

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PLASMODIUM VIVAX*'IN LAKTAT DEHİDROGENAZ
ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN İFADE EDİLEREK
İLGİLİ PROTEİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
ANALİZLERİNİN YAPILMASI**

ABDULLAH ASLAN

Tez Yöneticisi:
Yrd. Doç. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
ELAZIĞ, 2006

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PLASMODIUM VIVAX*'IN LAKTAT DEHİDROGENAZ
ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN İFADE EDİLEREK
İLGİLİ PROTEİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
ANALİZLERİNİN YAPILMASI**

ABDULLAH ASLAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez,..... tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile başarılı / başarısız olarak değerlendirilmiştir.

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Dilek Turgut-Balık

Üye: Doç.Dr. Ökkeş Yılmaz

Üye: Doç.Dr. Fikret Karataş

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

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın yürütülmesi esnasında gereken her türlü desteği sağlayan danışman hocam Sn. Yrd. Doç. Dr. Dilek TURGUT-BALIK'a, proje olarak yürütülen bu yüksek lisans tez çalışmasına maddi destek sağlayan TÜBİTAK ve FÜBAP'a teşekkür ederim.

Bana her konuda destek olan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	I
ŞEKİLLER LİSTESİ	IV
TABLolar LİSTESİ	V
KISALTMALAR VE SİMGELER	VI
ÖZET	VIII
ABSTRACT	IX

BÖLÜM 1 GİRİŞ	1
---------------------	---

1.1 Sıtma	1
1.2 Sıtmanın Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar	2
1.3 <i>Plasmodium vivax</i> 'ın Laktat Dehidrogenaz Enzimi	6

BÖLÜM 2 MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal	9
2.1.1 Kimyasal Maddeler ve Enzimler	9
2.1.2 İfade Vektörü	9
2.1.3 <i>Escherichia Coli</i> Soyları	9
2.1.4 Bakteriyolojik Gelişim İçin Besiyerleri	10
2.1.5 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar	11
2.1.6 Primerler	13
2.2. Metod	13
2.2.1 Plazmid DNA İzolasyonu	13
2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	14
2.2.3 Agaroz Jel Elektrophorezi	14
2.2.3.1 Etidyum Bromür ile Boyanan Agaroz Jel Elektrophorezi	14
2.2.3.2 Kristal Viyole ile Boyanan Agaroz jel Elektrophorezi	15
2.2.4 DNA'nın Jelden Geri Kazanılması	15
2.2.5 <i>PvLDH</i> Geninin Alt Klonlaması ve İfadesi	15
2.2.5.1 PCR ile C Terminaline 6-Histidin Eklenmesi	15

2.2.5.2 Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile DNA'nın Kesilmesi	16
2.2.5.3 Klonlanacak olan DNA ve Vektör DNA'sının Birleştirilmesi	16
2.2.5.4 Kalsiyum Klorür Etkileşimi ile Kompetant <i>E.coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması	17
2.2.5.5 Transformasyon	17
2.2.5.6 Koloni PCR	17
2.2.6 PvLDH Enziminin Analizi	18
2.2.6.1 PvLDH Enziminin Aktivitesinin Tayin Edilmesi	18
2.2.6.2 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi	19
2.2.6.3 PvLDH Enziminin Saflaştırılması	19
2.2.6.4 Western Blot ile PvLDH'ın PfLDH'ına Olan Benzerliğinin Test Edilmesi	20
BÖLÜM 3 BULGULAR VE TARTIŞMA	21
3.1. PvLDH Geninin Alt Klonlamasının Yapılması ve Proteinin İfade Edilmesi	21
3.1.1 PCR ile C Terminaline 6- Histidin Amino asidinin İlave Edilmesi	21
3.1.2 PvLDH Geninin <i>E. coli</i> JM105 Soyunda İfade Edilmesi	22
3.1.2.1 IPTG İndüklemesi ve PvLDH Proteininin İfadesindeki Rolü	23
3.1.2.2 Farklı IPTG Konsantrasyonunun PvLDH Enzim Aktivitesine Etkisinin Test Edilmesi	24
3.1.2.3 Farklı IPTG Konsantrasyonunun Hücre Yoğunluğuna Etkisi	26
3.2 PvLDH Enziminin Saflaştırılması	27
3.2.1 PvLDH Enziminin Denatüre Edici Şartlar Altında QIAGEN Ni-NTA Spin Kit Kullanılarak Saflaştırılması	27
3.2.2 PvLDH Enziminin Doğal Şartlar Altında QIAGEN Ni-NTA Spin Kit Kullanılarak Saflaştırılması	29
3.2.2.1 QIAGEN Ni-NTA Spin Kit ile PvLDH Enziminin Saflaştırılması..	29
3.2.2.2 QIAGEN Ni-NTA Agaroz ile PvLDH Enziminin Saflaştırılması	38
3.3 Saflaştırılan PvLDH Enziminin Aktivitesinin Tayin Edilmesi	41
3.4 PvLDH ve PfLDH Proteinleri Arasındaki Benzerliğin İmmünolojik Olarak Test Edilmesi	43

BÖLÜM 4 SONUÇ	44
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 Antimalarial ilaç etki bölgeleri ve <i>Plasmodium falciparum</i> 'un bir alyuvar içerisindeki trofozoit (bir sporozoon'un ergin evresi) safhası	6
Şekil 3.1 Pv7 ve Pv15 kullanılarak gerçekleştirilen PCR örnekleri	21
Şekil 3.2 Koloni PCR sonrası DNA bantlarının jelde görüntülenmesi	22
Şekil 3.3 PvLDH'ın üretildiğini gösteren ifade jeli	23
Şekil 3.4 Kültür ortamına IPTG ilavesi ile PvLDH enzim üretiminin teşvik edilmesi	24
Şekil 3.5 Değişen IPTG konsantrasyonu ve süreye göre spesifik PvLDH aktivite ölçüm grafiği	25
Şekil 3.6 Denatüre edici şartlar altında kit ile saflaştırılmış PvLDH proteininin SDS-PAGE ile analizi	28
Şekil 3.7 Denatüre edici şartlar altında kit ile saflaştırılmış PvLDH proteininin SDS-PAGE ile analizi	30
Şekil 3.8 Lizis tamponunda 15 mM imidazol kullanılan denemenin SDS-PAGE analiz sonucu	32
Şekil 3.9 Lizis tamponunda 15 mM, yıkama tamponunda 30 mM imidazol kullanılan denemenin SDS-PAGE analiz sonucu	33
Şekil 3.10 Yıkama tamponunda 400 mM NaCl kullanılan denemenin SDS-PAGE analiz sonucu	34
Şekil 3.11 Lizis tamponunda 5 mM, yıkama tamponunda 10 mM imidazol kullanılan denemenin SDS-PAGE analiz sonucu	35
Şekil 3.12 Yıkama tamponunda 1 mM NaCl kullanılan denemenin SDS-PAGE analiz sonucu	36
Şekil 3.13 Lizis tamponunda 20 mM merkaptoetanol kullanılan denemenin SDS-PAGE analiz sonucu	37
Şekil 3.14 Yıkama tamponunda % 1 Triton x-100 kullanılan denemenin SDS-PAGE analiz sonucu	38
Şekil 3.15 Ni-NTA agaroz kullanılarak yapılan denemenin SDS-PAGE analiz sonucu	39
Şekil 3.16 Ni-NTA agaroz kullanılarak yapılan denemenin SDS-PAGE analiz sonucu	41
Şekil 3.17 Western blotlama ile PvLDH'ın membrandaki görüntüsü	43

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1 Antimalarial kemoterapi için hedefler	5
Tablo 3.1 Değişen IPTG konsantrasyonu ve süreye göre spesifik PvLDH aktivite ölçüm sonuçları	25
Tablo 3.2 Değişen IPTG konsantrasyonu ve süreye göre hücre yoğunluklarının ölçümü	26
Tablo 3.3 Denatüre edici şartlar altında saflaştırılan PvLDH enziminin aktivitesinin ölçülmesi	29
Tablo 3.4 PvLDH enziminin saflaştırılmasında Ni-NTA Spin Kit tampon çözeltisinde yapılan değişiklikler	31
Tablo 3.5 Ni-NTA Spin kit ile saflaştırılan PvLDH enziminin aktivitesinin ölçülmesi	42

KISALTMALAR VE SİMGELER

Adenin	A
Adenozin trifosfat	ATP
Amino asit	aa
Aspartik asit	Asp
Asparagin	Asn
3-asetilpiridin adenin dinükleotit	APAD
Baz çifti	bp
Deoksiribonükleik asit	DNA
Deoksiribonükleotid trifosfat	dNTP
3,3'-Diaminobenzidin	DAB
Dihidropterat sentetaz	DHPS
Dihidrofolat redüktaz	DHFR
Distile su	dH ₂ O
1-deoxy-D-zylulose 5-phosphate	DOXP
Dünya sağlık örgütü	WHO
Etilendiamintetra asetik asit	EDTA
Guanin	G
Glutamik asit	Glu
Hemoglobin	hem
Histidin	His
Isopropil-B-D-thiogalactopyranosid	IPTG
Kilo dalton	kDa
Kristal viyole	CV
Laktat dehidrogenaz	LDH
Lisin	Lys
Litre	l
Mikrolitre	µl
Miliamper	mA
Mililitre	ml
Milimolar	mM
Molar	M

Nickel-Nitrilotriasetik asit	Ni-NTA
Nikotinamid adenin dinükleotit	NAD ⁺
NNN'N' - Tetramethilenethilendiamin.....	TEMED
Phosphate buffered saline	PBS
Pikomol	pmol
<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Pf</i>
<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Pv</i>
<i>Plasmodium falciparum</i> laktat dehidrogenaz enzimi	<i>Pf</i> LDH
<i>Plasmodium vivax</i> laktat dehidrogenaz enzimi	<i>Pv</i> LDH
Polimeraz zincir reaksiyonu	PCR
Sample amplification buffer	SAB
Serin	Ser
Sodyum dodesil sülfat	SDS
Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi	SDS-PAGE
Trikarboksilik asit	TCA
Triptofan	Trp
Tris-Asetat-EDTA	TAE
1,1,1-Trichloro-2,2 bis (p-chlorophenyl) ethane	DDT
Ultraviyole	UV
Ünite	ü

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***PLASMODİUM VIVAX*'IN LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN İFADE EDİLEREK İLGİLİ PROTEİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE ANALİZLERİNİN YAPILMASI**

Abdullah ASLAN

Fırat Üniversitesi

Fen Bilimleri enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

2006, sayfa : 50

Sıtma etkeni olan *Plasmodiumlar*'ın mevcut antimalarial ilaçlara karşı direnç kazanmaları yeni ve etkili antimalarial ilaçların geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Bu tezde *Plasmaodium vivax*'ın laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen C terminaline 6 histidin amino asidi ilave edilerek çoğaltılmış ve pKK223-3 ifade vektörüne aktararak genin *E. coli*'de ifadesi yapılmıştır. Üretilen bu protein Ni-NTA kit ve Ni-NTA agaroz kullanılarak saflaştırılmış ve kinetik olarak analiz edilmiştir. *PfLDH*'ına karşı üretilen bir antikor, kinetik olarak analiz edilen saf *PvLDH*'ına karşı test edilmiştir ve sonuçta iki proteinin de oldukça benzer olduğu ve *PvLDH*'ın *PfLDH* antikoruna ile reaksiyon verdiği gözlenmiştir. Bu benzerliğe dayanarak *PfLDH* enzimi üzerinde yeni antimalarial ilaç bulma yönünde yapılan çalışmaların, saf olarak elde edilen *P. vivax* LDH'ı kullanılarak da yapılabileceği ve benzer sonuçlar alınacağı ümit edilmektedir. Sonuç olarak türlerden biri üzerinde etkili olacak olan bir ilacın geliştirilmesi durumunda aynı ilacın diğer türler üzerinde de etkili olabileceği beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: Sıtma, *Plasmodium vivax*, laktat dehidrogenaz, ifade, saflaştırma.

ABSTRACT
MASTER THESIS

**EXPRESSION OF THE GENE CODING ENZYME LACTATE DEHYDROGENASE
FROM *PLASMODIUM VIVAX* PURIFICATION OF THE RELATED PROTEIN AND
ITS ANALYSIS**

Abdullah ASLAN

Firat University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

2006, Page : 50

Increasing resistance of *Plasmodium* against currently available antimalarials necessitates development of new and effective drugs. In this thesis; gene encoding lactate dehydrogenase from *Plasmodium vivax* was amplified by adding 6 histidines to the C-terminal of the enzyme prior to expression of the protein in the expression vector pKK223-3, in *E. Coli*. The overproduced protein was then purified by using Ni-NTA Spin kit and Ni-NTA agarose and analysed kinetically. An antibody produced against *Pf*LDH was tested against this kinetically analysed pure *Pv*LDH protein. It was shown that two proteins were similar enough that *Pv*LDH reacted with *Pf*LDH antibody. It is expected that the drug design studies applied on *Pf*LDH are also made applicable on *Pv*LDH after obtaining pure *Pv*LDH protein. As a result it is expected that, if we develop one antimalarial against one at the *Plasmodium* species would work against other species too.

Keywords: Malaria, *Plasmodium vivax*, Lactate dehydrogenase, Expression, Purification.

1 GİRİŞ

1.1 Sıtma

Sıtma, anofel cinsi sivri sineklerin kan emerken taşıdıkları sporozoitleri konukçu canlıya transferiyle bulaşan bir enfeksiyon hastalığıdır. *Plasmodium* türlerinden; *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Plasmodium ovale* (*P. ovale*) ve *Plasmodium malariae* (*P. malariae*) türleri insanda sıtmaya sebep olmaktadır. Sıtmanın karakteristik belirtileri olarak titreme ile beraber yüksek ateş görülmekte ve tedavi edilmedikçe bu durum 48 saatte bir tekrar etmektedir [1]. *P. vivax*, *P. falciparum* kadar tehlikeli ve öldürücü değildir; buna rağmen insan sağlığı üzerinde büyük olumsuz etkiler oluşturmakta ve enfekte ülkelerde ekonomik yönden çok büyük zararlara yol açmaktadır [2]. *P. vivax* daha çok sıcak ve tropik bölgelerde enfeksiyona neden olmakta ve *Plasmodium* türleri içerisinde tüm dünyada en geniş coğrafi yayılım göstermektedir. *P. falciparum*, Afrikada ve Güneydoğu Asyanın büyük bir bölümünde yaygındır [3]. *P. vivax*, Tropikal Afrika, Asya ve Güney Amerikada yaygındır [4]. *P. ovale* yalnızca Batı ve Pasifik yerlilerinde enfeksiyon oluşturur. *P. malariae* olgusuna ise pek rastlanılmamaktadır [3].

Bu bilgiler ışığında sıtma, artık günümüz insanlarını hızla tehdit eden önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Dünya nüfusunun % 40'dan fazlası sıtmaya yakalanma riskinin olduğu yerlerde yaşamaktadır. Sıtmanın geniş bir alana yayılmış olması ve her geçen gün bu hastalıktan ölen insan sayısının artış göstermesi, tehlikenin boyutunun ne derece önemli olduğunu göstermektedir [5]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre yüz yılı aşkındır sıtmayı kontrol altına almak için gösterilen çabalara rağmen gelişmekte olan ülkelerde sıtma en önemli sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Her yıl sıtmadan 1 milyondan fazla insan ölmekte ve 107 ülkede yaşayan 3.2 milyar insanın çoğu risk altında bulunmaktadır. Bununla birlikte Afrikanın Alt Sahara bölgesinin büyük çoğunluğunda beş yaş altı çocukların % 90'ı sıtmadan hayatını kaybetmektedir [6,7].

Ülkemizde 20. yüzyılın ortalarına kadar çok sayıda insan sıtmaya yakalanmış ve sıtmadan ölmüştür. Cumhuriyet'in ilanına kadar ülkede ne kadar sıtma vakasının bulunduğu kayıtlarda tam olarak gösterilememiştir. 1926 yılında bu hastalık için dikey bir örgütlenme oluşturularak yoğun bir çalışmaya girilmiştir. 1940'lı yıllarda DDT'nin de kullanılmaya başlanması, sağlık çalışanları ve halkın bu konuda duyarlı olması sonucunda 1970 yılında saptanan olgu sayısı yalnızca 1.260 olmuştur. Tüm bu çalışmalara rağmen sıtmaya verilen önemin zamanla azalması nedeniyle, bugün istenilen düzeylerin üzerinde vaka tespit edilmektedir. Eğer gerekli önlemler alınmazsa 2000'li yıllarda da sıtma, Türkiye için önemli bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkacaktır [8]. 2000

yılında yapılan araştırma sonuçlarına göre GAP bölgesi nüfusu toplam Türkiye nüfusunun %9,7'sini oluşturmakta ve sıtma, bu bölgenin en önemli sağlık problemi haline gelmektedir [9].

