ferrik hem veya hematin haline gelmekte ve malarial pigment olarak çökelmekte ya da kristalleşmektedir (Knell, 1991).



Şekil 1.5 *Plasmodium* 'daki bilinen temel metabolik yolların bir planı (Knell,1991).

1.3.2.3 Lipidler

Lipid sentezi özellikle parazitin çeşitli membran sistemlerinin üretimi için önemlidir. Açık olmamakla birlikte parazitin bazı lipid bileşenlerini sentezlemekte ve diğerlerini konak

hücreden aldığı bilinmektedir. Gliserol, trigliserit ve fosfolipidlerin temel bileşeni sentezleyebilmekte ve lipid öncüllerini fosforilleyebilmektedir. Konak hücreden yağ asitleri, kolesterol ve muhtemelen etanolamin ile kolini karşılamaktadır (Knell, 1991).

1.3.2.4 Folik asit

Folik asit DNA sentezi süresince urasilin timin haline metilasyonunu da kapsayan bir seri önemli reaksiyon için gerekli olan bir kofaktördür. Çoğu organizmada her kullanımdan sonra tekrar aktifleşmeyi gerektiren karmaşık bir metabolik döngüsü vardır. *Plasmodium* plazma ve eritrositte bol miktarda kaynak olmasına rağmen kendi folik asitlerini sentezleyebilmektedir. Gerekli olan öncül madde para-aminobenzoik asittir (PABA). Sülfonamid antimikrobiyal ilaçlar PABA metabolizmasına engel olur ve bazı antimalaryal aktiviteleri vardır (Knell, 1991).

Dihidrofolat redüktaz folik asit aktivasyonu için gerekli olan bir enzimdir. İki yararlı antimalaryal ilaç olan proguanil ve pirimetamin tarafından inhibe edilmektedir. İnsan enzimine eş değer olan sadece yüksek ilaç konsantrasyonlarında inhibe edilmektedir (Knell, 1991).

1.4 Sıtmanın Tedavisinde Kullanılan Antimalarial İlaçlar

Dünyada genelinde kullanılan antimalarial ilaçların yetersizliği ve parazitin bu ilaçlara karşı direnç kazanmasından dolayı yeni antimalarial ilaç tasarımı çalışmaları zorunlu hale gelmiştir. Günümüzde sıtmadan kaynaklı ölüm vakalarındaki fazlalık, bizi yeni antimalarial ilaçların geliştirilmesine, parazitin metabolik yolunun ve biyokimyasının araştırılıp hedeflenen amaçta göre ilaç geliştirilmesine yöneltmiştir (Akdur, 2004).

Parazit ile savaş sırasında antiparazitik ilaçlar kullanılmaktadır. Fakat bazı zamanlar bunun yeterli olmadığı görülmüştür. Var olan ilaçlar parazitin türüne ve yaşam evresine göre farklılıklar göstermektedir. Tüm parazit türlerine veya parazitin tüm evrelerinde etkili olabilen bir ilaç henüz keşfedilmediştir (Akdur, 2004).

Parazit ile savaş için kullanılan bir ilaçtan ideal olarak, eritrositler ve kan serumu içindeki şizontları yok etmesi, kişiye veya dokulara toksik etki yapmaması, preeritrositer, ekzoeritrositer şizontları öldürerek profilaktik etki yapması, kandaki gametositleri öldürmesi veya sivrisinekteki döneminin durdurulması gerekmektedir (Akdur, 2004).

Sıtma genom projesinin yeni ilaçların geliştirilmesine yardımcı olacağı ve ilerleyen zamanlarda yeni hedefleri göstermeye başlayacağı umutla beklenmektedir (Olliaro ve Yuthavong, 1999).

Sıtma tedavisi konağın sağlık durumu (gebelik, kalp krizi vb.), enfeksiyon tipi, enfeksiyonun şiddeti ve konağın durumu (yaş, kilo, çevresel faktörler vb) gibi bazı faktörlere bağlıdır. Doku şizontositleri, sıtma parazitinin karaciğer evresinde veya karaciğerden kana geçişindeki evrede etken bir ilaçtır. Şizontositler sıtma parazitinin kan hücrelerinde çoğaldığı veya çoğaldıktan sonraki aşama olan aseksüel evrede etken bir ilaçtır. Gametositler, mikrogametosit ve makrogametosit evrede etken bir ilaçtır. Sporozoitler, sivrisinekte meydana gelen ookist'lerin oluşumunu engellemektedir. Sıtma tedavisinde kullanılan ilaçlar sıtma parazitinin farklı evrelerini hedeflemektedirler. Sıtma ilaçlarının dört amacı vardır. Bunlar; korunmak için geliştirilmiş olanlar, sıtmanın ataklarını engellemek için geliştirilmiş olanlar, şüphe altındaki bireylerin tedavisi için geliştirilmiş olanlar ve son olarak bulaşma olasılığını engellemek için geliştirilmiş olanlardır (Akdur, 2004).

1.4.1 Kinin

Güney Amerika'ya özgü çinkona ağacının kabuğundan elde edilen bir çinkona, kınakına alkolooidlerinden biri olan antimalarial ajandır. Kınakına ağacından ilk olarak elde edilmiş ve geçmişte sıtmaya karşı kullanılan tek ilaç olmuştur (Akdur, 2004).

Kinin tüm parazit türleri üzerinde kan-şizontları evresine etki etmektedir. Bu nedenden dolayı etken bir şizontosittir. Fakat kandaki kalım süresi çok kısa olduğu için koruma amaçlı kullanılmamaktadır Klinik atak tedavisinde kullanılmaktadır (Akdur, 2004).

1.4.2 Klorokin

Klorokin 4-Aminoquolinler sınıfının en bilinen ve kullanılan türüdür. 1934'de sentezlenmiştir. Sıtma tedavisi için kullanılan diğer türler amodiakin, amopirakin ve siklokin'dir (Akdur, 2004). Klorokin, kinin gibi tüm sıtma türlerinde etken olan şizontosittir. Ayrıca, *falciparum* dışındaki türlerin gametositlerini de etkilemektedir. Fakat şizontosit ve sporontosit etkisi yoktur. Toksikitesi ve normal miktarlarda yan etkisi de düşüktür. Mide ve bağırsakta emilmekte, dokularda depolanmaktadır. Yavaş salınmaktadır (Akdur, 2004). Yarım yüzyıl önce *P. falciparum* malaryası Güneydoğu Asya ve Güney Amerikada klorokine karşı

direnç geliştirmiş ve ilaca dirençli sıtma büyük bir sorun teşkil etmiştir (Wongsrichanalai vd., 2002).

1.4.3 Amodiakin

Kullanım şekli ve miktarı dışında klorokine benzemektedir. Kullanım miktarı olarak daha avantajlıdır. Bu nedenden dolayı klorokine rezistans kazanmış *P. falciparum* olgularında akla gelen ilaçtır. Klorokine göre toksitesi yüksek olduğundan tercih edilmemektedir (Özcel, 2007).

1.4.4 Primakin

8-Aminoquolinler grubuna dahil olup ilk bulunan yapay ilaçlardandır. Tüm türler için gametositostir ve *P. ovela* ve *P. vivax* için doku şizontositidir (Akdur, 2004).

1.4.5 Meflokin

İlk defa Amerikan askerlerini *P. falciparum*'a karşı korumak amacıyla Vietnam savaşı sırasında, geliştirilmiştir. Çoklu ilaç direnci *P. falciparum* ve *P. vivax* sıtmasının tedavisi ve kemoprofilaksisinde kullanılan yeni bir ilaçtır. Genellikle çoklu ilaç direnci bulunan *P. falciparum*'a karşı kullanılmaktadır. Ayrıca klorokin direnci bulunan *P. berghei*'ye karşı da etkilidir. Yapıca kinine benzemektedir. Başlangıçta yeterince test edilmediği için, kullanımı yalnızca çoklu ilaç direnci olan *falciparum* olguları ile sınırlı tutulmuştur (Akdur, 2004).

1.4.6 Proguanil ve Chlorproguanil

Dünyada proguanil olarak bilinen bu ilaç aslında chloroguanide biguanide türevidir. *Falciparum* türünde etkili bir doku şizontositidir. Fakat diğer türler üzerinde bir etkisi yoktur. *Falciparum* göre önemli bir ilaçtır. Etkisi yavaş olduğundan hiçbir zaman yalnız kullanılmamaktadır. Gametosidal etkisi zayıftır. Sivrisinekteki sporogoniyi bloke eder ve bu özelliğinden dolayı bulaşmayı kesmek için de kullanılmaktadır (Akdur, 2004).

1.4.7 Antifolat Kombine İlaçlar

Antifolatlar yani dihidrofolat redüktaz inhibitörleri ile sülfa ilaçlarının kombinasyonudur. Bu ilaçların her biri ayrı ayrı kullanılabilir. Fakat bunlara sıtma paraziti hızlı direnç geliştirdiği için birlikte kullanılmaktadır (Akdur, 2004).

1.4.8 Primethamine

Bir aminopyrimidinden türetilmiş olup primethamine, folik asit antagonistidir. Ağızdan emilim olup yarı ömrü 4-6 gündür. Tüm türler arasında aseksüel kan formuna etkili olan şizontosittir (Akdur, 2004).

1.4.9 Primetamin/Sülfadoksin

Primetamin ve sülfadoksin komplikasyonsuz ve *P. falciparum* şizontlarındaki folat sentezini engelleme yönünde sinerjik etkiye sahiptir. Karaciğer, böbrek, alerjik ve G-6-FD yetersizliği olan hastalarda dikkatli kullanılmalıdır. Karaciğer ve eritrosit şizont formları üzerinde etkilidir (Akdur, 2004).

1.4.10 Sıtma Aşı Çalışmaları

Dünya genelinde her yıl 300-500 milyon kişi sıtmaya yakalanmakta ve bunların bir milyonu hayatını kaybetmektedir. Sıtmaya yakalanan vakaların çoğunun beş yaş altı çocuklar olduğu ve bu sayının gün geçtikçe arttığı bilinmektedir. Şimdiye kadar araştırmalarla bulunan antimalarial ilaçlar ile sıtma paraziti kontrol altına alınamamıştır. Bunun sonucunda özellikle sıtmanın fazla olduğu Afrika ülkelerinde kontrol altına alınabilmesi için dünya genelinde aşı çalışmaları önem kazanmıştır (WHO, 2002).

1967 yılında radyasyona tabi tutulmuş *P. berghei* sporozoitleri ile farelerden elde ettikleri sınırlı koruma ile aşı çalışmaları başlamıştır (Nussenzweig vd., 1967). Daha sonraki yıllarda Hoffman ve diğerleri tarafından yapılan aşı çalışmalarında *P. falciparum* sporozoitleri anofel vücudunda iken gamma ışımına tabi tutularak, gönüllü insanlar üzerinde kullanılmış ve 9 ay kadar bir koruma elde edilmiştir (Hoffman vd., 2002).

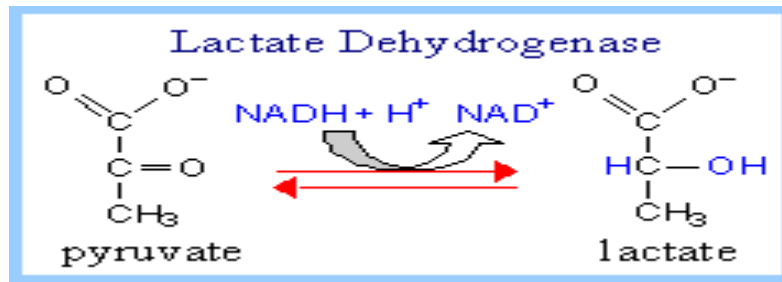
Modern biliminde bulunan en büyük engellerden biri etkin bir sıtma aşısının gelişimidir. Geçen on yıl sürecinde tasarım, yapım ve sıtma aşısı testine geçişte sayısız avantaj olmasına karşı birçok soru hala yanıtız kalmıştır (Chattopadhyay vd., 2009).

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, sporozoitlerin yüzeyinde bulunan proteinlerin *Escherichia coli* ve vektör olarak kullanılan virüslerin üretilmesinden sonra saflaştırılarak kullanımında 8 adet sporozoit yüzey proteini denenmiş ve sınırlı sayıda korunma elde edilmiştir (Ballou vd., 1987). Sonuç olarak sporozoit yüzey proteinleri (CS), rekombinant

DNA aşısı çalışmaları maymunlar üzerinde denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır (Wang vd., 1998).

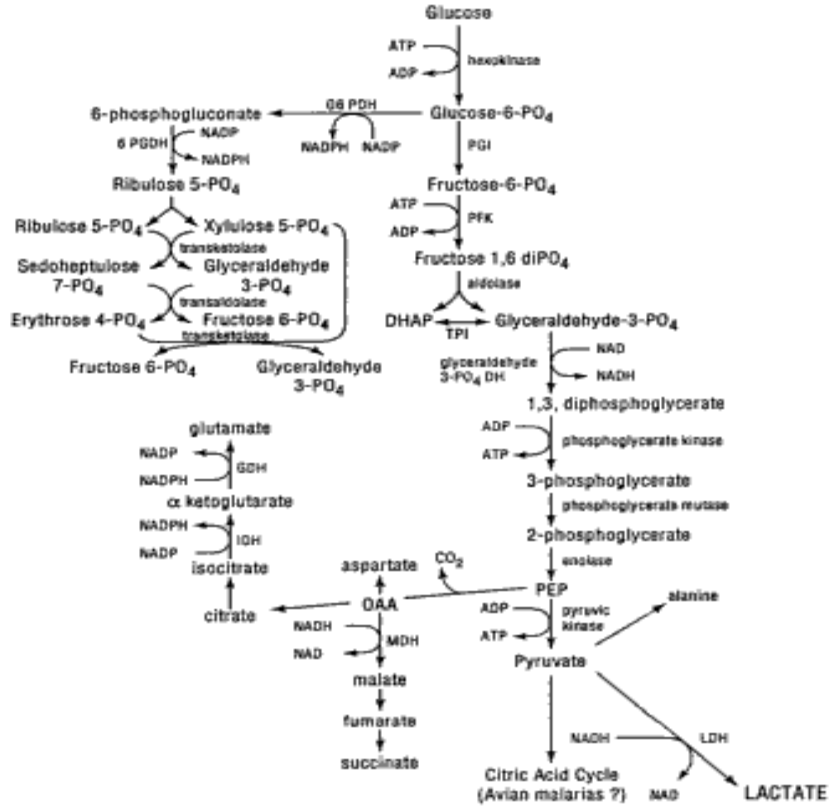
1.5 Laktat dehidrogenaz

Laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi bitki ve hayvanlar dahil olmak üzere tüm organizmalarda faaliyet göstermektedir. LDH, anaerobik glikolizin son enzimi olup pirüvatın laktata dönüşümünü kataliz etmektedir (Şekil 1.6). LDH, özellikle kalp kası, eritrositler, böbrek, iskelet kası, karaciğer ve akciğerde yaygın olarak bulunmaktadır (Turgut, 1998).



Şekil 1.6 Pirüvatın laktata dönüşümü

Normal şartlar altında hücrelerimiz, bol miktarda oksijen almakta ve enerji için gerekli şeker, çabuk ve etkili bir şekilde yıkılmaktadır. Bununla birlikte aşırı efor sarf edeceğimiz faaliyetlerde bulunulduğunda hücre için gerekli olan oksijen yoktur. Bu durumda hücrelerimiz birincil enerji kaynağı olarak glikolizi kullanmaktadır. Glikolize göre, glikoz hidrojenini NAD^+ vererek NADH formuna dönüşmektedir. Normalde bu hidrojen atomları daha sonra su oluşturmak için oksijenle birleşir eğer oksijen yoksa ortamda NADH birikir ve ATP oluşturmak için glikolizi devam ettirecek NAD^+ bulunmamaktadır. Bu olay sonucu LDH devreye girmektedir. Pirüvat NADH 'a bağlanmakta bunun sonucu laktik asit ve NAD^+ oluşmaktadır. NAD^+ glikoliz döngüsü için serbert kalmaktadır. Bununla beraber bir dakika içerisinde laktik asit birikmekte, böylece vücut aktivitesini durdurmaktadır. Biriken laktik asit pirüvata dönüştürülmektedir [2] (Şekil 1.7).



Şekil 1.7 Glikoliz döngüsü (Yılmaz, 1996)

Hücrelerimiz iki büyük tip LDH'a sahiptir. Bunlar M formu ve H formudur (aynı zamanda 3. form olan X form sperm hücrelerinde bulunur). Bunlar boyut ve şekil açısından çok benzerdir fakat katalitik özellikleri bakımından farklıdırlar. Bütün iskelet kaslarındaki form olan M formu pürivatı laktata en iyi dönüştüren formdur. Eğer kas anaerobik egzersizi gerçekleştirirse M formu hazır tutulur. buna karşılık ters reaksiyonda H form daha iyidir. Yani laktatı pürivata çevirmektedir. Oksijen için devamlı bir kaynak sahibi olan kalpteki ana formdur ve aerobik enerji kaynağı olarak laktatı kolayca kullanabilmektedir. Bu iki tip yapısal olarak oldukça benzerdir ve her iki tipin karışımı halinde kompleks oluşturmaktadırlar. Örneğin 2H zinciri ve 2M zinciri ile birleşmektedir. Böylece farklı hücreler mevcut ihtiyaçlarına uygun olan LDH'a çevirilmektedirler [2]. LDH, M(A) ve H(B) alt ünitelerinin kombinasyonu ile tetromerik bir formda bulunmaktadır. LDH izoenzimlerinin kantitatif yayılımı farklı ve karakteristiktir. Bu yüzden LDH aktiviteleri ve izoenzim modelleri laboratuvar teşhislerinde kullanılmaktadır (Maekawa, 2001)

Farklı türlerdeki LDH'lar, pürivatın laktata dönüşümünü katalizleyerek, anaerobik glikolizde önemli bir kontrol noktası oluşturmaktadır. Bu enzim, son zamanlarda sıtma ve kanser gibi

çok farklı hastalıklara karşı geçerli terapötik bir hedef oluşturduğu için dikkat çekmiştir. Günümüzde sıtma parazitinin var olan antimalarial ilaçlara direnç kazanmasından dolayı yeni çözümler aranmaktadır. Sıtma parazitinin metabolik yolunda kullandığı enzimlerden biri olan LDH enzimine dayandırılmış ilaç tasarım çalışmaları ilk hedeflerden biridir. *Plasmodium*'un glikolitik enzimleri hem yeni antimalarial ilaçlar için hedef molekül olarak hem de hastalığın teşhisinde kandaki parazit düzeyini gösteren birer indikatör olarak tanımlanmıştır. Sıtma parazetine karşı ilaç geliştirirken konağa karşı toksik olmaması ve bu amaçla konak ile parazit arasında ayırt edici farklılıkların bulunması gerekmektedir (Turgut, 1998).

