

***Theileria parva*'nın LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİ
KODLAYAN GENİN İZOLASYONU, KLONLANMASI ve
EKSPRESYONU**

İrmak İÇEN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömer MUNZUROĞLU

AĞUSTOS-2011

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Theileria parva*'nın LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN
İZOLASYONU, KLONLANMASI ve EKSPRESYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Irmak İÇEN

(092110104)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 18 Temmuz 2011

Tezin Savunulduğu Tarih : 17 Ağustos 2011

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ömer MUNZUROĞLU (F.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. A. Kadri ÇETİN (F.Ü)

Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL (İ.Ü)

TEMMUZ-2011

ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımın her aşamasında bana yön veren, bilgi birikimi ile beni sürekli destekleyen, çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Ömer MUNZUROĞLU'na, ve Arş. Gör. Dr. Venhar ÇELİK'e, İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL'e, *Thaileria parva*'ya ait genomik DNA'yı gönderen Dr. Roger PELLE'ye, Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne, FF. 11. 16 no'lu projeye finansal destek sağlayan Fırat Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi' ne ve her zaman yanımda olan, beni destekleyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Irmak İÇEN
ELAZIĞ-2011

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	IV
SUMMMARY	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
TABLolar LİSTESİ	VII
KISALTMALAR ve SİMGELER	VIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Theileria</i> ssp.....	1
1.2. <i>Theileria parva</i>	3
1.2.1. <i>Theileria parva</i> 'nın Yaşam Döngüsü.....	4
1.3. Theileriosis.....	5
1.4. <i>Theileria parva</i> 'nın Genomu.....	6
1.5. Theileriosis ile Mücadelede Kullanılan Yöntemler.....	7
1.5.1. Aşılar.....	7
1.5.2. Antitheilerial İlaçlar.....	8
1.5.3. Vektörle Mücadele.....	8
1.6. Laktat Dehidrogenaz Enzimi.....	9
1.6.1. <i>Theileria parva</i> 'nın Laktat Dehidrogenaz Enzimi.....	11
1.7. Çalışmanın Amacı.....	12
2. MATERYAL VE METOD.....	13
2.1. Materyal.....	13
2.1.1. <i>Escherichia coli</i> Suşları.....	13
2.1.2. Klonlama Vektörü.....	13
2.1.3. Tamponlar ve Stok Solüsyonlar.....	14
2.1.4. Bakteriyolojik Gelişim İçin Kullanılan Besi Yerleri ve Solüsyonlar.....	15
2.1.5. Primerler.....	16
2.1.6. DNA Örneği.....	17

2.2.	Metod.....	17
2.2.1.	Primer tasarımı.....	17
2.2.1.	<i>Theileria parva</i> Laktat Dehidrogenaz Geninin PCR ile Amplifikasyonu.....	18
2.2.2.	Agaroz Jel Elektroforezi.....	19
2.2.3.	DNA'nın Geri Kazanılması.....	19
2.2.3.1.	DNA'nın PCR'dan Geri Kazanılması.....	19
2.2.3.2.	DNA'nın Jelden Geri Kazanılması.....	20
2.2.4.	Klonlanacak DNA ile Vektör DNA'sının Birleştirilmesi (Ligasyon).....	21
2.2.5.	Kalsiyum Klorür Etkileşimiyle Kompetent <i>E. coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması	22
2.2.6.	Transformasyon.....	22
2.2.7.	Rekombinant DNA'yı İçeren Hücrelerin Seçimi.....	23
2.2.8.	Koloni PCR.....	23
2.2.9.	Stok Kültürün Hazırlanması.....	24
2.2.10.	Plazmid DNA İzolasyonu.....	24
2.2.11.	Dizi Analizi.....	25
2.2.12.	Yönlendirilmiş Mutagenезle İntronların Çıkarılması.....	25
3.	BULGULAR	29
3.1.	<i>Theileria parva</i> 'ya Ait Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin Tam Uzunluğunun Elde Edilmesi.....	29
3.2.	<i>TpLDH</i> Geninin p-GEM-T Easy Vektör Sistem i'le Aktarılması.....	30
3.3.	Rekombinant DNA'nın JM103 Bakteri Hücrelerine Transformasyonu.....	31
3.4.	Koloni PCR.....	31
3.5.	<i>TpLDH</i> Genini Sekans Analizi ve Sonucu.....	31
3.6.	Yönlendirilmiş Mutagenезle İntronların Çıkarılması ve Fragmentlerin Elde Edilmesi.....	39
3.7.	<i>TpLDH</i> Geninin Tam Uzunluğunun İntronsuz Olarak Elde Edilmesi.....	41
4.	SONUÇ ve TARTIŞMA.....	45
	KAYNAKLAR.....	49
	ÖZGEÇMİŞ.....	

ÖZET

Theileria parva, Şark sahili humması adı verilen (East Coast Fever, ECF), sığırlarda önemli ekonomik kayıplara neden olan kene kaynaklı bir hastalık etmenidir. ECF'nin tedavisinde kullanılan ilaçların maliyetlerinin yüksek olması, bu ilaçlardan bazılarında direnç geliştirildiğinin rapor edilmesi, parazite karşı etkili bir aşının bulunmaması hastalıkla mücadelede önemli bir problemdir. Bu nedenle etkili, ucuz ve güvenle kullanılabilecek yeni ilaçların geliştirilmesini sağlayacak, kemoterapötik hedeflerin araştırılması gerekmektedir.

Theileria parva ihtiyaç duyduğu enerjiyi glikoliz ile sağlamaktadır. Glikoliz metabolizmasında önemli bir yere sahip olan enzimler, antiheileriallerin tasarımı için yeni hedef olabilirler. Laktat dehidrogenaz enzimi, parazitin glikoliz enzimleri arasında en yüksek aktiviteyi gösteren enzim olmasından dolayı terapötik hedef olarak seçilmiştir. Laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan genin klonlanması standart metodlarla gerçekleştirilip, pGEM-T vektörüne aktarılmıştır. *TpLDH* geni 2 intron ve 3 ekson içerip, intronlarıyla beraber toplam 1353 baz çiftinden oluşmuştur. *TpLDH* geninin intronları yönlendirilmiş mutagenezle çıkarılıp, ekson fragmentleri PCR ile birleştirilmiştir. PCR ile gerçekleştirilen çalışmanın sonunda, *TpLDH* geni intronsuz, 966 baz çifti uzunluğunda, ekspresyona hazır halde elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Theileria parva*, Apikompleksan, Laktat dehidrogenaz, Antitheilerial, Kemoterapötik Hedef

SUMMARY

Isolation, Cloning and Expression of The Gene Encoding Lactate Dehydrogenase Enzyme From *Theileria parva*

Theileria parva is the causative agent of East Coast fever (ECF), a tick born disease, result in major economic losses in cattle. The high costs of drugs used to treat of ECF, development of resistance to some of these drugs , the absence of an effective vaccine against the parasite are significant problems in dealing with this illness. Thus, it is necessary that exploiting new resources to identify effective therapeutic targets to help develop new, effective, and cheap drugs, is imperative.

Glycolysis is the main pathway of *Theileria parva* for energy production. The enzymes that play an important role in glycolysis may provide new targets for designing antitheilerials. Given its highest activity among glycolytic enzymes of the parasite, lactate dehydrogenase enzyme has been selected as the therapeutic target. Lactate dehydrogenase gene was cloned into pGEM-T vector with standard methods. *TpLDH* gene contains 2 introns, 3 exons and the gene is 1353 base pair in lenght. The introns were removed by site-directed mutagenesis then, exons fragments were ligated by PCR which generated a protein coding region 966 bp in length.

Key Words: *Theileria parva*, Apicomplexan, Lactate Dehydrogenase, Antiheilerial, Chemotherapeutic Target

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Sığırlardaki temel <i>Theileria</i> türlerinin dünyadaki dağılımı.....	1
Şekil 1.2. <i>Theileria parva</i> ve <i>T. annulata</i> 'nın yaşam döngüsü.....	4
Şekil 1.3. LDH enzimi tarafından L-laktatın pürivata oksidasyonunu ve pürivatın laktata redüksiyonu.....	9
Şekil 2.1. pGEM-T vektörünün fiziki haritası ve referans bölgeler.....	14
Şekil 2.2. Yönlendirilmiş mutagenезle intronların çıkarılması.....	25
Şekil 3.1. Tam uzunluğa sahip <i>TpLDH</i> geninin elde edilmesi.....	30
Şekil 3.2. <i>TpLDH</i> geninin 5'→3' zincirinin dizi analizi sonucu.....	32
Şekil 3.3. <i>TpLDH</i> geninin 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu.....	34
Şekil 3.4. <i>TpLDH</i> enzimini kodlayan genin dizi analizi ile elde edilen nükleotid dizisi	36
Şekil 3.5. PCR ile A, B ve C fragmentlerinin elde edilmesi.....	41
Şekil 3.6. <i>TpLDH</i> genine ait A, B ve C fragmentlerinin jelden saflaştırılması sonucu elde edilen konsantrasyonları.....	42
Şekil 3.7. A, B ve C fragmentlerinin PCR ile birleştirilmesi sonucu intronsuz <i>TpLDH</i> geninin elde edilmesi.....	44
Şekil 4.1. <i>T. parva</i> (<i>TpLDH</i>), <i>T. annulata</i> ve <i>Bos taurus</i> 'un laktat dehidrogenaz enzimlerinin karşılaştırılması.....	47

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.1. Sığırlarda bulunan <i>Theileria</i> türleri, dünyadaki dağılışı ve patojeniteleri.....	2
Tablo 1.2. <i>Theileria parva</i> genomunun, genomu çözülmüş diğer Apikompleksanlarla (<i>P. falciparum</i> ve <i>C. parvum</i>) karşılaştırılması.....	7
Tablo 2.1. Primerlerin nükleotid dizileri, Tm değerleri ve GC yüzdeleri.....	17
Tablo 2.2. PCR reaksiyon bileşenleri, stok konsantrasyonları ve alınan miktarlar.....	18
Tablo 2.3. Ligasyon reaksiyonu.....	21
Tablo 2.4. Koloni PCR reaksiyon bileşenleri ve alınan miktarlar.....	24
Tablo 2.5. Yönlendirilmiş mutagenезle intronların çıkarılması sırasında kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları.....	26
Tablo 2.6. PCR ile A, B ve C fragmentlerinin birleştirilmesi.....	27
Tablo 2.7. PCR bileşenleri ve miktarları.....	27
Tablo 3.1. PCR bileşenleri ve miktarları.....	29
Tablo 3.2. A fargmentinin elde edilmesi için gerçekleştirilen PCR bileşenleri ve miktarları.....	39
Tablo 3.3. B fargmentinin elde edilmesi için gerçekleştirilen PCR bileşenleri ve miktarları.....	40
Tablo 3.4. C fargmentinin elde edilmesi için gerçekleştirilen PCR bileşenleri ve miktarları.....	40
Tablo 3.5. PCR basamak I'de yer alan reaksiyon bileşenleri ve miktarları.....	42
Tablo 3.6. PCR basamak II'de yer alan reaksiyon bileşenleri ve miktarları.....	43

KISALTMALAR ve SİMGELER

A	: Adenin
ATP	: Adenozin trifosfat
A/Ala	: Alanin
aa	: Aminoasit
Arg	: Arjinin
Asn	: Asparajin
bp	: Baz çifti
C	: Sitozin
°C	: Derece santigrat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotidtrifosfat
dH₂O	: Distile su
ECF	: Şark sahili humması
EDTA	: Etilendiamintetra-asetik asit
G	: Guanin
H/His	: Histidin
IPTG	: Isopropil-B-D-thiogaltopiranosid
LDH	: Laktat dehidrogenaz
L	: Litre
LB	: Luria bertani besi yeri
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
M	: Molar
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid (indirgenmiş)
OD	: Optik dansite
pmol	: Pikomol
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu

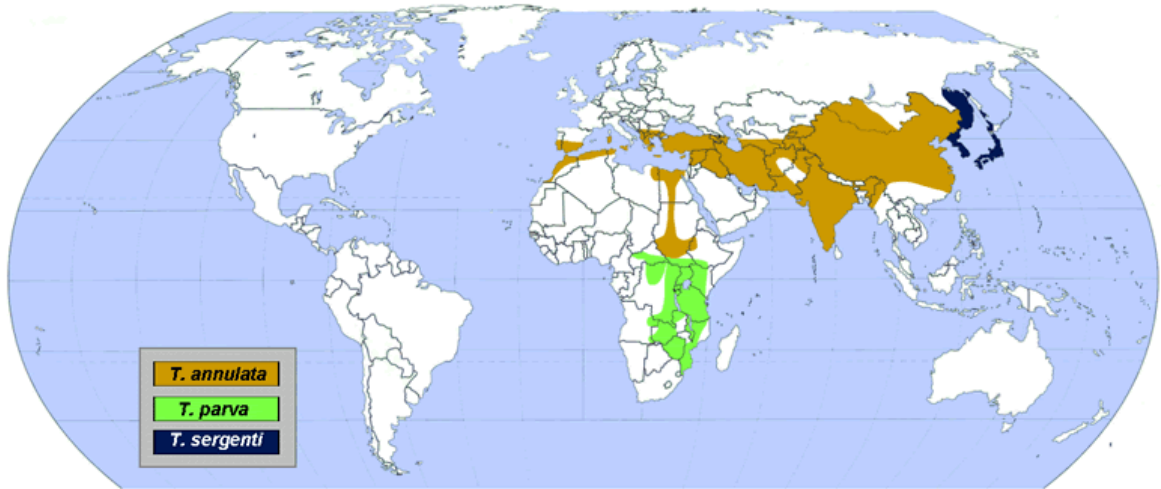
SAB	: Sample application buffer
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
T	: Timin
<i>Tp</i>	: <i>Theileria parva</i>
<i>Tp</i>LDH	: <i>Theileria parva</i> laktat dehidrogenaz enzimi
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
UV	: Ultraviyole
u	: Ünite
µL	: Mikrolitre

1. GİRİŞ

Apikompleksan şubesi, protista alemine ait tek hücreli parazit canlılardan oluşur [1, 2]. Bu protozoonların hepsi hayvanlarda parazit olarak yaşamakta, insanlarda ve tarım hayvanlarında büyük morbidite ve mortaliteye sebep olmaktadır. Bu parazitler, hücre içine aktif olarak girebilen, yalnızca konak hücre içinde gelişebilen ve çoğalabilen hücre içi parazitlerdir. Apikompleksan şubesi hem insan sağlığı için önemli olan hem de ekonomik önemi olan birçok paraziti barındırmaktadır [3]. Bu parazitler arasında; Afrika'da ruminantlarda şark sahili hummasına (East Coast Fever, ECF) neden olan *Theileria parva*, Tropikal Theileriosis'e neden olan *Theileria annulata* türleri, sıtma etkeni olan *Plasmodium* türleri, bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde önemli fırsatçı patojen etken *Toxoplasma gondii*, tavuk ve sığırlarda patojen olan *Eimeria* türleri, Cryptosporidiosis etkeni olan, başta hayvanlar olmak üzere insanlarda da hastalığa neden olan *Cryptosporidium* gibi parazitler yer almaktadır [4, 7].

1.1. *Theileria* spp.

Theileria türleri; Apikompleksan şubesi, Sporozoea sınıfı, Piroplasmia alt sınıfı, Piroplasmida takımı ve Theieridae ailesi içinde yer almaktadır. Bu soya bağlı türler, dünyanın her tarafında yaygın olarak bulunmakta [Şekil 1.1.] ve evcil hayvanlar için büyük tehdit oluşturmaktadır [8, 9].



Şekil 1.1. Sığırlardaki temel *Theileria* türlerinin dünyadaki dağılımı [11].

Theileria parazitlerinin hayat döngüsü *Ixodidae* ailesinde yer alan keneler ile sığır, koyun, keçi, manda, zebu ve geyik gibi memeli hayvanlar arasında geçer. Memeli hayvanlarda parazitlerin hayat döngüsü, arakonak kenenin nimf ve erişkin safhada kan emme esnasında sporozoitleri vermesiyle başlar [10].

Sığırlarda *Theileria* türleri tarafından oluşturulan enfeksiyonun şiddeti, türlerin patojenitesine göre farklılıklar göstermektedir. Bazı türler ileri derecede patojen etkiye ve yüksek ölüm oranına sahipken, bazı türler düşük patojeniteye sahip, bazıları da patojen değildir [Tablo 1.1.].

Tablo 1.1. Sığırlarda bulunan *Theileria* türleri, dünyadaki dağılışı ve patojeniteleri [12].

Türler	Evcil Konakları	Vektörler	Hastalık	Endemik Bölgeler
<i>T. parva</i>	Sığır, Evcil Buffalo	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Doğu sahili humması (ECF)	Doğu, Orta ve Güney Afrika
<i>T. annulata</i>	Sığır, Asya Buffalosı	<i>Hyalomma</i> Türleri	Tropikal theileriosis	Güney Avrupa, Kuzey Avrupa, Orta ve Uzak Doğu
<i>T. mutans</i>	Sığır	<i>Amblyomma</i> Türleri	Az patojen	Sahranın güneyi, Karayipler
<i>T. taurotragi</i>	Sığır	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Az patojen	Doğu, Orta ve Güney Afrika
<i>T. velifera</i>	Sığır	<i>Amblyomma</i> Türleri	Patojen değil	Sahranın güneyi, Karayipler
<i>T. buffeli</i>	Sığır, Manda	<i>Haemaphysalis</i> Türleri	Az patojen	Güney Amerika dışında tüm kıtalar

Hastalığın patogenezi parazitin lenf hücreleri ile eritrositlerde neden olduğu tahribat sonucu ortaya çıkar. Bu tahribatın oluşmasında *T. parva* enfeksiyonlarında başlıca T-lenfositlerinin alt birimleri (BoT4⁺ ve BoT8⁺) ve B-lenfositleri enfekte durumda bulunmuştur [13, 14]. *Theileria parva* enfeksiyonlarında eritrositler içindeki piroplasm formları çoğalmaz ve dolayısıyla hastalığın patogenezisinde şizontlar [10] etkilidir. *T. mutans* ve bazı türlerde lenf yumruları, dalak ve karaciğerde şizontlar geçici olarak

saptanmakla birlikte, piroplazmlar etkiliyken, *T. annulata*'da ise hem şizontlar hem de piroplazmlar etkin rol oynar [15-18].

Sığırlarda, *T. parva*, *T. annulata*, *T. mutans*, *T. taurotragi*, *T. velifera*, *T. buffeli* olmak üzere altı *Theileria* türü bulunmaktadır. Bu türler arasında biyolojik, morfolojik, genetik ve patojenite bakımından önemli farklılıklar bulunmaktadır. Bunlardan *T. parva* ve *T. annulata* en patojen iki tür olup, sığırlarda lenfoproliferatif karakterde, yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden hastalıklara neden olurlar. Diğer *Theileria* türleri ise daha az patojen veya apatojen türler olarak kabul edilmektedirler. *T. mutans*'ın birçok araştırmacı tarafından apatojen olduğu [15, 19, 20], bazı araştırmacılar tarafından ise patojen bir tür olduğu nitelendirilmiştir [21]. Geyik ve antilopların paraziti olan *T. taurotragi*'nin sığırlarda düşük patojeniteye sahip olduğu, manda ve sığırlarda bulunan *T. velifera*'nın ise apatojen bir tür olduğu ifade edilmektedir [22]. *T. parva* ve *T. annulata* dışındaki türler ekonomik anlamda önemli olmamalarına rağmen, bu türlerin şizontları ve piroplasm formları *T. parva*'nın teşhisini zorlaştırmaktadırlar [23].

1.2. *Theileria parva*

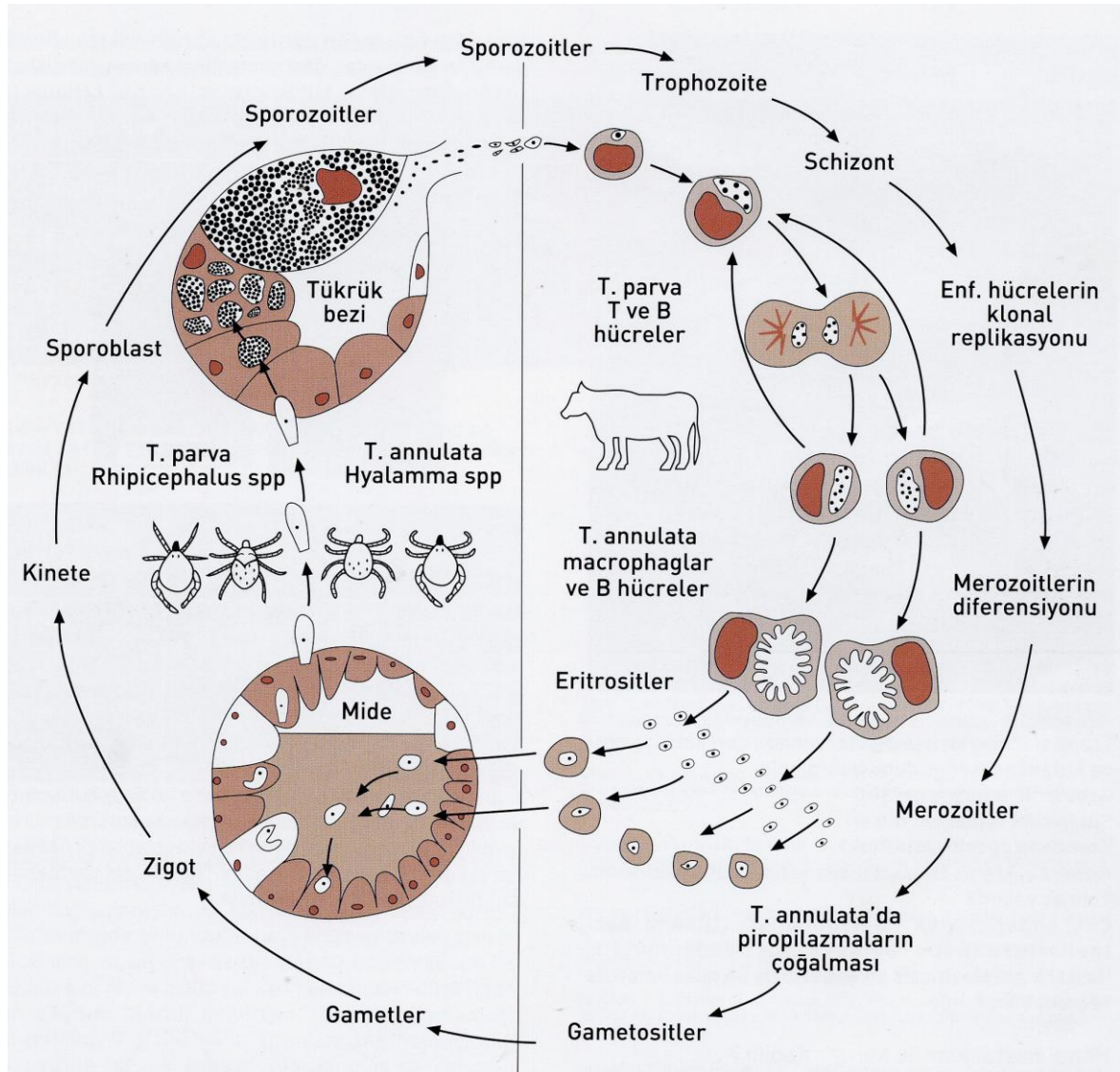
Şark Sahil Humması (East Cost Fever, ECF) etkeni olarak bilinen *T. parva*'nın Orta, Doğu ve Güney Afrika'da (Sudan, Zaire, Kenya, Victoria Gölü) sığır, zebu, manda ve antiloplarda bulunduğu belirtilmiştir [14, 24].

T. parva'nın vektörleri, *Rhipicephalus appendiculatus* başta olmak üzere, *R. zambesiensis*, *R. duttoni*, *R. simus* ve *R. evertsi*'dir [14]. *T. parva*'nın son konaktaki proliferasyon yeri lenfositlerdir. *T. parva* enfeksiyonlarında başta T-lenfositlerinin altbirimleri (BoT4+ ve BoT8+) ve B-lenfositleri enfekte bulunmuştur [13].

Theileria parva'nın, *T. parva parva*, *T. parva bovis* ve *T. parva lawrencei* olmak üzere üç alt tipinin bulunduğu, bu tipler arasında morfolojik ve serolojik farklılıklar olmadığı, ancak biyolojik ve epidemiyolojik farklılıkların bulunduğu ifade edilmektedir [22]. Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar bu alt tipler arasında genetik farklılıkların da olduğunu göstermektedir [25].