Bunun yanında sıtma etkeni olan *Plasmodium*'ların antimalarial ilaçlara karşı direnç kazanmaları, sıtmanın tehlike boyutunu daha ileri aşamalara götürmektedir. *P. falciparum* gibi *P. vivax*'ında var olan antimalarial ilaçlara karşı direnç kazanmış olması her iki tür içinde yeni ilaçların geliştirilmesini gerekli kılmıştır [2]. Parazitlerin metabolik yollarında kullandıkları enzimler, yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmalarının ilk hedeflerinden birisidir. *Plasmodium*'un glikolitik enzimleri hem yeni antimalarial ilaçlar için hedef moleküller hem de hastalığın teşhisinde kandaki parazit düzeyini gösteren birer indikatör olarak tanımlanmıştır [10,11,12]. Bu amaçla ilk olarak *P. falciparum*'un laktat dehidrogenaz enzimi hedef olarak seçilmiştir. Bu enzim sıtma parazitin yaşam döngüsü için gereklidir [13]. Yapılan araştırmalar bu enzim aktivitesinin önlenmesi ile parazitin yaşamının sonlandırılmasının mümkün olacağını göstermektedir [14].

Yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmalarının uygulanabilmesi amacı ile LDH geni *P. falciparum* soyları olan KI ve PF FCPR'den klonlanmış [15], gen ifadesi yapılmış [16] ve enzimin üç boyutlu yapısı belirlenmiştir [17]. *P. falciparum* LDH enzimini kodlayan genin klonlanmasından sonra *P. vivax* Belem soyu (Fransa) genomik DNA'sından laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen izole edilmiş, klonlanmış ve nükleotit dizisi belirlenmiştir [18]. Bu yüksek lisans tez çalışmasında ise, *P. falciparum* enzimi üzerinde yapılan yapısal ve kinetik çalışmaların, yeni antimalarial ilaç tasarım çalışmalarında kullanılmak üzere *P. vivax* LDH enzimi üzerinde de yapılmasını sağlamak amacı ile *P. vivax* LDH enziminin ifadesi yapılarak ilgili proteinin saflaştırılması ve LDH enzim aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

1.2 Sıtmanın Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar

Günümüzde var olan antimalarial ilaçlara karşı direnç artışı göz önünde tutulduğu zaman yeni antimalariallara duyulan ihtiyaç hızla artmaktadır [19]. Mevcut ilaçlar üzerinde, küçük değişikliklerle yapılan yeni düzenlemeler sonucunda yeni hedeflere karşı etkili yeni antimalarial ilaçlar geliştirilebilir. Yapılan bu yeni düzenlemeler, gelecekte önemli yeni antimalarial ilaçların geliştirilmesine ışık tutacaktır. Ayrıca yeni antimalarial ilaç keşfi için kemoterapik ve potansiyel yeni hedefler son yıllarda detaylı olarak belirtilmiştir [19,20,21]. Günümüze kadar geliştirilen temel antimalarial ilaçlar aşağıda belirtilmiştir:

Kininler

Kininler ve onlarla bağlantılı (aynı türevli) aril alkollerin kökeni *Cinchona* kabuğunun bir bileşeni olan kinindir. Bu antimalariaların ilk kullanımı 17. yüz yılda olmuştur [22]. Bu ilaçlara örnek olarak 4-aminokin, klorokin verilebilir. Bu ilaçların hemoglobinin yıkımı esnasında oluşan serbest hem bileşiğinin sıtma pigmenti olan hemozoin'e dönüşümünü engellediği belirtilmiştir [23,24]. Bu reaksiyonda, hemoglobin parazitin erken şizont evresinde besin kofuluna taşınmakta, burada küçük peptitlere ayrılmakta ve sonra parazitin sitoplazmasına taşınmaktadır. Hemoglobinin yıkımı esnasında hem bileşiği serbest kalmakta ve oksidatif bir mekanizma ile hemozoin olarak adlandırılan hücre içi sıvıda çözünmeyen toksik kristallere dönüşmektedir [25]. Dolayısıyla bu ilaçlar; "hem" polimerizasyonu, oksitlenme, glutatyon bağımlı hem yıkımı gibi reaksiyonları inhibe etmektedir [26].

Artemisininler

Birkaç yarısentetik artemisinin türev aktif bileşimi, Çin'de 'qinghao' adı verilen ve geleneksel ateş (sıcaklık) tedavisi için kullanılan *Artemisia annua* bitkisinden elde edilmiştir. Bu ilaçlar (artemeter, arteeter, artesunat), parazitin seksüel evresindeki gametositlere karşı çok hızlı etkilidirler [18].

Antifolatlar

Orjinleri hakkında pek fazla bilgi bulunmamaktadır. Bu ilaçlar (pirimetamin, sülfadoksin) gebelikte özellikle malaryal tedavide folat metabolizmasında rol almaktadır. Folat metabolizmasında; pirimetamin, dihidrofolat redüktaz (DHFR) enziminin inhibitörü, sülfadoksin ise dihidropterat sentetaz (DHPS) enziminin inhibitörü olarak görev yapmaktadır. Ayrıca bu ilaçlar profilaktik amaçlı olarak da kullanılmaktadır [19].

Atovakon-Proguanil

Son zamanlarda tedavi ve *P. falciparum*'a karşı korunma amaçlı olarak kullanımı uygun görülen bir bağlı bileşim atovakon ve proguanil'dir. Atovakon, mitokondriyal elektron taşınımında sitokrom c redüktaz enzimini inhibe etmektedir. Fakat bu etkiyi tam olarak proguanil ile birliktelik kurulduğu zaman göstermektedir. Bu birliktelik reaksiyonu hakkında pek fazla bilgi olmamasına rağmen bazı verilere göre proguanil ve atovakon mitokondriyal membranın çöküşünü sağlamaktadır. Ayrıca koruma amaçlı uygulamalar için proguanil-atovakon aktivitesi ile

eritrositlerin infeksiyonundan önce parazitlerin yaşam evresinin kontrol altına alınabileceği belirtilmiştir [27].

Glikoliz İnhibitörleri

Sıtma parazitleri metabolizmaları için gerekli enerjiyi glikoliz ile sağlamaktadırlar. İnsan LDH'ı ile parazit (*P. falciparum*) LDH'ının yapısal farklılığı nedeni ile insan LDH'ına karşı etkili olmayan fakat parazit LDH'ına etki eden spesifik inhibitörlerin üretilmesi amaç edinilmiştir Gossipol, pamuk çekirdeğinden izole edilen ve *P. falciparum* LDH enziminin inhibisyonunda etkili olan bir maddedir. Ayrıca *P. falciparum*'un LDH enziminden başka iki glikolitik enzimi daha çalışılmıştır. Bu enzimler; fruktoz 1,6 bifosfat aldolaz ve triozefosfat izomeraz'dır. Bu iki enzimin yapısı da muhtemelen memeli ve parazitte farklılık göstermektedir. Dolayısıyla bu iki enzim de LDH enzimi gibi spesifik inhibitör tasarımı için temel oluşturmaktadır [27].

Tablo 1'de sıtmanın tedavisinde etkili olan hedefler ve geliştirilen yeni antimalarialar belirtilmiştir [28].

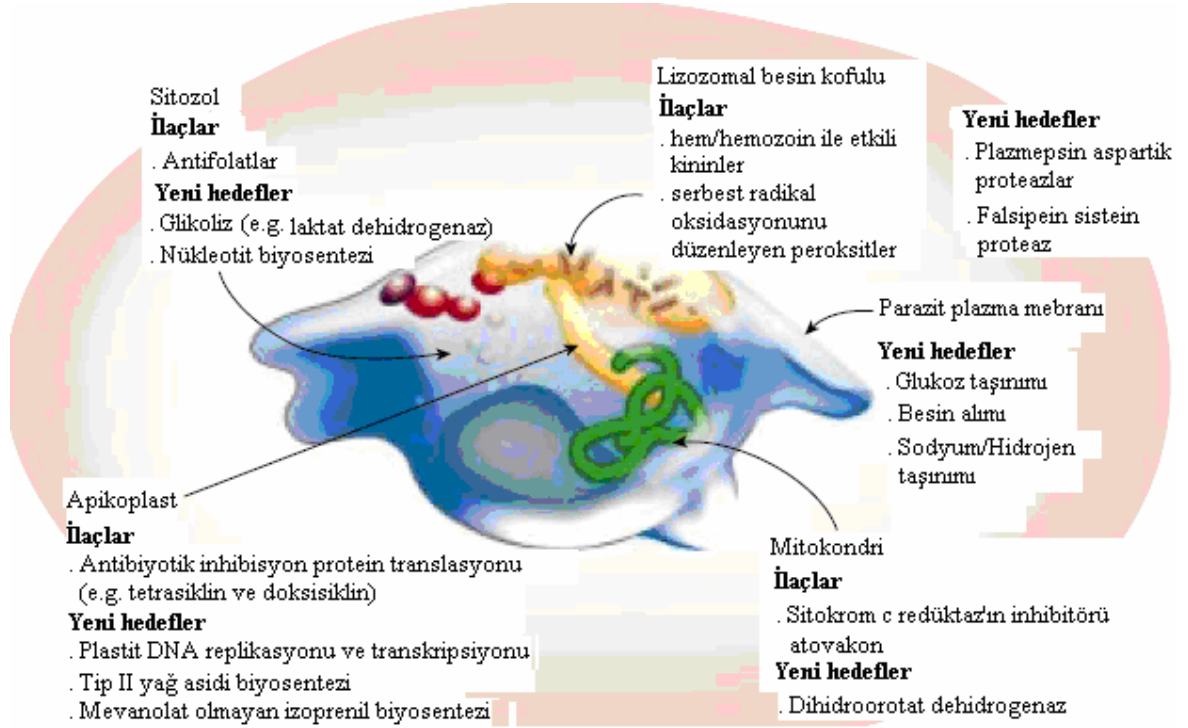
Tablo1.1 Antimalarial kemoterapi için hedefler

Hedefbölge	Mekanizma	Hedef molekül	Örnek ilaçlar	
			Var olan ilaçlar	Yeni ilaçlar
Sitozol	Folat metabolizması	Dihidrofolat redüktaz	Primetamin, proguanil	Klorproguanil
		Dihidropterat sentetaz	Sülfadoksin, dapson	
	Glikoliz	Timidilat sentetaz		5-flororotat
		Laktat dehidrogenaz		Gossipol türevleri
		Peptit deformilaz		Aktinonin
	Protein sentezi	Sıcak-şok protein 90		Geldanamisin
	Glutasyon metabolizması	Glutasyon redüktaz		Enzim inhibitörleri
	İşaret transdüksiyon	Protein kinazlar		Oksindol türevleri
	Bilinmiyor	Kalsiyum-ATPaz	Artemisininler	
Parazit	Fosfolipit sentezi	Kolin transporter		G25
Mebran	Mebran taşıyıcı	Tek kanallar	Kininler	Dinükleozit dimerleri
		Hekzos taşıyıcı		Hekzos türevleri
Besin kofalı	Hem polimerizasyonu	Hemozin	Klorokin	Yeni kuinolinler
	Hemoglobin hidrolizi	Plazmepsinler	Kininler	Proteaz inhibitörleri
		Falsipeinler		Proteaz inhibitörleri
	Serbest radikal dönüşümü	Bilinmiyor	Artemisininler	Yeni peroksitler
Mitokondri	Elektron taşıyıcı	Sitokrom-c oksidoredüktaz	Atovakon	
Apikoplast	Protein sentezi	Apikoplast ribozom	Tetrasiklinler, klindamisin	
	DNA sentezi	DNA giraz		
	Transkripsiyon	RNA polimeraz	Rifampin	
	Tip II yağ asidi biosentezi	FabH		Tiyolaktomisin
		FabI/ENR		Triklolan
	İzoprenoid sentezi	DOXP redüktiozomeraz		Fosmidomisin
	Protein farnesilasyonu	Farnesil transferaz		Peptidomimetiks
Hücreler arası	Eritrosit invazyonu	Subtilisin serin proteazlar		Proteaz inhibitörleri

Antibiyotikler

Yaygın antibiyotikler bakteriyel protein sentezine karşı etkilidirler, bunlardan tetrasiklin, doksisisiklin ve klindamisin protein biyosentezine etki etmekte ve böylece parazitin gelişimi engellenmektedir. Kinin tetrasiklin ve kinin doksisisiklin Güney doğu Asya’da birlikte kullanılmaktadır; fakat Afrika’da kullanımları sınırlıdır, çünkü her iki antibiotik de sekiz yaş altı çocuklar için sakıncalıdır. Klindamisin’in ise öteki antimalarialarla birlikte kullanımı bazı durumlarda tavsiye edilmektedir [19].

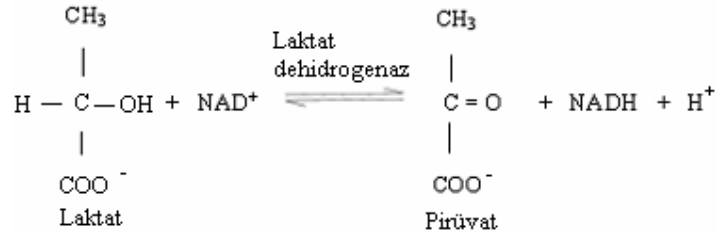
Şekil 1’de sıtmanın tedavisinde kullanılan antimalarial ilaçların etki bölgelerine göre farklı mekanizmalarda rol oynadıkları görülmektedir [19].



Şekil 1.1 Antimalarial ilaç etki bölgeleri ve *Plasmodium falciparum*’un bir alyuvar içerisindeki trofozit (bir sporozoon’un ergin evresi) safhası

1.3 *Plasmodium vivax*’ın Laktat Dehidrogenaz Enzimi

Birçok mikroorganizma ve egzersiz halindeki kaslarda olduğu gibi, yeterli oksijeni bulunmayan bazı yüksek organizma hücrelerinde pirüvat laktata çevrilir. Pirüvatın NADH tarafından indirgenerek laktatın oluşumu, laktat dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenir. Bu reaksiyon aşağıdaki gibi şematize edilmiştir: [29]



LDH, molekül ağırlığı 140.000 dalton olan tetramerik bir yapıya sahiptir. Enzim iki farklı altbirimin iki farklı konfigürasyonlarında dizilimi sonucunda oluşan 5 izoenzime sahip olup LDH-1 (H₄), LDH-2 (H₃M), LDH-3 (H₂M₂), LDH-4 (HM₃) ve LDH-5 (M₄) formları olarak ifade edilmektedir [30]. Bu izoenzimler kimyasal kompozisyon, kinetik ve immünolojik özellikleri ile birbirinden ayırdedilebilirler [31]. Özellikle H₄ ve M₄ formları farklı kinetik özelliklere sahiptir [30]. H₄ formu kalp ve karaciğer gibi aerobik dokularda bol bulunurken, M₄ formu iskelet kası gibi anaerobik dokularda bol bulunmaktadır [31].

Bu tezde *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen yeni antimalarial ilaçların geliştirilmesini mümkün kılmak için hedef gen olarak belirlenmiştir.

Laktat dehidrogenaz enzimi insan sıtma parazitlerinin karbohidrat metabolizmasında önemli bir rol oynar. Parazit, bu enzim sayesinde glikolizin son ürünü olan pirüvik asidi dönüşümlü bir reaksiyonla laktik aside çevirmektedir. Dolayısıyla bu enzimin inhibisyonu parazitin yaşamının sonlandırılmasını sağlayacaktır [14]. Ancak aynı enzim hem insanda hem de parazitte bulunduğu için insan LDH'sinin etkilenmeden kalması büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla *PfLDH*'ın elektroforetik, kinetik ve yapısal olarak insan LDH'ından farklı olduğu gösterilmiş olup bu farklılıklar aşağıda belirtilmiştir:

- i) İnsan LDH'ından farklı olarak *PfLDH* yüksek pirüvat konsantrasyonunda inhibe olmamaktadır [13].
- ii) İnsan M₄-LDH'ından farklı olarak, *PfLDH* 3-asetilpiridin adenin dinükleotit (APAD⁺) adlı koenzimi 0,5 M laktat konsantrasyonunda daha hızlı kullanabilme yeteğine sahiptir [12].
- iii) *PfLDH*'ın gossilik nitril diasetat ve türevleri tarafından inhibisyona insan LDH'ından daha duyarlı olduğu bildirilmiştir [14].
- iv) İnsan M₄-LDH'ından farklı olarak *PfLDH*, aktif bölge halkasında 5 ilave amino asit (aspartik asit, lizin, glutamik asit, triptofan, asparagin) içermektedir [32].

Sıtma parazitleri metabolizmaları için gerekli olan ATP ihtiyacını glikoliz ile sağlarlar. Sıtma parazitleri eşeysiz faz süresince (konukçudaki eritrositik döngüler arasındaki dönem) çok hızlı bir şekilde çoğalmaları gerektiğinden oldukça yüksek düzeyde enerjiye ihtiyaç duyarlar. Hem sıtma parazitlerinde hem de yetişkin insan eritrositlerinde ATP'nin temel metabolik kökeni glikolizdir [33], çünkü sıtma parazitleri ve konukçu oldukları memeli eritrositleri, etkin bir sitrik asit döngüsü ve aktif bir mitokondriden yoksundurlar [10,34]. Kullanılan glukozun hemen hemen tamamı glikolizde kullanılmak üzere oluşturulur ve neredeyse tamamı laktik asit oluşumu için metabolize edilir [10,35]. *P. falciparum* sadece bir mitokondriye sahiptir, fakat henüz mitokondrinin metabolik rolü tam olarak açıklanamamıştır. *P. falciparum* ile infekte edilmiş

eritrositler, infekte olmamış eritrositlerden yaklaşık olarak 100 kat kadar fazla glukoz kullanırlar [36]. Bu verilerin, anti-glikolitik inhibitör kökenli antimalarialların ortaya çıkarılması yönünde yapılacak çalışmalara katkı sağlayabileceği tahmin edilmektedir.