Laktat dehidrogenaz glikolitik bir enzim olup, yeni antimalarial ilaç çalışmaları için hedef seçilmiştir. Sıtma parazitinin yaşam döngüsü ele alınarak parazit LDH'ını engelleyen fakat konağın LDH'ı etkilemeyen ilaç çalışmaları yapılmaktadır (Turgut, 1998).

Özellikle sıtma parazitlerin enerji üretiminde anahtar enzimdir. Çünkü *Plasmodium*'lar ATP fermentasyonu için sitrik asit çemberine sahip değildir. Bu yüzden *PfLDH* inhibitörleri potansiyel olarak *plasmodium faciparum* için ölümcüldür (Granchi vd., 2010).

1.6 *Plasmodium faciparum* Laktat Dehidrogenaz Enzimi

Sıtma'ya sebep olan protozoa parazitlerinin infeksiyon siklusu boyunca enerjisinin çoğunu glikolizden sağladığı düşünülmektedir. Bu nedenle araştırmacılar parazitin LDH aktivitesini durduran ilaçlar üzerinde çalışmaya başlamışlardır [2].

Plasmodium'un glikoliz metabolizmasında görevli enzimlerinden biri olan LDH proteini, yeni antimalarial ilaçların tasarlanması için hedef molekül olarak seçilmiş hastalığın seyri sırasındaki değişiminden dolayı belirleyici olarak tanımlanmıştır ve bu bilgiler ışığında *PfLDH* enzimini kodlayan gen klonlanmış (Turgut-Balik ve Holbrook, 2001a), proteinin ifadesi yapılarak saflaştırılmış (Turgut-Balik vd., 2004) ve 3 boyutlu yapısı tespit edilmiştir (Dunn vd., 1996).

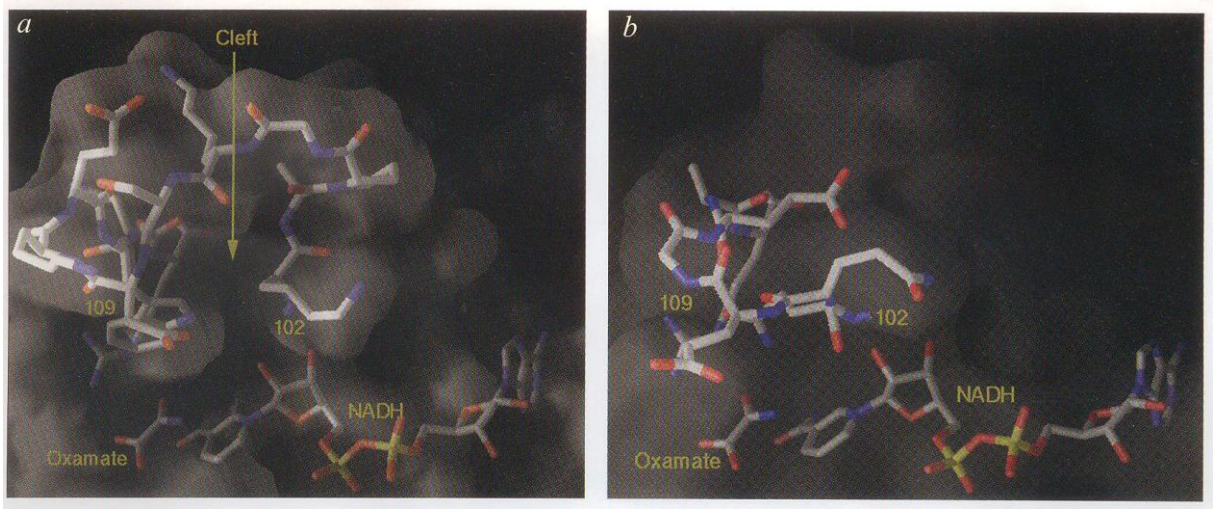
Laktat dehidrogenaz enzimi insanda sıtmaya neden olan parazitlerin karbohidrat metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Parazit, bu enzim sayesinde glikolizin son ürünü olan pirüvik asidi dönüşümlü bir reaksiyonla laktik aside çevirmektedir. Dolayısıyla bu enzimin inhibisyonu parazitin yaşamının sonlandırılmasını sağlayacaktır (Royer vd., 1986). Ancak aynı enzim hem insanda hem de parazitte bulunduğu için insan LDH'nın

etkilenmeden kalması büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla *PfLDH*'ın elektroforetik, kinetik ve yapısal olarak insan LDH'ından farklı olduğu gösterilmiştir (Bzik vd., 1993; Makler ve Hinrichs, 1993; Royer vd., 1986; Turgut-Balık ve Holbrook, 2001a; Deck vd., 1991, Dunn vd., 1996).

Sıtma parazitindeki LDH (*PfLDH*), NADH kofaktörün pozisyonunda, bu enzimdeki farklı biyokimyasal nitelikleri açıklayan bir değişiklik ortaya koymaktadır. Ayrıca, hedef inhibitör modeli için, NADH bağlanma noktasına bitişik belirgin bir yüzey yarığı vardır. Sıtma parazitinin, bilinen ilaç tedavisine gösterdiği direnç, yeni antimalaryal çalışmalarının sebebidir. Sıtma parazitindeki L-LDH formu, oksijensiz yaşam koşulu için gereklidir ve enzimi engelleyen bileşenler aynı zamanda sıtma parazitini öldürmektedir (Kell, 1991; Royer vd., 1986; Vander vd., 1981). *PfLDH*'ın yapısında anti-malarya modelleri için rasyonel bir hedef sağlayan aktif bölgeye bitişik, belirgin bir yarık gözlemlenmektedir. Bu bileşik yapı (enzim, NADH + oksidasyon) kofaktör, biyokimyasal türevi ve biyokimyasal özgünlük döngüsünün kapalı yapısını ortaya koymaktadır. *PfLDH*, daha önce LDH yapıları (Dunn, 1991; White, 1976; Wigley, 1992) için tanımlanmış Rossmann kıvrımlı topolojik yapıya sahiptir.

PfLDH yapısı, bu organizmada ilk detaylandırılan enzimdir ve yeni anti-malaryal çalışmaları için öncülük etmektedir. *PfLDH*'nin belirgin özelliği genişlemiş biyokimyasal özgünlük döngüsü ile beraber fark edilir yarığın olduğudur. Bu yarık tabanı NADH bağlanma noktasında nikotinamid bitimi ve yarığın kenarlarını oluşturan Thr₁₀₁, Lys₁₀₂, Asp_{108A} ve Asn₂₄₁ rezidüleri ile meydana gelmiştir. Bu yarık ~ 10 Å uzunluğunda, 5 Å genişliğinde ve 8 Å derinliğindedir. Bu yapı memeli LDH'ından farklılık göstermektedir. Parazitin LDH izoformlarına karşı geliştirilecek inhibitörler büyük bir terapötik değere erişmiştir. Aslında *PfLDH*'ın malarial parazitlerin hayatta kalması için anahtar bir enzim olduğu anlaşılmıştır. Sonuç olarak bu enzimi hedefleme amacı ile bazı organik moleküller tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Bunlardan bazıları gosipol ve türevleri, naftoik asit ve azol bazlı bileşiklerdir (Granchi, vd., 2010).

Bu bileşenler *PfLDH*'de gözlemlenen yarığa bitişik proteinin pruvat/nikotinamid-riboz yakın bağlandığı bölge olarak tanımlanmıştır. Kıvrılma, yapıdaki *PfLDH* yarığı bu noktada yer almaktadır. Bu durum, yarığın rasyonel anti-malaryal modellerinde seçicilik sağlamak için potansiyel kullanımını vurgulamaktadır (Şekil 1.8) (Makler ve Hinrichs, 1993; Deck, 1991).



Şekil 1.8 *PfLDH* ve memeli LDH’ında substrat bağlanma bölgesi ve substrat spesifik halkaya bitişik yarığın varlığının gösterilmesi. a. *PfLDH*’ın 108. ve 109. amino asitleri arasındaki ilave 5 amino asidin oluşturduğu yarık. b. Aynı pozisyonda ilave 5 amino asidin oluşturduğu yarığın memeli LDH’ında yokluğunun gösterimi (Dunn vd., 1996).

Heterosiklik azol bazlı birleşiklerin insan LDH enziminin inhibisyonu için gerekli olandan 100 kat daha düşük mikromolar konsantrasyonlarda *PfLDH*’ı inhibe ettiği belirlenmiştir. NAD^+ kofaktörünün nikotinamid halkasından yan yana kümelenen enzimin aktif bölgesindeki amino asitler ile bir etkileşim ağı oluşturduğunu göstermektedir. Bu bileşikler antimalaryallere karşı dirençli oldukları bilinen parazit suşlarını içeren eritrositlere ve BALB/C farelerindeki *Plasmodium berghei*’ye karşı az miktarda aktivite göstermektedir. Başlangıç toksisite verileri azol türevlerinin genel olarak düşük miktarda sitotoksositeye sahip olduğunu, öncelikli farmakokinetik veriler ise daha avantajlı olan biyoyumumluluğu ve dolaşım sürelerini göstermektedir. Bu ümit verici sonuçlar ileride bu yapıların geliştirilmesinin malaryanın tedavisinde yeni bir ilaç olarak değerlendirilmeye uygun adayların ortaya çıkmasını sağlayabileceğini düşündürmektedir (Cameron, 2004).

Bu tez çalışmasının amacı *Plasmodium falciparum*’un laktat dehidrogenaz enziminin, C-terminaline His-tag ilave ederek kolay bir şekilde saflaştırılmasını sağlamak ve saflaştırılan proteini enzim inhibitörü tespit etme çalışmalarında kullanıma hazır hale getirmektir. Bu amaçla, *Plasmodium falciparum*’un laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen, 3’ ucuna 6 histidin amino asidi ilave edilerek çoğaltılmış ve pKK223-3 vektörüne aktararak genin *E. coli*’de ifadesi yapılmıştır. Yabancıl tip *PfLDH* ve his-tag eklenmiş *PfLDH*’ın total protein ifadesi ve immunolojik analizleri yapılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Kimyasal Maddeler, Enzimler ve Kitler

Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan *Pfu* DNA Polimeraz enzimi ve tampon çözelti, Polimeraz zincir reaksiyonu taramasında kullanılan *Pfu* DNA polimeraz enzimi ve tampon çözeltisi; DNA'nın kesilmesi için kullanılan *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon enzimleri ve tampon çözeltileri, ligasyon için kullanılan T4 DNA Ligaz enzimi ve tampon çözeltisi Promega'dan (USA) temin edilmiştir. Plazmid DNA izolasyonunda kullanılan "QIAprep Spin Miniprep Kit", PCR ürünlerinin jelde yürütüldükten sonra saflaştırılmasında kullanılan "QIAquick Gel Extraction Kit" QIAGEN (Almanya)'den, "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" Promega (USA)'dan temin edilmiştir. Agaroz jel elektroforezi sırasında DNA bantlarının molekül ağırlıkları ve konsantrasyonunun tayininde kullanılan "100bp G2101 DNA ladder" Promega'dan (USA) ve "Mass Ruler DNA Ladder, High Range" Fermentas'tan (Lithuania); "Lambda DNA Hind III Digest", Amersham Pharmacia Biotech'den (USA); sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi sırasında protein bantlarının molekül ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılan "Protein Molecular Weight Marker- SM0431" Fermentas'tan (Lithuania) temin edilmiştir. İfadesi yapılan proteinin saflaştırılması için kullanılan Ni-NTA Agaroz, QIAGEN (Almanya)'den sağlanmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan diğer bütün kimyasallar BDH, Sigma, Bio-Rad, Roche ve Merck'ten sağlanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonlarında ve DNA dizi analizinde kullanılan primerler Iontek (Türkiye) tarafından sentezlenmiştir. Gen klonlama sonrası DNA dizi analizi, Iontek firmasına yaptırılmıştır. Aksi belirtilmediği takdirde Materyal ve Metod bölümü Sambrook vd., (2001)'e göre yapılmıştır.

2.1.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar

- Sonikatör- Blandelin
- Soğutmalı Santrifüj- Sigma
- Mikrosantrifüj- Sigma
- Uv -Visible Spectrophotometre- Thermo
- Otoklav- Systec

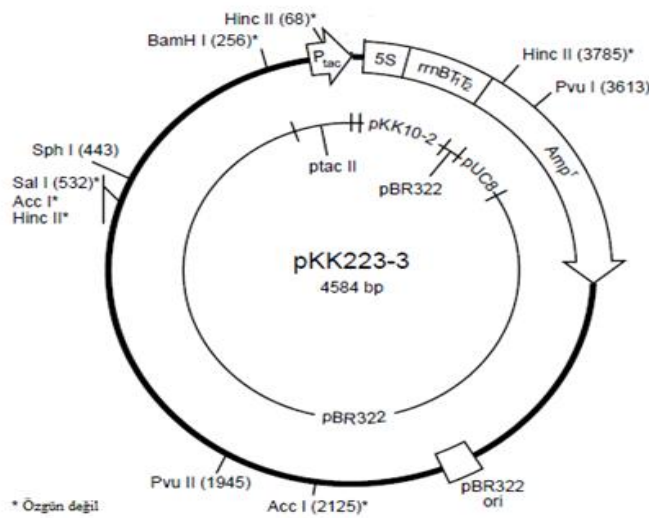
- Çalkalamalı İnkübatör- GFL
- Etüv- Binder
- Vorteks- Heidolph
- Hassas Terazî- Ohaus
- Saf Su Cihazı- GFL
- Jel Görüntüleme sistemi- Biorad
- Termal Döndürücü- Eppendorf
- pH Metre- Eutech
- Su Banyosu- Kerman
- Manyetik Karıştırıcı- Heidolph
- Dikey Elektroforez Sistemi- Biorad
- Yatay Elektroforez Sistemi- Biorad

2.1.3 *Echerichia coli* Soyu

JM105 : { *supE endA sbcB15 hsdR4 rpsL thi Δ (lac-proAB) F' [traD36 proAB+ lacIq lacZ ΔM15]* }

2.1.4 Klonlama Vektörü

pKK223-3: Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden (Şekil 2.1)



Şekil 2.1 pKK223-3 klonlama vektör haritası (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Sweden)

2.1.5 Bakteriyolojik Gelişim İçin Besiyerleri ve Solüsyonlar

Çift Kuvvetli Yeast-Tripton (2xYT) Buyyon

Maya Ekstrakt	10 g/l
Tripton	16 g/l
NaCl	5 g/l

Çift Kuvvetli Yeast-Tripton (2xYT) Agar

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

Amfisilin

dH₂O ile 100 mg/ml stok solüsyonu hazırlanır, 0,2 µm çaplı filtre ile sterilize edilir. -20 °C'de saklanır.

Isopropyl-β-D-thiogaltpyranoside (IPTG)

dH₂O ile 20 mg/ml stok solüsyonu hazırlanır, 0,2 µm çaplı filtre ile sterilize edilir. -20 °C'de saklanır.

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

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

SDS-PAGE İçin Örnek 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 2-Merkaptoetanol	0,25 ml/10 ml
% 0,05 Bromfenol mavisi	0,005 g/10 ml

5x 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 Çalışma 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 çökeltilir. Solüsyon filtre kağıdından süzülerek tekrar kullanılabilir.

Transfer Tamponu

39 mM Glisin 2,93 g/l

48 mM Trizma Base 5,81 g/l

1,3 mM SDS 0,375 g/l

% 20 Metanol 200 ml/l

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.

Hücre Lizisi ve Kolon Yıkama Tamponu

% 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

Protein Elüsyon Tamponu

% 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

Kinetik Ölçüm İçin Pirüvat Çalışma Solüsyonu

2,916 M pirüvat eH₂O'da (elgastat H₂O) çözülür. 1/3 oranında dilüsyon serileri (972 µM, 324 µM, 108 µM, 36 µM, 12 µM, 4 µM) hazırlanır. Kinetik ölçüm için taze hazırlanmış pirüvat dilüsyon serisi kullanılır.

Kinetik Ölçüm İçin Stok NADH Solüsyonu

200 mM NADH eH₂O'da (elgastat H₂O) çözülür. -80 °C'de saklanır. Kullanılmadan önce 1/10 oranında seyreltilerek 20 mM konsantrasyonda NADH solüsyonu hazırlanır.

Kinetik Ölçüm Tamponu

50 mM Trizma Base

50 mM KCl

pH: 7.5

Taze Millipore saf su ile hazırlanır.

2.1.7 Primerler

Plasmodium falciparum'un LDH enzimini kodlayan genin ekspresyonu ile proteinin saflaştırılması ve analizinin yapılması için iontek firmasına sentezlenmiş olan aşağıdaki primerler kullanılmıştır.

LDH enzimini ifade eden genin 5' ucuna komplementer olan

Pf3 (5' CCG GAA TTC ATG GCA CCA AAA GCA AAA ATC GTT TTA GTT GGC 3') ile, 3' ucuna komplementer olan ve 6 adet histidin amino asidine sahip olan

PfHis-tag (5' TTT TCT GCA GTT AGT GAT GGT GAT GGT GAT GTT AAG CTA 3') primerleri kullanılmıştır.