1.2.1. *Theileria parva*'nın Yaşam Döngüsü

Theileria parva'nın birincil vektörü *Rhipicephalus appendiculatus* olmasına rağmen parazit aynı zamanda *R. zembeziensis* and *R. duttoni* tarafından da taşınır [26]. Kenelerle taşınmanın gerçekleşebilmesi için parazitin kenede gelişimini tamamlamış olması gerekir [27].



Şekil 1.2. *Theileria parva* ve *T. annulata*'nın yaşam döngüsü [28].

Sporozoitler nimf ya da yetişkin kenenin tükürük bezlerinde oluşur. İnfekte kenenin omurgalı konağı ısırmasıyla sporozoitler konak hücreye aktarılır. Daha sonra sporozoitler lenfositleri işgal ederek makroşizontları oluştururlar. Makroşizontlar konakçı hücreyi

(lenfosit) transformasyona ve bölünmeye teşvik eder. Bunun sonucunda enfekte lenfositler mitotik yolla bölünerek bütün lenf dokusuna yayılıp, omurgalı hayvanın ölümüne neden olmaktadır. Diğer yandan enfeksiyonun 8-10. günlerinde bir kısım makroşizontlar mikroşizont haline dönüşürler ve hücreyi parçalar. Neticede serbest kalan mikromerozoitler eritrositleri istila eder. Eritrosit içerisinde bulunan bu formlara piroplasm olarak adlandırılır. Keneler kan emerken eritrositlerle beraber piroplasm formlarını da alırlar. Kene bağırsağında mikrogametler ve makrogametler oluşur. Makrogamet mikrogamet tarafından döllenmesi ile kenenin bağırsak epitel hücrelerinde zigotlar oluşurlar. Daha sonra zigotlar hareketli kinetler haline dönüşürler [29, 30]. Kinetler kene tükürük bezlerine hareket ederler ve kenenin gömlek değiştirip bir sonraki döneminde konağa tutunmasıyla birlikte tükürük bezindeki parazitler olgunlaşır ve sporogoni şeklinde çoğalmayla sporozoitler meydana gelir. Kenenin omurgalı konağı ısırmasıyla sporozoitler konağa aktarılmış olur [28].

1.3. Theileriosis

Theileriosis, özellikle sığırlarda konaklanan hücre içi zorunlu parazit olan, *Theileria spp.* türlerinin neden olduğu hastalık olup dünyadaki evcil ve yabani hayvanların geniş bir kısmını etkilemektedir. Bunlardan *Theileria parva*, Şark Sahili Hummasına neden olurken, *Theileria annulata*'da Tropikal Theileriosis'e (Mediterranean Theileriosis) neden olmaktadır [23]. *Theileria* türlerinin biyolojik olarak dikkate alınmalarının en önemli nedenlerinden biri de lenfositlere etki edebilen tek ökaryotik patojen olmalarıdır [31].

Theileria parva'nın neden olduğu Şark Sahili Humması, her yıl Afrika'da 100 milyon sığırın ölümüne sebep olup, yıllık 200 milyon doları aşan ekonomik kayıplara yol açmaktadır [32]. Direk ölümlerin dışında, Şark Sahili Humması'nın görüldüğü endemik bölgelerde sığırlarda aşırı kilo kaybına, düşük fertilité oranına, genç hayvanlarda gelişmenin yavaşlamasına, et veriminde ve süt üretiminde ciddi kayıplara, felçlere, konaklarının bağışıklık sistemini zayıflatarak ikincil parazit enfeksiyonlarına karşı savunmasız kalmalarına neden olmaktadır [33, 34].

Hastalık hayvanlarda kendini başta kenenin ısırıldığı yerde lenf yumrularının şişmesi, bu şişkinliğin bütün lenf yumrularına yayılmasıyla gösterir. Bunu ateş, iştahsızlık, hareketlerin yavaşlaması, geviş getirmenin durması izler. Hastalığın diğer belirtileri ise; göz kapaklarında, kulaklarda, çene altında ödem ve şişkinlik, burun akıntısı, soluk alıp

vermenin hızlanması ve ishaldir [35]. Şark Sahili Humması, aynı zamanda merkezi sinir sistemine etki ederek nörolojik semptomlarında ortaya çıkmasına neden olur. Bazı hayvanlar iyileşip taşıyıcı olmalarına rağmen herhangi bir belirti göstermezken, bir kısım taşıyıcıda gelişmede gerileme, et ve süt veriminde azalış gözlenmiştir [36-38].

1.4. *Theileria parva*'nın Genomu

T. parva genomu; parazitin biyolojisi üzerinde araştırmaların genişletilmesi, parazitin neden olduğu Şark Sahili Humması'na karşı aşı üretilebilmesi için şizont antijenlerinin belirlenmesi, diğer Apikompleksan genomlarıyla özellikle *Plasmodium falciparum* (sıtma etkenlerinden biri) ve *Theileria annulata* genomuyla karşılaştırılma yapmak amacıyla sekanslanmıştır [31, 39]. *T. parva*'nın haploid nükleer genomu 8.3×10^6 bazdan oluşmuş dört kromozoma sahiptir. Genomda yer alan toplam G+C içeriğinin % 34.1 olduğu saptanmıştır. Oysa bu oran *Plasmodium falciparum*'da sadece % 19.4 olarak gözlenmiştir. *Theileria parva*'nın her bir kromozomunda *Plasmodium falciparum*'unda kromozomlarında da gözlenen, A+T bakımından oldukça zengin (% 97 oranından büyük), 3 kbp uzunluğunda, sentromer olabileceği düşünülen bölgelerin yer aldığı saptanmıştır [31].

Theileria parva genomu yaklaşık olarak 4035 protein kodlayan gene sahiptir. Bu sayının *Plasmodium falciparum* genlerine oranla % 20 daha az olmasına rağmen, daha yüksek gen yoğunluğuna sahip, genler arası mesafenin kısa olduğu, çok sayıda intron içeren genler bulundurmaktadır.

Theileria parva 'nın önemli özelliklerinden biride T ve B lenfositlerini enfekte edip, bu enfeksiyon sonucu lenfosit hücrelerinin geri dönüşümsüz olarak dejenere olup, kontrolsüz bir şekilde çoğalmalarına neden olmalarıdır [39].

Theileria parva proteomu üzerinde yapılan araştırmalarda, 85 üyeden oluşan bir protein grubu saptanmıştır. Bu protein grubunun benzer yapılara sahip oldukları, N -terminal uçlarında sekresyon sinyali içeren, merkezde prolin bakımından zengin glutamin yoğunluğunun az olduğu, omurgalı konağın immün sistemi tarafından tanımayı zorlaştırdığı düşünülen bir kompleks yer almaktadır [40].

Tablo 1.2. *Theileria parva* genomunun, genomu çözülmüş diğer Apikompleksanlarla (*P. falciparum* ve *C. parvum*) karşılaştırılması

Özellikler	Apikompleksan Organizmalar		
	<i>T. parva</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>C. parvum</i>
Büyükölük (bp)	8.308.027	22.853.764	9.100.000
Kromozom Sayısı	4	14	8
Toplam G+C içeriğı (%)	34.1	19.4	30
Protein olarak kodlanan gen sayısı	4035	5268	3807
Gen yoğunluğu	2057	4338	2382
Kodlanma yüzdesi	68.4	52.6	75.3
İntronlu genler (%)	73.6	53.9	5
Her bir gende ekson sayısı (ortalama)	4	2	1

1.5. Theileriosis ile Mücadelede Kullanılan Yöntemler

Theileriosis'e karşı kemoterapi, aşılama ve vektör mücadelesi şeklinde kontrol metodları uygulanmaktadır [41].

1.5.1. Aşılar

Genel olarak Theileriosis'e karşı iki çeşit bağışıklama yöntemi kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi; enfeksiyon ve tedavi yöntemi olarak adlandırılan, hayvanların bir yandan canlı parazitlerin kullanıldığı aşılama ve eş zamanlı olarak uzun süre oksitetrasiklinle tedavi edilmesine dayanmaktadır [42]. Bu yöntemde canlı parazit kullanıldığı için, aşının ülkeler arasında taşınımı sırasında, o ülkelerde varolmayan suşların bulaşma olasılığı endişelere neden olmaktadır [43, 44].

Diğer bir yöntemde zayıflatılmış şizont aşısının kullanımına dayanır. *In vitro* kültürde *Theileria spp.* türleri hücrelerle enfekte ettirilip zayıflatılır. Kullanılan bu yöntem sığırlarda hastalık belirtilerine neden olmaz. Ancak aşının etkinliği kısa bir süreliğine olduğu için etkin bir korumadan söz edilemez [45]. Dolayısıyla *Theileria parva*'ya karşı güvenli ve etkili bir aşıdan söz etmek mümkün değildir [35, 46].

1.5.2. Antitheilerial İlaçlar

Hastalığın tedavisinde kullanılan buparvaquone, parvaquone ve halofuginone gibi antitheileriallar mevcuttur [47-49]. Bunlardan halofuginone hydrobromidin sığırlardaki ilk hastalık belirtilerini ortadan kaldırdığı ve lenf yumrularına sürülmesiyle şizontları tamamen yok ettiği bildirilmiş olsa da, ilerlemiş olgularda hastalığın tekrarlandığı gözlenmiştir [50]. Ayrıca halofuginonenin tedavi edici doz ve toksik etkisi yaratan doz arasındaki farkın çok az olması pratikte kullanımını sınırlandırmaktadır [45,49]. Günümüzde kullanılan en önemli kemoterapötik ajan, hydroxynaphthoquinone grubunda bulunan parvaquone ve buparvaquonenin sığırlar için etkili bir antitheilerial olduğu *in vitro* ve *in vivo* olarak geniş bir şekilde gösterilmiştir [47-49]. Her iki ilaçta parazitin şizont formu üzerinde etkili olmasına rağmen, parvaquone parazitin tamamen elemine etme özelliğine sahip değildir [47]. Ayrıca bu ilaçların etkinliğini gösterebilmesi için hastalığın erken evresinde kullanılmaları gerekir [46]. Buparvaquone ve parvaquonenin temininde sorunların yaşanması ve fiyatının da oldukça yüksek olması ilacın kullanımını sınırlandırmaktadır [28]. İlaç kullanımını sınırlandıran koşulların yanında, son zamanlarda bu antitheileriala karşı direnç geliştiği rapor edilmiştir [51]. Bu durum, etkili, ucuz ve güvenle kullanılabilecek yeni bir antitheileriala acil ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir [39].

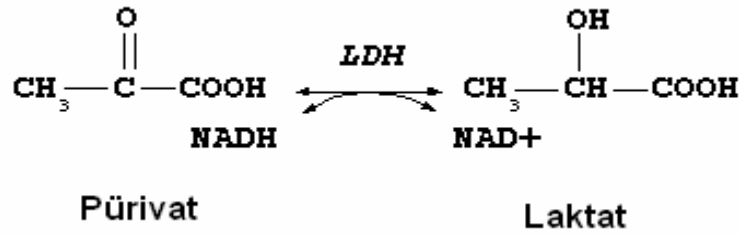
1.5.3. Vektörle Mücadele

Konak-*Theileria* sp.-kene üçlüsü arasındaki herhangi bir zincir halkasının kırılmasının Theileriosis'in engellenmesini sağlayacağı düşünülmektedir. Bunun için en öncelikli amaçlardan biri duyarlı hayvanların vektör kenelerle karşılaşmasını engellemektir. Bu amaçla kene kontrolü, sığırların ve barınaklarının akarisitlerle ilaçlanmasıyla yapılır [52]. Kene kontrolü için kullanılan akarisitlerin yüksek maliyeti ve geniş bir kısmına direncin hızlı bir şekilde gelişmesi [44] ve buna bağlı olarak akarisit direnci ile mücadele için daha yeni ve daha pahalı olanlarına ihtiyaç duyulması önemli bir problemdir [46, 53]. Diğer taraftan akarisit uygulamaları masraflı olduğu kadar, et ve sütte kalıntı bırakmaları, çevreyi kirletmeleri gibi dezavantajlarada sahiptirler [14]. Bütün bunlar göz önüne alındığında akarazitlerle kontrolün sürdürülebilir bir koruma sağlamadığı ortadadır [54].

1.6. Laktat Dehidrogenaz Enzimi

Laktat dehidrogenaz enzimi(LDH) (EC: 1. 1. 1. 27) L-laktatın pirüvata ve pirüvatın laktata dönüşmesini katalizleyen bir enzimdir [55].