*Pf*LDH geni ilk olarak 1993 yılında Bzik ve Fox tarafından Honduras I olarak adlandırılan soydan izole edilmiştir [32]. Daha sonra aynı gen K1 (Tayland) ve *PF* FCBP (Kolombiya) soylarından izole edilmiş ve klonlanmıştır [15]. Yapılan karşılaştırmalar neticesinde izole edilen tüm bu soyların LDH geninin nükleotid dizilerinin aynı olduğu belirlenmiştir. Üç soy itibarıyla yapılan bu değerlendirmenin tüm soylar için genellenemeyeceği de bir gerçektir.

*Pf*LDH, amino asit dizisi bilinen diğer türlerin LDH'ları ile karşılaştırılmış ve *Bs*LDH ile %29, Köpek balığı LDH'ı ile %29, insan M4-LDH'ı ile %31, domuz LDH'ı ile %33, insan H4-LDH'ı ile %29 oranında amino asit düzeyinde benzerlik görüldüğü belirlenmiştir. Bu karşılaştırmalar yapılırken gözlenen en önemli farklılık *P. falciparum*'un LDH enziminde, insan LDH enziminden farklı olarak aktif bölgede Serin-108 ve Arjinin-109 amino asitleri arasında ilave 5 amino asidin (aspartik asit, lisin, glutamik asit, triptofan, asparagin) var olmasıdır [15]. Yapılan X ışını kristallografi çalışmaları; bu 5 amino asit ilavesinin enzim yüzeyinde bir yarık oluşturduğunu, insan LDH'ında ise aynı bölgede ilave 5 amino asit bulunmadığı için söz konusu bir yarığın oluşmadığını göstermiştir [17]. Bu bölge, çeşitli enzim inhibitörlerine yer sağlayacak bir potansiyele sahip olduğu için yeni antimalarial ilaç tasarımı hedef olarak seçilmiştir. [37]. *P. falciparum* LDH enzimini kodlayan genin klonlanmasından sonra *Plasmodium vivax* Belem soyu (Fransa) genomik DNA'sından laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen izole edilmiş, klonlanmış ve nükleotid dizisi belirlenmiştir [18].

P. falciparum ve *P. vivax* LDH genlerinin nükleotid dizileri karşılaştırıldığı zaman *Pf*LDH ve *Pv*LDH genlerinin nükleotid dizileri arasında %90 oranında bir benzerlik olduğu belirtilmektedir. Bu benzerliğe dayanarak; *Pv*LDH geninde de, *Pf*LDH geninde olduğu gibi aktif bölgede ilave 5 amino asitin bulunduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda *Pf*LDH enziminin yapısal ve kinetik özellikleri üzerinde yapılan çalışmaların, *Pv*LDH enzimi üzerinde de yapılabileceği ve benzer sonuçlar alınacağı ümit edilmektedir. Yapılan son bir çalışma bu fikri desteklemiştir. *Pv*LDH proteininin X-ışını kristallografisi ile yapı analizi ve bazı kinetik analizleri yapılmış ve bu yapı eşdeğeri olan *P. falciparum*'un proteininin yapısı ile karşılaştırılmıştır [2]. Her iki enzimin de aktif bölgeleri ve kofaktör bağlanma ceplerinin son derece benzer olduğu ve *Pf*LDH'da bulunan ilave 5 amino asitin, *Pv*LDH'da da enzim yüzeyinde bir yarık oluşturduğu gözlenmiştir. Yüksek orandaki bu benzerlikler dolayısıyla genel olarak geliştirilecek olan bir inhibitör ile her iki enzimin de engellenmesinin mümkün olacağı fikrini kuvvetlendirmiştir.

İlaç tasarım çalışmalarında proteinin fazlaca üretimi en önemli basamaklardan birisidir. Bu yüksek lisans tez çalışması, *PvLDH* geninin ifadesi yapılarak ilgili proteinin saf olarak bolca üretilerek yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmalarında kullanılmasını amaçlamaktadır.

2 MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Kimyasal Maddeler ve Enzimler

Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan *Taq* DNA polimeraz enzimi, tampon çözelti ve $MgCl_2$ solüsyonu Promega'dan, USA; *pfu* turbo DNA polimeraz enzimi ve tampon çözeltisi Stratagene'den, USA; DNA'nın kesilmesi için kullanılan *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon enzimleri ve tampon çözeltileri, ligasyon için kullanılan T_4 DNA ligaz enzimi ve tampon çözeltisi, Promega'dan, USA; plazmid DNA izolasyonunda kullanılan QIAprep Spin Miniprep Kit, *PvLDH* enziminin saflaştırılmasında kullanılan Ni-NTA Spin Kit ve Ni-NTA Agaroz, PCR ürünlerinin jelde koşturulduktan sonra saflaştırılmasında kullanılan QIAquick Gel Extraction kit, QIAGEN'den, Almanya, temin edilmiştir. Agaroz jel elektroforezi sırasında DNA bantlarının molekül ağırlıkları ve konsantrasyonunun tayininde kullanılan Hyperladder I, Bioneer'dan, USA; Lambda DNA Hind III Digest Amersham-Pharmacia Biotech'ten, USA; sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi sırasında protein bantlarının molekül ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılan Low Molecular Weight (LMW) kalibrasyon kit Amersham-Pharmacia Biotech'ten, USA, temin edilmiştir.

Deneyisel çalışmalarda kullanılan diğer bütün kimyasallar BDH (Germany), Sigma (Germany), Bio-Rad (USA) ve Merck (UK)'ten temin edilmiştir.

2.1.2 İfade Vektörü

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

2.1.3 *Escherichia coli* Soyları

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

DH5α: { *supE44 ΔlacU69 (φ80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* }

2.1.4 Bakteriyolojik Gelişim İçin Besiyerleri

Çift Kuvvetli Yeast-Trypton (2x YT) Buyyon

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

Çift Kuvvetli Yeast-Trypton (2xYT) Agar

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

Minimal agar

2x Minimal Tuzlar	500 ml/l
% 3.3 Agar	500 ml/l
% 20 Glukoz	10 ml/l
% 20 MgSO ₄ .7H ₂ O	1 ml/l
% 0,1 Tiamin Hidroklorür	0,5 ml/l

2x Minimal Tuzlar

K ₂ HPO ₄	14 g/l
KH ₂ PO ₄	6 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g/l
Sodyum Sitrat	1 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g/l

Amfisilin

100 mg/ml stok solüsyonu hazırlanır (filtre ile sterilize edilir).

Isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside (IPTG)

20 mg/ml (filtre ile sterilize edilir).

2.1.5 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar

Agaroz jel için SAB (Sample Amplification Buffer)

Sükroz	4 g/10 ml
2 M Tris HCl	0,5 ml/10 ml
0.5 M EDTA	2 ml/10 ml
Bromofenol Mavisi	4 mg/10 ml

Kristal Viyole (CV) Solüsyonu

dH₂O ile 5 mg/ml stok solüsyonu hazırlanır. Hazırlanan solüsyon karanlık bir ortamda muhafaza edilir.

SAB + CV Solüsyonu

Gliserol	50 ml/l
Kristal Viyole	2 µg/ml

Bis-Tris Solüsyonu

0.02 M Bis-Tris	4,184 g/l
0.05 M KCl	3,725 g/l
pH: 6.0	

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)

50x TAE Tampon Çözeltisi (Tris-Asetat-EDTA)

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

dH₂O ile 1x TAE'ye seyreltilerek çalışmalarda kullanılır.

SDS-PAGE İçin 5x Tank (yürütme) Tamponu (5x Running Buffer)

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

dH₂O ile 1x Running buffer'a seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlanır ve çalışmalarda 5 defa aynı tampon kullanılabilir.

SDS-PAGE İçin Örnek Uygulama Tamponu (SAB: Sample Amplification Buffer)

% 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 Bromofenol Mavisi	0,005 g/10 ml

SDS-PAGE Sonrası Protein Boyama Solüsyonu

% 0,1 Coomassie Brilliant Mavisi	0,1 g/100 ml
% 40 Metanol	40 ml/100 ml
%10 Glasiyal Asetik Asit	10 ml/100 ml

SDS-PAGE Sonrası Boya Giderici (Destaining) Solüsyon

% 5 Metanol	5 ml/100 ml
% 7 Asetik Asit	7 ml/100 ml

Western Blot Transfer Tamponu

39 mM Glisin	2,93 g/l
48 mM Trizma Base	5,81 g/l
1,3 mM SDS	0,375 g/l
% 20 Metanol	200 ml/l

PBS (Phosphate Buffered Saline)

0,15 M NaCl	900 ml/l
0,1 M Na ₂ HPO ₄ (pH: 7.4)	100 ml/l

PBS Tween 20

PBS	1000 ml
Tween 20	2 ml

% 5'lik Süt tozu

Yağsız süt tozu	5 g
PBS Tween 20	100 ml'ye tamamlanır.

2.1.6 Primerler

Plasmodium vivax'ın laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan genin ifade edilerek ilgili proteinin saflaştırılması ve analizlerinin yapılması için MWG tarafından Almanya'da sentezlenmiş olan aşağıdaki primerler kullanılmıştır.

Pv7: 5'-GCC GAC CCG GAA TTC ATG ACG CCG AAA CCC AAA ATT GTG C-3'
EcoRI

Bu primer, *PvLDH*'ın 5'ucunun tamamlayıcısı olup, başında *EcoRI* restriksiyon enzimi kesim bölgesini taşımaktadır.

Pv15: 5'-TTT TCT GCA GTT AGT GAT GGT GAT GGT GAT GAA TGA GCG
CCT TCA TCC-3' *PstI*

Bu primer, *PvLDH*'ın 3'ucunun tamamlayıcısı olup, *PstI* restriksiyon enzimi kesim bölgesini taşımaktadır. *Pv15* primeri 6 histidin amino asidi ilave edilerek sentezlenmiştir. Böylece bu primerler kullanılarak *PvLDH* geni 6 histidin ilave edilmiş olarak PCR ile çoğaltılıp işaretlenecektir. İlave edilen bu dizi işaretlenmiş olan *PvLDH* geninin ifadesi sonrasında üretilecek olan *PvLDH* proteininin saflaştırılmasını kolaylaştırmış olacaktır.

2.2 Metod

2.2.1 Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid DNA içeren *E.coli* bakteri soyu 100 mg/ml amfisilin içeren çift kuvvetli (2x) YT agar besiyerinde geliştirilir. Seçilen kolonilerden bir tanesi steril bir kürdan yardımıyla 100 mg/ml amfisilin içeren 5 ml 2x YT buyyona aktarılır, bir gece 37°C'de ve 100 rpm'de inkübe edilir. 1,4 ml

bir gecelik kültür 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınır ve DNA Mini Prep Kiti kullanılarak izole edilir [38].

2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

*Pv*LDH enzimini kodlayan genin amplifikasyonu aşağıdaki reaksiyon şartlarında yapılmıştır.

10x <i>Pfu</i> DNA Polimeraz 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 dH ₂ O)
5'primeri (<i>Pv</i> 7)	1 µl (stok; 50 pmol/µl)
3'primeri (<i>Pv</i> 15)	1,22 µl (stok; 41 pmol/µl)
Kalıp DNA	1 µl
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	1 µl (stok; 2,5 ünite/µl)
Steril dH ₂ O	35,8 µl (son hacim 50 µl olacak şekilde)

Amplifikasyon, *Pfu* DNA Polimeraz enzimi ilave edilmeden önce 95°C'de 5 dakika, 72°C'de 5 dakika, enzim ilave edildikten sonra ise 94°C'de 1,5 dakika, 55°C'de 2 dakika, 72°C'de 2 dakika ve 25 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez sonrası jeldeki DNA bantlarının görüntülenmesi ve jelden saflaştırılması amacıyla bağli olarak iki farklı agaroz jel elektroforezi yapılmıştır:

2.2.3.1 Etidyum Bromür İle Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi

% 1 agaroz içeren 1x TEA tampon çözeltisi kaynatılır. Oda sıcaklığında 55-65°C'ye kadar soğutulur. Bu arada jelin döküleceği jel tepsisi hazırlanır, taraklar düzgün bir şekilde yerleştirilir. Jeli tepsiye dökmeden önce etidyum bromür ilave edilir (30 ml % 1'lik agaroz jel için 1,5 µl etidyum bromür). Jel tepsiye dökülür ve katılaşması beklenir. Katılaştıktan sonra tarak çıkartılır. Jel üzerindeki kuyucuklara yerleştirilecek olan DNA örneklerine 2 µl SAB ilave edilir. Elektroforez, rutin agaroz jeller için 40-60 mA, düşük erime noktalı jeller için 30-40 mA'de bromofenol mavisi yaklaşık olarak jelin 2/3'üne ulaşınca kadar sürdürülür. Jel ortamında DNA'lar moleküler ağırlıklarına bağli olarak bir ayırma tabi tutulurlar. Elektroforez sonrası DNA bantları 254-312 nm dalga boyunda UV (ultraviyole) transilluminatöründe görüntülenir. Etidyum bromür DNA'ya bağlanarak UV ışık altında floresan etki göstermektedir. Bu sayede çok düşük miktarlardaki DNA'nın bile varlığını belirlemek mümkün olmaktadır [39].

2.2.3.2 Kristal Viyole ile Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi

% 1 agaroz içeren 1x TAE tampon çözeltisi kaynatılır. Oda sıcaklığında 55-65°C'ye kadar soğutulur. Bu arada jelin döküleceği jel tepsiyi hazırlanır, taraklar düzgün bir şekilde yerleştirilir. Jeli tepsiye dökmeden önce son konsantrasyon 2 µg/ml olacak şekilde kristal viyole (CV) ilave edilir. Jel tepsiye dökülür ve katılaşması beklenir. Katılaştıktan sonra tarak çıkartılır. Jel üzerindeki kuyucuklara yerleştirilecek olan DNA örneklerine 2 µl SAB + CV ilave edilir. Elektroforez, 2 µg/ml kristal viyole içeren 1x TAE tampon çözeltisi ile 40-60 mA'de gerçekleştirilir. Elektroforez süresince DNA bantlarının ayırımı izlenir. Bantlar jelin 2/3'üne ilerleyinceye kadar elektroforez işlemine devam edilir. DNA bantları beyaz ışık kutusunda görüntülenir [40].

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 kullanılarak saflaştırılır [41].

2.2.5 PvLDH Geninin Alt Klonlaması ve İfadesi

Plasmodium vivax'ın laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan genin ifade edilerek ilgili proteinin saflaştırılması ve analizlerinin yapılması çalışmasında daha önceden klonlanmış olan PvLDH geni [18] bir vektörden bir başka vektöre (pKK223-3) aktararak alt klonlama işlemi yapılmış, PvLDH genini içeren pKK223-3 ifade vektörü de JM105 ve *E.coli* bakteri soylarına aktararak PvLDH geninin ifadesi yapılmış ve böylece PvLDH proteini elde edilmiştir.

2.2.5.1 PCR ile C Terminaline 6 Histidin Amino Asidinin Eklenmesi

PCR ile PvLDH geninin C terminaline 6 histidin amino asidi ilave edilip PvLDH geni işaretlenerek çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonu şartları aşağıda verilmiştir:

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 dH ₂ O)
5'primeri (<i>Pv</i> 7)	1 µl (stok; 50 pmol/µl)
3'primeri (<i>Pv</i> 15)	1,22 µl (stok; 41 pmol/µl)
Kalıp DNA	1 µl
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	1 µl (stok; 2,5 ünite/µl)
Steril dH ₂ O	35,8 µl (son hacim 50 µl olacak şekilde)

Amplifikasyon, *Pfu* DNA polimeraz enzimi ilave edilmeden önce 95°C’de 5 dakika, 72°C’de 5 dakika, enzim ilave edildikten sonra ise 94°C’de 1,5 dakika, 55°C’de 2 dakika, 72°C’de 2 dakika ve 25 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.5.2 Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile DNA’nın Kesilmesi

DNA örnekleri ve ifade vektörü pKK223-3, *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek birleştirmeye hazır yapışkan uçlar oluşturulmuştur. Reaksiyon şartları aşağıdaki gibidir:

	<u><i>PvLDH</i></u>	<u>pKK223-3</u>
DNA	30 µl	5 µl
10x Tampon H (enzim ile beraber verilmiştir)	4 µl	2 µl
<i>EcoRI</i> (stok 12 ünite/µl)	2 µl	2 µl
<i>PstI</i> (stok 10 ünite/µl)	2 µl	2 µl
Steril dH ₂ O	2 µl	9 µl
Toplam	40 µl	20 µl

Reaksiyon 37°C’de su banyosunda 1,5 saatte gerçekleştirilir. Daha sonra DNA örnekleri kristal viyole ile boyalı agaroz jelde koşuturur, jelde gözlenen DNA örnekleri QIAquick jel ekstraksiyon kiti kullanılarak jelden saflaştırılır [41].