2.2 Metod

2.2.1 Plazmid DNA İzolasyonu

PfLDH genini his-tag eklenmemiş hali ile içeren pKK223-3 plazmid DNA vektörünü içeren *E. coli* bakteri soyları -80 °C' deki stok kültüründen 100 µg/ml amfisilin içeren çift kuvvetli 2xYT agar besiyerine sürme ekim yapılır ve 37 °C'de bir gece inkübe edilerek geliştirilir. Seçilen kolonilerden bir tanesi steril bir kürdan yardımıyla alınarak 100 µg/ml amfisilin içeren 5 ml 2xYT buyyona aktarılır, bir gece 37 °C ve 120 rpm'de çalkalamalı etüvde inkübe edilir. Bir gecelik kültürden 1,4ml alınarak 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınır ve plazmid DNAlar QIAprep®Miniprep, QIAGEN, kullanılarak izole edilir.

2.2.2 Proteinin C Terminaline Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile His-tag Eklenmesi

Gen ürünü proteinler Ni-NTA agaroz ile saflaştırılacağından dolayı LDH enzimini ifade eden genin 5' ucuna komplementer olan *Pf3* (5' CCG GAA TTC ATG GCA CCA AAA GCA AAA ATC GTT TTA GTT GGC 3') ile, 3' ucuna komplementer olan ve 6 adet histidin amino asidine sahip olan *PfHis-tag* (5' TTT TCT GCA GTT AGT GAT GGT GAT GGT GAT GTT AAG CTA 3') primerleri kullanılmıştır. PCR şartları Çizelge 2.1'deki gibidir.

Çizelge 2.1 *Pfu* DNA polimeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirilen PCR.

Bileşenler	Miktar
10x <i>Pfu</i> Tamponu	5 µl (enzim ile beraber verilmiştir)
dNTP'ler	5 µl (stok; her biri 10 mM olan dNTP'lerden 10'ar µl ve 10 µl H ₂ O)
5' primeri (<i>Pf3</i>)	2.5 µl (stok; 20 pmol/µl)
3' primeri(<i>PfHis-tag</i>)	2.5 µl (stok; 20 pmol/µl)
Kalıp DNA	1 µl
<i>Pfu</i> DNA polimeraz	1 µl (2.5 ünite)
dH ₂ O	33 µl (son hacim 50 µl olacak şekilde)

Amplifikasyon, 95°C'de 5 dakika ön denaturasyon yapılarak, daha sonra *Pfu* DNA Polimeraz enzimi eklenerek 95°C'de 1.5 dakika, 55°C'de 2 dakika, 72°C'de 2 dakika ve 25 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon sonunda hedef gen, 3'-ucuna 6 adet histidin amino asiti (His-tag) eklenmiş olarak çoğaltılmıştır. Tezin bu aşamasından itibaren 3'-ucuna His-tag eklenmiş olan gen ve daha sonra protein *PfLDH* olarak adlandırılacaktır.

2.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi

2.2.3.1 Etidyum Bromür İle Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi

Etidyum Bromür jel hazırlamak için, % 1 agaroz içeren 1x TAE tampon çözeltisi kaynatılır. Oda sıcaklığında 55-65°C'ye kadar soğutulur. Bu arada jelin döküleceği jel tepsi hazırlanır. Hazırlanan jel içerisine etidyum bromür eklenir (30 ml % 1'lik agaroz jel için 1,5 µl etidyum bromür). Jel tepsiye dökülür, taraklar yerleştirilir, kaynatmadan kaynaklı baloncullar jelden arındırılır ve katılaşması beklenir. Katılaştıktan sonra tarak çıkartılır. Konsantrasyon tayininde 7 µl Steril dH₂O + 2 µl SAB +1 µl DNA örneği kullanılır. Elektroforez, 40-60 mA'de bromofenol mavisini yaklaşık olarak jelin 2/3'üne ulaşıncaya kadar sürdürülür. Jel ortamında DNA'lar moleküler ağırlıklarına bağlı olarak bir ayırımı tabi tutulurlar. Elektroforez sonrası DNA bantları 254-312 nm dalga boyunda UV (ultraviyole) transilluminatöründe görüntülenir ve konsantrasyon tayini gerçekleştirilir (Sambrook vd., 2001, Mutlu, 2009).

2.2.3.2 Kristal Viyole ile Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi

Kristal viyole ile boyanmış agaroz jel elektroforezi yapılarak LDH genleri PCR sonrası saflaştırılmış ve geri kazanılmıştır. Elektroforezi için % 1 agaroz içeren 1x TAE tampon çözeltisi mikrodalga fırında kaynatılır. Oda sıcaklığında 55-65 °C'ye kadar soğutulur. Aynı zamanda jelin döküleceği jel tepsi 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 kurduktan sonra taraklar çıkarılır. Jel tepsi 2 µg/ml kristal viyole içeren 1x TAE tampon çözeltisi bulunan elektroforez sistemine yerleştirilir. 50 µl 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 (Turgut-Balik vd., 2005, Mutlu, 2009).

2.2.4 DNA'nın Jelden Geri Kazanılması

Elektroforez sonrası DNA bantları dilimler halinde jelden kesilerek 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine bırakılır ve DNA, QIAquick jel ekstraksiyon kiti (QIAGEN) kullanılarak saflaştırılır.

2.2.5 Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile DNA'nın Kesilmesi (Digest)

Jelden izole edilen DNA örnekleri ve pKK223-3 DNA vektörü *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak kesilmiş ve yapışkan uçlar elde edilmiştir. Reaksiyon şartları (Çizelge 2.2) gibidir.

Çizelge 2.2 Digest reaksiyonları ve bileşenleri

	Mutant LDH'lar	pKK223–3 vektörü
DNA	30 µl	30 µl
10x Tampon H (enzim ile beraber verilmiştir)	4 µl	4 µl
<i>Eco</i> RI (stok 12 ünite/µl)	2 µl	2 µl
<i>Pst</i> I (stok 10 ünite/µl)	2 µl	2 µl
Steril dH ₂ O	2 µl	9 µl
Toplam	40 µl	40 µl

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile DNA'nın kesilmesi işlemi 37°C'de 1,5 saatte gerçekleştirilir. Kesim sonrası örnekler kristal viyole ile boyanmış agaroz jelde koşturulur ve DNA örnekleri QIAquick jel ekstraksiyon kiti (QIAGEN) kullanılarak jelden geri kazanılır.

2.2.6 Klonlanacak olan *Pf*LDH Geni İle İfade Vektörünün Birleştirilmesi (Ligasyon)

Jelden geri kazanılan *Pf*LDH geni taşıyan DNA örnekleri ve klonlama vektörü olan pKK223–3 DNA 1:1 oranında birleştirilir. Reaksiyon şartları Çizelge 2.3'deki gibidir.

Çizelge 2.3 Ligasyon reaksiyonları ve bileşenleri.

Bileşenler	1:1 oranı
10x Ligasyon Tamponu	1µl
İnsert (<i>Pf</i> LDH)	100ng
Vektör (pKK223–3)	100ng
T4 DNA Ligaz (3 u/µl)	1µl
Steril dH ₂ O	Xµl
Toplam	10µl

Ligasyon, örneklerin 4°C'de bir gece bekletilmesiyle gerçekleştirilir.

2.2.7 Kalsiyum Klorür Etkileşimi ile Kompetant *E. coli* Hücrelerinin Hazırlanması

E. coli hücrelerinin JM105 soyunun -80 °C'deki stok kültürden alınarak 2xYT agara ekim yapılır ve bir gece 37°C' de inkübe edilir. Gelişen bakteri hücrelerinden kürdan yardımıyla tek koloniye dokunularak 5 ml 2xYT buyyona bırakılır ve 37°C, 120 rpm'de bir gece inkübasyona bırakılır. Bir gecelik kültürden 500 µl alınarak 50 ml 2xYT buyyona aktarılır ve 37°C, 120 rpm'de OD600'deki hücre yoğunluğu 0,3–0,4 arasında bir değere ulaşınca 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 ardından 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 hücreler ya hemen transformasyonda kullanılır ya da daha sonra kullanılmak üzere sıvı nitrojen içerisinde gliserol stoğu hazırlanarak -80°C'de aklanır (Sambrook, 2001).

2.2.8 Transformasyon

Ligasyonu yapılmış örnek üzerine kompetent *E. coli* 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. Ardından örnek üzerine 100 µl/ml ampisilin içeren 2x YT buyyondan 300 µl ilave edilir. Ters-düz edilerek karıştırılır ve 37 °C de 30 dakika etüvde bekletilir. İnkübasyon sonrası 100 µl/ml ampisilin içeren 2 x YT agara ekim yapılır ve 37 °C'deki etüvde bir gece beklemeye alınır (Sambrook, 2001).

2.2.9 PCR Taraması

PCR Çizelge 2.1'de açıklanan şekilde gerçekleştirilir. Kalıp DNA olarak transformasyon sonrasında elde edilen koloniler kullanılarak saflaştırılmış olan rekombinant DNA plazmidi kullanılır. PCR ürününün tamamı EtBr jele yüklenerek gen klonlamasının gerçekleştirildiğinin ön kontrolü yapılır. PCR'dan pozitif sonuç alındığı takdirde PCR'ın gerçekleştirildiği plazmid DNA dizilemeye gönderilir ve stok kültür hazırlanır.

2.2.10 Dizi Analizi

Transformasyon sonrası elde edilen rekombinant DNA plazmidinin dizi analizleri Iontek (Türkiye) tarafından gerçekleştirilmiştir.

2.2.11 Enzim Aktivitesinin Kontrolü

Transformasyon ürününün 2xYT buyyon'da kültürü yapıldıktan sonra 2ml'si 5000rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatat dökülür ve 500µl Tris/KCl pH:7.5 tamponda çözülür. Hücreler buzun içine oturtularak, sonikatör (Bandelin Sonopuls, Almanya) ile güç % 60'da 30 saniye aralıklarla dokuz defa 10'er saniye parçalanır. Daha sonra 13000rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Santrifüj edilen örneklerin süpernatant ve pellet ayrılır. Pellet tekrar 500µl Tris/KCl pH:7.5 tamponda çözülür. Süpernatantından enzim aktivitesinin ölçülmesi, UNICAM UV-Visible spektrofotometre kullanılarak NADH'ın NAD⁺'a çevrilmesi ile 340 nm'deki ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$) absorpsiyon değişim oranı takip edilerek yapılmıştır. Bütün reaksiyonlar 50 mM KCl içeren Tris/KCl, pH:7.5 ile 25°C'de gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için 500 mM pirüvat ve 50 mM NADH kullanılır. 1 ml'lik küvete pirüvat ve NADH solüsyonları bırakılır ve en son enzim ilavesi ile reaksiyon başlatılır. Aktivite, 10 mM ve 1 mM pirüvat konsantrasyonlarında ölçülür (Turgut-Balik, vd., 2001b). LDH aktivite ölçümleri 3 defa tekrar edilmiştir.

2.2.12 *Pf*LDH Proteinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile Analizi

SDS-PAGE yapımında BIO-RAD Mini-PROTEAN® 3 Cell jel elektrofrez sistemi kullanılmıştır. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez için kullanılan jel aşağıdaki gibi hazırlanmıştır (Laemmli, 1970)

Ayrırma jeli (% 12)

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

Yükleme jeli (% 4)

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

2.2.13 PflLDH'in İfadesi

SDS-PAGE jel hazırlanır. Süpernatant ve pellet şeklinde ayrılan örneklere eşit miktarda SDS-PAGE SAB boyası ilave edilerek 5 dakika kaynatılır ve jele yüklenir. Elektroforez için 1x Tank tamponu kullanılır. Bromfenol mavisi jelin sonuna gelinceye kadar 10 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 (Laemmli, 1970).

2.2.14 Ni-NTA Agaroz Kullanılarak PflLDH Enziminin Saflaştırılması

Transformasyon sonrası 2xYT agarda kültürü yapılmış örneğe, otoklavlanmış bir kürdan

yardımı ile dolunulup 100 µg/ml ampisilin içeren 2xYT buyyon içerisinde 37 °C’de ve 180 rpm’de bir gece inkübe edilir. 100 µg/ml ampisilin içeren 500 ml 2xYT buyyon içerisine bir gecelik kültürden 2.5 ml inoküle edilir. OD₆₀₀’deki hücre yoğunluğu 0,6’ya ulaşınca kadar 37 °C’de ve 180 rpm’de inkübe edilir. Kültür belirtilen hücre yoğunluğuna ulaşınca final 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, 6 ml hücre lizisi ve kolon yıkama tamponunda çözülür. Hücreler, sonikatör (Bandelin Sonopuls, Almanya) ile güç % 60’da 30 saniye aralıklarla 6 defa 10’ar saniye parçalanır. 14.000 rpm’de 1 saat 4 °C’de santrifüj edilir. Süpernatant (CL; cell lysate) alınır ve SDS-PAGE analizi için bir miktar ayrılır. Pistonu çıkarılmış 5 ml’lik bir şırıngaya bir miktar cam yünü yerleştirilir ve uç kısmına ilk önce kalın ardından ince iki tubing geçirilir. Bu şekilde hazırlanan kolon dik bir pozisyonda stabil bir yüzeye sabitlenir. Kolona 4 ml Ni-NTA agaroz resin konulur. Kolon, 10 kat resin hacmi (40 ml) kadar hücre lizisi ve kolon yıkama tamponu ile yıkanır. Daha sonra Süpernatant kolona eklenir. Kolondan akan süzüntü (flow-through) fraksiyonlarından (AS1, akan süzüntü 1; AS2, akan süzüntü 2; AS3, akan süzüntü 3) Aktivite kontrolü için alınır. Kolon, 10 kat resin hacmi (40 ml) kadar hücre lizisi ve kolon yıkama tamponu ile yıkanır. Yıkama (wash) fraksiyonları (Y1, yıkama 1; Y2, yıkama 2; Y3, yıkama 3) SDS-PAGE analizi için saklanır. Yıkama sonrası 10 defa 1’er ml protein elüsyon tamponu ile saf protein örneği kolondan toplanır (Shoemark, 2000).

2.2.15 Saflaştırılmış Proteinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile Analizi

Saflaştırılan protein örneklerinin SDS-PAGE ile analizinin yapılması için Bölüm 2.2.12’de verilen şartlara uygun hazırlanıp, SDS-PAGE jeline yüklenilmiş ve analiz edilmiştir.

2.2.16 Saf PflDH Proteinin SDS-PAGE ve Western Blot analizi

Blotlama öncesinde yukarıda anlatıldığı gibi SDS-PAGE ile proteinlerin ayrılması sağlanır. Immobilon-P transfer membranı jel büyüklüğünde kesilir. Filtre kağıtları ile birlikte yarım saat transfer tamponu içerisinde bekletilir. 10 dakika Immobilon-P transfer membranı transfer tamponunda bekletir. Western blota özgü kasetin kapağı açılır. Alt tarafa filtre kağıdı ve onun üzerine jel yerleştirilir. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek membran ve tekrar bir

filtre kağıdı yerleştirilir. Kasetin kapağı kapatılır ve güç kaynağına bağlanarak 15 V'da 15 dakika akım verilir. Blotlama sonrası membran, PBS Tween 20'de 10 dakika yıkanır. % 5'lik yağsız süt tozu içerisinde 4°C'de bir gece bloklama yapılır. Bloklamadan sonra PBS Tween 20'de 10 dakika yıkanır. 3 defa % 5'lik süt tozu ile 1/1,000 oranında seyreltilmiş primer antikor ilave edilir. Oda sıcaklığında 1 saat bekletilir. 10 dakika 3 defa PBS Tween 20 ile yıkama işlemi 3 defa tekrar edilir. Yıkama sonrasında 60 mg 3,3'-Diaminobenzidin, 100 ml PBS, 100 µl H₂O₂ içerisinde bantlar belirinceye kadar bekletilir. Daha sonra dH₂O içerisine alınarak reaksiyon durdurulur (Turgut-Balik, vd., 2001b).

2.2.17 Saflaştırılmış *Pf*LDH Proteininin Konsantrasyonlarının Hesaplanması

Saflaştırılmış olan *Pf*LDH proteininin konsantrasyon hesaplamalarında Beer-Lambert Kanunu kullanılmıştır. Buna göre ilk önce *Pf*LDH enzimlerinin ekstinksiyon katsayısı (ϵ , Extinction Coefficient) yukarıda anlatıldığı gibi belirlenmiş ve deneysel aşamada 1 cm genişliğinde kristal küvet ile A₂₈₀'de spektroskopik ölçüm alınmıştır. Elde edilen veriler aşağıdaki formül kullanılarak enzimin molar konsantrasyonu (mol/l) hesaplanmış ardından moleküler ağırlığı ile çarpılarak ml'de kaç mg enzim olduğu hesaplanmıştır.

$$\text{Beer-Lambert Kanunu; } c \text{ (mol/l)} = A / (\epsilon \times \ell)$$

Formülde c protein konsantrasyonu, A, 280 nm'de ölçülen absorbans değerini, ϵ , enzimin ekstinksiyon katsayısını ve ℓ de küvetin enini temsil etmektedir. Kullanılan küvvet 1 cm eninde olduğu için formül kısaca aşağıdaki gibidir (Grimsley ve Pace, 2004, Mutlu, 2009)

$$c \text{ (mol/l)} = A / \epsilon$$

2.2.18 Saflaştırılan Proteinin Kinetik Analizi

Aktif *Pf*LDH enzimlerin Steady-State kinetik ölçümleri 340 nm'de UNICAM UV-Visible spektrofotometre kullanılarak NADH'nin NAD⁺'a çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranı takip edilerek yapılmıştır. Bütün reaksiyonlar 50 mM Trizma Base ve 50 mM KCl içeren kinetik ölçüm tamponu, pH: 7.5 ile 25 °C'de gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için farklı pirüvat konsantrasyonları (20 µM, 60 µM, 180 µM, 340 µM, 1.6 mM, 4.8 mM, 14.48 mM, 20.4 mM, 29 mM) ve 200 µM NADH kullanılmıştır. 1 ml'lik küvete pirüvat ve NADH solüsyonları bırakılmış ve en son enzim ilavesi ile reaksiyon başlatılmıştır.