Omurgalı LDH enziminin aktif formu 140,000 daltonluk dört altbirimden oluşmuş, tetrametrik bir yapıya sahiptir. Bu yapı fizyolojik koşullarda enzimin daha kararlı olmasını sağlamaktadır [56, 57]. Tetramerik yapıda, her alt ünitenin katalitik olarak birbirinden bağımsız aktif merkezleri bulunmaktadır. Metabolik koşullara bağlı olarak LDH enzimi glikolizin son ürünü olan pirüvatın L-laktata oksidasyonunu ve pirüvatın laktata redüksiyonunu NAD^+ (nikotinamid adenin dinükleotit) koenzimi aracılığıyla katalizler [55]. İleri ve geri tepkimelerin pH'ları farklıdır. İleri tepkime için pH: 9-10 iken geri tepkime için pH: 6.8-7.5'tir [58]. Laktat dehidrogenaz enzimi birçok organizmada bulunmakta ve başta glikoliz olmak üzere glukoneogenez ve fosfoketolaz metabolik yollarında görev almaktadır [59-61].



Şekil 1.3. LDH enzimi tarafından L-laktatın pirüvata oksidasyonunu ve pirüvatın laktata redüksiyonu

LDH enziminin katalizlediği reaksiyonda NADH hidrojen verici olarak kullanılır. Metabolizmada bu NADH da gliseraldehit-3-fosfatın, 1,3-difosfoglisarik asite oksitlenmesi sırasında oluşur. Bu açıdan LDH enzimi anaerobik glikolizin hem son basamağını temsil etmesi, hem de sabit bir NAD^+ kaynağı olması itibarıyla önemli bir enzimdir [61].

Yüksek yapılı canlılarda LDH enzimi, farklı genler tarafından kodlanan M, H, ve X altbirimlerine sahiptir [57]. Bu alt birimlerden aminoasit dizisi bakımından çok az değişiklik gösteren, farklı katalitik özelliklere sahip H ve M alt birimlerinin tetrametrik yapıda gelişigüzel dizilmeleri sonucu toplam 5 farklı LDH izoenzimi oluşmaktadır [55, 56, 62]. Bunlar; LDH-1 (H_4), LDH-2 (H_3M), LDH-3 (H_2M_2), LDH-4 (HM_3), LDH-5 (M_4)

izoenzimleridir [56]. H altbirimleri M altbirimlerine oranla daha çok asidik özellikte olup, daha az temel aminoasitlere sahiptir [56].

LDH izoenzimlerinin dağılımı, dokuların metabolik ihtiyaçlarına göre farklılık göstermektedir [63]. M₄ izoenzimi iskelet kasında, H₄ izoenzimi ise kalp ve karaciğerde bol miktarda bulunmaktadır. X₄ izoenzimi ise testis ve spermatozoada bulunur. Bu formların dışında bazı canlılarda farklı genler tarafından kodlanan E (kemikli balıkların sinir sistemlerinde) ve F (balık karaciğerinde) formlarına da rastlanmıştır [55, 64].

Her bir LDH altbiriminin aktif bölgesinde, bir katalitik bölge ve bir nükleotid bağlama bölgesi yer almaktadır. Bu yapısal motif Rossmann motifi olarak isimlendirilmektedir [69]. Dehidrogenaz grubuna ait enzimlerle yapılan çalışmalarda, koenzim bağlama bölgeleri (nükleotid bağlama bölgeleri) büyük bir benzerlik gösterirken, katalitik bağlanma bölgelerinin yapısal olarak daha çok farklılık gösterdikleri ortaya çıkmıştır [66, 67].

Katalitik bağlanma bölgesinde, üç zincirin bulunduğu (β G, β H, β 3J ve β K, β L, β M) iki tabakanın dışında paketlenmiş dört heliks (α 2F, α 1G, α 2G, ve α H) yer almaktadır.

LDH katalitik bağlanma bölgesi iki bölümden oluşmuştur. Bunlardan biri substrat bağlanma bölgesi (pirüvat veya laktat), ikincisi ise kofaktör bağlanma bölgesidir (NADH ya da NAD⁺). Katalitik bağlanma bölgesi substrat kordinasyonunu ve katalizlenme için gerekli aminoasitleri sağlamaktadır [68]. Substrat bağlanmasından ve katalizlenmesinden sorumlu olan aminoasitler His-195, Arg-171, Asp-168, Arg-109, Thr-246 olup bunlar kimyasal olarak [69], yapısal olarak [55, 70, 71] ve kinetik olarak [72] analiz edilmişlerdir.

LDH enzimi, NAD(H) yokluğunda pirüvat veya laktatla kompleks oluşturmaz. Benzer şekilde nükleotidlerin yokluğunda substrat analogu olan oxamat ve oxalat ile de kompleks oluşturmadağı gözlenmiştir [73]. Katalitik mekanizma, LDH/NADH ikili kompleksinin oluşumundan sonra substratın LDH'a bağlanmasıyla başlar. Substrat, enzimin aktif merkezine yeterince yaklaştığı zaman, bir dizi olay meydana gelir. Pirüvatın karbonil grubunun ve koenzimin nikotinamid grubunun birbirine göre optimal yönelmeye ulaşması ve bu yönelmenin sabitlenmesi önemlidir. Polipeptit zincirinin ön yüzü, 98-110 aminoasitlik ('mobile loop' olarak adlandırılır) aktif bölge halkası, substrat bağlanma bölgesi üzerine kapanır [74]. His-195'in imidazol grubu asit-baz katalizi gibi görev görür. Hidroksiasidin ketoaside dönüşmesi sırasında substratın hidroksil grubundan bir proton alır. Diğer yandan tersi reaksiyonda (laktatın pürivata dönüşümü sırasında) karbonil oksijenine proton sağlar [75]. His-195'in imidazol grubu protonlanmadıkça LDH'ın enzim-NADH-pirüvat kompleksini oluşturmadağı gözlenmiştir. Asp-168, His-195'in protonlanmış

formunu kararlı hale getirmek için onunla etkileşir [75]. Aynı zamanda aktif merkezde yer alan diğer bir önemli aminoasit olan Arg171'in artı yükünün substratın negatif yükünü dengelediği ortaya çıkmıştır [76]. Sonuçta substrat LDH enzimine bağlanır ve reaksiyon gerçekleşir. Aktif merkezde yer alan Arg-109'un pozitif yüklü guanidinium grubu karbonilin oksijenine yaklaşır. Protein konformasyonunda değişiklik meydana gelir. His-195'e ek olarak Arg-109'un da pürivatın karbonilinin polarizasyonunun devam etmesinde rol aldığı düşünülmektedir [69].

Histidin-195, Arg-109, Asp-168 ve Arg-171'in bilinen tüm LDH dizilerinde korunmuş olması bu amino asitlerin, enzimin işlevinde önemli yere sahip olduğunu göstermektedir. Aktif merkezde yer alan bu enzimlerin önemi yönlendirilmiş mutagenезler ile gösterilmiştir [72, 75, 77, 78].

1.6.1. *Theileria parva*'nın Laktat Dehidrogenaz Enzimi

T. parva'nın hayati fonksiyonu için önemli olabilecek enerji metabolizmasının potansiyel zayıf noktaları yeni bir antitheilerial tasarımı için kemoterapötik hedef olabilir [79]. Birçok Apikompleksan protozoalara karşı etkin ve orjinal ilaçların tasarımı için hedef olarak biyokimyasal yolların potansiyel zayıf noktaları araştırılmış olmasına rağmen *Theileria parva*'ya yönelik kapsamlı çalışmalar uygulanmamıştır. Bu tür önemli yollar hakkında gerekli bilgilerin yeterli olmayışı *T. parva*'ya karşı ucuz ve etkili kemoterapik ajanların araştırılmasını engellemiş olup, bu alandaki ilerlemenin gerçekleşmesini ağırlaştırmıştır [80].

T. parva şizontlarının uzun bir süre infekte edilmiş hücrelerden kontamine olmadan kültüre alınmasının imkansız olması, maliyet, izolasyon prosedürlerinin uzunluğu gibi problemler şizontlardaki enerji metabolizmasının enzimleri üzerinde çalışmalar yapılmasını geciktirmiştir [80]. Bu yüzden *T. parva* şizontlarında laktat dehidrogenaz enzimi ve diğer glikolitik enzimlerin varlığı sadece elektroforetik çalışmalarla gösterilebilmiştir [81].

İzolasyon problemlerinin aşılması [82] ve sonrasında *T. parva*'nın genom projesinin tamamlanması [32] ile laktat dehidrogenaz geni tespit edilmiştir. Buna göre LDH geni, 321 amino asitlik proteini kodlayan 966 baz çiftlik açık okuma çerçevesini içermektedir [32]. LDH geni klonlanmış olmamakla birlikte *T. parva* laktat dehidrogenaz enziminin (*TpLDH*) yapısı ve karakterizasyonu ile ilgili ek çalışmalarda bulunmamaktadır. Bununla beraber

yapılan çalışmalarda *T. parva* şizontlarında glikolitik enzimlerin yüksek aktiviteye sahip oldukları ve en yüksek aktiviteyi laktat dehidrogenaz enziminin gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, *T. parva* şizontlarının enerji üretimi için temel yol olarak glikolize bağlı olması açısından *Plasmodium*'lardaki eritrositik aşamaya [83] benzediğini göstermiştir [80].

1.7. Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasında, ECF'ye karşı etkin olacak yeni ilaç tasarımlarına katkıda bulunmak amacıyla *T. parva*'nın laktat dehidrogenaz enzimi kodlayan geninin literatürde ilk defa izole edilip, klonlanması ve sonrasında ekspresyonu amaçlanmıştır. Bu alışma, *T.parva*'nın genom projesi tamamlanmış olmasına rağmen, bu güne kadar karakterizasyonu ile ilgili ilave çalışmaların bulunmadığı laktat dehidrogenaz enzimi hedef alınarak yapılacak olan ilaç tasarım çalışmaları için ilk olması açısından son derece önemlidir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

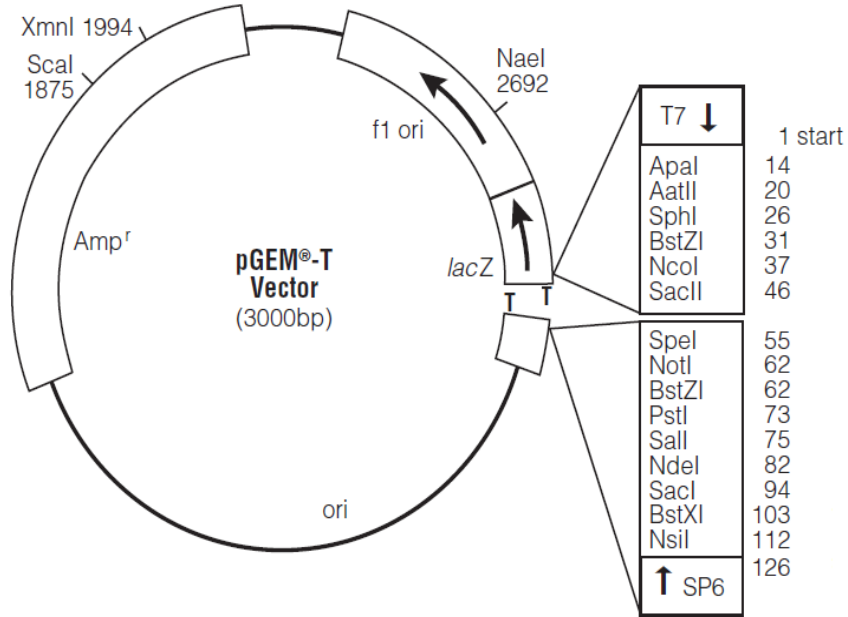
Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan M8305 kodlu *Taq* DNA Polimeraz enzimi, tampon çözeltisi ve $MgCl_2$ solüsyonu Promega'dan, USA; D0081 kodlu *Ts*q DNA Polimeraz enzimi, tampon çözeltisi ve $MgSO_4$ solüsyonu Takara'dan, Japonya; M7745 kodlu *Pfu Turbo* DNA Polimeraz enzimi ve tampon çözeltisi Promega'dan, USA; ligasyon için kullanılan A1360 kodlu T4 DNA Ligaz enzimi ve tampon çözeltisi Promega'dan, USA; plazmid DNA izolasyonu için kullanılan 27104 kodlu QIAprep Spin Miniprep Kit, PCR sonrası elde edilen ürünlerin jelde koşturulduktan sonra saflaştırması aşamasında kullanılan 28704 kodlu QIAquick Gel Extraction Kit QIAGEN' den, Almanya, sağlanmıştır. Agaroz jel elektroforezi esnasında DNA bantlarının molekül ağırlıkları ve konsantrasyonunun tayininde kullanılan G42.60 kodlu Lambda DNA Hind III Digest Amersham Pharmacia Biotech'den, USA; SM0403 kodlu MassRuler DNA Ladder Fermentas'dan, Litvanya, alınmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonları aşamasında kullanılan primerler İontek tarafından sentezlenmiştir [84-86]. Aynı şekilde sekans analizleri de İontek tarafından gerçekleştirilmiştir. Koloni seçimi için kullanılan X-gal ve IPTG Roche'dan, USA, alınmıştır.