2.2.5.3 Klonlanacak Olan DNA ve Vektör DNA’sının Birleştirilmesi (Ligasyon)

DNA örneklerinin konsantrasyonları dikkate alınarak değişik insert: vektör oranlarında ligasyonlar yapılmıştır. Ligasyon bileşenleri aşağıda verilmiştir:

	<u>1:3 oranı</u>	<u>1:1 oranı</u>	<u>3:1 oranı</u>
10x Ligasyon Tamponu	1µl	1µl	1µl
İnsert	0,7µl (33 ng)	2 µl (100 ng)	6 µl (300 ng)
Vektör	0,7µl (100 ng)	0,7µl (100 ng)	0,7µl (100 ng)
T4 DNA Ligaz (stok 3 u/µl)	1µl	1µl	1µl
Steril dH ₂ O	6,6 µl	5,3 µl	1,3 µl
Toplam	10 µl	10µl	10µl

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

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

E.coli hücreleri minimal agarda 37°C’de bir gece inkübe edilir. İnkübasyon sonrası tek bir koloni steril bir kürdan yardımı ile alınır, 5 ml 2 x YT buyyon içerisine konur ve 37°C’de çalkalamalı etüvde 100 rpm’de bir gece (ON) inkübe edilir. Bir gecelik kültürden 500 µl alınarak 250 ml’lik erlendeki 50 ml 2 x YT buyyona inoküle edilir. OD₆₀₀’deki hücre yoğunluğu 0,3-0,4 arasında bir değere ulaşınca kadar inkübe edilir. Kültür belirtilen yoğunluğa ulaşınca iki falkon tüpüne bölünür. 25 ml’lik kültürün her biri 5000 rpm’de 5 dakika boyunca 4°C’de santrifüjlenerek hücreler çöktürülür. Süpernatant dökülür. Pelet üzerine 25 ml CaCl₂ solüsyonu ilave edilerek çözülür, 30 dakika buz içerisinde bekletilir, bu süre içerisinde bir-iki kez çok yavaş bir şekilde karıştırılır. 5000 rpm’de 5dk 4°C’de santrifüj edilir. Bu aşamada tüpleri sarımsamaya dikkat edilir. Süpernatant dökülür, pelet 1ml CaCl₂ solüsyonunda çözülür ve buz içerisinde 1.5-2 saat bekletilir. Böylece kompetant hücreler hazırlanmış olur. Buz içerisinde bekletilen hücreler ya hemen transformasyonda kullanılır ya da sonra kullanılmak üzere sıvı nitrojen içerisinde gliserol stoku hazırlanarak -70°C’de saklanır [39].

2.2.5.5 Transformasyon

Ligasyonu yapılmış örneğin üzerine hazırlanan kompetant hücreden 200 µl ilave edilerek 30 dakika buzda bekletilir. Bu süre içerisinde ara sıra karıştırılır. Daha sonra 42°C’deki su banyosunda 90 saniye bekletilerek sıcak şoku uygulanır. Hemen 300 µl 2 x YT buyyon tüplere ilave edilir. Çok iyi bir şekilde karıştırılır. 30 dakika 37°C’de etüvde inkübasyona bırakılır ve daha sonra 100 mg/ml amfisilin içeren 2 x YT agar’a ekim yapılır [39] ve 37°C’de bir gece bekletilir.

2.2.5.6 Koloni PCR

Alt klonlama sonrası besiyeri üzerinde gelişen bir koloniye steril bir kürdan yardımı ile dokunulur ve kürdan, içerisinde 50 µl steril dH₂O bulunan bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. Koloni kalıntısı kürdandan tamamen ayrılınca kadar kürdan su içerisinde çevirilir. Daha sonra örnek 10 dakika kaynatılır, 13000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatantın 10 µl’si kalıp olarak kullanılıp aşağıda şartları verilen reaksiyon gerçekleştirilir:

<i>Taq</i> Tamponu	5 µl (enzim ile beraber verilmiştir)
MgCl ₂	3 µl (stok; 25 mM)
dNTP'ler	5 µl (stok; her biri 10 mM olan dNTP'lerden 10'ar µl ve 10 µl dH ₂ O)
5' Primeri (<i>Pv</i> 7)	1 µl (stok; 50 pmol/µl)
3' Primeri (<i>Pv</i> 15)	1,22 µl (stok; 41 pmol/µl)
Kalıp DNA	10 µl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	0,5 µl (5 u/µl)
dH ₂ O	24,5 µl (son hacim 50µl olacak şekilde)

Amplifikasyon 94°C'de 1,5 dakika, 55°C'de 2 dakika, 72°C'de 2 dakika ve 25 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.6 *Pv*LDH Enziminin Analizi

2.2.6.1 *Pv*LDH Enziminin Aktivitesinin Tayin Edilmesi

*Pv*LDH genini içeren *E.coli* hücreleri 100 mg/ml amfisilin içeren 2 xYT buyyon içerisinde 37°C'de çalkalamalı etüvde 100 rpm'de bir gece inkübasyona bırakılır. Bir gecelik kültürün 500 µl'si 100 mg/ml amfisilin içeren 50 ml 2 x YT buyyon içerisine inoküle edilir. Hücre yoğunluğu 37°C'de çalkalamalı etüvde 100 rpm'de OD₆₀₀: 0,6'ya ulaşınca kadar inkübasyona bırakılır. Hücre yoğunluğu 0,6'ya ulaşınca 0,5 mM IPTG ilave edilerek hücrelerin ifade yeteneği arttırılır ve daha sonra belli aralıklarla (1 saat, 2 saat, 3 saat, bir gecelik) kültür örnekleri alınır.

1 ml kültür 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Pelet 500 µl TEA (pH: 7.5) içerisinde çözülür. Hücreler, sonikatör (Bandelin Sonopuls, Almanya) ile güç 2'de iki defa 10 saniye parçalanır (iki 10 saniye arasında 5 saniye durularak sonikasyon yapılır). 5 dakika buz içerisinde bekletilir, 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant, LDH aktivitesinin ölçümü için temiz bir tüpe alınır [16].

*Pv*LDH enziminin aktivitesinin ölçülmesi, UNICAM UV-Visible spektrofotometre kullanılarak NADH'ın NAD⁺'ye çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranı takip edilerek yapılır. Aktivite ölçüm reaksiyonu 50 mM KCl içeren 20 mM Bis-Tris solüsyonu (pH: 6.0) ile 25°C'de gerçekleştirilir. 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 [16]. LDH aktivite ölçümleri 3 defa tekrar edilmiştir.

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

SDS-PAGE, BIO-RAD Mini-PROTEAN® 3 Cell jel elektroforez sistemi kullanılarak yapılmıştır. Proteinleri ayırmak için kullanılan jel aşağıdaki gibi hazırlanmıştır [42].

Ayırma Jeli (separating)'nin Hazırlanışı (% 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 (stacking)'nin Hazırlanışı (% 4)

dH ₂ O	6,1 ml
0,5 M Tris HCl (pH:6.8)	2,5 ml
% 10 SDS	100 µl
% 30 Akrilamid/Bis	1,3 ml
% 10 Amonyum Persülfat	60 µl
TEMED	12 µl

Örnekler kuyulara yüklenmeden önce eşit miktarda SDS-PAGE SAB boyası ilave edilerek 5 dakika kaynatılır. Elektroforez için 1 x tank tamponu kullanılır ve proteinlerin jeldeki hareketinin izlenmesini sağlayan boyaya (bromofenol mavisi) ait mavi bant, jelin sonuna gelinceye kadar 20 mA akım uygulanır. Elektroforez sonrası jel, oda sıcaklığında yarım saat süreyle Coommasie mavisi ile boyanır ve sonrasında jeldeki protein bantları görünür hale gelinceye kadar boya uzaklaştırıcı solüsyon ile yıkanır. Jeller, fotoğrafları alındıktan sonra jel kurutma sistemi ile kurutularak saklanır [42].

2.2.6.3 PvLDH Enziminin Saflaştırılması

Saflaştırma öncesi PvLDH genini içeren *E.coli* hücreleri ekspresyon kültürü hazırlamak için 100 mg/ml amfisilin içeren 2 xYT buyyon içerisinde 37°C'de çalkalamalı etüvde 100 rpm'de bir gece inkübasyona bırakılır. Bir gecelik kültürün 833 µl'si 1:6 oranında (30ml 2 xYT buyyon için 500 µl kültür) 100 mg/ml amfisilin içeren 50 ml 2 x YT buyyon içerisine inoküle edilir. Hücre yoğunluğu 37°C'de çalkalamalı etüvde 100 rpm'de OD₆₀₀: 0,6'ya ulaşınca kadar inkübasyona

bırakılır. Hücre yoğunluğu 0,6'ya ulaşınca 1 mM IPTG ilave edilir ve bundan sonra 5 saat ve bir gecelik kültür örnekleri alınır. Örnekler 4000 RCF'de 15 dakika santrifüjlenir [43]. Süpernatant dökülür. Pelet yapılacak olan saflaştırma yöntemine göre işleme tabi tutulur. Bu çalışmada farklı solüsyonlar denenerek sonuçlar bu metodlara göre değerlendirilmiş ve sonuçlar bölümünde tartışılmıştır.

2.2.6.4 Western Blot ile *Pv*LDH'ın *Pf*LDH'ına Olan Benzerliğinin Test Edilmesi

Wild-type (Yabancıl tip) *Pf*LDH (WT-*Pf*LDH) proteini ile hazırlanan emülsiyonun Yeni Zelanda beyaz tavşanlarına enjeksiyonu ile elde edilen antikorlar [16]. *P. vivax*'a karşı da denenmiş ve iki LDH'ın benzerlik oranı immunolojik olarak test edilmiştir.

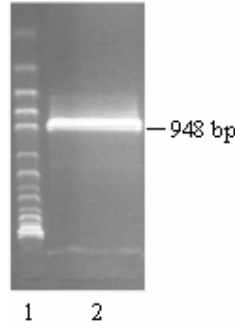
Blotlama öncesinde SDS-PAGE ile Bölüm 2.2.6.2'da anlatıldığı gibi proteinlerin jelde ayrılması sağlanır. Immobilon-P transfer membranı (Milipore) jel büyüklüğünde kesilir. Filtre kağıtları ile birlikte 1 saat transfer tamponu içerisinde bekletilir. Elektroforez sonrasında jel 15 dakika transfer tamponu içerisinde bekletilir. Western blota özgü kasetin kapağı açılır. Alt tarafa filtre kağıdı ve onun üzerine jel yerleştirilir. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek membran ve tekrar bir filtre kağıdı yerleştirilir. Kasetin kapağı kapatılır ve elektroforez tankına yerleştirilir. Tanka buz ünitesi yerleştirildikten sonra transfer tamponu doldurulur ve güç kaynağına bağlanarak 100 V'da 1 saat akım verilir. Blotlama manyetik karıştırıcı üzerinde yapılarak ısının düzenli dağılması sağlanır. 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. % 5'lik süt tozu ile 1/1000 oranında seyreltilmiş primer antikor ilave edilir. Oda sıcaklığında 1 saat bekletilir. 10 dakika PBS Tween 20'de yıkama işlemi 3 defa tekrar edilir. % 5'lik süt tozu ile 1/1000 oranında seyreltilmiş sekonder antikor ilave edilir. Oda sıcaklığında 1 saat bekletilir. Yine aynı şekilde 10 dakika PBS Tween 20'de yıkama işlemi 3 defa tekrar edilir. Yıkama sonrasında 60 mg 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), 100 ml PBS, 100 µl H₂O₂ içerisinde bantlar belirinceye kadar bekletilir. Daha sonra dH₂O içerisine alınarak reaksiyon durdurulur [44].

3 BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1 *PvLDH* Geninin Alt Klonlamasının Yapılması ve Proteinin İfade Edilmesi

3.1.1 PCR ile C Terminaline 6 Histidin Amino Asidinin İlave Edilmesi

Bu reaksiyonda *Pv7* ve üzerinde 6 adet histidin taşıyan *Pv15* primerleri kullanılarak Materyal ve Metod'da şartları verilen PCR yapılmış ve bu reaksiyon sonrasında *PvLDH* geninin C terminaline (3' ucuna) 6 histin amino asidi ilave edilmiştir (Şekil 3.1). 6 histidin amino asidinin ilavesi *PvLDH* geninin ekspresyonu sonrasında üretilecek olan *PvLDH* proteininin QIAGEN Nİ-NTA Spin kit ve Nİ-NTA Agaroz ile saflaştırılmasını mümkün kılacaktır. İlave edilen bu histidin dizisi, nikel iyonları ile bir reaksiyon sonucu sıkıca bağlanarak *PvLDH* proteininin kolona tutunmasını sağlayacak ve proteinin saflaştırılmasını kolaylaştırmış olacaktır [43].

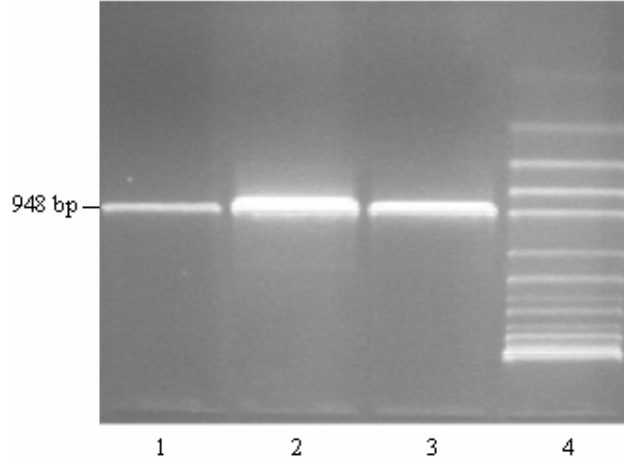


Şekil 3.1 *Pv7* ve *Pv15* primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR örnekleri Hatlar: (1) Markır (Hyper Ladder I), (2) *PvLDH*.

PCR sonrası agaroz jelde koşturulan örneklerden DNA saflaştırması yapılarak C terminalinde 6 histidin içeren *PvLDH* geni geri kazanılmıştır. Hem *PvLDH* geni hem de genin aktarılacağı pKK223-3 vektörü *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon endonükleaz enzimleri (RE) ile kesilmiş yapışkan uçlar oluşturularak ligasyona hazır duruma getirilmiştir. Ligasyon, T4 DNA ligaz enzimi yardımı ile klonlanacak olan genin (*PvLDH*) vektör DNA'sının içerisine aktarılmasıdır. Ligasyon 4°C'de bir gecelik inkübasyon ile sağlanmıştır.

Ligasyon sonrası elde edilen rekombinant DNA (pKK223-3 vektörü + *PvLDH* geni) ve pozitif kontrol için hiç bir gen içermeyen pKK223-3 vektörü *E. coli* JM105 hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyon sonrasında seçilen bazı kolonilerin *PvLDH* genini taşıyıp

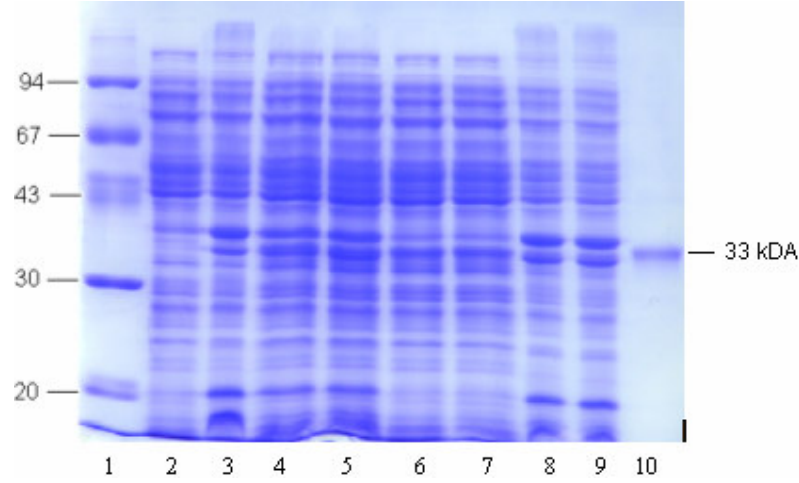
taşımadıklarını belirlemek için koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR sonrası örnekler % 1'lik agaroz jel'de yürütülmüş ve jelde klonlanan genin büyüklüğünde bir bant görülmüştür. Görülen bu bant seçilen koloninin bu geni taşıdığını dolayısı ile transformasyon işleminin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Koloni PCR sonrası DNA bantlarının jelde görüntülenmesi.
Hatlar: (1,2 ve 3) *PvLDH*; (4) Markır (Hyper Ladder I).

3.1.2 *PvLDH* Geninin *E. coli* JM105 Soyunda İfade Edilmesi

E. coli JM105 hücrelerine aktarılan *PvLDH* geninin ifade edilip edilmediğini kontrol etmek için geni içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin ekstraktının analizi yapılmıştır. Bunun için hücreler logaritmik faza (OD_{600} : 0,6) ulaşınca indükleyici madde olarak 0,5 mM IPTG ilave edilerek genin ekspresyonu teşvik edilmiştir. Bu aşamadan sonra belli aralıklarla alınan kültür örneklerinin SDS-PAGE ile analizi yapılmış ve genin ifadesinin gerçekleştirildiği gözlenmiştir (Şekil 3.3).