Bütün kinetik ölçümler 3 defa tekrar edilmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak Grafit 3.0 (Leatherbarrow, 1992) isimli program ile k_{cat} , K_m , ve V_{max} değerleri elde edilmiştir (Mutlu, 2009).

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 His-tag İlave Edilmemiş Olan *Pf*LDH'in Dizi Analizi

*Pf*LDH'ı kodlayan gen, grubumuzun yaptığı önceki çalışmalarda *Plasmodium falciparum*'un K1 (Tayland) ve FCRB (Kolombiya) soylarından klonlanmıştır (Turgut-Balık, vd., 2001b). Klonlama sonrasında *P. falciparum*'un K1 soyu LDH geni klonlama vektörüne aktarılmış ve proteinin *E. coli* hücrelerinde ifadesi gerçekleştirilerek enzim aktivitesi kontrol edilmiştir (Turgut, 1998). Sonuçlar enzimin aktif olmadığını ve proteinin jel üzerinde iki bant halinde koştüğünü göstermiştir. Yapılan yoğun çalışmalar sonucunda translasyonun birinci metiyoninden değil de üçüncü metiyoninden başlamış olduğu görülmüştür. Genin 5' ucu dizisinin incelenmesi, 3. Metiyoninden önce bulunan iki glisin amino asitinin kodonlarının GGA GGA şeklinde yer aldığını ve bu dizinin de Shine-Dalgarno benzeri bir dizi olduğu tespit edilmiştir. Çiçek vd., 2010'da da açıklandığı gibi, Shine-Dalgarno dizisi; *E. coli*'de, mRNA molekülünde ilk amino asiti (metiyonin) kodlayan AUG kodonundan yaklaşık 6-10 baz önce, 5' ucuna yakın bir yerde bulunan ve 5'-UAGGAGG-3' dizisinden oluşan bir dizidir (Shine and Dalgarno, 1975). Ribozomlarda ise 30S ribozomal alt birimin 16S'lik rRNA'sının 3'-ucuna yakın bir yerinde Shine-Dalgarno dizisine kısmen veya tamamen komplementer bir nükleotid dizisi bulunur. Bu nedenle mRNA'nın 5'-ucu ile 16S'lik rRNA'nın 3' ucu arasında komplementer baz eşleşmesinin yapılması mümkün olmaktadır. Böylece mRNA'nın translasyon amacı ile ribozomun 30S ribozomal alt birimine bağlanması hızlanır ve mRNA ribozoma doğru bir şekilde yerleşmiş olur (Lippinkot, 1997). Uygulanmakta olan klonlama stratejisi gereği oluşturduğumuz rekombinant DNA moleküllerinin transformasyonu *E. coli*'ye yapılmaktadır. Bu durum 3. methioninden önce bulunan Shine-Dalgarno dizisinin ökaryotik proteinlerin prokaryotik sistemlerde ifade edilirken ortaya çıkabilecek durumu açıklamaktadır (Turgut, 1998, Çiçek vd., 2010). K1 soyu *Pf*LDH'in üçüncü metiyonininden önce bulunan iki glisin amino asitinin GGA GGA kodonu, yönlendirilmiş mutagenез ile GGT GGT olarak değiştirilmiş ve bu değişiklik Shine-Dalgarno dizisinin uzaklaştırılmış olması nedeni ile translasyonun 3. metiyonin yerine 1. metiyoninden başlayarak aktif protein üretiminin yapılmasını sağlamıştır (Turgut, 1998). Bu mutant protein SDK1 olarak adlandırılmıştır. Oluşturulan SDK1 adlı rekombinant DNA molekülü, bu tez çalışmasında kalıp DNA olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 *Plasmodium falciparum*'un SDK1 LDH geninin (SDK1) nükleotid ve aminoasit dizisi. 5' ucu metiyoninleri mavi renk ile, 3. metiyoninden önceki glisinler ise koyu renk ile gösterilmiştir. Glisinin kodonlarında yapılan değişiklik ise kırmızı renk ile gösterilmiştir (Turgut, 1998) (Devamı diğer sayfada).

	ATGGCTCCAAAAGCAAAAATCGTTTTAGTTGGCTCAGGTATGATTGGTGGTGTAAATGGCT	
1	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----	60
	TACCGAGGTTTTTCGTTTTTAGCAAAATCAACCGAGTCCATACCTAACCTCCTCATTACCGA	
a:	MetAlaProLysAlaLysIleValLeuValGlySerGlyMetIleGlyGlyValMetAla	
	ACCTTAATTGTTTCAGAAAAATTTAGGAGATGTAGTTTTGTTCGATATTGTAAAGAACATG	
61	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----	120
	TGGAATTAACAAGTCTTTTTAAATCCTCTACATCAAAACAAGCTATAACATTTCTTGTAC	
a:	ThrLeuIleValGlnLysAsnLeuGlyAspValValLeuPheAspIleValLysAsnMet	
	CCACATGGAAAAGCTTTAGATACATCTCATACTAATGTTATGGCATATTCAAATTGCAAA	
121	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----	180
	GGTGTACCTTTTCGAAATCTATGTAGAGTATGATTACAATACCGTATAAGTTTAACGTTT	
a:	ProHisGlyLysAlaLeuAspThrSerHisThrAsnValMetAlaTyrSerAsnCysLys	
	GTAAGTGGTTCAAACACTTATGACGATTTGGCTGGAGCAGATGTAGTAATAGTAACAGCT	
181	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----	240
	CATTACCAAGTTTGTGAATACTGCTAAACCGACCTCGTCTACATCATTATCATTGTGCA	
a:	ValSerGlySerAsnThrTyrAspAspLeuAlaGlyAlaAspValValIleValThrAla	
	GGATTTACCAAGGCCCCAGGAAAGAGTGACAAAGAATGGAATAGAGATGATTTATTACCA	
241	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----	300
	CCTAAATGGTTCCGGGGTCCTTCTCACTGTTTCTTACCTTATCTCTACTAAATAATGGT	
a:	GlyPheThrLysAlaProGlyLysSerAspLysGluTrpAsnArgAspAspLeuLeuPro	
	TTAAACAACAAGATTATGATTGAAATTGGTGGTCATATTAAGAAGAATTGTCCAAATGCT	
301	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----	360
	AATTTGTTGTTCTAATACTAACTTTAACCACCAGTATAATTCCTTCTTAACAGGTTTACGA	

```

a:      LeuAsnAsnLysIleMetIleGluIleGlyGlyHisIleLysLysAsnCysProAsnAla

      TTTATTATTGTTGTAACAAACCCAGTAGATGTTATGGTACAATTATTACATCAACATTCA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
      AAATAATAACAACATTGTTTGGGTCATCTACAATACCATGTTAATAATGTAGTTGTAAGT
a:      PheIleIleValValThrAsnProValAspValMetValGlnLeuLeuHisGlnHisSer

      GGTGTTCCATAAAAACAAGATTATTGGTTTAGGTGGTGTATTAGATACATCAAGATTGAAG
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
      CCACAAGGATTTTTGTTCTAATAACCAAATCCACCACATAATCTATGTAGTTCTAACTTC
a:      GlyValProLysAsnLysIleIleGlyLeuGlyGlyValLeuAspThrSerArgLeuLys

      TATTACATATCTCAGAAATTAATGTATGCCCAAGAGATGTAATGCACACATTGTAGGT
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
      ATAATGTATAGAGTCTTTAATTTACATACGGGTCTCTACATTTACGTGTGTAACATCCA
a:      TyrTyrIleSerGlnLysLeuAsnValCysProArgAspValAsnAlaHisIleValGly

      GCTCATGGAAATAAAATGGTCTTTTTAAAAGATACATTACTGTAGGTGGTATCCCTTTA
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
      CGAGTACCTTTATTTTACCAAGAAAATTTTCTATGTAATGACATCCACCATAGGGAAAT
a:      AlaHisGlyAsnLysMetValLeuLeuLysArgTyrIleThrValGlyGlyIleProLeu

      CAAGAATTTATTAATAACAAGTTAATTTCTGATGCTGAATTAGAAGCTATATTTGATAGA
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
      GTTCTTAAATAATTATTGTTCAATTAAGACTACGACTTAATCTTCGATATAAACTATCT
a:      GlnGluPheIleAsnAsnLysLeuIleSerAspAlaGluLeuGluAlaIlePheAspArg

      ACTGTTAATACTGCATTAGAAATTGTAAACTTACATGCATCACCATATGTTGCACCAGCT
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
      TGACAATTATGACGTAATCTTTAACATTTGAATGTACGTAGTGGTATAACAACGTGGTCGA
a:      ThrValAsnThrAlaLeuGluIleValAsnLeuHisAlaSerProTyrValAlaProAla

```

```

GCTGCTATTATCGAAATGGCTGAATCCTACTTAAAAGATTTGAAAAAGTATTAATTTGC
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
CGACGATAATAGCTTTACCGACTTAGGATGAATTTTCTAAACTTTTTTCATAATTAAACG
a: AlaAlaIleIleGluMetAlaGluSerTyrLeuLysAspLeuLysLysValLeuIleCys

TCAACCTTGTTAGAAGGACAATATGGACACTCCGATATATTCGGTGGTACACCTGTTGTT
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
AGTTGGAACAATCTTCCTGTTATACCTGTGAGGCTATATAAGCCACCATGTGGACAACAA
a: SerThrLeuLeuGluGlyGlnTyrGlyHisSerAspIlePheGlyGlyThrProValVal

TTAGGTGCTAATGGTGTGGAACAAGTTATCGAATTACAATTAATAGTGAGGAAAAAGCT
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
AATCCACGATTACCACAACCTTGTCAATAGCTTAATGTTAATTTATCACTCCTTTTTCGA
a: LeuGlyAlaAsnGlyValGluGlnValIleGluLeuGlnLeuAsnSerGluGluLysAla

AAATTTGATGAAGCCATAGCTGAAACTAAGAGAATGAAGGCATTAGCTTAA
901 -----+-----+-----+-----+-----+- 951
TTTAACTACTTCGGTATCGACTTTGATTCTCTTACTTCCGTAATCGAATT
a: LysPheAspGluAlaIleAlaGluThrLysArgMetLysAlaLeuAlaEnd

```

3.2 *Pf*LDH Proteininin C Terminaline 6 Histidin Amino Asidinin İlave Edilmesi

*Pf*LDH proteinin ileride anlatılacak olan işlemlerle saflaştırılmasını sağlamak için, polimeraz zincir reaksiyonu ile *Pf*LDH proteinin C terminaline 6 adet histidin amino asidi ilave edilmiştir. Genin 3' ucuna 6 adet histidin amino asidinin kodonunun eklenmesi, *Pf*LDH enziminin Ni-NTA (Nitrilotriasetik asit Metal Afinite kromatografisi) agaroz ile saflaştırılmasını sağlamak için gerçekleştirilmiştir. İlave edilen bu histidin kodlayan dizi, nikel iyonları ile iki bağ yaparak histidinlerin NTA'ya bağlanmasını sağlayıp, *Pf*LDH proteininin kolona tutunmasını ve proteinin saflaştırılmasını mümkün kılmaktadır (Berwal vd., 2008).

3.2.1 Primer Tasarımı

Plasmodium falciparum K1 soyundan LDH enzimini kodlayan geninin PCR ile izolasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere tasarlanacak primerler için, gen bankası kayıtlarından *Plasmodium falciparum*'a ait olarak tanımlanmış laktat dehidrogenaz enzimi dizisine ait erişim numarasından DQ198261 yola çıkarak *Pf3* ve *PfHis-tag* adlı 2 adet primer tasarlanmıştır (Çizelge 3.2). *Pf3* primeri genin 5' ucuna, *PfHis-tag* primeri ise genin 3' ucuna komplementer olacak şekilde tasarlanmıştır.

İfade vektörüne klonlamayı ve devamında protein saflaştırmasını sağlamak amacıyla, *Pf3* primerine başlama metiyonininden hemen önce *EcoRI* restriksiyon endonükleazının kesim bölgesi ve *PfHis-tag* primerine de genin açık okuma çerçevesinin son bazından sonra sırası ile 6 adet histidin amino asitinin kodonları, sonlanma kodonu ve *PstI* restriksiyon endonükleazının kesim dizisi ilave edilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 *PfLDH* amplifikasyonunu gerçekleştirmek amacıyla tasarlanan oligonükleotidler. Restriksiyon endonükleazların kesim dizisi mor renk (*EcoRI*) ve yeşil renk (*PstI*), başlama kodonu sarı (start), sonlanma (stop) kodonu mavi renk ve His-tag dizisi kırmızı renk ile gösterilmiştir.

Primer	Baz Dizisi	Uzunluk	T _m
<i>Pf3</i>	5'- CCG GAA TTC ATG GCA CCA AAA GCA AAA ATC GTT TTA GTT GGC-3'	42 mer	71.4 °C
<i>PfHis-tag</i>	5'-TTTT CTG CAG TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG TTA AGC TA ATGCC-3'	44 mer	66.4 °C

3.2.2 *PfLDH*'ın 3' Ucuna Altı Adet Histidin İlave Etmek Üzere Amplifikasyonu

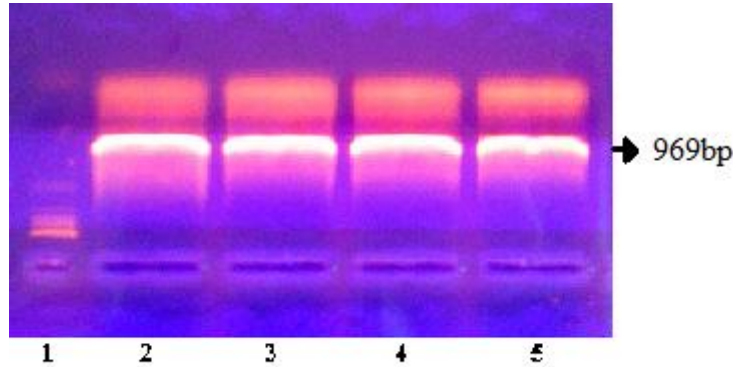
PfLDH genin PCR ile amplifikasyonu çalışmalarından önce SDK1'i içeren plazmid DNA kontrolü yapılmıştır. SDK1'i içeren plazmid DNA EtBr ile boyanmış %1'lik agaroz jelde Lambda DNA *HindIII* digest Marker (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027,564 baz çifti bantları) ile birlikte koşturulmuş ve beklendiği şekilde yaklaşık 6 kb büyüklüğünde bir bant olarak tespit edilmiştir.

3.2.3 His-tag İlaveli *PfLDH*'ın Amplifikasyonu

PfLDH geninin izolasyon sonrası, PCR ile amplifikasyonunda reaksiyon şartları daha önceki

çalışmalar ışığında belirlenmiş olup *Pfu* DNA polimeraz enzimi kullanılarak reaksiyon yapılmıştır. Bu reaksiyonlarda kalıp DNA olarak jel üzerinde analizi yapılmış olan *Plasmodium falciparum*'nın plazmid DNA'sı kullanılmıştır. Kullanılan primerler, *Pf3* (5'→3') ve *PfHis-tag* (3'←5')dir. Amplifiye edilen *PfLDH* örneklerine his-tag eklenmiş olup daha sonraki isimlendirmesinde *PfLDH* olarak kalmıştır. *Pfu* DNA polimeraz enziminin tercih edilmesinin reaksiyon gerçekleşirken oluşabilecek yanlış baz eşleşmelerini engelleyen 3'→5' eksonükleaz 'proofreading-düzeltilme' aktivitesine sahip enzimlerden bir tanesi olmasıdır [3].

Amplifikasyon 95°C'de 5 dakika ön denatürasyon basamağı ile başlatılmıştır. Bu basamağı; 95°C'de 1,5 dakika denatürasyon, 55°C'de 2 dakika primerlerin bağlanması, 72°C'de 2 dakika istenilen bölge kopyalarının uzaması basamakları takip etmiş ve reaksiyon 25 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. PCR sonrasında elde edilen ürün, etidyum bromür (EtBr) boyalı agaroz jelde marker ile birlikte koşturularak hedef LDH geninin doğru büyüklükte amplifiye edildiğinin kontrolü yapılmış ve yaklaşık 969 bp büyüklüğünde DNA bantları elde edilmiştir (Şekil 3.1).

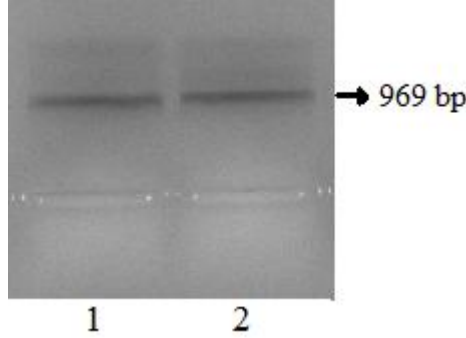


Şekil 3.1 *PfLDH*'ın amplifikasyon sonrası görüntüsü. Hatlar:1:Markır 2-3-4-5: *PfLDH*'ın amplifikasyon fragmentleri

3.2.4 *PfLDH* Geninin CV ile Boyanan Jelde Analizi

PCR ile amplifiye edilmiş *PfLDH* genin saflaştırılması için EtBr ile boyanmış jel yerine, kristal viyole ile boyanmış % 1'lik agaroz jel kullanılmıştır. (Sambrook ve Russell, 2001). Bu aşamada kristal viyole ile boyanmış % 1'lik agaroz jel kullanılmasındaki amaç etidyum bromürün daha hassas olmasına karşı, UV kullanılması mutasyona neden olmaktadır. Etidyum bromür, DNA molekülünün baz çiftleri arasındaki bağlara yerleşerek çift sarmalı yapısına katılması ve kırmızı floresans yaymasını sağlar. Bu sebepten dolayı DNA

replikasyonunda ilave baz oluşumuna yada farklı baz eşleşmesine neden olabilir (Rand, 1996). Bu nedenden dolayı diğer bir seçenek olarak kristal viyole ile boyanan agaroz jeller kullanılmıştır. % 1'lik kristal viyole ile boyalı agaroz jelde koşturulmuştur (Şekil 3.2). Kristal viyole boyalı agaroz jelde koşturulan örneklerden DNA saflaştırması yapılarak C terminalinde 6 histidin içeren ve yaklaşık 969 bp büyüklüğünde olan *PfLDH* DNA fragmentleri geri kazanılmıştır.