2.1.1. *Escherichia coli* Suşları

JM103: endA1 glnV44 sbcBC rpsL thi-1 Δ (lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15]

2.1.2. Klonlama Vektörü

pGEM-T Easy Vektor System I (Katalog No: A1360, Promega, USA): pGEM-T vektörüne ait harita ve vektör üzerinde yer alan önemli referans bölgeler ve bu bölgelerin içerikleri Şekil 2.1'de yer almaktadır.



Şekil 2.1. pGEM-T vektörünün fiziki haritası ve referans bölgeler [87].

2.1.3. Tamponlar ve Stok Solüsyonlar

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

Trizma Base:	242 g/L
Asetik Asit:	57.1 mL/L
0.5 M EDTA (pH: 8.0):	100 ml/L

Tampon çözelti TAE, dH₂O kullanılarak 1x TAE oranında seyreltilip, uygun miktarda hazırlanır.

Agaroz Jel İçin Örnek Yükleme Tamponu (SAB, Sample Application Buffer)

EDTA:	0.4 gr/5 mL
Gliserol:	2.5 mL/5 mL
Brom fenol blue (BFB):	0.003 gr/5 mL

CaCl₂ Solüsyonu

100 mM CaCl ₂ .6H ₂ O:	21.9 g/L
5 mM MgCl ₂ .6H ₂ O:	1.02 g/L
5 mM Tris HCl (pH:7):	5 mL/L (pH: 7.6 olan stok Tris HCl çözeltisinden)

Otoklav ile 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu gerçekleştirilir.

2.1.4. Bakteriyolojik Gelişim İçin Kullanılan Besi Yerleri ve Solüsyonlar

Luria-Bertani (LB) Buyyon Besiyeri

NaCl:	10 gr/L
Pepton:	10 gr/L
Yeast ekstrat:	5 gr/L

Otoklav ile 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu gerçekleştirilir.

Luria-Bertani (LB) Agar Besiyeri

NaCl:	10 gr/L
Pepton:	10 gr/L
Yeast ekstrat:	5 gr/L
Agar:	15 gr/L

Otoklavda ile 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu gerçekleştirilir.

Mavi-Beyaz (Blue-White Selection Agar) Koloni Seçimi İçin Besiveri

LB Agar:	100 mL/L
Amfisilin:	100 µL/L
X-gal:	160 µL/L
IPTG:	160 µL/L

Amfisilin

100 mg/mL stok solüsyon hazırlanır (filtre ile sterilize edilir). Küçük hacimlere bölünüp, -20 °C'de muhafaza edilir.

Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)

20 mg/mL konsantrasyonda hazırlanır. Filtre ile sterilize edilir. Küçük hacimlere bölünüp, -20 °C'de muhafaza edilir.

X-gal

20 mg/mL konsantrasyonda hazırlanır. Filtre ile sterilize edilir. Küçük hacimlere bölünüp, -20 °C'de saklanır.

2.1.5. Primerler

*Tp*LDH enzimine ait genin klonlanması ve intronlarının yönlendirilmiş mutagenез (site directed mutagenез) ile çıkarılması için spesifik primerler kullanılmıştır. Bu primerlerin nükleotid dizileri, Tm değerleri ve % GC oranları Tablo 2.1.'de yer almaktadır.

Tablo 2.1. Primerlerin nükleotid dizileri, T_m değerleri ve GC yüzdeleri

Primerler	Nükleotid dizileri (5'-3')	T _m değerleri (°C)	% GC
<i>Tp</i> LDHF	5' ATGTCTGGAATTAGGAGGAAGTTGATTAG 3'	62.4	37.9
<i>Tp</i> LDHR	5' TTATTTGATGAGTGATTCTAGTCGTCTG 3'	60.7	35.7
<i>Tp</i> LDHEx1R	5' CAGCGCCAATATTGGGGACAATATC 3'	63.0	48.0
<i>Tp</i> LDHEx2F	5' GATATTGTCCCAATATTGGCGCTG 3'	63.0	48.0
<i>Tp</i> LDHEx2R	5' AGCCTTCGCCAAACCGGCGGTAAC 3'	67.8	62.5
<i>Tp</i> LDHEx3F	5' GTTACCGCCGGTTTGGCGAAGGCT 3'	67.8	62.5

2.1.6. DNA Örneği

Theileria parva'ya ait, laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan geni taşıyan genomik DNA örneği Dr. Roger Pelle (ILRI, International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya) tarafından gönderilmiştir. Yapılan bütün çalışmalarda bu DNA örneği kalıp olarak kullanılmıştır.

2.2. Metod

2.2.1. Primer tasarımı

Bu tez çalışmasında primerler *Theileria parva* genomuna ait dizi analizi üzerinden, laktat dehidrogenaz geninin bulunduğu bölge hedef alınarak tasarlanmıştır. Laktat dehidrogenaz enzimi intronlara sahiptir. Bu aşamada genin intronlarıyla amplifikasyonu söz konusu olup, genin başladığı bölgeden DNA zincirlerine komplementer *Tp*LDHF ve *Tp*LDHR uç primerleri tasarlanmıştır. Eksonların çıkarılıp intronların birleştirilmesi için iç primerlerin birbirlerine komplementer yapışkan uç taşımaları sağlanmıştır. Primerler tasarlanırken beraber kullanılacak primerlerin erime sıcaklıklarının (T_m, Melting Temperature) birbirine eş yada yakın olması sağlanmıştır. Ayrıca amplifikasyonu engelleyecek, primer çiftleri arasında dimer

oluşumuna yol açacak yada primerlerin kendi içlerinde saç tokası oluşturmalarına neden olacak yapıların oluşmamasına dikkat edilmiştir.

2.2.1. *Theileria parva* Laktat Dehidrogenaz Geninin PCR ile Amplifikasyonu

PCR için gerekli bileşenler kalıp DNA molekülü, primerler, dNTP'ler, termostabil DNA polimeraz ve reaksiyon tamponudur. PCR reaksiyonu hazırlanmadan önce reaksiyon bileşenleri tek tek incelenip, kontaminasyonu önlemek amacıyla her birinden bir kaç kullanımlık steril ependorflara belli miktarlarda paylaştırılmıştır. PCR bileşenleri son hacim 50 µl olacak şekilde hazırlanır. 0.5 mL'lik PCR tüplerinde hazırlanan karışım daha önce programlanan cihazın örnek bloğuna yerleştirilmiştir. PCR bileşenleri ve amplifikasyon şartları Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Tablo 2.2. PCR reaksiyon bileşenleri, stok konsantrasyonları ve alınan miktarlar

PCR Reaksiyonunun Bileşenleri	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar
Steril dH ₂ O	-	31 µL
aTaq Tamponu	10X	5 µL
MgCl ₂	25 mM	3 µL
dNTPs	Final konsantrasyon 2 mM	5 µL
5' primeri	20 pmol/µL	2.5 µL
3' primeri	20 pmol/µL	2.5 µL
Kalıp DNA	50 ng/µL	0.5 µL
aTaq DNA Polimeraz	5 u/µL	0.5 µL
Toplam		50 µL

Amplifikasyon koşulları; 94 °C'de 1.5 dakika, 55 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 2 dakika ve 30 döngü olarak gerçekleştirildi.

2.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi, BIORAD Sub-Cell GT horizontal jel elektroforez sistemi ile yapılmıştır. Yapılan bütün elektroforez çalışmalarında etidyum bromür ile boyanan agaroz jel kullanılmıştır. Bunun için % 1 agaroz içeren 1x TAE tampon çözeltisi mikrodalga fırında kaynatılır. Oda sıcaklığında 55-65 °C'ye kadar soğutulur. Bu esnada jelin döküleceği jel tepsisi hazırlanır, taraklar yerine yerleştirilir. Jeli tepsiye dökmeden önce son konsantrasyon 0.5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür ilave edilir. Jel tepsiye dökülür ve katılaşması beklenir. Katılaştıktan sonra tarak çıkarılır. Jel üzerindeki kuyucuklara yerleştirilecek olan DNA örneklerine 2 µL SAB ilave edilir. Elektroforez rutin agaroz jeller için 40-60 mA, düşük erime noktalı agaroz jeller için 30-40 mA'de bromfenol mavisi yaklaşık olarak jelin 2/3'üne ulaşınca kadar yürütülür. Jel ortamında, DNA'lar moleküler ağırlıklarına bağlı olarak bir ayırma tabii tutulurlar. Elektroforez sonrası DNA bantları bir transillüminatör kullanılarak görüntülenir [88].

2.2.3. DNA'nın Geri Kazanılması

2.2.3.1. DNA'nın PCR'dan Geri Kazanılması

PCR sonrasında elde edilen ürünlerin 10 µL'leri jelde yürütüldü. Beklenen büyüklükte bant gözlemlendikten sonra geriye kalan 40 µL'leri PCR ekstraksiyon kiti, QIAGEN, kullanılarak aşağıdaki şekilde saflaştırıldı [89].

- 1) Ependorfa 1 hacim PCR ürünü için 5 hacim PB tamponu eklendi.
- 2) Karışım 5 saniye vortekslendi.
- 3) Ependorftaki sıvı kolona aktarıldı ve 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 4) Kolonun altında bulunan sıvı boşaltıldı. Boşaltılan tüplerin içerisine kolon yeniden konuldu.
- 5) Yıkamak için kolonun üzerine 750 µL PE tamponu konuldu ve 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 6) Altındaki tüpte biriken sıvı dökülüp kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.

- 7) Kolon tekrar 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 8) Daha sonra kolon yeni bir 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- 9) 1.5 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılan kolon üzerine tam merkeze gelecek şekilde DNA konsantrasyonunu artırmak için sadece 30 µL EB tamponu ilave edildi. Kolon 1 dakika bekletildikten sonra 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek DNA'nın kolondan santrifüj tüpüne alınması sağlandı ve örnekler kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

2.2.3.2. DNA'nın Jelden Geri Kazanılması

Elektroforez sonrası jelden dilimler halinde kesilen spesifik DNA bantları 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine bırakılır ve DNA, QIAquick jel ekstraksiyon kiti, QIAGEN, kullanılarak aşağıdaki şekilde saflaştırıldı [88].

- 1) Temiz ve keskin bir bistüri ile DNA parçası agaroz jelden kesilip çıkarıldı.
- 2) Jel parçası tartıldı. 1 hacim jel için (100 mg = ~100 µL) 3 hacim QG tamponu eklendi.
- 3) 10 dakika 50 °C'de inkübe edilerek ve 2-3 dakika aralıklarla vorteksenerek jelin tamamen çözülmesi sağlandı.
- 4) Jel çözüldükten sonra karışımın renginin sarı olmasına dikkat edildi (renkte değişiklik gözlenirse pH değişmiştir ve pH=7.5 ayarlanmalıdır).
- 5) Örneğe 1 hacim izopropanol eklendi ve karıştırıldı.
- 6) Örnek QIAQuick kolonuna aktarıldıktan sonra 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek DNA'nın kolona bağlanması sağlandı ve çöken sıvı döküldü ve işlem tekrarlandı.
- 7) Yıkamak için kolona 750 µL PE tamponu eklendi ve 10,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra kolon tamponun tamamen uzaklaştırılması için 13,000 rpm'de 1 dakika daha santrifüjlendi.
- 8) 1.5 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılan kolon üzerine tam merkeze gelecek şekilde DNA konsantrasyonunu artırmak için sadece 30 µL EB tamponu ilave edildi. Kolon 3 dakika bekletildikten sonra 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek DNA'nın kolondan santrifüj tüpüne alınması sağlandı ve örnekler kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

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

DNA örneği konsantrasyonu dikkate alınarak çeşitli insert: vektör oranları ile ligasyon yapılmıştır. Ligasyon reaksiyonu ve bileşenleri aşağıda verilmiştir.