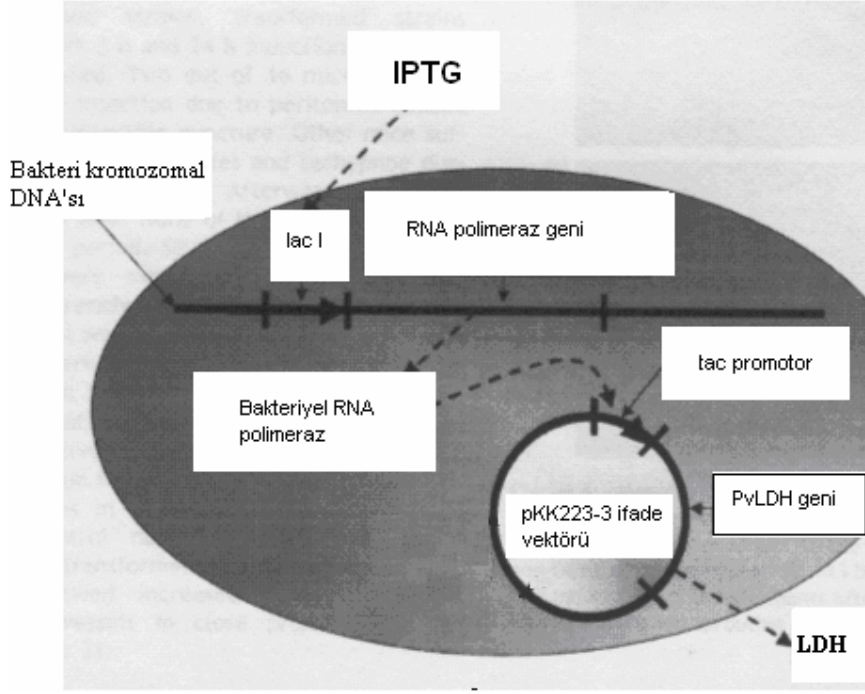


Şekil 3.3 *PvLDH*'ın üretildiğini gösteren ifade jeli. Hatlar (1) Markır; (2) *E. coli* süpernatant hücreleri; (3) *E. coli* pelet hücreleri; (4, 5) *PvLDH* total proteini; (6, 7) *PvLDH* süpernatant fraksiyonu; (8, 9) *PvLDH* pelet fraksiyonu; (10) insan saf LDH proteini.

3.1.2.1 IPTG İndüklemesi ve *PvLDH* Proteininin İfadesindeki Rolü

IPTG, laktoz analogu olup *lac* operonunda transkripsiyonu indüklemektedir [39]. Ortamda laktozun yokluğunda *LacI* proteini operatör bölgeye bağlanarak *lac* proteininin transkripsiyonu önlenmektedir. Ortamda laktoz varsa, laktoz, *lac* I inhibitörüne bağlanır ve *lac* proteinlerinin üretimine izin verilir. Bu nedenle *E. coli*, ortamda sadece laktoz olduğu zaman laktozu metabolize edici proteinlerini sentezlemektedir [45].

Şekil 3.4'de görüldüğü gibi laktoz analogu olan IPTG, *E. coli* hücreleri aktarılmış kültür ortamına ilave edildiği zaman *lac* promotordan T7 RNA polimeraz enzimi transkripsiyonla sentezlenmektedir. Sentezlenen T7 RNA polimeraz enzimi, plazmid vektörü üzerindeki geç *lac* promotor bölgesini tanıyarak genin yüksek oranda transkripsiyonunu katalizlemekte [46] ve böylece IPTG ilavesi ile *PvLDH* enziminin yüksek oranda üretilmesi teşvik edilmektedir.



Şekil 3.4 Kültür ortamına IPTG ilavesi ile *PvLDH* enzim üretiminin teşvik edilmesi.

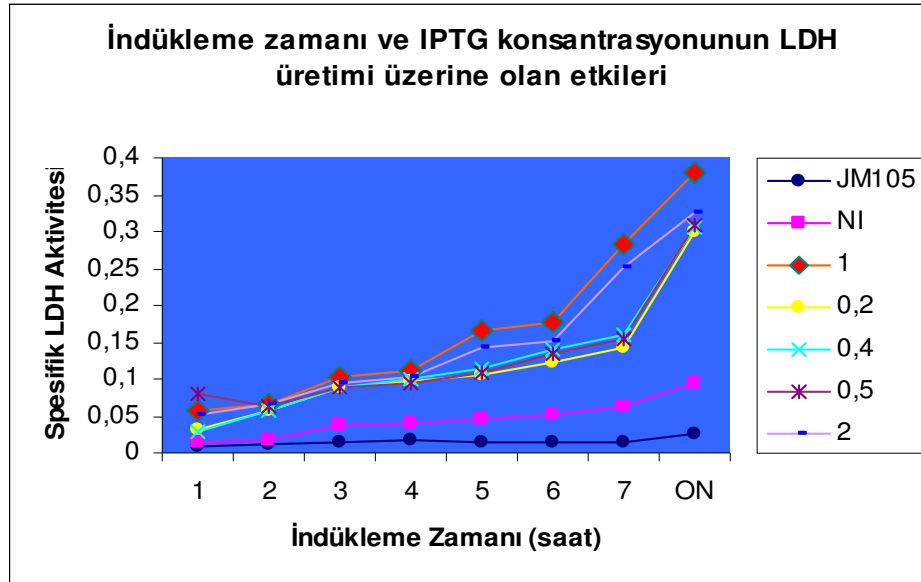
3.1.2.2 Farklı IPTG Konsantrasyonunun *PvLDH* Enzim Aktivitesine Etkisinin Test Edilmesi

Proteinin ifadesine farklı IPTG konsantrasyonlarının etkisini test etmek için, *PvLDH* genini içeren *E. coli* JM105 hücreleri logaritmik faza (OD_{600} : 0,6) ulaşınca 0,2, 0,4, 0,5, 1,2 mM IPTG ayrı ayrı kültürlerle ilave edilmiş ve bu aşamadan sonra belli aralıklarla (1 saat (h), 2 h, 3 h, 4 h, 5h, 6 h, 7 h ve bir gecelik (ON) kültürlerden örnekler alınmış ve bu örneklerin süpernatant fazı hazırlanmıştır. Elde edilen bu süpernatant fazlar kullanılarak spesifik LDH aktivitesi, 340 nm'de NADH'ın NAD^{+} 'ye dönüşümünün sebep olduğu absorbans değişiminin oranı gözlemlenerek tespit edilmiştir ve aktivite ölçümünde 1 mM pürivat kullanılmıştır. Hiçbir gen içermeyen *E. coli* JM105 hücreleri ve *PvLDH* genini içeren, ancak IPTG indüklemesi yapılmayan hücreler de kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Değişen IPTG konsantrasyonu ve süreye göre spesifik *PvLDH* aktivitesi ölçülmüş ve ölçümlerin herbiri 3 defa tekrar edilerek elde edilen değerlerin ortalamaları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 Değişen IPTG konsantrasyonu ve süreye göre spesifik *Pv*LDH aktivite ölçüm sonuçları

		IPTG konsantrasyonu (mM)						
	JM105	NI	0.2	0.4	0.5	0.6	1	2
1h	0.008	0.014	0.032	0.030	0.079	0.030	0.057	0.051
2h	0.012	0.018	0.058	0.058	0.062	0.046	0.067	0.066
3h	0.090	0.036	0.089	0.090	0.088	0.072	0.104	0.093
4h	0.016	0.040	0.096	0.100	0.093	0.089	0.111	0.102
5h	0.015	0.047	0.107	0.114	0.109	0.098	0.165	0.144
6h	0.013	0.051	0.124	0.139	0.134	0.113	0.167	0.152
7h	0.014	0.062	0.144	0.159	0.154	0.135	0.282	0.252
ON	0.026	0.094	0.301	0.305	0.310	0.277	0.379	0.325

Tablo 3.1’de görüldüğü gibi elde edilen veriler değerlendirilerek en yüksek enzim aktivitesi 1 mM IPTG konsantrasyonunda kültürün bir gece süreyle geliştirilmesi sonucunda elde edilmiş ve bu şartlar bol miktarda *Pv*LDH proteininin üretimi için ideal şartlar olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar Şekil 3.5’de daha açık olarak görülmektedir.

**Şekil 3.5** Değişen IPTG konsantrasyonu ve süreye göre spesifik *Pv*LDH aktivite ölçüm grafiği.

3.1.2.3 Farklı IPTG Konsantrasyonunun Hücre Yoğunluğuna Etkisi

Bölüm 3.1.5.3’de anlatıldığı gibi IPTG ile indüklenmiş aynı kültürlerden ve kontrol gurubu olarak kullanılan kültürlerden logaritmik fazdan sonra belli aralıklarla (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5h, 6 h, 7 h ve ON) kültürlerden 1 ml örnekler alınmış ve spektrofotometrede OD₆₀₀’de hücre yoğunlukları ölçülmüştür. Tablo 3.2’de de görüldüğü gibi hiçbir gen içermeyen JM105 hücreleri ve *PvLDH* genini içeren ancak IPTG indüklemesi yapılmayan hücrelerin yoğunluğu süreye bağlı olarak paralel bir şekilde artmıştır. Aynı şekilde *PvLDH* genini içeren ve farklı konsantrasyonlarda IPTG ilave edilen hücrelerin yoğunluğu da süreye bağlı olarak paralel bir şekilde artmıştır. Bu veriler hücre yoğunluğundaki artışa paralel olarak enzim aktivitesinin de arttığını desteklemekte ve en yüksek hücre yoğunluğuna bir gecelik gelişme sonucunda ulaşılmaktadır. Bu sonuçlar 1 mM IPTG uygulaması yapıldığı zaman bir gecelik gelişme sonunda en yüksek aktivitenin elde edilmiş olduğunu gösteren Tablo 3.1 ve Şekil 3.5 ile uyum içerisinde. Bu uygulama ile kinetik ve yapı analizi çalışmalarının gerektirdiği fazla protein üretiminin ideal şartları belirlenmiştir.

Tablo 3.2 Değişen IPTG konsantrasyonu ve süreye göre hücre yoğunluklarının ölçümü.

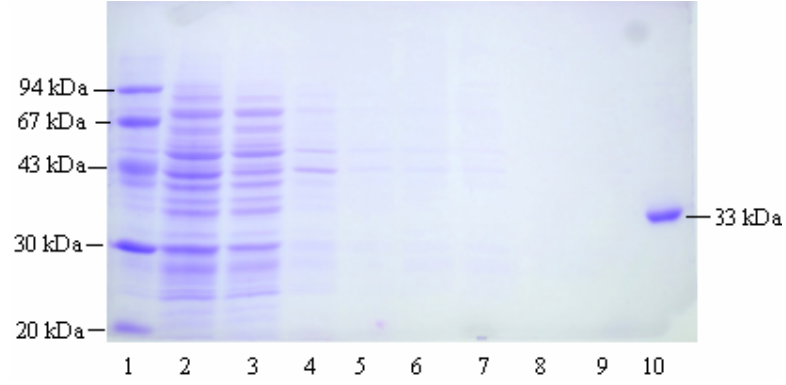
IPTG	1hr	2 hrs	3 hrs	4 hrs	5 hrs	6 hrs	7 hrs	O.N
(mM)	OD₆₀₀	OD₆₀₀	OD₆₀₀	OD₆₀₀	OD₆₀₀	OD₆₀₀	OD₆₀₀	OD₆₀₀
JM105	0.833	0.950	1.008	1.076	1.123	1.181	1.228	1.460
NI	0.791	0.854	0.937	1.006	1.065	1.090	1.122	1.430
0.2	0.740	0.813	0.847	0.947	0.981	1.016	1.049	1.277
0.4	0.833	0.842	0.918	0.983	1.012	1.068	1.099	1.358
0.5	0.771	0.825	0.928	0.987	1.040	1.094	1.137	1.358
1	0.758	0.817	0.898	0.974	1.029	1.068	1.114	1.330
2	0.769	0.824	0.925	0.983	1.032	1.096	1.109	1.366

3.2 PvLDH Enziminin Saflaştırılması

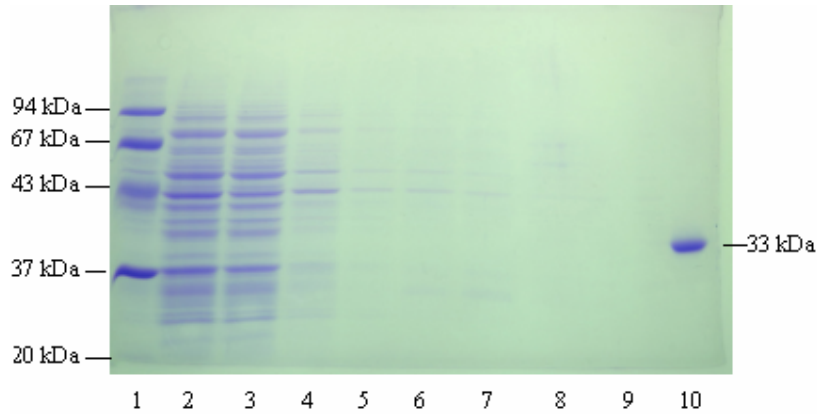
Bu çalışmada PvLDH enzimini saflaştırma işleminde farklı metodlar denenerek en ideal şekilde saf enzim elde edilmeye çalışılmıştır. Saflaştırma sonrasında jelde PvLDH'a ait tek bir protein bandı görülmesi halinde LDH proteini saf olarak elde edilmiş olacaktır.

3.2.1 PvLDH Enziminin Denatüre Edici Şartlar Altında QIAGEN Ni-NTA Spin Kit Kullanılarak Saflaştırılması

Bölüm 2.2.6.3'de anlatıldığı gibi indüklenmiş ve indüklenmemiş 5 saat'lik kültürler hazırlanmış ve hücreler 37°C'de 5 saat geliştirilmiştir. İdeal şartlarda en fazla protein üretimi bir gecelik kültür gelişimi ile sağlanmaktayken bu denemelerde 5 saatlik kültür kullanılmasının sebebi uygun saflaştırma tekniği uygulanırken süre kayıplarını en aza indirmektedir. Saf proteinin elde edileceği şartlar bir defa sağlandıktan sonra kültürler 5 saat değil bir gece süre ile geliştirilecektir. Saflaştırma işlemi Ni-NTA spin kit kullanılarak yapılmış [43] ve saflaştırma sonrası indüklenmemiş (Şekil 3.6-a) ve indüklenmiş (Şekil 3.6-b) örnekler SDS-PAGE tekniği ile analiz edilmiştir. Bu tez çalışmasının tamamında şekillerdeki kısaltmalardan (L) lizise uğratılmış olan örneği, (FT) kolona protein yüklemesi sonucunda kolondan alınan ilk süzüntüyü, (W1) ve (W2) saflaştırma öncesi kolonun iki defa uygun tampon çözelti ile yıkanmasını, (E1) ve (E2) ise iki defa uygun tampon çözelti uygulayarak saf olarak elde edilmiş enzimi temsil etmektedir.



(a)



(b)

Şekil 3.6 Denatüre edici şartlar altında kit ile saflaştırılmış *PvLDH* proteininin SDS-PAGE ile analizi : **(a)** İndüklenmemiş *PvLDH* proteininin saflaştırılması, hatlar: (1) Markır ; (2) L; (3) FT; (4) W1; (5) W2; (6) E1; (7) E2; (8) E1+E2; (10) insan saf LDH proteini. **(b)** İndüklenmiş *PvLDH* proteininin saflaştırılması, hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) FT; (4) W1; (5) W2; (6) E1; (7) E2; (8) E1+E2; (10) insan saf LDH proteini.