Şekil 3.2 His-tag ilave *PfLDH*'ın DNA fragmentlerinin elde edilmesi. Hatlar:1-2: *PfLDH*

3.2.5 His-tag İlaveli *PfLDH*'ın ve Vektörünün Enzim ile Kesimi (Digest)

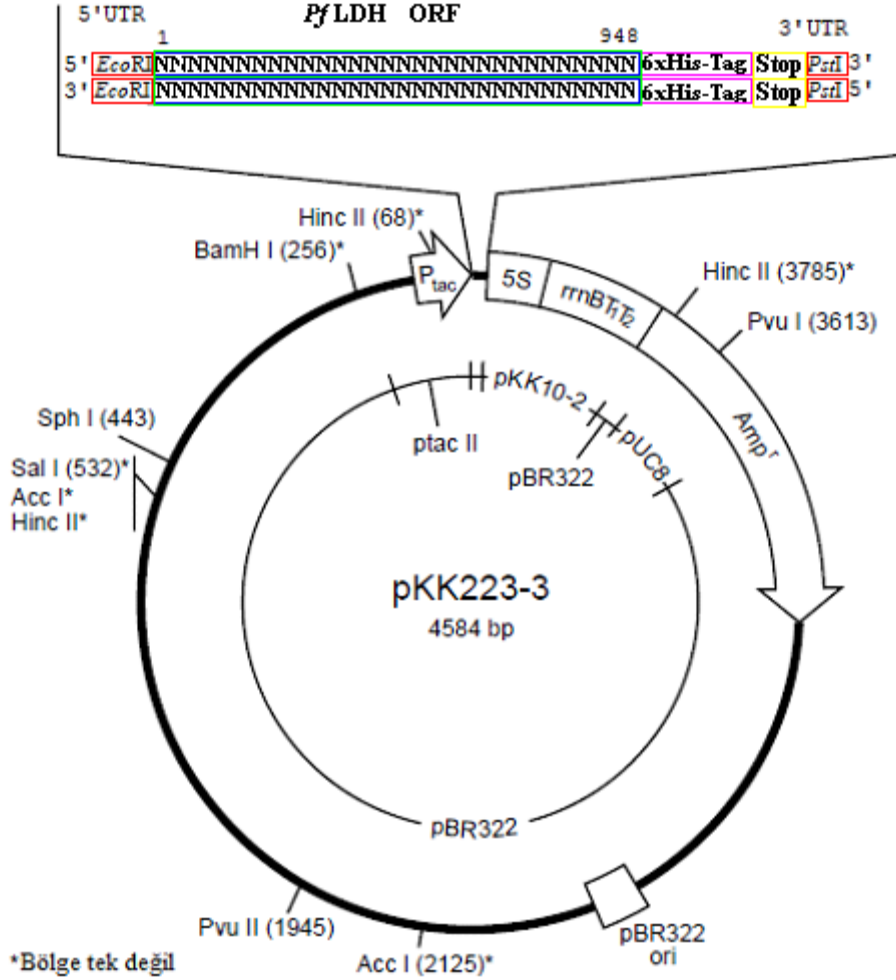
Pf3 ve *PfHis-tag* primerleri ile amplifiye edilmiş, *PfLDH*'ını kodlayan DNA fragmentlerinin kontrolü yapıp kristal viyole ile boyanmış jelle yüklenip saflaştırıldıktan sonra, hem *PfLDH* geni hem de genin aktarılacağı pKK223-3 klonlama vektörü *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon endonükleazları ile kesilmiş, yapışkan uçlar oluşturularak ligasyona hazır duruma getirilmiştir.

3.2.6 Rekombinant DNA Molekülünün Oluşturulması (Ligasyon)

Ligasyon işlemi, T4 DNA ligaz enzimi yardımı ile klonlanacak olan *PfLDH* geninin pKK223-3 vektör DNA'sının içerisine aktarılmasıdır. Ligasyon işlemi +4°C'de bir gecelik inkübasyon ile sağlanmıştır.

PfLDH'ı kodlayan gen dizisi ve kesilerek doğrusal konuma getirilmiş pKK223-3 vektörü bir araya getirildiklerinde farklı yapıları içerseler bile, birbirlerini tamamlayıcı özellikteki (yapışkan) uçları taşımalarından dolayı uçlar arasındaki baz eşleşmeleriyle moleküller hidrojen bağı oluşturarak bağlanmış ve T4 ligaz enzimi nükleotidler arasında fosfodiester bağları kurarak açık uçları kapatmıştır. *PfLDH* geninin, pKK223-3 klonlama vektörüne

yerleştirilmesi ile oluşturulan rekombinant DNA molekülü Şekil 3.3’de gösterilmiştir.



Şekil 3.3 *Pfl*LDH geninin organizasyonu ve pKK223-3 klonlama vektörünün haritası.

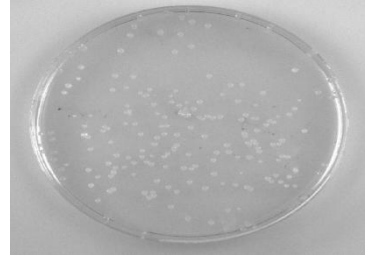
3.2.7 Rekombinant DNA Molekülünün *E. coli* JM105 Hücrelerine Transformasyonu

Ligasyon sonucu oluşturulmuş rekombinant DNA (*Pfl*LDH geni + pKK223-3 vektörü) ve pozitif kontrol için hedef geni içermeyen pKK223-3 vektörü, kompetan *E. coli* JM105 hücrelerine 30 dakika buzun içerisinde bekletilerek daha sonra 42 °C’deki su banyosunda 90 saniye boyunca sıcak şok uygulanarak aktarılmıştır. Ardından örnek üzerine 100 µl/ml ampisilin içeren 2xYT buyyondan 300 µl ilave edilerek ters-düz edilerek karıştırılmış ve 37°C de 30 dakika etüvde bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası 100 µl/ml ampisilin içeren 2xYT agara ekim yapılmış ve 37 °C’deki etüvde bir gece beklemeye alınmıştır. Transformasyon

aşamasında ilk denemede elde edilen örneklerden beklenen sonuç elde edilememiştir. Transformasyon örneklerinin etrafında uydu olarak nitelendirilen koloniler geliştiğinden dolayı çift kuvvetli Yeast Ekstrakt-Tripton (2xYT), agarda kullanılan amfisilin aşamasına geri dönölüp taze hazırlanmış antibiyotik kullanılarak deney tekrar edilmiş ve sorun giderilmiştir (Şekil 3.4).



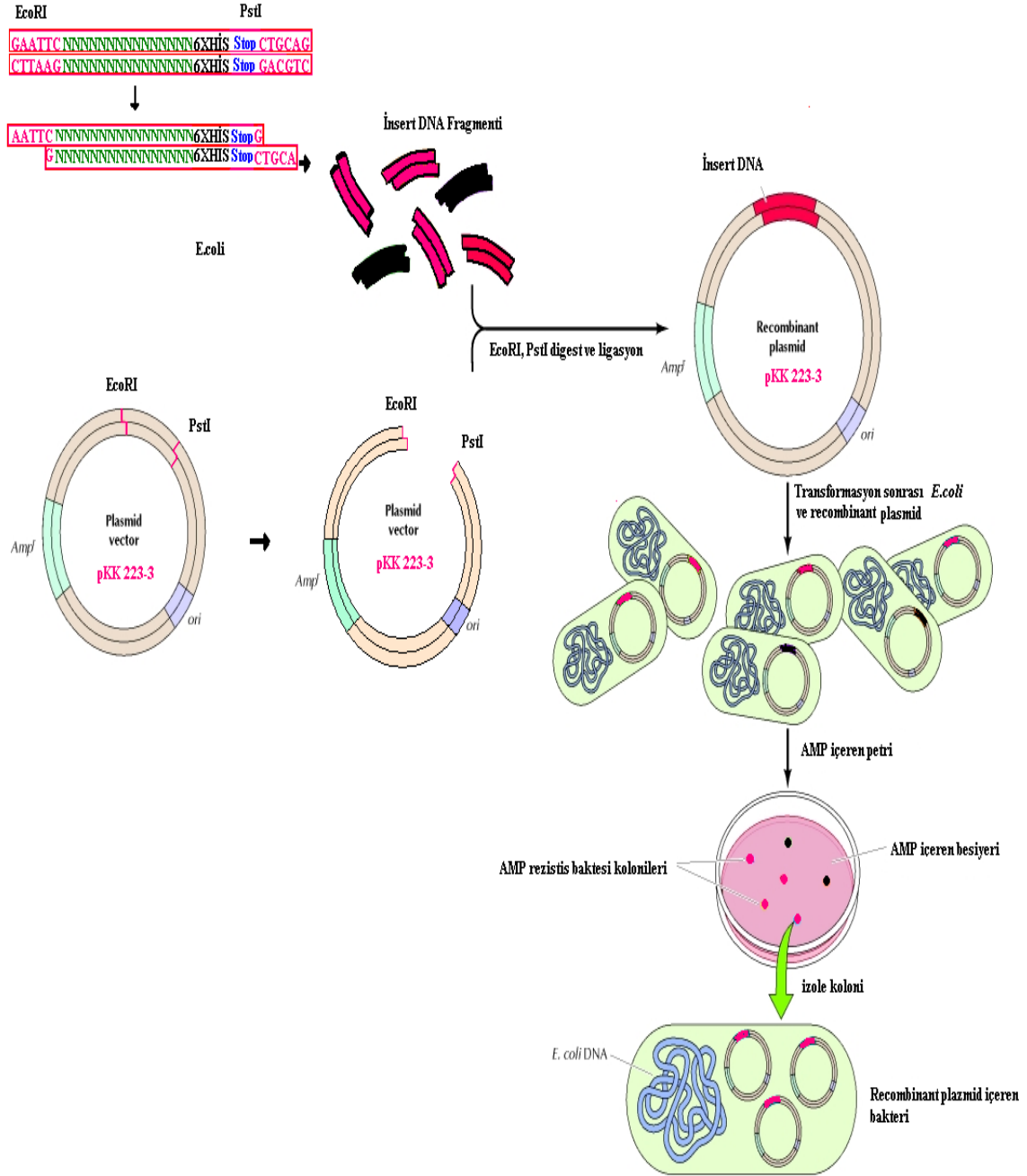
a



b

Şekil 3.4 Transformasyon sonrası petrilerin görüntülenmesi a.Negatif sonuç alınan petri görüntüsü. b.Pozitif sonuç alınan petri görüntüsü

Şekil 3.5'de *PfLDH* genininin klonlanması sırasında uygulanan ve sonuç alınan bütün işlem basamakları özetlenmiştir.

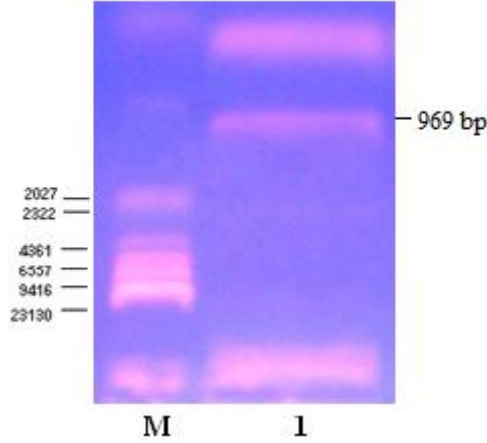


Şekil 3.5 Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak yapılan çalışmanın görsel anlatılması [4 nolu kaynaktan modifiye edilmiştir].

3.2.8 Gen Klonlanmasının PCR Taraması ile Kontrolü

Transformasyon sonrası seçilen kolonilere, otoklavlanmış bir kürdan yardımı ile dokunulup 2xYT buyyon içerisine bırakılarak bir gece 37°C inkübe edildikten sonra örneklerin DNA'sı

QIAprep®Miniprep kiti kullanılıp ekstrakte edilerek, *Pf*LDH genine sahip olup olmadıklarını anlamak için PCR taraması yapılmıştır. Bunun için genin tam uzunluğunu amplifiye edecek olan *Pf3* ve *PfHis-tag* primerleri kullanılmıştır. PCR sonucunda örnekler %1'lık EtBr jele yüklenerek *Pf*LDH geni yaklaşık olarak 969 bp büyüklüğünde bant görüntüsü alınmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 PCR taraması sonrası pozitif sonuçların jelde görüntülenmesi. Hatlar: M: Markır 1: *Pf*LDH

Pozitif sonuçların kesin olarak doğrulanması için PCR ile pozitif sonuç alınan kolonilerden izole edilen plazmid DNA'ların dizi analizi yaptırılmıştır.

3.2.8 C-Terminaline His-tag ilave edilmiş *Pf*LDH 'ın Dizi Analizinin Yapılması

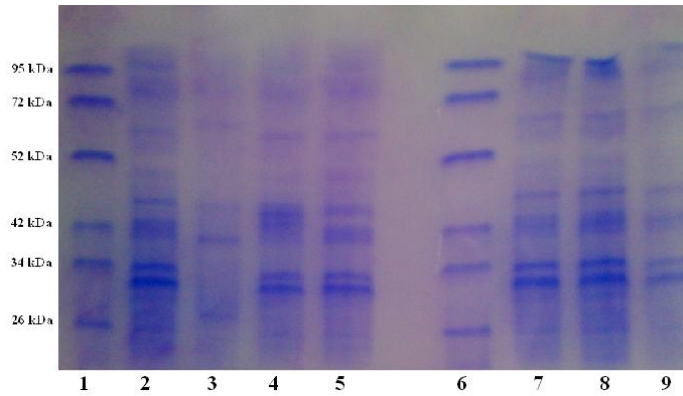
Örneklerinin dizileme işlemi Iontek firması (Türkiye) tarafından gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizi, DNA örneklerindeki baz dizilerinin sırasını ortaya çıkarmak için kullanılan bir genetik şifre çözme yöntemidir. Otomatik DNA dizi analizinde, Sanger tarafından geliştirilen enzimatik sentez yöntemi gelişmiş bir kapiller sisteme uyarlanmıştır. Boya terminasyon işaretleme adı verilen bir metod kullanılarak farklı bazlarda (A, G, T, C) sonlanan DNA sentez ürünlerine floresan işaretli boyalar iliştilir. Elektroforez, örnekler bir kapillerden geçirilirken uygulanır. Floresan işaretli boyaları uyarlamak için bir lazer, boyaların yaydığı ışığı toplamak içinse bir CCD kamera kullanılır. Böylece, lazer uyarımının ardından dört boya tarafından yayılan farklı dalga boylarındaki ışık tek kulvarda ayırılabilir. Floresan miktarlarının ölçülmesi ve yorumlanmasının ardından DNA örneğindeki baz dizisi saptanır [5].

DNA dizi analizi için yine Iontek firmasına sentezletilen pKK C-terminal primeri ile klonlanan genlerin 5'→3' zincirlerinin sekansı, pKK N-terminal primeri ile de 3'←5' zincirlerinin sekansı yaptırılmıştır. Bu şekilde gerçekleştirilen çift yönlü sekanslama ile genin tam uzunluk dizisinin ve her iki DNA zinciri dizisinin kontrolü sağlanmıştır.

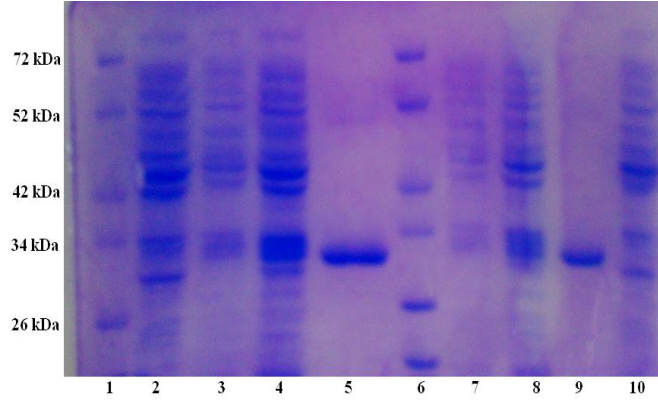
*Pf*LDH geninin ifadesi sonrasında üretilecek olan *Pf*LDH proteininin QIAGEN Ni-NTA Agaroz ile saflaştırılmasını mümkün kılmak için ilave edilen 6 histidin aminoasidinin genin 3' ucundaki varlığı gösterilmiştir.

3.1 *Pf*LDH Proteinin İfadesinin Yapılması

Klonlama işleminden sonra *Pf*LDH total protein örnekleri, *E. coli* ve *Pf*LDH, daha önce çalışmalarda elde edilen kontrol *Pv*LDH örnekleri ve Multicolor Broad Range Protein Ladder (26, 34, 42, 52, 72, 95, 135) 50 mM trizma base ve 50 mM KCl içeren kinetik ölçüm tamponu, pH: 7.5, içerisinde çözüldükten sonra santrifüjlenmiş ve üstte kalan süpernatant ayrı bir tüpe alınarak total protein ifadesi yapılmıştır (Şekil 3.7, Şekil 3.8). Total proteinlere ait bantlarda yoğunlaşmalar gözlenmiş ve uygun görüntüyü alabilmek için SDS-PAGE jele farklı oranlarda (ilk 5 kuyucuğa 7.5µl ve ardından gelen kuyulara ise 4 µl) yükleme yapılmıştır. Şekillerde de görüldüğü gibi doğru büyüklükte belirgin bir ifade bandı elde edilememiştir.