Tablo 2.3. Ligasyon reaksiyonu

Ligasyon Reaksiyonunun Bileşenleri	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar
Rapid Ligasyon Tamponu	2x	5µL
Vektör (pGEM-T)	50 ng	1µL
İnsert (<i>Tp</i> LDH)	100 ng	1µL
T4 DNA Ligaz	3 u/µL	1 µL
Steril dH ₂ O	-	2 µL
Toplam		10 µL

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

2.2.5. Kalsiyum Klorür Etkileşimiyle Kompetent *E. coli* Hücrelerinin Hazırlanması

Kompetent hücre oluşturulması standart CaCl₂ yöntemi ile aşağıdaki protokol çerçevesinde gerçekleştirilmiştir [88].

- 1) Gece boyunca (15–18 saat) 37 °C'de 200 rpm'de kültürü yapılan hücrelerden 100 µL örnek alınarak 20 mL LB içeren erlenlere ekim yapıldı ve bu kültürler yine çalkalamalı şartlarda (160 rpm) ve 37 °C'de OD₆₀₀ değeri yaklaşık 0.5 olana kadar inkübe edildi.
- 2) Yukarıdaki optik yoğunluğa ulaşan erlenler bir buz kabına gömülerek 10 dk. bekletildikten sonra, endorf tüplerine kültürler pipetlendi ve soğutmalı (4 °C'de) santrifüjde 5.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
- 3) Bu işlem 2 defa tekrarlandı.

- 4) Soğuk 10 mM NaCl'den 1 mL peletlerin üzerine pipetlendi ve peletler çözdürüldü.
- 5) 5 dk. 5,000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edildi.
- 6) Toplanan pelete 0.5 mL soğuk 0.1 M CaCl₂ eklenerek 20 dk. buz üstünde tutulduktan sonra 4 °C'de 5,000 rpm'de yine 5 dk. santrifüj edildi ve yine pelet muhafaza edildi.
- 7) Toplanan pelet 150 µL soğuk 0.1 M CaCl₂ içinde süspanse edilerek transformasyon için hemen kullanılmıştır.

2.2.6. Transformasyon

Yukarıdaki şekilde elde edilen kompetent hücrelere *TpLDH* genlerini taşıyan plazmidinin aktarımı literatürdeki standart “ısı şoku” protokolüne göre aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

- 1) Süspansiyonun üzerine 0.1–1 µg DNA içeren 2 µL DNA solüsyonu eklendi ve buzda 1 saat bekletildi.
- 2) Tüpler 42 °C'deki bir su banyosuna alınarak 2 dk. tutulduktan sonra tekrar buza gömülerek 10 dk. bekletildi.
- 3) Tüpler 1 mL LB eklenerek hafifçe çalkalandıktan sonra 37 °C'de yaklaşık 1 saat inkübe edildiler.
- 4) Hücreler amfisilin (100 µg/mL), IPTG ve X-gal içeren LB agar petri kaplarına 400 µL olarak transfer edilerek cam çubukla yayıldıktan sonra inkübatöre kaldırılarak en az 18 saat süre ile inkübe edildi.

2.2.7. Rekombinant DNA'yı İçeren Hücrelerin Seçimi

Elde edilen rekombinant kolonilerin gözle görülebilir bir büyüklüğe ulaşmalarının en az 18 saatlik bir inkübasyonu gerektirdiği belirlenmiştir. Klonlama sonucunda her plazmit istenilen rekombinant DNA molekülünü içermeyebilir. Bu nedenle besiyerinde üretilen bakterilerin rekombinant plazmiti içerip içermediği yönünden taranması gerekir. Hücrenin rekombinant

DNA molekülünü içerip içermediğini saptamak için izlenecek yollar kullanılan plazmitin özelliğine göre değişmektedir.

Bu tezde kullanılan klonlama vektöründe *Lac Z* geni yer almaktadır. Bu genin ürünü X-gal'ı parçalar ve mavi renk oluşturur. Bu tür plazmitlerde klonlama bu genin ortasına yapılmaktadır ve başarılı bir klonlamada gen işlevsiz hale gelir. Dolayısıyla oluşan koloniler beyaz renktedir. Mavi renkli koloniler, klonlamanın başarılı olmadığını ve ortamda *Lac Z* genini içeren plazmitlerin varlığını gösterir. En az 18 saatlik bir inkübasyon süresinden sonra, petri kutularında yer alan beyaz renkli koloniler koloni PCR için seçilmiştir.

p-GEM-T easy vektöründe klon içeren hücrenin seçimi görsel olarak yapılmaktadır. Klon içeren koloniler beyaz içermeyenler ise mavi renkte gözlenir. Inkübasyon süresinin sonunda beyaz renkte görünen koloniler seçildi.

2.2.8. Koloni PCR

Alt klonlama sonrası besiyeri üzerinde gelişen kolonilere iki ayrı steril kürdan yardımı ile dokunulur. Kürdanlardan birisi 100 µl/mL amfisilin içeren LB buyyon içerisine atılır. Buyyon, 37 °C'de ve 100 rpm'de inkübasyona bırakılır. Diğer kürdan koloni PCR'ı gerçekleştirmek üzere içerisinde 50 µL steril dH₂O bulunan bir mikrosantrifüj tüpü içerisine aktarılır. Koloni kalıntısı kürdandan tamamen ayrılncaya kadar kürdan su içerisinde karıştırılır. Daha sonra örnek 10 dakika kaynatılır, 13,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatantın 15 µL'si kalıp olarak kullanılarak aşağıda şartları verilen reaksiyon gerçekleştirilir.

Tablo 2.4. Koloni PCR reaksiyon bileşenleri ve alınan miktarlar

PCR Reaksiyonunun Bileşenleri	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar
Steril dH ₂ O	-	16.5 µL
aTaq Tamponu	10X	5 µL
MgCl ₂	25 mM	3 µL
dNTPs	Final konsantrasyon 2 mM	5 µL
5' primeri	20 pmol/µL	2.5 µL
3' primeri	20 pmol/µL	2.5 µL
Kalıp DNA	50 ng/µL	15 µL
aTaq DNA Polimeraz	5 u/µL	0.5 µL
Toplam		50 µL

Amplifikasyon 94 °C'de 1 dakika, 55 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 2 dakika ve 30 döngü olarak gerçekleştirilir.

Koloni PCR'dan pozitif sonuç alınması durumunda inkübasyona bırakılan kültürden stok kültür hazırlanır ve plazmid DNA hazırlanarak örnekler dizi analizine gönderilmiştir.

2.2.9. Stok Kültürün Hazırlanması

Bir mikrosantrifüj tüpüne 0.2 µm çaplı sterilize edilmiş % 50 gliserolden 300 µL eklenir. Üzerine hedef geni içeren rekombinant bakteri kültüründen 700 µL aktarılır. Kültür ve gliserolün homojen bir şekilde karışması için mikrosantrifüj tüpü vortekslenir ve hemen sıvı nitrojen içerisine bırakılır. Stok kültür donduktan sonra -80 °C'de saklanır [95].

2.2.10. Plazmid DNA İzolasyonu

İçerisinde plazmid DNA bulunduran *E. coli* bakteri soyu 100 µg/ml amfisilin ihtiva eden LB agar besiyerinde geliştirilir. Steril bir kürdan yardımıyla daha önce seçilen kolonilerden bir tanesi alınarak içerisinde 5 µg/mL amfisilin bulunan 5 mL'lik LB buyyona aktarılır. 37 °C'de ve 100 rpm'de bir gece inkübe edilir. 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne bir gece önce

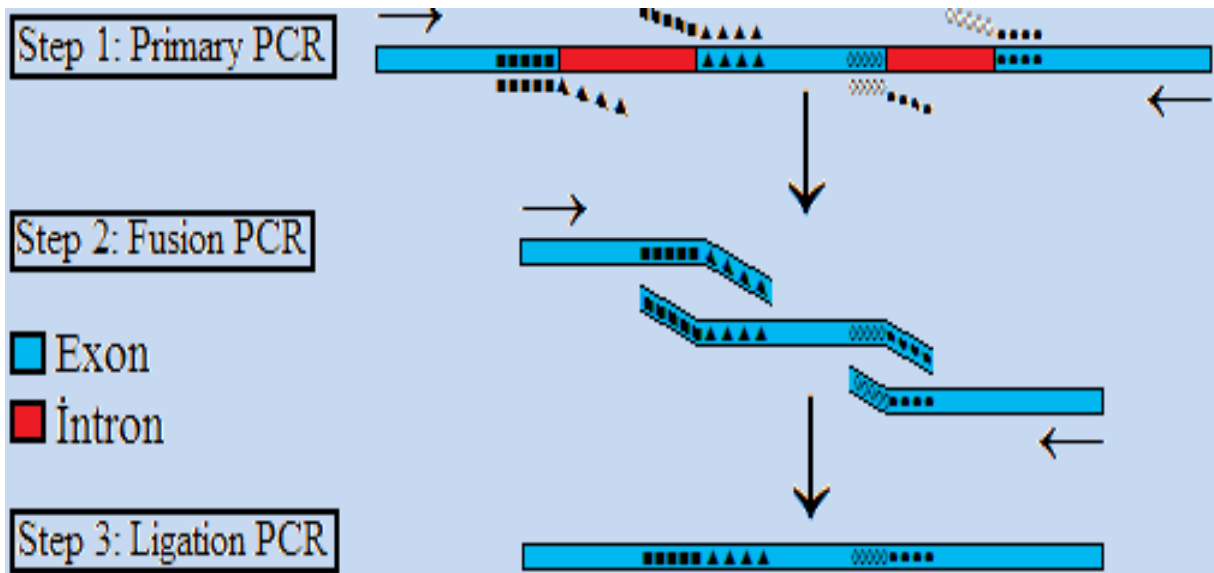
hazırladığımız kültürden 1.4 mL alınır. Bu işlem sonrası QIAprep Miniprep kiti, QIAGEN, kullanılarak DNA izole edilir.

2.2.11. Dizi Analizi

Stok kültürü hazırlanmış kolonilerden *TpLDH* geninin nükleotid dizilerinin belirlenmesi için dizi analizi yaptırılmıştır. Dizi analizi işlemi İntek, Türkiye firması tarafından gerçekleştirildi. *TpLDH* içeren p-GEM-T klonlarının plazmid ekstraktlarına, *TpLDHF* ve *TpLDHR* primerleri ile çift yönlü olarak dizi analizi uygulandı. Böylelikle çift yönlü dizi kontrolü yapılmış oldu.

2.2.12. Yönlendirilmiş Mutagenezle İntronların Çıkarılması

Bu tez çalışmasında yönlendirilmiş mutagenez, intronların çıkarılması için kullanılmıştır. Yönlendirilmiş mutagenez genlerde baz değişikliği, insersiyon, delesyon gibi değişiklikler yapmak için kullanılan yaygın bir yöntem olmanın yanında, restriksiyon enzimlerine ihtiyaç duyulmadan iki farklı DNA fragmentini birleştirmek (kimerik genler) için kullanılır [91].



Şekil 2.2. Yönlendirilmiş mutagenezle intronların çıkarılması

Polimeraz zincir reaksiyonu ile üç aşamada ekson birleştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlk olarak *TpLDH*'ın ekson bölgelerini çıkarmak için sırasıyla birbirleriyle örtüşen *TpLDHEx1R*, *TpLDHEx2F*, *TpLDHEx2R*, *TpLDHEx3F* primerleri ve *TpLDHxF* ve *TpLDHxR* uç primerleri kullanıldı. Aşağıda PCR bileşenleri ve şartları Tablo 2.5.'de verilmiştir.

Tablo 2.5. Yönlendirilmiş mutagenез ile intronların çıkarılması sırasında kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları

PCR Reaksiyonunun Bileşenleri	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar
Steril dH ₂ O	-	26 µL
GoTaq Tamponu	5X	10 µL
MgCl ₂	25 mM	3 µL
dNTPs	Final konsantrasyon 2 mM	5 µL
5' primeri	20 pmol/µL	2.5 µL
3' primeri	20 pmol/µL	2.5 µL
Kalıp DNA	~100 ng	0.5 µL
GoTaq DNA Polimeraz	5 u/µL	0.5 µL
Toplam		50 µL

Amplifikasyon 94 °C'de 1 dakika, 55 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 2 dakika ve 30 döngü olarak gerçekleştirilir.

Bu işlemin sonunda uç kısımları birbiriyle komplementer, eksonlardan oluşan üç DNA fragmenti (A, B ve C fragmentleri) elde edilmiştir.