Şekil 3.6-a ve b’de ki jellerde görüldüğü gibi 6. ve 7. hatlarda saflaştırılan *PvLDH* proteinine ait bant çok zayıf görülmektedir. Bu sebeple elde edilen E1 ve E2 proteinlerinin *PvLDH* enzim aktivitesi ölçülmüş ve Tablo 3.3’de de görüldüğü gibi düşük enzim aktiviteleri kaydedilmiştir. Aktivitenin düşük olarak ölçülmesi jeldeki protein bantlarının zayıf olmasının sebebini açıklamaktadır. Sonuç olarak kit ile denatüre edici şartlarda protein saflaştırılmasının, *PvLDH* proteini için uygun olmadığı ve bu proteinin doğal şartlarda saflaştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

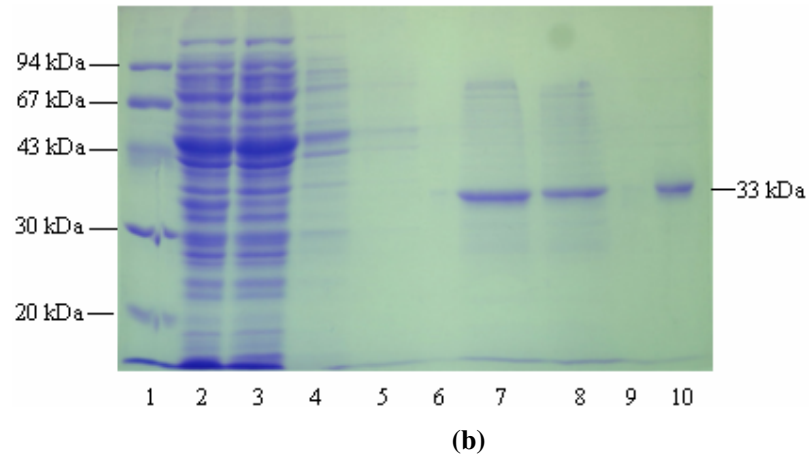
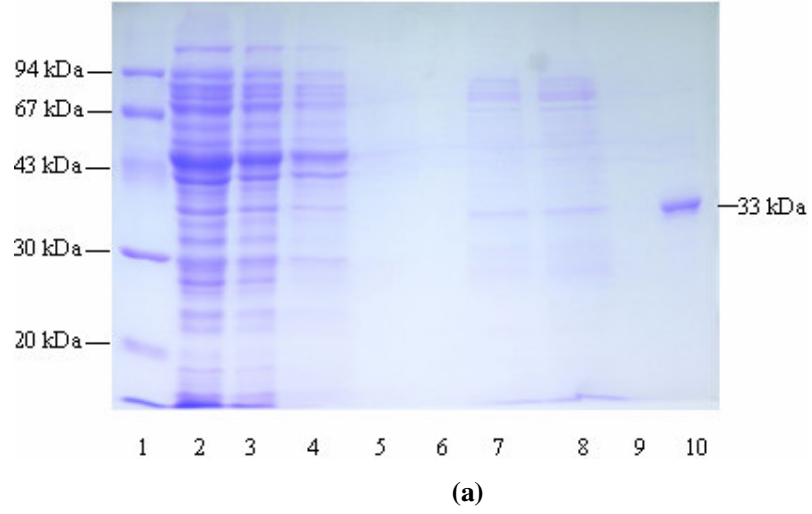
Tablo 3.3 Denatüre edici şartlar altında saflaştırılan *PvLDH* enziminin aktivitesinin ölçülmesi

$\Delta A_{340}/\text{dakika}$			10 mM pürivat	1 mM pürivat
Saflaştırılan <i>PvLDH</i> (Elution 1)	İndüklenmemiş	5 saat	0,093	0,210
	İndüklenmiş		0,152	0,181
Saflaştırılan <i>PvLDH</i> (Elution 2)	İndüklenmemiş	5 saat	0,142	0,186
	İndüklenmiş		0,115	0,123
JM105	5 saat		0,031	0,023

3.2.2 *PvLDH* Enziminin Doğal Şartlar Altında QIAGEN Ni-NTA Spin Kit Kullanılarak Saflaştırılması

3.2.2.1 QIAGEN Ni-NTA Spin Kit ile *PvLDH* Enziminin Saflaştırılması

İndüklenmemiş ve indüklenmiş 5 saat'lik kültürler çalkalamalı etüvde 37°C'de 100 rpm'de geliştirilmiştir. İndükleme 1 mM IPTG ile yapılmıştır. Saflaştırma işlemi Ni-NTA spin kit kullanılarak [43] indüklenmemiş (Şekil 3.7-a) ve indüklenmiş (Şekil 3.7-b) örneklerde gerçekleştirilmiş ve SDS-PAGE ile örneklerin ifade analizi yapılmıştır. Şekil 3.7-a ve b jellerinde 7 ve 8'inci hatlarda görüldüğü gibi indüklenmiş jel görüntüsünde indüklenmemişe oranla saflaştırılan *PvLDH* proteini IPTG'nin etkisi ile daha belirgindir. Fakat hatlarda görüldüğü gibi LDH bandından başka bakteriyal kökenli bantlarda görülmektedir.



Şekil 3.7 Denatüre edici şartlar altında kit ile saflaştırılmış *Pv*LDH proteininin SDS-PAGE ile analizi. **(a)** İndüklenmemiş *Pv*LDH proteininin saflaştırılması; hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) FT; (4) W1; (5) W2; (7) E1; (8) E2; (10) insan saf LDH proteini. **(b)** İndüklenmiş *Pv*LDH proteininin saflaştırılması; Hatlar: (1) Markır (LMW); (2) L; (3) F.T; (4) W1; (5) W2; (7) E1; (8) E2; (10) insan saf LDH proteini.

Bu çalışmanın sonucuna göre saf proteinden başka proeinler de elde edildiğinden, *Pv*LDH proteininin tam olarak saf olmadığı görüldüğü için saflaştırılan *Pv*LDH enzimi ikinci defa Ni-NTA spin kit kolonlarına uygulanarak bu bantların uzaklaştırılıp uzaklaştırılmayacağı test edilmiştir.

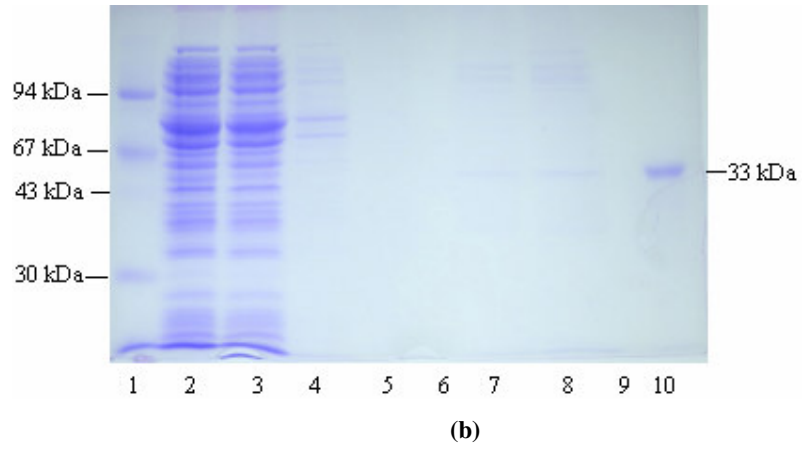
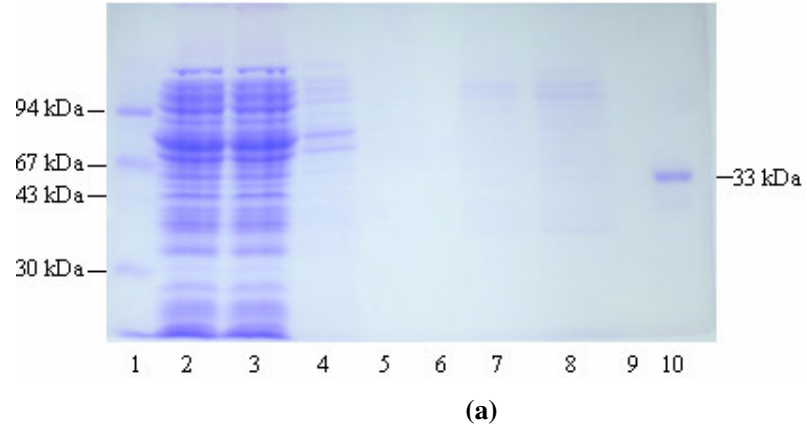
Uygulama sonucunda kolona uygulanan örnekler SDS-PAGE ile analiz edilmiş ve elde var olan proteinin arka planındaki bantların yok olduğu fakat saf proteinin de hemen hemen tamamının kaybedildiği görülmüştür.

Yapılan bütün bu çalışmalarda amaç *PvLDH* proteinini saf olarak bol miktarda üretmek olduğu için, bu metot ile elde edilen bu proteinin ileri çalışmalar yapmak için yeterli olmayacağından, literatür incelemeleri yapılarak bu çalışmalar [47] ve bu çalışmalarda yapılan bazı değişiklikler doğrultusunda daha saf ve daha fazla miktarda elde edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Kit içeriğinde kullanılan tampon çözeltilerde Tablo 3.4’de verilen değişiklikler yapılmış, *PvLDH* proteinleri saflaştırılmış ve SDS-PAGE ile analizi yapılmıştır.

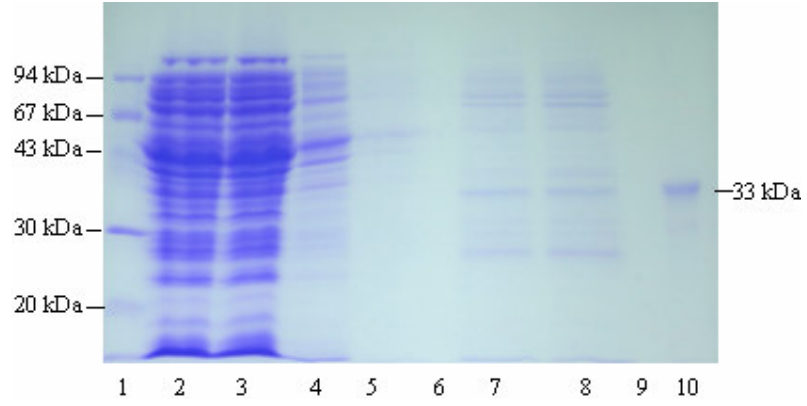
Tablo 3.4 *PvLDH* enziminin saflaştırılmasında Ni-NTA Spin Kit tampon çözeltilerinde yapılan değişiklikler.

Ni-NTA Spin Kit tampon çözeltileri			
SDS-PAGE Jeli	Lizis tamponu	Yıkama tamponu	Saflaştırma tamponu
Şekil 3.8	İmidazol 15 mM	-	-
Şekil 3.9	İmidazol 15 mM	İmidazol 30 mM	-
Şekil 3.10	-	NaCl 400 mM	-
Şekil 3.11	İmidazol 5 mM	İmidazol 10 mM	-
Şekil 3.12	-	NaCl 1 mM	-
Şekil 3.13	20 mM merkaptotanol	-	-
Şekil 3.14	-	% 1 Triton x-100	-

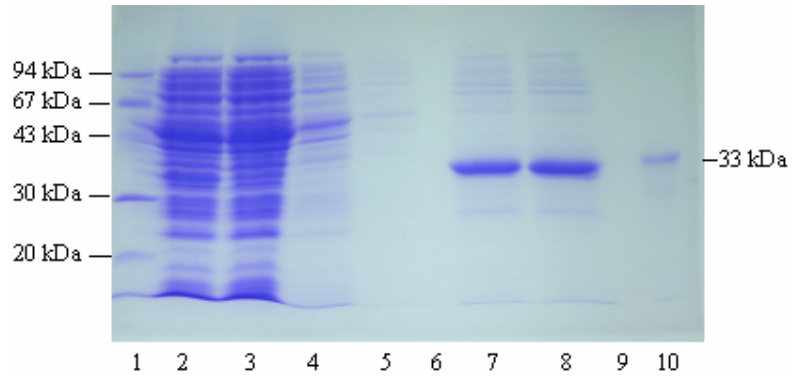
Tablo 3.4’de verilen şartlara göre *PvLDH*’ın saflaştırılması gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar SDS-PAGE ile gösterilerek aşağıda sıralanmıştır:



Şekil 3.8 Lizis tamponunda 15 mM imidazol kullanılan denemenin SDS-PAGE analiz sonucu. **(a)** İndüklenmemiş PvLDH'ın jeldeki görüntüsü; hatlar: (1) Markır (2) L; (3) FT; (4) W1; (5) W2; (7) E1; (8) E2; (10) insan saf LDH proteini. **(b)** İndüklenmiş PvLDH'ın jeldeki görüntüsü; hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) F.T; (4) W1; (5) W2; (7) E1; (8) E2; (10) insan saf LDH proteini.

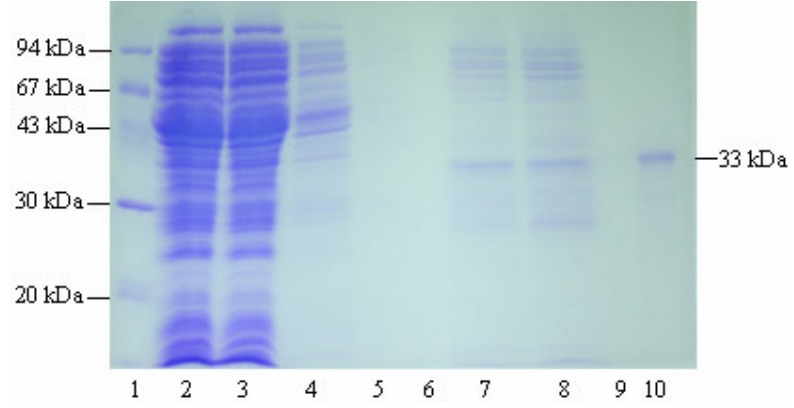


(a)

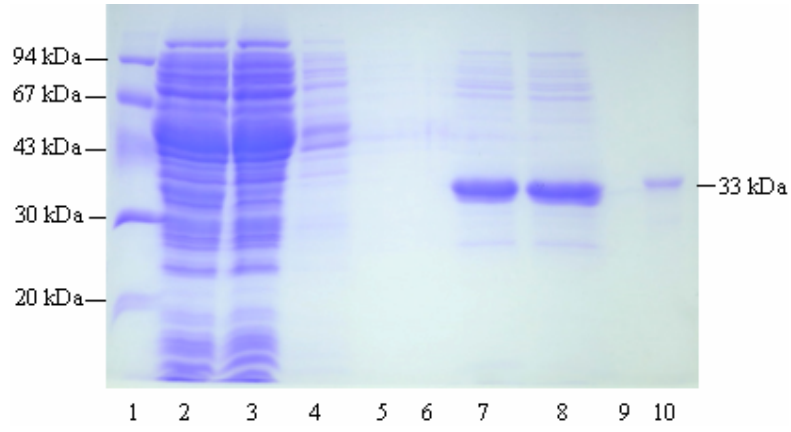


(b)

Şekil 3.9 Lizis tamponunda 15 mM, yıkama tamponunda 30 mM imidazol kullanılan deneyin SDS-PAGE analiz sonucu. **(a)** İndüklenmemiş *PvLDH*'ın jeldeki görüntüsü; hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) FT; (4) W1; (5) W2; (7) E1; (8) E2; (10) insan saf LDH proteini. **(b)** İndüklenmiş *PvLDH*'ın jeldeki görüntüsü; hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) FT; (4) W1; (5) W2; (7) E1; (8) E2; (10) insan saf LDH proteini.

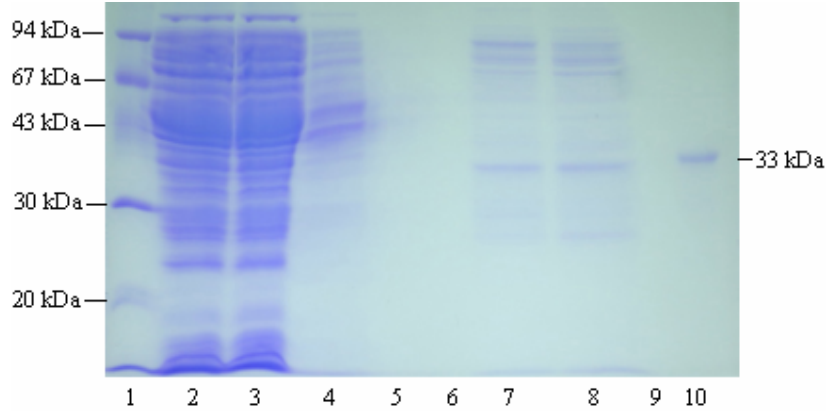


(a)

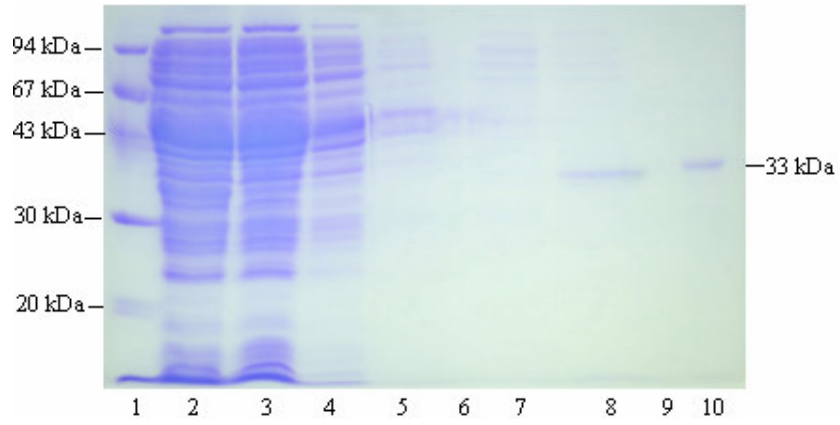


(b)

Şekil 3.10 Yıkama tamponunda 400 mM NaCl kullanılan denemenin SDS-PAGE analiz sonucu. **(a)** İndüklenmemiş *PvLDH*'ın jeldeki görüntüsü; hatlar: (1) Markır ; (2) L; (3) F.T; (4) W1; (5) W2; (7) E1; (8) E2; (10) insan saf LDH proteini. **(b)** İndüklenmiş *PvLDH*'ın jeldeki görüntüsü Hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) F.T; (4) W1; (5) W2; (7) E1; (8) E2; (10) insan saf LDH proteini.