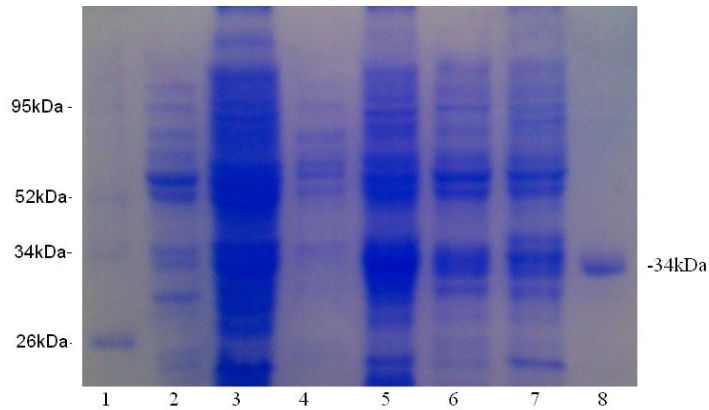


Şekil 3.7 Total proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü. Hatlar: 1:Markır 2: *Pf*LDH geni içeren *E. coli* (JM105) 3: *E. coli* (JM105) 4: SDK1 içeren *E. coli* (JM105) 5: *Pv*LDH geni içeren *E. coli* (JM105) 6: Markır 7: *Pf*LDH geni içeren *E. coli* (JM105) 8: SDK1 9: *Pv*LDH geni içeren *E. coli* (JM105)

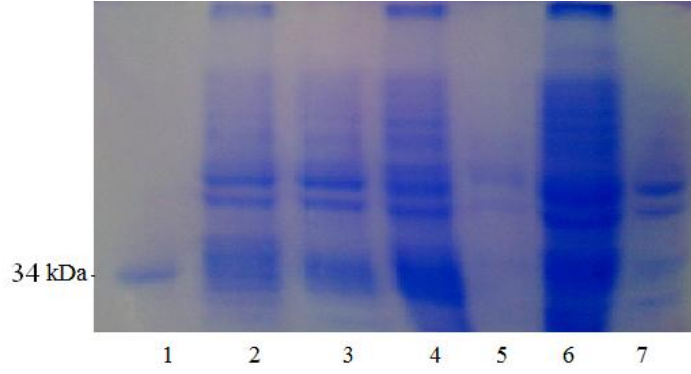


Şekil 3.8 Total proteinlerin ve *PvLDH* protein SDS-PAGE görüntüsü. Hatlar: 1:Markır 2: SDK1 içeren *E. coli* (JM105) 3: *E. coli* (JM105) 4: *PfLDH* geni içeren *E. coli* (JM105) 5: *PvLDH* içeren *E. coli* (JM105) 6: Markır 7: *E. coli* (JM105) 8: *PfLDH* geni içeren *E. coli* (JM105) 9: *PvLDH* içeren *E. coli* (JM105) 10: SDK1 içeren *E. coli* (JM105)

PfLDH total protein ifadesinin kontrolü yapıldıktan sonra hazırlanan tamponlarda proteinlerin çözülüp çözülmedikleri hücre ekstraktlarının süpernatant ve pelet fazlarının SDS-PAGE jele yüklenmesi ile belirlenmiştir. Bu analizi yapabilmek için total protein analizine tabi tutulan örnekler aynı tampon çözeltide çözülmüş ve ifadenin kontrolü öncesinde sonikasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Sonikasyon işleminden sonra örnekler 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek örnekler süpernatant ve pellet şeklinde ayrılmış, SDS-PAGE görüntüleri alınmıştır (Şekil 3.9, Şekil 3.10). SDS-PAGE protein ifadesini tam olarak göstermediği için, proteinin ifade edilip edilmediği önce Western blot analizi ile onaylanmış, sonraki bölümde de anlatıldığı gibi enzim aktivitesi kontrol edilmiştir.



Şekil 3.9 SDK1, *PfLDH* ve *E. coli* süpernatant ve pelletleri ayrılarak ve *PvLDH* SDS-PAGE görüntüleri. Hatlar: 1:Markır 2:SDK1 3: *PfLDH* 4: *E. coli*, pelletleri 5: SDK1 6: *PfLDH* 7: *E. coli*, süpernatantları 8:*PvLDH*



Şekil 3.10 SDK1, *PflDH* ve *E.coli* süpernatant ve pelletleri ayrılarak SDS-PAGE görüntüleri. 1:Markır 2: *E.coli* 3: *PflDH* 4: SDK1, pelletleri 5: *E.coli* 6: *PflDH* 7: SDK1, süpernatantları

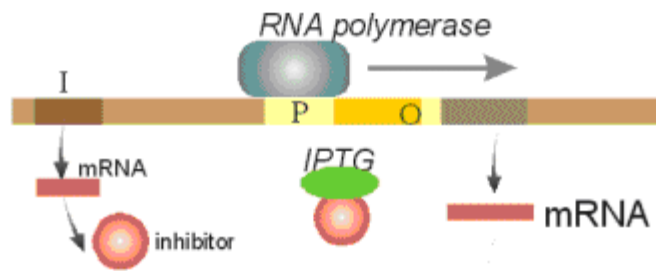
3.2 *PflDH*'ın Aktivitesinin Tespiti

İstenilen *PflDH* geni pKK223-3 vektörüne aktarılıp, *E. coli* JM105 hücrelerine transformasyonu yapıldıktan sonra, bu hücrelerden elde edilmesi amaçlanan proteininin üretilip üretilmediklerini kontrol etmek için geni içeren *E. coli* JM105 hücreleri (*PflDH*), ve kontrol olarak kullanılan SDK1 içeren *E. coli* JM105 hücreleri (SDK1) aktivite ölçümü öncesinde indüklemeye tabi tutulmuştur. *PflDH* geninin ifadesini arttırmak için ortama indükleyici madde olarak IPTG ilave edilmiş, hiçbir gen içermeyen *E. coli* JM105 hücreleri IPTG ilavesi yapılmadan geliştirilmiştir. Besiyeri ortamındaki hücreler logaritmik faza (OD_{600} : 0,6) ulaşınca kadar inkübe edilmiştir. Daha önceki çalışmalara göre *PflDH*, *E. coli* JM105 hücrelerinde en yüksek aktiviteyi 1 mM IPTG konsantrasyonunda göstermiştir (Aslan vd., 2005). Bu amaçla IPTG konsantrasyonu aynı kullanılmıştır. Bir gecelik inkübasyon sonucunda gelişen hücrelerden 2.5 ml bir tüpe alınarak santrifüjlenmiş ve elde edilen çökelti Tris/KCl tampon çözeltisi, pH:7.5, içerisinde çözüldükten sonra sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Sonikasyondan sonra santrifüjleme işlemi gerçekleştirilmiş ve üstte kalan süpernatant fraksiyonu kullanılarak enzim aktivitesi kontrol edilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 *PfLDH* proteininin aktivitesinin ölçülmesi. (LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiş olup bu değerlerin ortalaması verilmiştir).

$\Delta A_{340}/\text{dakika}$			10 mM Pirüvat
SDK1	İndüklenmemiş	Bir gece	0,217
	İndüklenmiş		0.750
<i>E. coli</i> JM105	İndüklenmemiş	Bir gece	0.012
<i>PfLDH</i>	İndüklenmemiş	Bir gece	0.209
	İndüklenmiş		0.800

E. coli lac operon sisteminde operatör genin kontrol ettiği, birbirine oldukça yakın yerleşimde bulunan genler vardır [5]. Hücrede laktoz yokluğunda *lac* repressörün operona bağlanmasıyla laktoz parçalayan enzimlerin kodlanması durur. Laktoz operonunu transkripsiyonu indükleyen alternatif bir indükleyici de laktozun analogu olan izopropilthiogalaktosid (IPTG)'dir [6]. Hücreye laktoz alındığında ise indükleyici madde *lac* repressöre bağlanır; *lac* repressör böylece konformasyonel değişikliğe uğrar ve operatörden ayrılır; transkripsiyon başlar (Şekil 3.11)



Şekil 3.11 *E. coli* kromozomunda kültür ortamına IPTG ilavesi ile enzim üretiminin indüklenmesi. P promotör, O operatördür; I *lac* repressörü kodlayan genidir [8].

Daha önce yapılmış olan çalışmaların sonucunda *PfLDH* proteininin ifadesinin zayıf olduğu bilindiği için (Turgut, 1998), *PfLDH* proteinin ifadesinin indüklenerek miktarının artırılması yapılmıştır. *PfLDH* geni ifade vektörü olan pKK223-3 vektörüne klonlanmıştır. pKK223-3

vektörünün Lac promotor bölgesi taşıdığı bilinmektedir. IPTG gibi indükleyici bileşikler represöre bağlanarak operatör genle etkileşmesini önlemektedirler (Sambrook, 2001).

3.3 *Pf*LDH'in Saflaştırılması

Bu çalışmada *Pf*LDH proteini Ni-NTA Agaroz tekniği kullanılarak saflaştırılmış ve UV-Visible spektrofotometre ile A_{280} ve A_{260} 'da ölçümler yapılmış olup, saf olan ve spektrofotometre ile ölçümlerde tek bir pikin ve SDS-PAGE analizinde *Pf*LDH'a ait tek bir protein bandının görülmesi amaçlanmıştır.

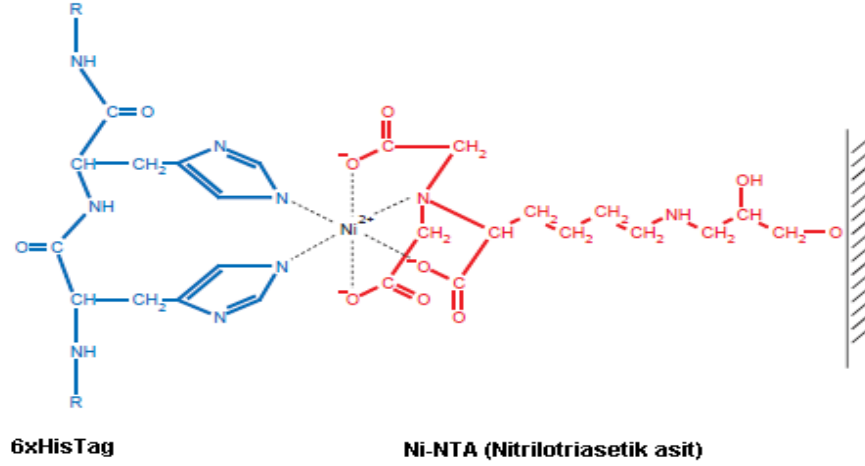
3.3.1 Hücrelerinin Hazırlanması

Aktivite ölçümleri sonucunda pozitif olarak belirlenen örnekler bir gece 37 °C'de ve 180 rpm'de inkübe edilmiş ve aktivite kontrolü yapılmıştır. İnkübe edilmiş örnek, 100 µg/ml ampisilin içeren 500 ml 2xYT buyyon içerisine 2 ml inkübe edilmiştir. OD_{600} 'deki hücre yoğunluğu 0,6'ya ulaşıncaya kadar inkübe edilmiştir. Kültür istenilen hücre yoğunluğuna ulaşıncı final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG ilave edilmiştir. IPTG ile indüklenmiş kültür 37 °C'de ve 180 rpm'de bir gece inkübe edilmiştir. Bir gecelik indüklenmiş kültür örnekleri 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant dökülmüştür. Pelet, 6 ml hücre lizisi ve kolon yıkama tamponunda çözülerek, hücreler sonikatör (Bandelin Sonopuls, Almanya) ile güç % 60'da 30 saniye aralıklarla dokuz defa 10'ar saniye parçalanmıştır. 14.000 rpm'de 1 saat 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant (CL; cell lysate) alınıp bir miktarı SDS-PAGE analizi için ayrılmıştır.

3.3.2 Saflaştırma İşlemleri

*Pf*LDH enziminin, gen dizisine PCR aracılığı ile eklenen 6 adet histidin amino asitidi (6xHistag) kodlayan dizisi kolon dolgu maddesi olarak kullanılan Ni-NTA (Nikel-Nitriлотriasetik asit) agarozun Ni iyonu ile etkileşerek kolon dolgu maddesine bağlanmasını sağlamaktadır. Nikel iyonu, nitriлотriasetik asit ile 4 bağ yaparken histidin ile 2 bağ yaparak histidinlerin NTA'ya bağlanmaktadır. (Şekil 3.12). Kolona yüklenen Ni-NTA'ya, 6xHis-tag ile bağlı olan *Pf*LDH enzimi, kolondan geri Ni-NTA'ya yüksek konsantrasyonlarda daha güçlü bağlanabilen imidazol ile alınmaktadır. Ni-NTA sabit fazı bir seferde %95 saflık derecesinde proteinlerin saflaştırılmasını gerçekleştirmektedir [9]. Bu saflık derecesi moleküler biyoloji uygulamaları ve yapı çalışmaları için yeterlidir. Ni-NTA agaroz, mililitre başına 5–10 mg

6xHis-tag'lı *Pf*LDH (rekombinant) proteininin elde edilmesini sağlayan başarılı bir saflaştırma ligandır (The QIAexpressionsit, 2003).



Şekil 3.12 6xHis-tag'ın Ni-NTA agarozaya bağlanması. (The QIAexpressionsit, 2003)

Saflaştırma işlemi Bölüm 2.2.14'deki anlatıldığı gibi Ni-NTA Agaroz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yıkama ve lizis çözeltileri aynı olup bakteriyel proteinlerin yıkamada atılması için 20 mM imidazol ve 300 mM NaCl kullanılmıştır. Yıkama aşamasında *Pf*LDH'ın kaybedilmesini önlemek için imidazol miktarı düşük tutulmuştur. Elüsyon aşamasında ise yüksek oranda protein elde etmek amacıyla toplamda 250 mM imidazol kullanılmıştır. pH 7.5 kullanılarak proteinin aktivitesinin olumsuz olarak etkilenmemesi için doğal şartlar sağlanmıştır. Ni-NTA makriksi içindeki alkolün uzaklaştırılması için saflaştırma işleminden önce kolon 40 ml yıkama tamponuyla yıkanmış ve ardından kolona hücre lizatı (CL; cell lysate) eklenerek saflaştırma işlemi başlatılmıştır. Tamamı kolona yüklenen hücre lizatı, kolondan geçtikten sonra süzütünün başından, ortasından ve sonundan AS1, AS2 ve AS3 (akış süzütüsü) bir miktar örnek alınmış ve tekrar 40 ml yıkama tamponuyla yıkanmıştır. Y1, Y2, Y3, (yıkama 1, yıkama 2, yıkama 3) kolona yıkama tamponu uygulanması sonrasında alınan yıkama örneklerini; E1, E2, E3, ...vs. (elüsyon 1, elüsyon 2, elüsyon 3, ...vs.) kolona elüsyon tamponu uygulanması sonrasında alınan elüsyon örneklerini temsil etmektedir. Alınan bu örneklerin enzim aktivitesine bakılmıştır.

3.3.3 Saflaştırma İşlemleri Sırasında Elde Edilen Fraksiyonların Aktivite Ölçümleri

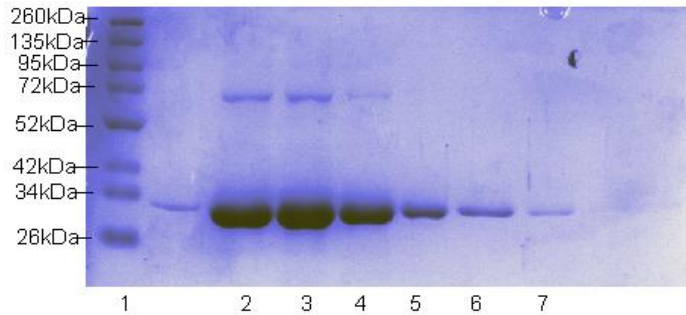
Saflaştırılmış *Pf*LDH fraksiyonları üzerinde ayrı ayrı ölçümler alınmıştır. Spektrofotometrik ölçümlerin yapılması ile yeterli miktarda protein içeren ve kromatogramda tek pik veren saflaştırılmış enzimler kinetik analizler için kullanılmıştır. Enzim varlığı, $\Delta A_{340}/\text{dakika}$ yapılan enzim aktivite ölçümlerinde de tespit edilmiş olup, bu durum SDS-PAGE jel görüntülerinin doğruluğunu destekler niteliktedir. Tüm elüsyonlarda yüksek enzim aktivitesi belirlenmiştir ancak son elüsyonlardaki enzim aktivitesinin düşük olmasının enzim miktarının az olmasına bağlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 *Pf*LDH'nin Hücre lizatı, süzüntüler (AS1, AS2 ve AS3), yıkamalar (Y1, Y2 ve Y3) ve elde edilen saflaştırmadaki (E1-E10) enzim aktivitesinin tespiti

$\Delta A_{340}/\text{dakika}$ Aktivite Ölçümü (10mM pirüvat)																	
Mutant Enzim	Hücre Lizatı	AS1	AS2	AS3	Y1	Y2	Y3	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
<i>Pf</i> LDH	1.502	0.341	0.656	0.419	0.203	0.015	0.009	0.016	0.258	0.408	0.662	0.814	0.553	0.453	0.251	0.147	0.02

3.3.4 *Pf*LDH Proteinin SDS-PAGE İle Analizi

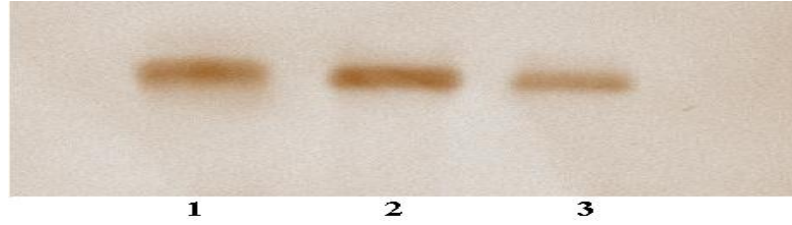
Örneklerin sonikasyonu sonrası elde edilen hücre lizatı, kolondan alınan ilk süzüntü, yıkama sırasında alınan süzüntüler ve elüsyon örnekleri SDS-PAGE jelde koşturularak elde edilen örneklerin saflığı ve miktarı kontrol edilmiştir. Saflaştırılmış *Pf*LDH proteininin SDS-PAGE görüntüsünün elüsyon 5'de en saf hali Şekil 3.13'de gösterilmiştir.