Bu aşamadan sonra % 1'lik agaroz jelden safaştırılan A, B ve C fragmentleri 2. aşamada PCR yöntemiyle birleştirilmiştir. Konsantrasyonları esas alınarak belirlenen miktarlarda kullanılan A, B ve C fragmentleri ile son hacim 25 µL olacak şekilde yapılan PCR'ın reaksiyon şartları Tablo 2.6.'te verilmiştir.

Tablo 2.6. PCR ile A, B ve C fragmentlerinin birleştirilmesi

PCR Reaksiyonunun Bileşenleri	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar
Steril dH ₂ O	-	X µL
GoTaq Tamponu	5X	10 µL
MgCl ₂	25 mM	1.5 µL
dNTPs	Final konsantrasyon 2 mM	2.5 µL
A Fragmenti	50 ng/µL	X µL
B Fragmenti	50 ng/µL	X µL
C Fragmenti	50 ng/µL	X µL
GoTaq DNA Polimeraz	5 u/µL	0.5 µL
Toplam		25 µL

Amplifikasyon 94 °C'de 2 dakika, 50 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika ve 7 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. Bunu takiben 3. aşamada uç primerlerin ve diğer PCR bileşenlerinin ilavesi ile reaksiyon 50 µL'ye tamamlanmıştır. 3. aşamaya ait PCR bileşenleri ve miktarları Tablo 2.7.'da verilmiştir.

Tablo 2.7. PCR bileşenleri ve miktarları

PCR Reaksiyonunun Bileşenleri	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar
Steril dH ₂ O	-	10.5 µL
GoTaq Tamponu	5X	5 µL
MgCl ₂	25 mM	1.5 µL
dNTPs	Final konsantrasyon 2 mM	2.5 µL
5' primeri	20 pmol/µL	2.5 µL
3' primeri	20 pmol/µL	2.5 µL
GoTaq DNA Polimeraz	5 u/µL	0.5 µL
Toplam		25 µL

Amplifikasyon 94 °C'de 1.5 dakika, 55 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 2 dakika ve 30 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

Birçok parazitik protozoonlara karşı orjinal ilaçların tasarımı için hedef olarak biyokimyasal yolların potansiyel zayıf noktaları araştırılmış olmakla birlikte, *T. parva*'da kapsamlı çalışmalar uygulanmamıştır. Böyle önemli yollar hakkında gerekli bilgi eksikliği *T. parva*'ya karşı ucuz kemoterapötik ajanların araştırılmasında hızlı ilerlemeyi engellemiştir. Bu tez çalışmasının amacı, yeni antitelmial tasarım çalışmalarına katkı sağlamak için parazitin metabolizması için gerekli bir enzim olan laktat dehidrogenazın (*TpLDH*) kemoterapötik hedef olarak kullanılıp kullanılamayacağını belirlemek amacıyla enzimi kodlayan genin izole edilerek klonlanması ve sonrasında ekspresyonunun yapılarak proteinin elde edilmesidir.

3.1. *Theileria parva*'ya Ait Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin Tam Uzunluğunun Elde Edilmesi

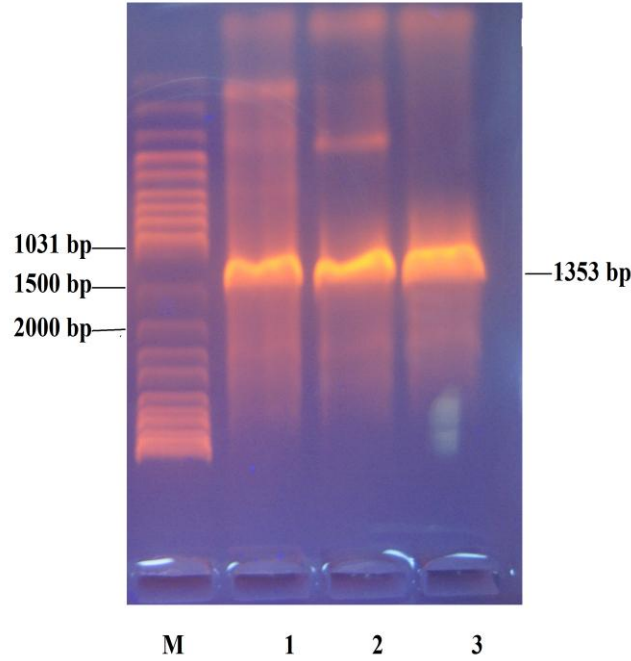
T. parva laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen polimeraz zincir reaksiyonu ile genomik DNA'dan elde edilmiştir. Bunun için ilk olarak 5' yönünde *TpLDHF* ve 3' yönünde *TpLDHR* uç primerleri kullanılarak, tam uzunluğa sahip *TpLDH* geninin klonlanması amaçlanmıştır. PCR bileşenleri ve içeriği Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. PCR bileşenleri ve miktarları

PCR Reaksiyonunun Bileşenleri	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar
Steril dH ₂ O	-	31 µL
aTaq Tamponu	10X	5 µL
MgCl ₂	25 mM	3 µL
dNTPs	2 mM	5 µL
<i>TpLDHF</i> primeri	20 pmol/ µL	2.5 µL
<i>TpLDHR</i> primeri	20 pmol/ µL	2.5 µL
<i>Theileria parva</i> Genomik DNA	50 ng/ µL	0.5 µL
aTaq DNA polimeraz	5 u/ µL	0.5 µL
Toplam		50 µL

Amplifikasyon koşulları; 94 °C'de 1.5 dakika, 55 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 2 dakika ve 40 döngü olarak gerçekleştirildi.

Elde edilen ürünleri koşturmak için % 1'lik agaroz jel hazırlandı. PCR ürünlerinin 10 µL'si 60 mA'de koşturuldu. *TpLDH* geni için 1353 bp uzunluğunda DNA bantlarının oluşumu beklenmiş ve doğru bant büyüklükleri Şekil 3.1.'de gözlemlenmiştir.



Şekil 3.1. Tam uzunluğa sahip *TpLDH* geninin elde edilmesi. M: Markır; 1-3 *TpLDH* geni

Geriye kalan 40 µL'lik PCR ürünleri, QIAGEN PCR saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırıldı.

3.2. *TpLDH* Geninin pGEM-T Easy Vektör Sistem I'e Aktarılması

TpLDH geni PCR'dan saflaştırıldıktan sonra, pGEM-T easy sistem I vektörüne aktarmak için ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon gerçekleştirildikten sonra +4 °C'de bir gece boyunca bekletildi.

Vektör yoğunluğunu artırıp bununda ligasyon oranına yansması için, pGEM-T easy vektör sistem I klavuzunda yer alan miktarlar üzerinde değişiklikler yapılmıştır. Ligasyon oranının en yüksek olacağı düşünülen miktarlar kullanılmıştır.

3.3. Rekombinant DNA'nın JM103 Bakteri Hücrelerine Transformasyonu

Ligasyon sonrası elde edilen rekombinant DNA (*TpLDH* geni + pGEM-T easy vektör) örnekleri ve pozitif kontrol olarak pKK223-3 vektörü JM103 hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyon işlemi Bölüm 2.6.6.'da belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Transformasyon sonrasında beyaz renkte koloniler içeren, hem pozitif kontrol olarak kullanılan pKK223-3 vektörünü içeren JM103 kolonileri hem de *TpLDH* genini içeren JM103 kolonileri elde edilmiştir.

3.4. Koloni PCR

Transformasyon sonrası seçilen kolonilerin *TpLDH* genine sahip olduklarını kanıtlamak için koloni PCR yapılmıştır. Bunun için genin tam uzunluğunu çoğaltacak *TpLDHF* ve *TpLDHR* primerleri kullanılmıştır. Koloni PCR sonucunda jel üzerinde klonlanan genin büyüklüğünde bir bant görülmesi seçilen kolonilerin bu geni taşıdığını göstermektedir. Uç primerlerle yapılan koloni PCR sonucunda örnekler % 1'lik agaroz jelde koşturuldu. Jelde beklenen büyüklükte bantlar görüldü.

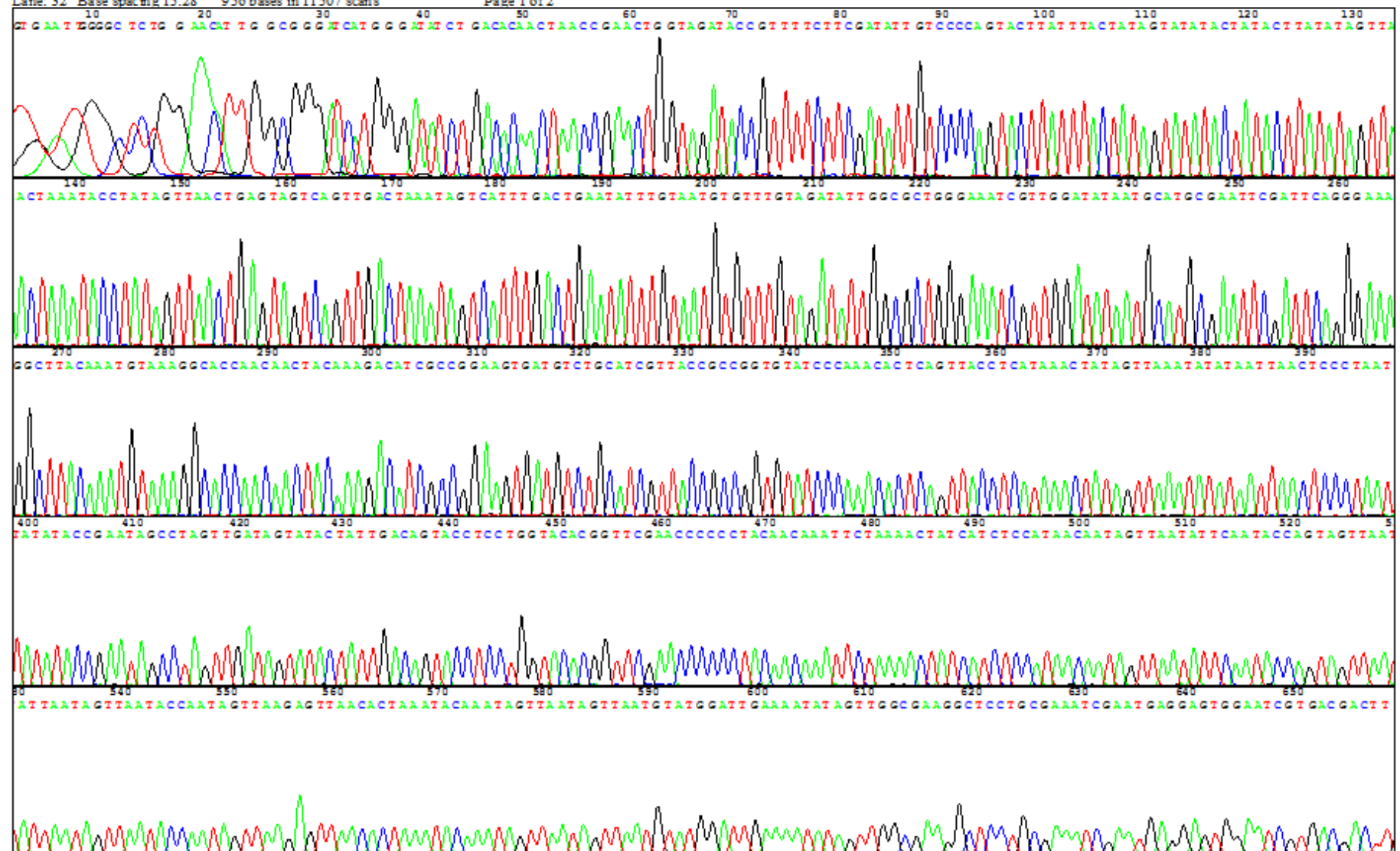
Koloni PCR' da pozitif sonuç görülmesinin ardından koloniler amfisilin içeren LB buyyon besiyerine aktarılıp, bu kolonilerden Bölüm 2.2.9'da yer alan şekilde stok kültürler hazırlandı.