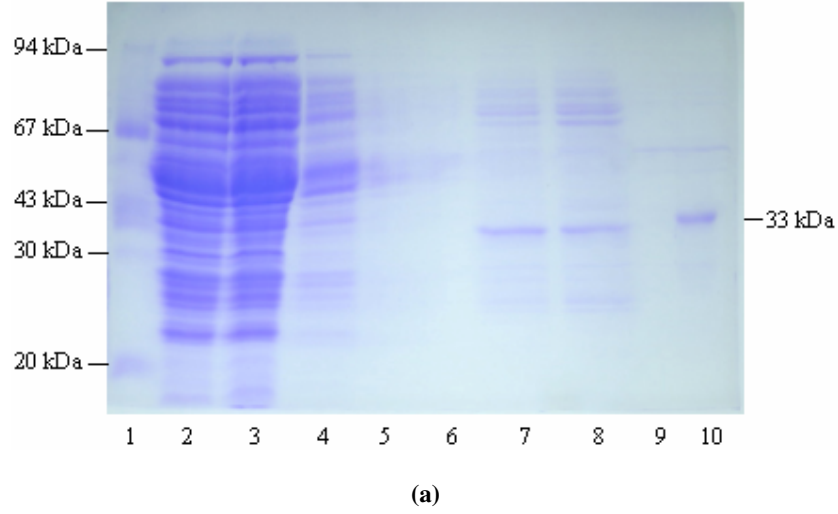


(a)

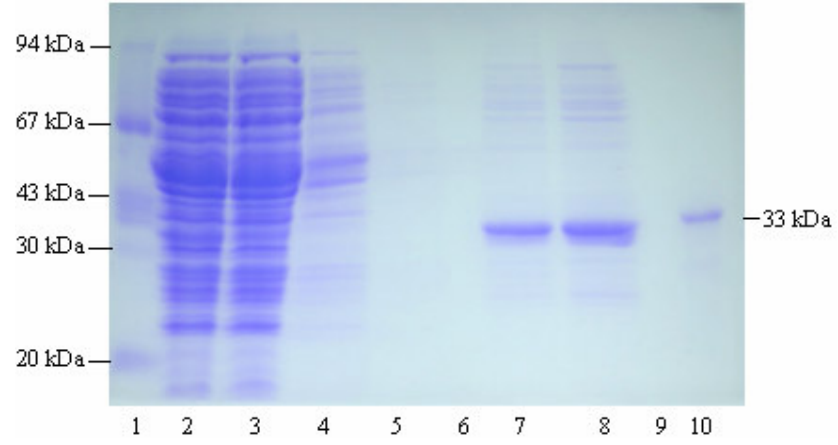


(b)

Şekil 3.11 Lizis tamponunda 5 mM, yıkama tamponunda 10 mM imidazol kullanılan denemenin SDS-PAGE analiz sonucu. **(a)** İndüklenmemiş PvLDH'ın jeldeki görüntüsü; hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) FT; (4) W1; (5) W2; (7) E1; (8) E2; (10) insan saf LDH proteini. **(b)** İndüklenmiş PvLDH'ın jeldeki görüntüsü; hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) FT; (4) W1; (5) W2; (7) E1; (8) E2; (10) insan saf LDH proteini.

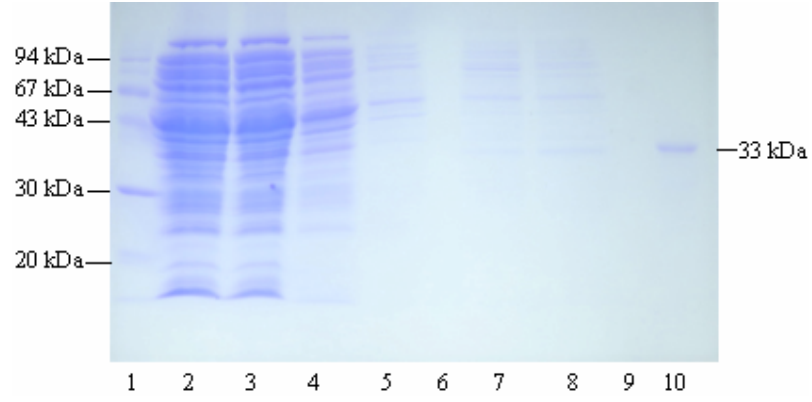


(a)

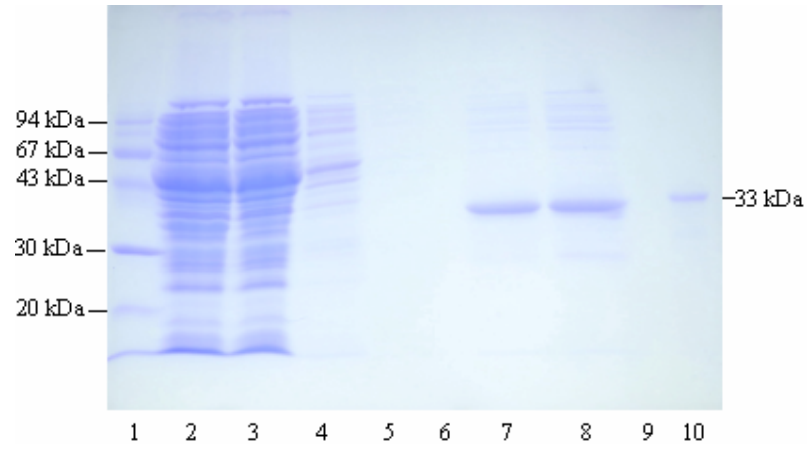


(b)

Şekil 3.12 Yıkama tamponunda 1 mM NaCl kullanılan denemenin SDS-PAGE analiz sonucu. **(a)** İndüklenmemiş *PvLDH*'ın jeldeki görüntüsü Hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) F.T; (4) W1; (5) W2; (7) E1; (8) E2; (10) insan saf LDH proteini. **(b)** İndüklenmiş *PvLDH*'ın jeldeki görüntüsü Hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) F.T; (4) W1; (5) W2; (7) E1; (8) E2; (10) insan saf LDH proteini.

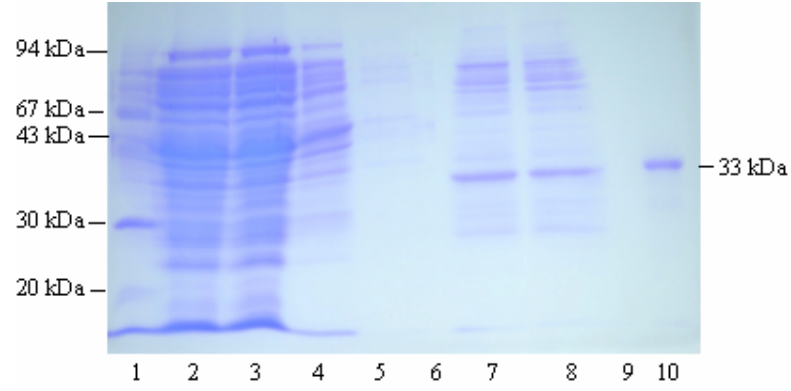


(a)

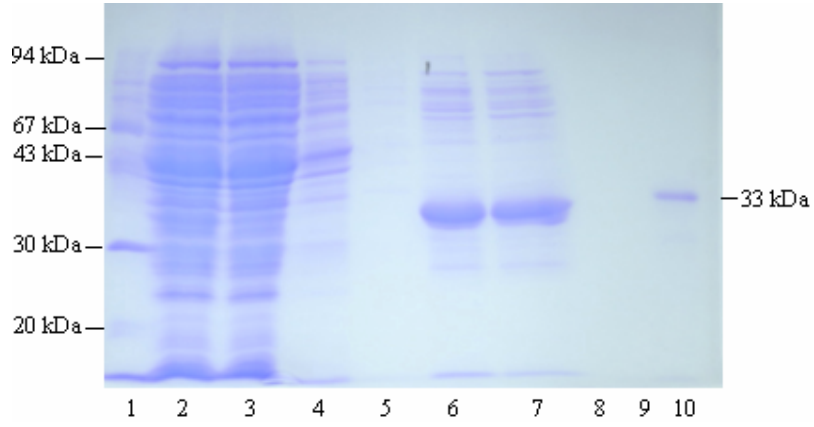


(b)

Şekil 3.13 Lizis tamponunda 20 mM merkaptotanol kullanılan denemenin SDS-PAGE analiz sonucu. **(a)** İndüklenmemiş PvLDH'ın jeldeki görüntüsü; hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) FT; (4) W1; (5) W2; (7) E1; (8) E2; (10) insan saf LDH proteini. **(b)** İndüklenmiş PvLDH'ın jeldeki görüntüsü; hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) FT; (4) W1; (5) W2; (7) E1; (8) E2; (10) insan saf LDH proteini.



(a)



(b)

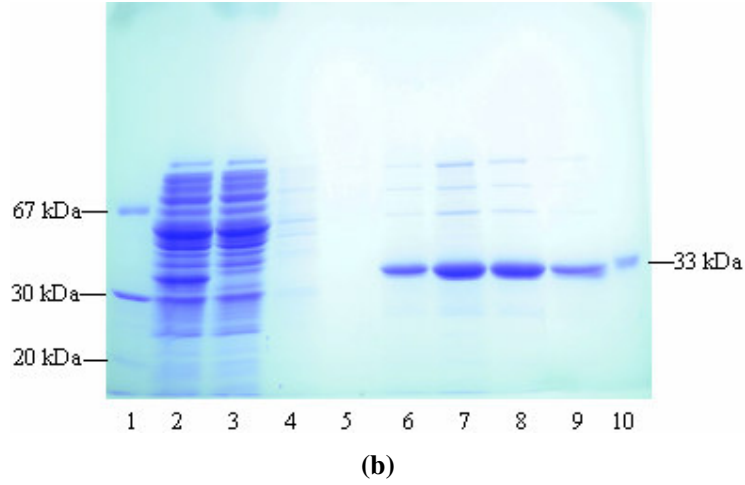
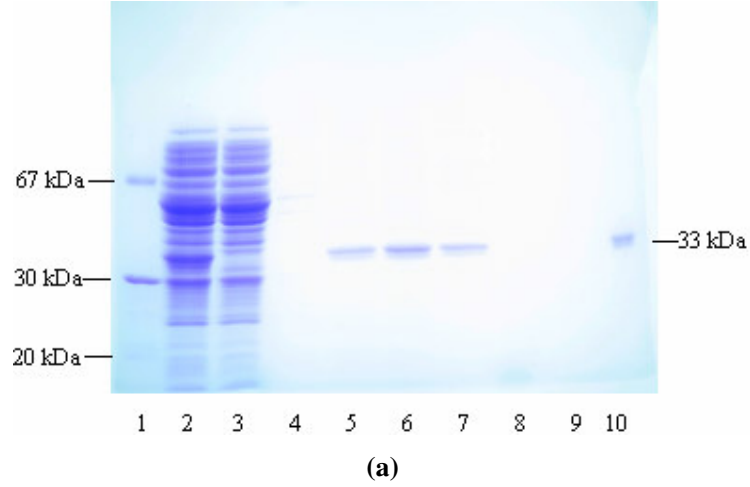
Şekil 3.14 Yıkama tamponunda % 1 Triton x-100 kullanılan denemenin SDS-PAGE analiz sonucu. **(a)** İndüklenmemiş *PvLDH*'ın jeldeki görüntüsü; hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) FT; (4) W1; (5) W2; (7) E1; (8) E2; (10) insan saf LDH proteini. **(b)** İndüklenmiş *PvLDH*'ın jeldeki görüntüsü; hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) FT; (4) W1; (5) W2; (6) E1; (7) E2; (10) insan saf LDH proteini.

Kit solüsyonlarının optimize edilmesi ile protein üretimi artırılabilmiş, ancak bakteriyel kaynaklı ilave bantları tamamen uzaklaştırmak mümkün olmamıştır.

3.2.2.2 QIAGEN Ni-NTA Agaroz ile *PvLDH* Enziminin Saflaştırılması

Bu çalışmalarda kite ait Ni-NTA kolonları yerine kolon, bir şırınga içerisinde Ni-NTA agaroz kullanılarak hazırlanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda indüklenmemiş örnekler ile protein üretimi belirgin bir şekilde daha az olduğu için çalışmalar bu aşamadan sonra sadece

indüklenmiş örnekler üzerinden yürütülmüştür. Şekil 3.15’de görüldüğü gibi Ni-NTA agaroz kullanılarak hazırlanan kolona uygulanan bu çalışmada protein bantları saf olarak elde edilmiş ancak protein ifadesi düşük olduğu için protein kaybının en aza indirilmesi için denemeler yapılmıştır.

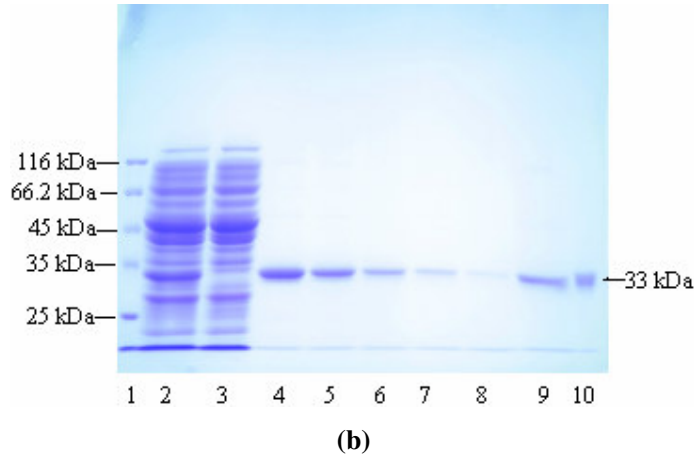
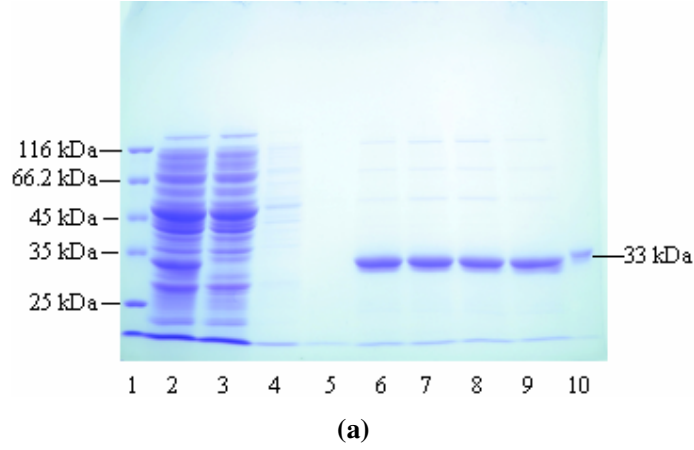


Şekil 3.15 Ni-NTA agaroz kullanılarak yapılan denemenin SDS-PAGE analiz sonucu. **(a)** İndüklenmiş *PvLDH*’ın jeldeki görüntüsü. Hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) F.T; (4) W2; (5) E3; (6) E2 süpernatant; (7) E3 süpernatant; (8) kit ile saflaştırılmış E2; (9) kit ile saflaştırılmış E3; (10) insan saf LDH proteini. **(b)** İndüklenmiş *PvLDH*’ın jeldeki görüntüsü. Hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) F.T; (4) W2; (5) E3; (6) E2 süpernatant; (7) E3 süpernatant; (8) kit ile saflaştırılmış E2; (9) kit ile saflaştırılmış E3; (10) insan saf LDH proteini.

Jel fotoğraflarında görüldüğü gibi *PvLDH* bu metoda göre saflaştırma sonucunda belirgin olarak görülmektedir ve saflık oranı diğer jellere nazaran daha yüksektir. Saflaştırma işleminde şiringanın ucuna yerleştirilen cam yünü ve süzgeç kağıdı da önemlidir. Şiringanın ucuna cam yün yerleştirilerek yapılan jel resmine dikkat edilirse protein kaybı olmaktadır, dolayısı ile *PvLDH* bandı zayıf görülmektedir. Cam yünü, şiringadan agarozla beraber süpernatantın'da hızlı bir şekilde akmasını sağlayarak protein kaybına neden olmaktadır. Şiringanın ucuna süzgeç kağıdı yerleştirilerek yapılan jel resmine bakıldığında ise protein kaybı olmamakta ve *PvLDH* protein bandı belirgin şekilde görünmektedir.

Bu denemeden sonra aşağıda anlatıldığı gibi son bir deneme yapılmış ve *PvLDH* ideal olarak yapılan diğer denemelere nazaran en iyi şekilde saflaştırılmıştır.

Bu denemede örnekler 2.2.6.3'de anlatıldığı gibi hazırlandı ve saflaştırma kiti göre yapıldı [48], fakat indüklenmemiş kültür örnekleri hazırlanmadı. Kitten ayrı olarak; 50 ml'lik indüklenmiş kültür santrifüjlenerek pelet 4 ml Wash buffer'da çözüldü, kolumn olarak kullanılan şiringanın ucuna içten süzgeç kağıdı yerleştirildi. Saflaştırma sonrasında örneklerin SDS-PAGE'i yapılarak jel görüntüleri aşağıda verilmiştir:



Şekil 3.16 Ni-NTA agaroz kullanılarak yapılan denemenin SDS-PAGE analiz sonucu. **(a)** İndüklenmiş *PvLDH*'ın jeldeki görüntüsü; hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) F.T; (4) W1; (5) W2; (6) E1; (7) E2; (8) E3; (9) E4; (10) insan saf LDH proteini. **(b)** İndüklenmiş *PvLDH*'ın jeldeki görüntüsü; hatlar: (1) Markır; (2) L; (3) F.T; (4) E5; (5) E6; (6) E7; (7) E8; (8) E9; (9) E5; (10) insan saf LDH proteini.

3.3 Saflaştırılan *PvLDH* Enziminin Aktivitesinin Tayin Edilmesi

Nİ-NTA Spin kit ile saflaştırılan *PvLDH* enziminin aktivitesi, hiç bir gen içermeyen JM105 hücreleri ile birlikte ölçülmüş ve değerler Tablo 3.5'de belirtilmiştir. Tablo 3.5'deki değerlere bakılarak JM105 aktivitesine karşı enzim aktivitesi değerlendirildiği zaman indüklenmiş *PvLDH* enziminin son derece aktif olduğu sonucuna varılmıştır.