Şekil 3.13 Saflaştırılmış *Pf*LDH örneklerinin SDS-PAGE görüntüleri. Hatlar; 1: Markır, 2: Elüsyon 4, 3: Elüsyon 5, 4: Elüsyon 6, 5: Elüsyon 7, 6: Elüsyon 8, 7: Elüsyon 9

3.3.5 Saf *Pf*LDH Proteinin Western Blot Analizi

Saflaştırılmış olan *Pf*LDH proteini Western blot ile de analiz edilmiştir. Western blot ile doğru proteinin saflaştırıldığı immunolojik olarak gösterilmiştir. SDS-PAGE metodu uygulandıktan sonra, elektroblotting yöntemiyle proteinler bir membrana geçirilmiştir. Daha sonra çeşitli solüsyonlarla işleme tabi tutulup membranda bulunan *Pf*LDH proteinine spesifik, Yeni Zelanda tavşanlarından elde edilen antikorlar (Turgut-Balık vd., 2001b) ile etkileşimi sağlanarak Western Blot görüntüsü alınmıştır. Saflaştırılmış olan *Pf*LDH proteininin SDS-PAGE jeline uygun görüntünün elde edilmesi amacıyla farklı oranlarda yüklemeleri yapılmıştır. SDS-PAGE jeline ilk önce 7.5 µl *Pf*LDH enzimi yüklenmiş istenilen görüntü elde edilememiş, yoğun bir bant görülmesinden dolayı yükleme miktarı 5 µl indirilmiştir. Aynı antikor ile pozitif sonuç verdiği bilinen saf *Pv*LDH proteini pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Yapılan işlemler sonucunda doğru proteinin üretilmiş olduğu gösterilmiştir. Saflaştırılmış *Pf*LDH Elüsyon 7 ve elüsyon 8'in kullanıldığı blotlama sonucunda tek bant elde edilmiş olması bu proteinin çok yüksek saflıkta saflaştırılmasının başarılı olduğunu göstermektedir. (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 Saflaştırılmış olan *Pf*LDH elüsyon 7, ve 8 protein Western Blot görüntüsü.
Hatlar:1:*Pv*LDH 2:*Pf*LDH Elüsyon 7 3:*Pf*LDH Elüsyon 8

3.4 Kinetik Analiz

*Pf*LDH enzimlerin Steady-State kinetik ölçümleri UNICAM UV-Visible spektrofotometre kullanılarak NADH'nin NAD⁺'a çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranı takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Kinetik ölçüm için 200 µM NADH ve değişen pirüvat konsantrasyonları (20 µM, 60 µM, 180 µM, 340 µM, 1.6 mM, 4.8 mM, 14.48 mM, 20.4 mM, 29 mM) ve kullanılmıştır. 1 ml'lik küvete pirüvat ve NADH solüsyonlarının ilavesinin ardından en son enzim ilavesi ile reaksiyon başlatılmıştır. Bütün kinetik ölçümler

birçok kere tekrar edilmiştir ve elde edilen veriler kullanılarak Grafit 3.0 (Leatherbarrow, 1992) isimli program ile K_m , ve V_{max} değerleri elde edilmiştir.

Elde edilen enzim ve NADH miktarı sabit tutularak 9 farklı pirüvat konsantrasyonunda *Pf*LDH enziminin aktivitesi ölçülmüş ve Çizelge 3.5 'de verilen değerler elde edilmiştir.

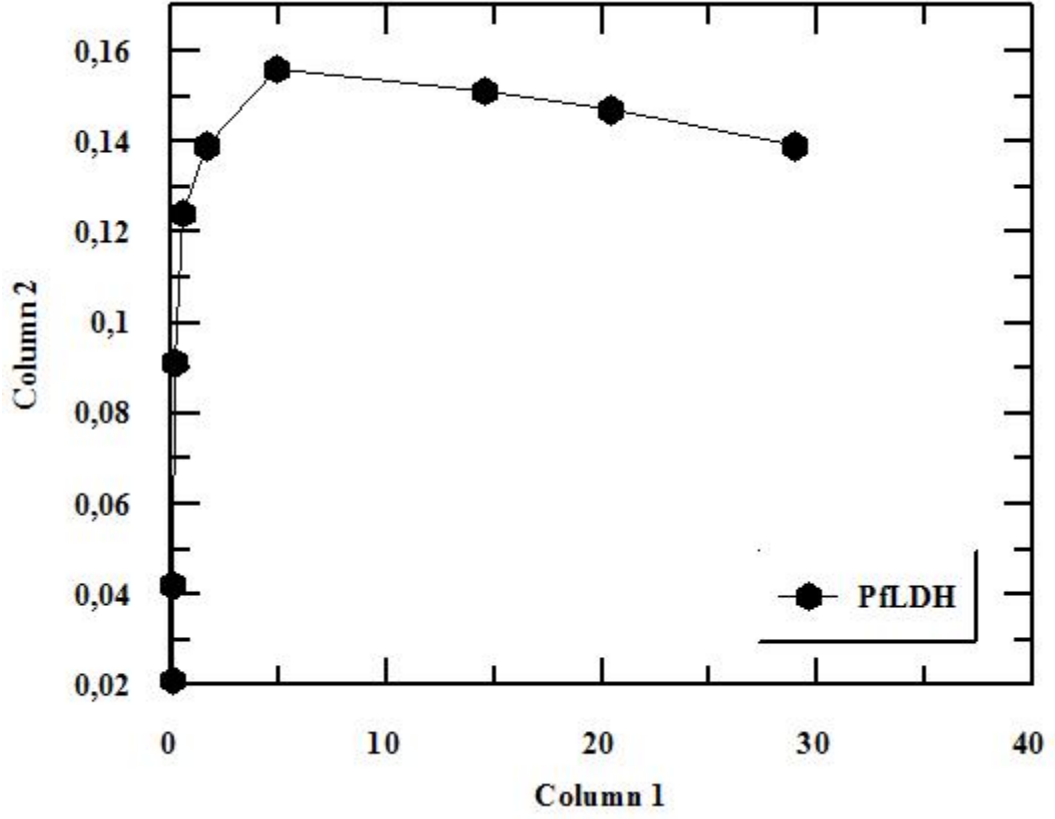
Çizelge 3.5 *Pf*LDH enziminin aktivitesinin NADH'ın NAD^+ 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki ($\Delta A_{340}/dakika$) absorbans değişim oranının takip edilerek ölçülmesi.

Pirüvat (mM)	Oran ($\Delta A_{340}/dakika$)
0,02	0,016
0,06	0,053
0,18	0,089
0,54	0,121
1,6	0,142
4,86	0,149
14,58	0,137
20,4	0,123
29	0,120

Elde edilen veriler Grafit 3.0 (Leatherbarrow, 1992) programı kullanılarak değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.6 ve Şekil 3.15 verilmiştir.

Çizelge 3.6 *Pf*LDH'ın Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar

Steady-State Kinetik Sabitesi	Değer	Standart Hata
V_{max}	0.1368	0.0052
K_m (mM)	0.0940	0.00234



Şekil 3.15 *PflDH*'ın Steady-State kinetik davranışı

Görüldüğü gibi *PflDH* için tepsi edilen ve NADH'in kofaktör olarak kullanıldığı K_m pürivat değeri 0.094 mM ve V_{max} değeri 0.1368 olarak belirlenmiştir. Bu değerler literatür bilgisi ile uyum içerisindedir (Brown vd., 2004)

4. SONUÇ

Antimalarial ilaçlara karşı direncin her geçen gün arttığı bilinmektedir. Bu yüzden sıtma ile mücadelede yeni ilaçların geliştirilmesi oldukça önem taşımaktadır (Olliaro ve Yuthavong, 1999, Akdur, 2004, Turgut, 1998). İnsanı etkilemeyen fakat parazitin yaşam döngüsünü durduran alternatif çalışmalardan biri metabolik bir enziminin engellenmesidir. Bu nedenle, *P. falciparum*'da pirüvatın laktata redüksiyonunu katalizleyen ve anaerobik glikolizin ana kontrol noktası olan LDH enzimi hedef olarak seçilmiştir. Parazitin hayat döngüsünü sürdürebilmesi için LDH enzimi gereklidir (Dunn, vd., 1996, Turgut, 1998). Parazit ATP ihtiyacını glikolizle karşılamaktadır. LDH enzimi glikolizin son ürünü olan pirüvik asidi, dönüşümlü bir reaksiyon ile laktik aside çevirir. Bu nedenden dolayı parazitin yaşam döngüsünü durdurmak için bu enzimin aktivitesinin durdurulması alternatif yollardan biridir. Daha önce yapılmış olan çalışmalar ile *P. falciparum* genomik DNA'sından LDH enzimi kodlayan gen izole edilerek klonlanmış ve protein ifadesi gerçekleştirilmiştir. Enzim daha sonra karakterize edilerek 3 boyutlu yapısı çözülmüş ve çeşitli inhibitör çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ancak yapılan bütün inhibitör çalışmalarına rağmen, henüz tam olarak ucuz, etkin, güvenilir bir ilaç tasarlanması gerçekleştirilememiştir (Dunn vd., 1996, Turgut-Balik ve Holbrook, 2001a, Turgut-Balik vd., 2004, Cameron, 2004).

Bu yüksek lisans tez çalışmasında *P. falciparum* LDH enzimini kodlayan genin C terminaline 6 histidin amino asidini kodlayan gen eklenmiş olup pKK223-3 klonlama vektörüne aktararak genin ifadesi yapılmış ve optimizasyon çalışmaları yapılarak *PfLDH* enzimi üretilmiştir. Yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmalarının merkez basamakların biri çalışmada kullanılacak olan proteinin saf olarak elde edilmiş olmasıdır. Yapmış olduğumuz çalışma ile *PfLDH* genine, 6 histidin amino asidini kodlayan gen eklenerek gen amplifikasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen DNA klonlanmıştır. Klonlanan rekombinant *PfLDH* geninin DNA dizi analizi Iontek firmasına yaptırılmıştır. His-tag içeren *PfLDH* total proteinin SDS-PAGE ile analizi His-tag içermeyen SDK1 proteini ile karşılaştırmalı olarak yapılmış ve bantlaşma profillerinde bir fark olmadığı gözlenmiştir. IPTG'nin *PfLDH* enziminin ifadedeki rolü daha önceki çalışmalarda tespit edilmiş olup bu çalışmada da IPTG ilavesi ile yüksek miktarda enzim elde edilmiştir. *PfLDH* genini içermeyen *E. coli* JM105 hücrelerindeki enzim aktivitesi 0.012 olarak ölçülmüş iken enzim aktivitelerinin indüklenmemiş *PfLDH* için 0.217, indüklenmiş *PfLDH* için 0.800 olduğu ölçülmüştür.

Böylece saflaştırma öncesi oluşturulan klonun aktif enzim taşıdığı ve üretilen *Pf*LDH miktarının IPTG indüklemesi ile 4 kat artırılacağı gösterilmiştir. Ayrıca elde edilen sonuçlar his-tag ilavesinin proteinin ifadesine bir etkisinin olmadığı göstermiştir.

Bir sonraki aşamada ucuna cam yünü yerleştirilen 5 ml'lik şırıngaya Ni-NTA Agaroz bırakılarak kolon oluşturulmuştur. His-tag ile işaretlenmiş *Pf*LDH enzimi hazırlanmış olan bu kolon kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu basamak inhibitör tasarım çalışmaları için hayati öneme sahip bir basamak olup yapılmış olan tez çalışması sonucunda başarı ile gerçekleştirilmiştir. *Pf*LDH proteini istenilen miktar ve yüksek saflık oranında elde edilmiştir. Saflık oranı önce SDS-PAGE analizi ile gösterilmiş ve daha sonra gerçekleştirilmiş olan Western blot analizi ile hem proteinin saflık oranı onaylanmış hem de saflaştırılan proteinin doğruluğu ispatlanmıştır. Western blot sonucunda membranda sadece spesifik bantların olduğu ve bakteriyel kaynaklı bantların olmadığı gözlenmiştir. Elde edilen saf *Pf*LDH proteini kullanılarak proteinin K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır.

Bu tez çalışması sonucunda *Pf*LDH proteininin; yüksek saflıkta, ihtiyaç duyulan miktarda ve kolay uygulanabilir bir protokol ile elde edilmiş olmasıyla; protein, inhibitör tespiti çalışmalarında kullanıma hazır hale getirilmiştir.

KAYNAKLAR

Akdur, R., (1997), Sıtma Eğitim Notları, Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi Genel Koordinat6rluğu, Ankara.

Akdur, R., (2004), Sıtma Temel Bilgiler, Ankara.

Anderson, L, (1981), "Identification of Mitochondrial Proteins and Some of Their Precursors in Twodimensional Electrophoretic Maps of Human Cells", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Biological Sciences, 78 (4): 2407-2411.

Aslan, A., elik, V. ve Turgut-Balık, D., (2005), "IPTG İndüklemesinin Yapıya Dayandırılmış İlaç Tasarım alışmalarında Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Geninin İfadesi Üzerine Etkisi", Türk Biyokimya Dergisi, 30:1, 30-31.

Aslan, A., 2006, *Plasmodium vivax*'ın laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan genin ifade edilerek ilgili proteinin saflaştırılması ve analizlerinin yapılması, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 50s.

Ballou, W.R., Hoffman, S.L, Sherwood, J.A., Hollingdale, M.R., Neva, F.A., Hockmayer, W.T., Gordon, D.M., Schneider, I., Wirtz, R.A., Young, J.F., Wassman, G.F., Reeve, P. D., Riggs, C.L. and Chulay, C.D., (1987) "Safety and Efficacy af Recombinant DNA *P. falciparum* Sporozoite Vaccine Lancet", I:1277-1281.

Berwal, R., Gopalan, N., Chandel, K., Prasad, G.B.K.S. ve Prakash, S., (20089, "*Plasmodium falciparum*: Enhanced Soluble Expression, Purification and Biochemical Characterization of lactate Dehydrogenase", Experimental Parasitology, 120(2): 135-141.

Bowman, S., Lawson, D., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Churcher, C.M., Craig, A., Davies, R.M., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Gwilliam, R., Hamlin, N., Haris, D., Holroyd, S., Hornsby, T., Horrocks, P., Jagels, K., Jassal, B., Kyes, S., McLean, J., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Oliver, K., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutter, S., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Whitehead, S., Woodward, J.R., Newbold, C. and Barrell, B.G., (1999), "The Complete Nucleotide Sequence of Chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*", Nature, 400(6744): 532-538.

Brown, W.M., Yowell, C.A., Hoard, A., Vander Jagt, T.A., Hunsaker, L.A., Deck, L.M., Royer, R.E., Piper, R.C., Dame, J.B., Makler, M.T. ve Vander Jagt, D.L., (2004), "Comparative Structural Analysis and Kinetic Properties of Lactate Dehydrogenases from the Four Species of Human Malarial Parasites", Biochemistry, 43: 6219- 6229.

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.

Cameron, A., Read, J., Tranter, R., Winter, J.V., Sessions, R.B., Brad R.L., Vivas L., Easton, A., Kendrick, H., Croft, S.,L. Barros, D., Lavandera, J.L., Martin, J.J., Risco, F., Garcı'a-

Ochoa, S., Gamo F.J., Sanz, L., Leon, L., Ruiz, J.R. Gabarro', R., Mallo, A., Go'mez de las Heras, F., (2004) "Identification and Activity of a Series of Azole-based Compounds with Lactate Dehydrogenase-directed Anti-malarial Activity," The Journal of Biological Chemistry, Vol. 279, 30:23

Carlton, J.M., Adams, J.H., Silva, J.C., Bidwell, S.L., Lorenzi, H., Caler, E., Crabtree, J., Angiuoli, S.V., Merino, E.F., Amedeo, P., Cheng, Q., Coulson, R.M.R., Crabb, B.S., del Portillo, H.A., Essien, K., Feldblyum, T.V., Fernandez-Becerra, C., Gilson, P.R., Gueye, A.H., Guo, X., Kang'a, S., Kooij, T.W.A., Korsinczky, M., Meyer, E.V.S., Nene, V., Paulsen, I., White, O., Ralph, S.A., Ren, Q.H., Sargeant, T.J., Salzberg, S.L., Stoeckert, C.J., Sullivan, S.A., Yamamoto, M.M., Hoffman, S.L., Wortman, J.R., Gardner, M.J., Galinski, M.R., Barnwell, J.W., Fraser-Liggett, C.M., 2008 (a), Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*, Nature. 455(7214): 757-763.

Carlton, J.M., Adams, J.H., Silva, J.C., Bidwell, S.L., Lorenzi, H., Caler, E., Crabtree, J., Angiuoli, S.V., Merino, E.F., Amedeo, P., Cheng, Q., Coulson, R.M.R., Crabb, B.S., del Portillo, H.A., Essien, K., Feldblyum, T.V., Fernandez-Becerra, C., Gilson, P.R., Gueye, A.H., Guo, X., Kang'a, S., Kooij, T.W.A., Korsinczky, M., Meyer, E.V.S., Nene, V., Paulsen, I., White, O., Ralph, S.A., Ren, Q.H., Sargeant, T.J., Salzberg, S.L., Stoeckert, C.J., Sullivan, S.A., Yamamoto, M.M., Hoffman, S.L., Wortman, J.R., Gardner, M.J., Galinski, M.R., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M. and Barrell, B., (2002), "Genome Sequence of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*" Nature, 419(6906): 498-511.

Chattopadhyay, R., Kumar S., (2009), "Malaria vaccine: latest update and challenges ahead", Indian J Exp Biol. Jul;47(7):527-536.