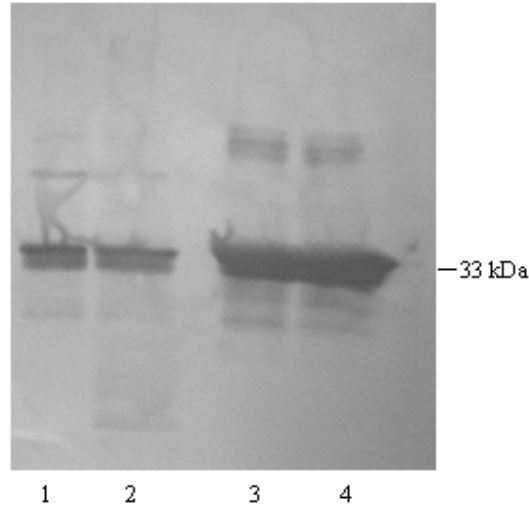
Tablo 3.5 Ni-NTA Spin kit ile saflaştırılan *PvLDH* enziminin aktivitesinin ölçölmesi.

ΔA_{340} /dakika			1 mM pürivat
Saflaştırılan <i>PvLDH</i> (Elution 2)	İndüklenmemiş	5 saat	0.235
Saflaştırılan <i>PvLDH</i> (Elution 2)	İndüklenmiş	5 saat	0.797
JM105	5 saat		0.02

Yapılan bütün bu denemelerin sonucunda bu tez çalışmasının hedefi olan *PvLDH* proteini göröldüğü gibi saf ve aktif olarak elde edilmiş olup ileri çalışmalarda kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.4 *Pv*LDH ve *Pf*LDH Proteinleri Arasındaki Benzerliğin İmmünojenik Olarak Test Edilmesi

Bu uygulamada Yabancı *Pf*LDH proteinini ile hazırlanan emülsiyonun Yeni Zelanda beyaz tavşanlarına enjeksiyonu ile elde edilen antikorlar [16], Western blotlama ile *P. vivax*'a karşı da denenmiş ve iki LDH'nin benzerlik oranı immünojenik olarak test edilmiştir. Yapılan çalışma sonrasında Şekil 3.17'de görüldüğü gibi 33 kDa büyüklüğündeki *P. falciparum* LDH'nı tanıyan antikorlar *P. vivax* LDH'nı da tanımıştır. Böylece *P. vivax* ve *P. falciparum* LDH'ları arasındaki benzerlik immünojenik olarak kanıtlanmıştır.



Şekil 3. 17 Western blotlama ile *Pv*LDH'nin membrandaki görüntüsü; hatlar: (1) *Pv*LDH süpernatant; (2) *Pv*LDH pelet; (3) E1; (4) E2.

BÖLÜM 4 SONUÇ

Mevcut antimalarial ilaçlara karşı direnç artışı dikkate alındığında sıtmayı önlemek için her geçen gün yeni ilaçlara duyulan ihtiyaç artmaktadır. Bu amaçla *P. vivax*'ın LDH enzimi hedef olarak seçilmiştir. Bu enzim parazitin yaşam döngüsü için gereklidir. Kan hücrelerinde bulunan sıtma parazitleri aktif bir mitokondriye ve işlevsel bir trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne sahip olmadıkları için [35] ATP ihtiyaçlarını glikolizle karşılamaktadırlar. Laktat dehidrogenaz enzimi; glikolizin son ürünü olan pirüvik asidi dönüşümlü bir reaksiyonla laktik aside çevirmektedir. Dolayısıyla bu enzim aktivitesinin önlenmesi, parazitin yaşamının sonlandırılmasını mümkün kılacaktır [14]. Bu bilgiler ışığı altında *P. vivax* Belem soyu genomik DNA'sından laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen; izole edilmiş, klonlanmış, ifade edilmiş ve genin dizi analizi yapılmıştır [18]. Sonrasında yapılan X'ışını kristallografi çalışmaları ile *P. vivax*'ın üç boyutlu yapısı tanımlanmıştır [2].

Bu yüksek lisans tez çalışmasında *P. vivax* LDH enzimini kodlayan gen pKK223-3 ifade vektörüne aktararak genin ifadesi yapılmış ve PvLDH proteini bolca üretilmiştir. IPTG indüklemesi yapılarak IPTG nin PvLDH proteininin ifadesindeki rolü tespit edilmiştir ve sonuçta protein üretimi artırılmıştır. Bir sonraki basamakta farklı IPTG konsantrasyonunun PvLDH enzim aktivitesine etkisi test edilmiştir ve sonuçta en yüksek enzim aktivitesi 1 mM IPTG konsantrasyonunda kültürün bir gece süreyle geliştirilmesi sonucunda elde edilmiştir. Ayrıca farklı IPTG konsantrasyonunun hücre yoğunluğuna etkisi test edilmiş ve sonuçta PvLDH genini içeren ve farklı konsantrasyonlarda IPTG ilave edilen hücrelerin yoğunluğunun süreye bağlı olarak paralel bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Bir sonraki basamakta PvLDH enzimi denatüre edici şartlar altında QIAGEN Ni-NTA Spin Kit kullanılarak saflaştırılmış ve sonrasında yapılan aktivite ölçüm sonucuna göre; hiç bir gen içermeyen JM105 aktivitesi 0,023 olarak ölçülmüş ve bu değer indüklenmemiş PvLDH için 0,186, indüklenmiş PvLDH için ise 0,123 olarak ölçülmüştür. Bu değerler aktif olmayan JM105 için ölçülen 0,023'e göre değerlendirildiğinde enzimin aktif olduğu anlaşılmıştır fakat SDS-PAGE analizi sonrası jelde bakteriyel kökenli bantlar da görülmüş ve bunun sonucunda enzimin tam saf olmadığı sonucuna varılmıştır. Bir sonraki basamakta doğal şartlar altında Ni-NTA Spin kit kullanılarak kit içeriğinde kullanılan tampon çözeltilerde değişiklikler yapılarak PvLDH proteini saflaştırılmış ve sonrasında yapılan SDS-PAGE analiz sonucuna göre bakteriyel kaynaklı ilave bantları tamamen uzaklaştırmak mümkün olmamıştır. Bundan sonra Ni-NTA agaroz kullanılarak hazırlanan ucuna cam yün ve süzgeç kağıdı yerleştirilmiş kolona uygulanan bir diğer iki çalışmada protein bantları saflaştırılmıştır. Yapılan SDS-PAGE analiz

sonuçlarına göre kolon ucuna cam yün yerleştirilerek yapılan çalışmaya nazaran kolon ucuna süzgeç kağıdı yerleştirilerek yapılan çalışma sonucuna göre *PvLDH* proteini ideal bir şekilde saf olarak elde edilmiştir. Doğal şartlar altında saflaştırılan *PvLDH* enziminin aktivitesi indüklenmiş ve indüklenmemiş olarak ölçülmüş indüklenmemiş olarak 0,235 ve indüklenmiş olarak 0,797 olarak ölçülen değerler, hiç bir gen içermeyen JM105 hücresi için ölçülen 0,02 değerine göre enzimin aktif olduğu anlaşılmıştır. Yapılan bütün bu denemelerin sonucunda bu tez çalışmasının hedefi olan *PvLDH* proteini saf ve aktif olarak elde edilmiş ve ileri çalışmalarda kullanıma hazır hale getirilmiştir. Protein saf ve aktif olarak elde edildikten sonra yabancı *PfLDH* proteini ile hazırlanan emülsiyonun Yeni Zelanda beyaz tavşanlarına enjeksiyonu ile elde edilen antikorlar [16]. *P. vivax* LDH'ına karşı da denenmiş ve her iki LDH'ın benzerlik oranı immünolojik olarak test edilmiştir ve sonuçta *PfLDH*'ını tanıyan antikorların, *PvLDH*'ını da tanıdığı gözlenmiştir. Böylece *P. vivax* ve *P. falciparum* LDH'ları arasındaki benzerlik immünolojik olarak kanıtlanmıştır. Elde edilen bu bilgiler ve saf olarak elde edilen *PvLDH* proteini daha ileriki çalışmalarda sıtmanın tedavisine yönelik olarak insan LDH'ına zarar vermeden *P. vivax* LDH'ının aktivitesini önleyecek yapıya dayandırılmış etkili bir ilaç bulma çalışmalarında kullanılacaktır.

KAYNAKLAR

1. Knell, A.J., 1991, *Malaria*, Oxford University Press, Oxford, 91s.
2. Chaikuad, A., Fairweather, V., Connors, R., Josep- Horne, T., Turgut-Balik, D., Brady, R.L., 2005, Structure of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium vivax*: Complexes with NADH and APADH, Biochemistry Published on WEB (ASAP Article 10.1021/bio51416y S0006-2960 (05) 01416-9).
3. Unat, E.K., Yücel, A., Altaş K., Samastı, M., 1995, Unat'ın Tıp Parazitolojisi-İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları:15, İstanbul, 664s.
4. Mendis, K., 2002, The Neglected Burden of *Plasmodium vivax* Malaria. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 64,97-106.
5. WHO, WHO Scientific Group, 1999, Rolling Back Malaria, World Health Report 1999, Geneva.
6. World Health Organisation (WHO) and UNICEF (2005). World Malaria Report 2005.
7. 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., Pertea, 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., 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.
8. Özcel, M.A., 1999, Sıtma, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları no : 16, İzmir, 295s.
9. Simsek, Z., Kurcer, M.A., 2005, Malaria: Knowledge and Behaviour in an Endemic Rural Area of Turkey, Public Health, 119, 202-208.
10. Roth, E.F. JR., Calvin, M.C., Max-Audit, I., Rosa, R., 1988, The Enzymes of the Glycolytic Patway in Erythrocytes Infected With *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites, Blood, 72, No.6, 1922-1925.
11. Klenermn, P., Dickson, H., 1992, Plasma Lactate Dehydrogenase Estimation in the Diagnosis of Malaria, Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 86, 563-565.
12. Makler, M.T., Hinrichs, D.J., 1993, Measurement of the Lactate Dehydrogenase Activity of *Plasmodium falciparum* as an Assesment of Parasitemia, Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 48, No.2, 205-210.

13. Vander Jagt, D.L., Hunsaker, L.A. and Heidrich, J.E., 1981, Partial Purification and Characterization of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 4, 255-264.
14. Royer, R.E., Deck, L.M., Campos, N.M., Hunsaker, L.A., & Vander Jagt D.L., 1986, *Journal of Medical Chemistry*, 29, 1799-1801.
15. Turgut-Balik, D., Holbrook, J.J., 2001, Determination of the DNA and Amino Acid Sequences of the Lactate Dehydrogenase Gene from *Plasmodium falciparum* Strains K1 and PF FCBP: A route to the Design of new Antimalarials, *Turkish Journal of Biology*, 25, 241-250.
16. Turgut-Balik, D., Shoemark, D.K., Sessions, R.B., Moreton, K.M. & Holbrook, J.J., 2001, Mutagenic Exploration of the Active Site of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*, *Biotechnology Letters*, 23, 923-927.
17. Dunn, C.R., Banfield, M.J., Barker, J.J., Higham, C.W., Moreton, K.M., Turgut-Balik, D., Brady, R.L. & Holbrook, J.J., 1996, *Nature Structural Biology*, 3, 912-915.
18. Turgut-Balik, D., Akbulut, E., Shoemark, D., Celik, V., Sessions, R., Moreton, K., 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.
19. Ridley, R.G., 2002, Medical Need, Scientific Opportunity and The Drive for Antimalarial Drugs, *Nature*, 415, 686-693.
20. Olliaro, P., Yuthavong, Y., 1999, An Overview of Chemotherapeutic Targets for Antimalarial Drug Discovery, *Pharmacology & Therapeutics*, 81, 2, 91-110.
21. Rosenthal, P.J., 2001a, *Antimalarial Chemotherapy: Mechanism of Action, Resistance and New Directions in Drug Discovery*, Totowa, New Jersey.
22. Meshnick, S. & Dobson, M., 2001, in *Antimalarial Chemotherapy: Mechanism of Action and New Directions in Drug Discovery* (ed. Rosenthal P.J.) 15-26 (Humana, Totowa, New Jersey).
23. Sanchez, C.P., Lanzer, M., 2000, *Current Opinion in Infect.Dis.* 13, 653-658.
24. Ginsburg, H., War, S.A., Bray, P.G., 1999, *Parasitology Today*, 15, 357-360.
25. Loria, P., Miller, S., Foley, M., Tilley, L., 1999, *Biochemical Journal*, 339, 363-370.
26. Foley, M., Tilley, L., 1998, *Pharmacology & Therapeutics*, 79, 55-87.
27. Wiesner, J., Ortmann, R., Jomaa, H., Schlitzer, M., 2003, *New Antimalarial Drugs*, *Angew. Chem. Int. Ed*, 42, 5274-5293.
28. Fidock, D.A., Rosenthal, P.J., Croft, S.L., Brun, R., Nwaka, S., 2004, *Antimalarial drug Discovery: Efficacy Models for Compound Screening*, *Nature*, 3 (6), 509-520.

29. Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 1997, Şafak Yayınevi, Erzurum, 630s.
30. Fersth, A., 1985, Structures and Mechanisms of Selected Enzymes, W.H. Freeman and Company, New York, 400p.
31. Holbrook, J.J., Liljas, A., Steindel, S.J., Rossman, M.G., 1975, Lactate Dehydrogenase, In: Boyer, D.P. (Ed.), The Enzymes, Vol. XI, Academic Press, New York, 292p.
32. Bzik, D.J., Fox, B.A., and Gonyer, K., 1993, Expression of *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase in *Escherichia coli*, Molecular and Biochemical Parasitology, 59, 155-166.
33. Basco, L.K., Marquet, F., Makler, M.m., Le Bras, J., 1995, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*: Lactate Dehydrogenase Activity and Its Application for in Vitro Drug Susceptibility Assay, Experimental Parasitology, 80, 260-271.
34. Trager, W., 1986, Metabolism: Energy Sources: Respiration, in *Living Together-The Biology of Animal Parasitism*, Plenum, New York, 169s.
35. Sherman, I.W., 1979, Biochemistry of *Plasmodium* (Malarial Parasites), Microbiological Reviews, 43, No. 4, 453-495.
36. Roth, E.F. J.R, Raventos-Suarez, C., Perkins, M. and Nagel, R.L., 1982, Glutathione Stability and Oxidative Stress in *P. falciparum* Infection In-vitro: Responses of Normal and G6PD Deficient Cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, 109, No.2, 355-362.
37. Sessions, R.B., Dewar, V., Clarke, A.R., Holbrook J.J., 1997, A model of *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase and Its Implications for the Design of Improved Antimalarials and Enhanced Detection of Parasitaemia, Protein Engineering, 10, No. 4, 301-306.
38. QIAGEN, QIAprep® Miniprep Handbook, 2003, Cat. No: 27104, Germany, 46p.
39. Sambrook, J. and Russell, D.W., 2001, Molecular Cloning A Laboratory Manual I-II-III, Third Edit., CSHL Press, New york.
40. Turgut-Balık, D., Çelik, V., Moreton, K., Brady, R.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.
41. QIAGEN, QIAquick® Spin Handbook, 2002, Cat. No: 28704, Germany, 34p.
42. Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4, Nature, 227, 5259, 680-685.
43. QIAGEN, Ni-NTA Spin Handbook, 2003, Cat. No: 31314, Germany, 18,20p.

44. Turgut-Balik, D., 1998, Overproduction of the Active Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* Opens a Route to Obtain New Antimalarials, Thesis University of Bristol, U.K, 227p.
45. Kercher, M.A., Lu, P., Lewis, M., 1997, Lac Repressor-Operator Complex, Current Opinion in Structural Biology, 7, 76-85.
46. Sommer, C.A., Silva, F.H., Novo, M.T.M., 2004, Teaching Molecular Biology to Undergraduate Biology Students, Biochemistry and Molecular Biology Education, 32, 7-10.
47. Bader, B., Knecht, W., Fries, M., Löffler, M., 1998, Expression, Purification and Characterization of Histidine-Tagged Rat and Human Flavoenzyme Dihydroorotate Dehydrogenase, Protein Expression and Purification, 13, 414-422.
48. QIAGEN, The QIA expressionist™ A Handbook for High-Level Expression and Purification of 6xHis-Tagged Proteins, 2003, Cat. No: 31314, Germany, 82p.

ÖZGEÇMİŞ

Abdullah ASLAN

Doğum Yeri: Elazığ

Doğum Tarihi: 22.07.1982

Görevi: Araştırma Görevlisi

İş Adresi: Fırat Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji A.B.D., Elazığ

Tel: 0 424 237 00 00/ 3827

Fax: 0 424 233 00 62

e-posta: aaslan@firat.edu.tr

abdullahaslan1@gmail.com

2003-2006: Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji A.B.D.'da Yüksek Lisans Eğitimi

Yüksek Lisans Tez Konusu: *Plasmodium vivax*'ın laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan genin ifade edilerek ilgili proteinin saflaştırılması ve analizlerinin yapılması

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Dilek Turgut-Balık

1999-2003: Fırat Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde Lisans Eğitimi

1992-1998: Orta ve Lise Eğitimi

1987-1992: İlkokul Eğitimi