Coulson, C.J. and Rabin, B.R., (1969), FEBS Lett. , 3:333-334.

Cox-Singh, J., Davis, T.M.E., Lee, Kim-Sung, Shamsul, S.S.G., Matusop, A., Ratnam, S., Rahman, H.A., Conway, D.J. and Singh, B., (2008), "*Plasmodium knowlesi* Malaria in Humans is Widely Distributed and Potentially Life Threatening", Clinical Infectious Diseases, 46: 165–171.

Çelik, V., (2004), "*Plasmodium falciparum*'da Laktat Dehidrogenaz Enziminin Aktif Bölge Halkası Aminoasitlerinin Site-Directed Mutagenез Çalışmaları ile Analizi", Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 53s.

Çiçek, M., ve Turgut B. D., (2010) "*Plasmodium* Türlerinin Laktat Dehidrogenaz Enziminin Amino Terminal Bölgesinde Bulunan Shine-Dalgarno Benzeri Bir Dizinin Proteinin Translasyonuna Etkisi" , *1.ulusal moleküler biyoloji ve biyoteknoloji kongresi*.

Deck, L.M., Vander-Jagt, D.L. and Royer, R.E., (1991), "Gossypol and Derivatives: A New Class of Aldolase Reductase Inhibitors", J. Med. Chem., 34:3301-3305.

Deng, H., Zheng, J ., Clarke, A., Holbrook, J.J., Callender, R. and Burgner, J.W., (1994), Biochemistry, 33:2297-230s.

Dunn, C.R., Banfield, M.J., Barker, J.J., Higham, C.W., Moreton, K.M., Turgut-Balik, D., Brady, R.L. ve Holbrook, J.J., (1996), "The Structure of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* Reveals a New Target for Anti-malarial Design", *Nature Structural Biology*, 3(11): 912-915.

Fromm, H.J., (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, 52:199-200.

Gardner, M.J., Tettelin, H., Carucci, D.J., Cummings, L.M., Aravind, L., Koonin, E.V., Shallom, S., Mason, T., Yu, K., Fujii, C., Pederson, J., Shen, K., Jing, J.P., Aston, C., Lai, Z.W., Schwartz, D.C., Perlea, M., Salzberg, S., Zhou, L.X., Sutton, G.G., Clayton, R., White, O., Smith, H.O., Fraser, C.M., Adams, M.D., Venter, J.C. and Hoffman, S.L., (1998), "Chromosome 2 Sequence of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*", *Science*, 282(5391): 1126-1132.

Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Perlea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M.A., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Hyman, R.W., Fung, E., Conway, A., Kurdi, O., Mao, J., Miranda, M., Nakao, B., Rowley, D., Tamaki, T., Wang, F. and Davis, R.W., (2002), "Sequence of *Plasmodium falciparum* Chromosome 12", *Nature*, 419(6906): 534-537.

Granchi, C., Bertini, S., Macchia, M. and Minutolo, F., (2010), "Inhibitors of Lactate Dehydrogenase Isoforms and Their Therapeutic Potentials", *Curr. Med. Chem.*, 17(7):672-97.

Grimsley, G.R ve C. N. Pace, (2004), "Spectrophotometric Determination of Protein Concentration", *Current Protocols in Protein Science*, Chapter 3, Unit 3.1.

Gutfreund, H., Cantwell, R., McMurray, C.H., Criddle, R.S. and Hathaway G., (1968), "The Kinetics of the Reversible Inhibition of Heart Lactate Dehydrogenase Through the Formation of the Enzyme-Oxidized Nicotinamide-Adenine Dinucleotide-Pyruvate Compounds", *Biochem. J.*, 106(3):683-687.

Hall, N., Pain, A., Berriman, M., Churcher, C., Harris, B., Harris, D., Mungall, K., Bowman, S., Atkin, R., Baker, S. ve vd., (2002), "Sequence of *Plasmodium falciparum* Chromosomes 1, 3-9 and 13", *Nature*, 419: 527-531.

Hansen, L.H., Knudsen, S., Sorensen, S.J., (1998). "The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*", *Curr. Microbiol.* 36(6): 341-7.

Hewitt, C.O., Sessions, R.B. and Holbrook, J.J. (1996) In Geisow, M.J. (ed.), "Perspectives on Protein Engineering", CD-ROM edition, Biodigm Ltd, UK

Hoffman, S.L., Goh, L.M., Luke, T.C., Schneider, I., Le T., Dolan, D.J., Sacci, J., de laVega,

P, Dowler, M., Paul, C., Gordon, D.M., Stoute, J.A., Church, L.W., Sedegah, M., Hepper, D.G., Ballou, W.R. and Richie, T.L., (2002), "Protection of Humans Against Malaria by Immunization with Radiation-attenuated *P. falciparum* Sporozoites", *J. infect Dis.* 185:1155-1164.

Holt, R.A., Subramanian, G.M., Halpern, A., Sutton, G.G., Charlab, R., Nusskern, D.R., Wincker, P., Clark, A.G., Ribeiro, J.M.C., Wides, R., Salzberg, S.L., Loftus, B., Yandell, M., Majoros, W.H., Rusch, D.B., Lai, Z.W., Kraft, C.L., Abril, J.F., Anthouard, V., Arensburger, P., Atkinson, P.W., Baden, H., de Berardinis, V., Baldwin, D., Benes, V., Biedler, J., Blass, Bolanos, C., Boscus R., Barnstead, D.M., Center, Cai, S., A., Chatuverdi, K., Christophides, G.K., Chrystal, M.A., Clamp, M., Cravchik, A., Curwen, V., Dana, A., Delcher, A., Dew, I., Evans, C.A., Flanigan, M., Grundschober-Freimoser, A., Friedli, L., Gu, Z.P., Guan, P., Guigo, R., Hillenmeyer, M.E., Hladun, S.L., Hogan, J.R., Hong, Y.S., Hoover, J., Jaillon, O., Ke, Z.X., Kodira, C., Kokoza, E., Koutsos, A., Letunic, I., Levitsky, A., Liang, Y., Lin, J.J., Lobo, N.F., Lopez, J.R., Malek, J.A., McIntosh, T.C., Meister, S., Miller, J., Mobarry, C., Mongin, E., Murphy, S.D., O'Brochta, D.A., Pfannkoch, C., Qi, R., Regier, M.A., Remington, K., Shao, H.G., Sharakhova, M.V., Sitter, C.D., Shetty, J., Smith, T.J., Strong, R., Sun, J.T., Thomasova, D., Ton, L.Q., Topalis, P., Tu, Z.J., Unger, M.F., Walenz, B., Wang, A.H., Wang, J., Wang, M., Wang, X.L., Woodford, K.J., Wortman, J.R., Wu M, Yao A, Zdobnov EM, Zhang HY, Zhao Q, Zhao SY, Zhu SPC, Zhimulev I, Coluzzi M, della Torre A, Roth CW, Louis C, Kalush F, Mural RJ, Myers EW, Adams MD, Smith HO, Broder S, Gardner MJ, Fraser CM, Birney E, Bork P, Waller RF and McFadden GI, (2005), *The Apicoplast: A Review of the Derived Plastid of Apicomplexan Parasites*, *Current Issues in Molecular Biology*, 7: 57-80.

Hyman, R.W., Fung, E., Conway, A., Kurdi, O., Mao, J., Miranda, M., Nakao, B., Rowley, D., Tamaki, T., Wang, F. ve Davis, R.W., 2002, "Sequence of *Plasmodium falciparum* Chromosome 12", *Nature*, 419: 534-537.

İnan, A.Ş., Erdem, I., D., Öztürk-Engin, Hitit, G., Ceran, N., Şenbayrak, S., Özyürek, S.Ç., Karagül, E. ve Göktaş, P., (2001) "Sıtma: 40 Olgunun Değerlendirilmesi" *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 34(3):147-151

Kayser., F.H., (2005), *Medical Microbiology*, Thieme, Stuttgart-New York.

Kercher, M. A., Lut, P. and Lewis M., (1997), "Lac repressor-operator complex" *Current Opinion in Structural Biology*, 7:76-85

Kilejian, A., (1974), "Mitochondrial DNA from *Plasmodium lophurae*", *Journal of Protozoology*, 21: 434.

Kilejian, A., (1975), "Circular Mitochondrial DNA from the Avian Malarial Parasite *Plasmodium lophurae*", *Biochimica Biophysica Acta.*, 390: 276-284

Klenerman, P. ve Dickson, H., (1992), "Plasma Lactate Dehydrogenase Estimation in the Diagnosis of Malaria", *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 86:563-565.

Knell, A.J., (1991), *Malaria*, Oxford University Press, Oxford.

Koram, K.A. and Gyan, B.A., (2010), “Malaria Vaccine Development: An Endemic Country Perspective”, *Hum Vaccin*, Jan;6(1):12-6.

Köhler, S., Delwiche, C.F., Denny, P.W., Tilney, L.G., Webster, P., Wilson, R.J.M., Palmer, J.D. and Roos, D.S., (1997), “A Plastid of Probable Green Algal Origin in Apicomplexan Parasites” *Science*, 275: 1485-1488.

Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227:5259, 680-685

Lau, A.O.T., (2009), “An overview of the Babesia, Plasmodium and Theileria genomes: A Comparative Perspective”, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 164 (1): 1-8.

Leatherbarrow, R.J., (1992), *Grafit*, Version 3.0. Eritcrasus Software Ltd., Staines, UK.

Lippinkot, J.M., (1997) “Pharmaceutical Biochemistry”, New York, ABD.

Maekawa, M., (2001), “L-Lactate Dehydrogenase Isoenzymes”, *J. Chromatogr., Biomed.-Appl.*, 73:373–398.

Makler, M.T. and Hinrichs, D.J., (1993), “Measurement of the Lactate Dehydrogenase Activity of *Plasmodium falciparum*”, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48:205–210.

McFadden, G.I., Reith, M., Munholland, J. and Lang-Unnasch, N., (1996), “Plastid in Human Parasites”, *Nature*, 381:482-483.

Mutlu, Ö. (2009), “*Plasmodium vivax* Yabancıl Tip Laktat Dehidrogenaz Enziminin Safılaştırmasının Optimizasyonu ve Yabancıl Tip ile Mutant Enzimlerinin Kinetik Analizlerinin Yapılması” Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Nussenzweig, R.S., Vanderberg, J., Most, H. and Orton, C., (1967), “Protective Immunity Produced by the Injection of Xirradiated Sporozoits of *P. berghei*”, *Natura*, 216:160-162.

Olliaro, P.L. and Yuthavong, Y., (1999), “An Overview of Chemotherapeutic Targets for Antimalarial Drug Discovery”, *Pharmacol. Ther.*, 81(2): 91–110.

Özcel, M.A., (1999), *Sıtma*, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

Perkins, S.L. and Austin, C., (2009), "Four New Species of *Plasmodium* from New Guinea Lizards: Integrating Morphology and Molecules", *J. Parasitology*, 95(2): 424-433.

Ralph, S.A., van Dooren, G.G., Waller, R.F., Crawford, M.J., Fraunholz, M.J., Foth, B.J., Tonkin, C.J., Roos, D.S. and McFadden, G.I., (2004), “Metabolic Maps and Functions of the *Plasmodium falciparum* Apicoplast” *Nature Reviews Microbiology*. 2(3): 203-216.

Rand, K.N., 1996, Crystal violet can be used to visualize DNA bands during gel electrophoresis and to improve cloning efficiency, Technical Tips Online.

Roth, E.F. JR, Calvin, M.C., Max-Audit, I., Rosa, J. ve Rosa, R., (1988), "The Enzymes of the Glycolytic Pathway in Erythrocytes Infected with *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites", Blood 72, 6:1922-1925.

Royer, R.E., Deck, L.M., Campos, N.M., Hunsaker, L.A. and Vander Jagt, D.L., (1986), "Biologically Active Derivatives of Gossypol: Synthesis and Antimalarial Activities of Peri-Acylated Gossylic Nitriles", Journal of Medicinal Chemistry, 29:1799-1801.

Sambrook, J. ve Russell, D.W., (2001), Molecular Cloning a Laboratory Manual I-II-III, Third Edit., CSHL Press, New York.

Sinden, R.E., (2010), A Biologist's Perspective on Malaria Vaccine Development, Hum Vaccin, 6:1, 1-9.

Singhal, T., (2004), Management of Severe Malaria, Indian J. Pediatr, 71(1):81-8.

Shine, J., Dalgarno, L., (1975), "Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes", Nature 254 :5495, 34-38

Stentz, R., Bongaerts, R.J., Gunning, A.P., Gasson, M. and Shearman, C., (2010), "Controlled Protein Release from Viable *Lactococcus Lactis* Cells", Appl. Environ. Microbiol., 76(9): 3026-3031.

Stoute, J.A., Slaoui, M., Heppner, D.G., Momin, P., Kester, K.E., Desmon, P., Wellde, B.T., Garçon, N., Krzych, U., Marchand, M., Balon, W.R., Coher, J.D., Aprelimi Suplick, K., Akella, R., Saul, A., Vadya, A.B., (1997) Molecular cloning and partial sequence of a 5.8 kilobase pair repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*. Molecular and Biochemical Parasitology. 30(3): 289-290.

Suplick, K., Akella, R., Saul, A., Vadya, A.B., (1988) "Molecular cloning and partial sequence of a 5.8 kilobase pair repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*", Molecular and Biochemical Parasitology, 30(3): 289-290.

Tuğluoğlu, F., (2008) "Türkiye'de Sıtma Mücadelesi" Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32 (4): 351 - 359,

Turgut-Balik, D., (1998), "Overproduction of the Active Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* Opens a Route to Obtain New Antimalarials", Ph.D., University of Bristol Department of Biochemistry, Bristol, UK.

Turgut-Balık, D., Holbrook, J.J., (2001a), "Determination of the DNA and amino acid sequences of the lactate dehydrogenase gene from *Plasmodium falciparum* strains K1 and PF FCBR: A route to the design of new antimalarials", Turkish J. Biology, 25: 241-250.

Turgut-Balik, D., Shoemark, D., Moreton, K.M., Sessions, R.B., Holbrook, J. J., (2001b), "Mutagenic exploration of the active site of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*", Biotechnology Letters, 23: 923-927.

Turgut-Balık, D., Akbulut, E., Shoemark, D., Celik, V., Sessions, R., Moreton, K. ve Brady R. L., (2004), "Molecular Cloning, Sequence Analysis and Expression of the Lactate Dehydrogenase Gene from Human Malaria Parasite *Plasmodium vivax*", Biotechnology Letters, 26:1051-1055.

Turgut-Balik, D., Celik, V., Moreton, K., Brady, L., 2005, Overcoming cloning problems by staining agarose gels with crystal violet instead of ethidium bromide in lactate dehydrogenase gene from *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*, *Acta Biologica Hungarica*, 56:3-4, 389-397.

Yılmaz, S., (1996) "Tanısında Güçlük Çekilen Sıtma Olgularında Hematolojik Parametreler ve Laktik Dehidrogenaz Ölçümlerinin İndirekt Tanısal Değeri", Uzmanlık Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Tıp Fakültesi.

Yotoko, K.S.C. and Elisei, C., (2006), "Malaria Parasites (Apicomplexa, Haematozoa) and Their Relationships with Their Hosts: Is There an Evolutionary Cost for the Specialization?", *J. Zoo. Syst. Evol. Res.*, 44(4): 265.

Vaidya, A.B., and Arasu, P., (1987) Tandemly Arranged Gene Clusters of Malaria Parasites that are Highly Conserved and Transcribed, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 22(2-3): 249-257.

Vander Jagt, D., Hunsaket, L.A. and Heidrich, J.E., (1981) *Molec. and Biochem. Parasitology* 4:25-264

Waller, R.F. ve McFadden, G.I., (2005), "The Apicoplast: A Review of the Derived Plastid of Apicomplexan Parasites", *Current Issues in Molecular Biology*, 7: 57-80.

Wang, Q., Wang, M., Chang, H., Yang, B., (1998) "Accumulation and effluxion of chloroquine in chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium berghei*" *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. 16(3):189-92.

White, J.L., Hackert, M.L., Buehner, M., Adams, M.J., Ford, G.C., Lentz, P.J., Miley, I.E., Steindl, S.J. and Rossmann, M.G. (1976) *J. Mol. Biol.* 102:759-779.

Wigley, D.B., Gamblin, S.J., Turkenburg, S.P., Dodson, E.J., Piontek, K., Muirhead, H., and Holbrook, J.J. (1992). The Structure of a Ternary Complex of an Allosteric Lactate Dehydrogenase from *B. stearothermophilus* at 2.5 Å Resolution, *J. Mol. Biol.* 223:317-335.

Wongsrichanalai, C., Pickard, A.L., Wernsdorfer, W.H. ve Meshnick, S.R., (2002), "Epidemiology of Drug-Resistant Malaria", *Lancet Infect Dis.*, 2: 209-18.

World Health Organization (WHO), (2009), World Malaria Report 2009, WHO Press,

Switzerland.

İNTERNET KAYNAKLARI

[1] www.saglik.com

[2] www.pdb.org.com

[3] www.web.inonu.edu.tr/~iozerol/rdurmaz/UygMolMikr/057.pdf

[4] www.ncbi.nlm.nih.gov

[5] www.qiagen.com

[6] www.mustafaaltinisik.org.uk

[7] www.scribd.com/doc/38426601/prokaryotlarda-gen-%c4%b0fades%c4%b0n%c4%b0n-duzenlenmes%c4%b0

[8] www.biochemistry.yonsei.ac.kr

[9] www.qiagen.com/products/protein/patentandlicensinginformation.aspx

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi 03.06.1981

Doğum yeri İstanbul

Lise 1996-1999 Fatih Kız Lisesi

Lisans 2004-2008 Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fak.
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Yüksek Lisans 2008-2010 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik Anabilim Dalı

Çalıştığı kurum(lar)

2007-2010 Acıbadem Hastanesi, Laboratuvar Teknisyeni,