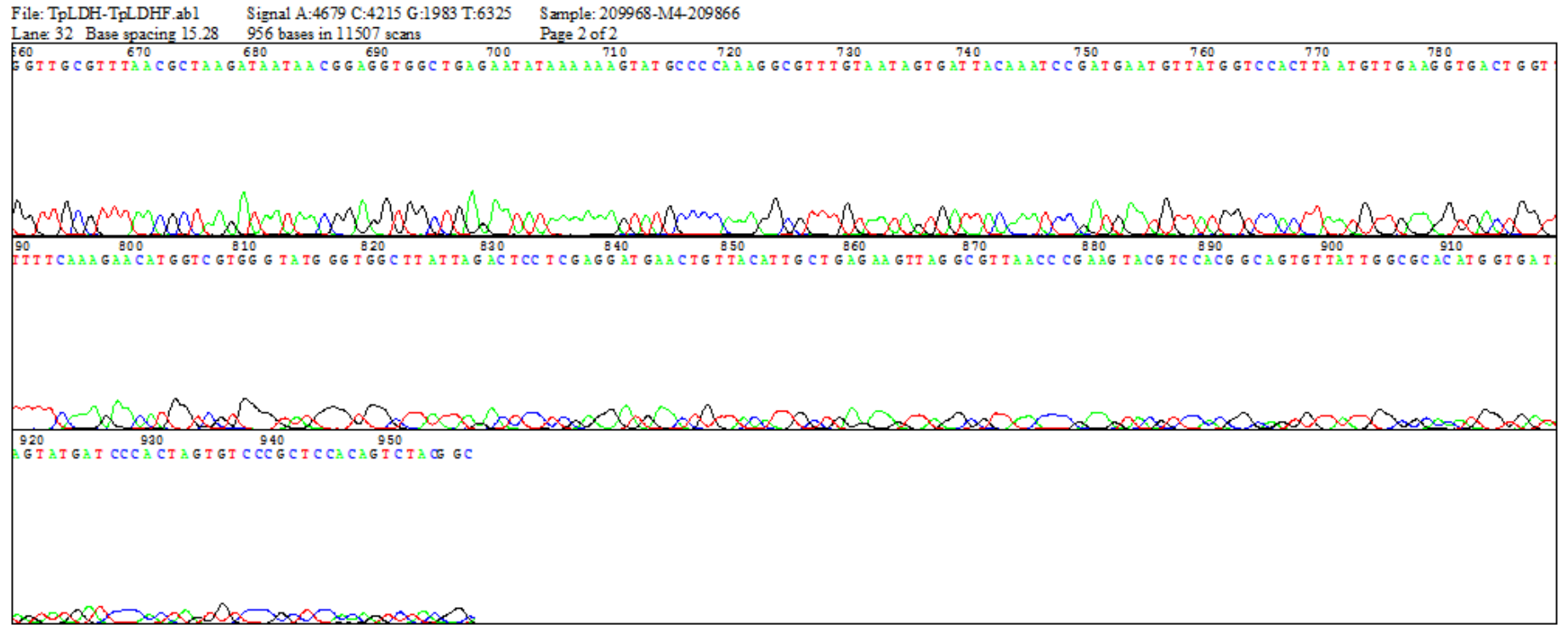
pGEM-T vektörüne aktarılan ve JM103 bakterilerine transformasyonu yapılan (*TpLDH* in pGEM-T in JM103) kültürlerden sekans analizi için miniprep yapıldı. Miniprep (plazmit izolasyonu) işlemi QIAprep Miniprep kiti, QIAGEN'de yer alan protokol şeklinde gerçekleştirildi.

3.5. *TpLDH* Genini Sekans Analizi ve Sonucu

Plazmit izolasyonu gerçekleştirildikten sonra *TpLDHF* ve *TpLDHR* primerleri hazırlanarak, örnekler İontek' e, Türkiye sekanslanması için gönderildi. Sekans sonucu Şekil 3.2. ve Şekil 3.3.'de yer almaktadır. Şekil 3.4.'de ise sekanslama sonucu elde edilen *TpLDH* geninin nükleotid dizisi verilmiştir.

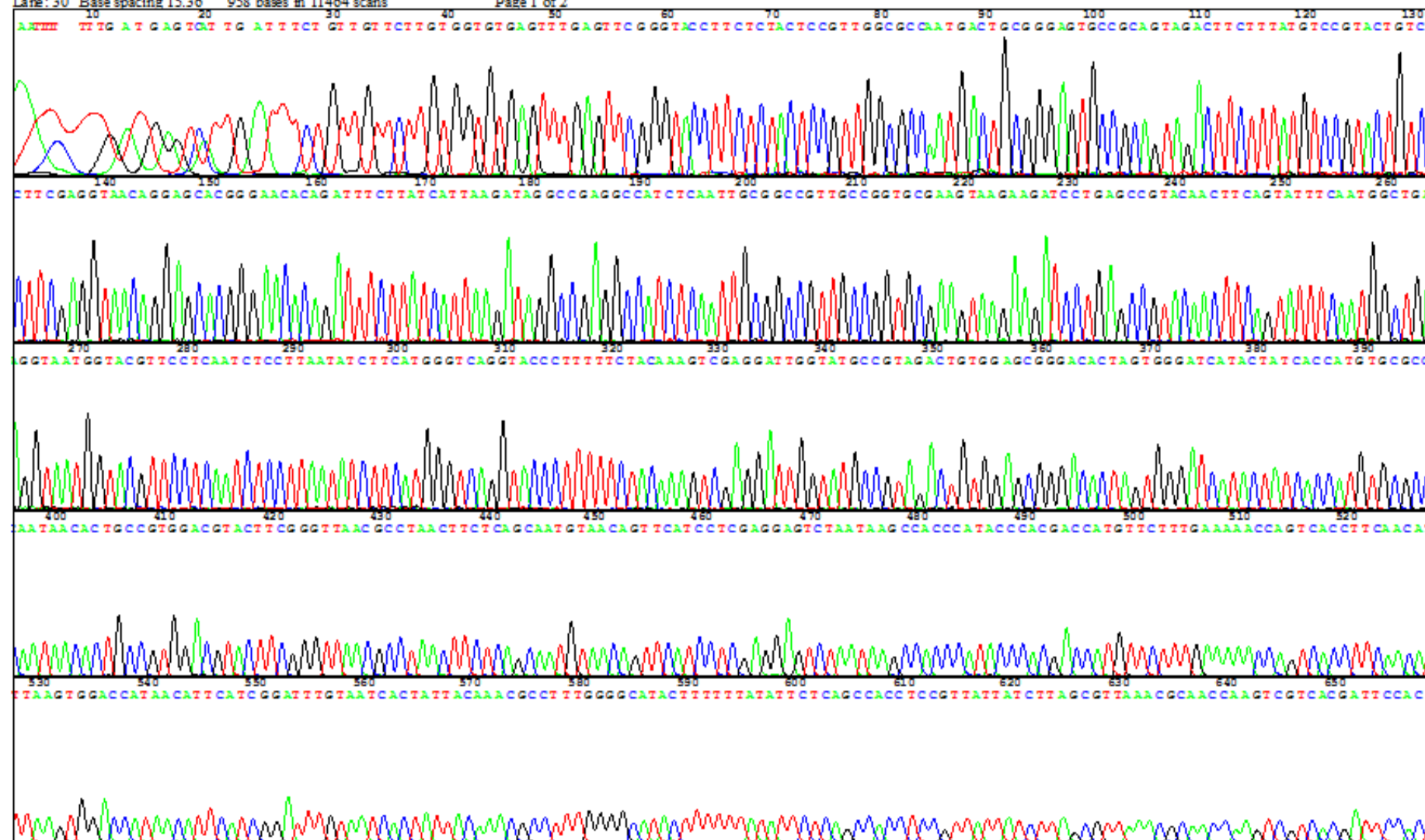
File: TpLDH-TpLDHF.ab1 Signal A:4679 C:4215 G:1983 T:6325 Sample: 209968-M4-209866
 Lane: 32 Base spacing 15.28 956 bases in 11507 scans Page 1 of 2

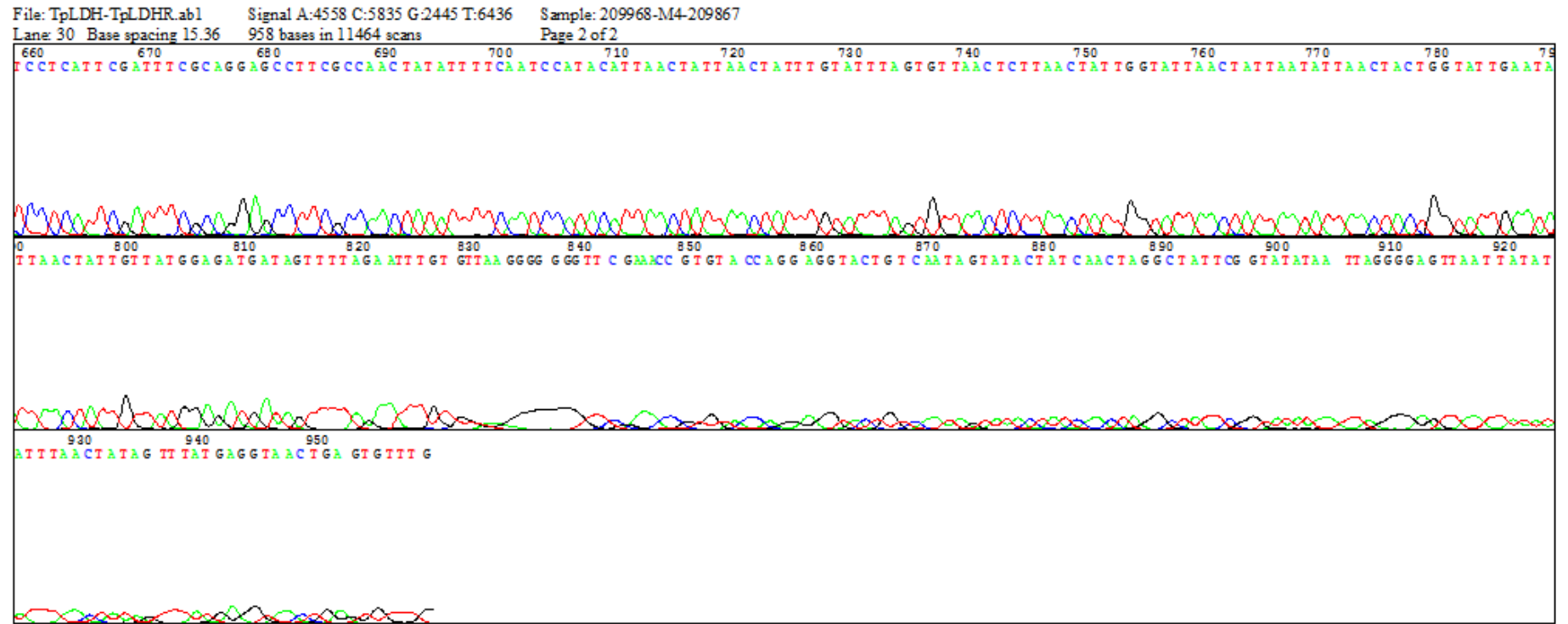




Şekil 3.2. *Tp*LDH geninin 5'→3' zincirinin dizi analizi sonucu

File: TpLDH-TpLDHR.ab1 Signal A:4558 C:5835 G:2445 T:6436 Sample: 209968-M4-209867
 Lane: 30 Base spacing 15.36 958 bases in 11464 scans Page 1 of 2





Şekil 3.3. *TpLDH* geninin 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu

 TpLDHF

```

ATGTCTGGAATTAGGAGGAAGTTGATTAGTTTGATTGGCTCTGGAAACATTGGCGGGATC
----- 60
TACAGACCTTAATCCTCCTTCAACTAATCAAACCTAACCGAGACCTTTGTAACCGCCCTAG

ATGGGATATCTGACACAACCTAACCGAACTGGTAGATACCGTTTTCTTCGATATTGTCCCC
----- 120
TACCCTATAGACTGTGTTGATTGGCTTGACCATCTATGGCAAAAGAAGCTATAACAGGGG

AGTACTTATTTACTATAGTATATACTATACTTATATAGTTAACTAAATACCTATAGTTAA
----- 180
TCATGAATAAATGATATCATATATGATATGAATATATCAATTGATTTATGGATATCAATT

CTGAGTAGTCAGTTGACTAAATAGTCATTTGACTGAATATTTGTAATGTGTTTGTAGATA
----- 240
GACTCATCAGTCAACTGATTTATCAGTAACTGACTTATAAACATTACACAAACATCTAT

TTGGCGCTGGGAAATCGTTGGATATAATGCATGCGAATTCGATTCAGGGAAAGGCTTACA
----- 300
AACCGCGACCCCTTTAGCAACCTATATTACGTACGCTTAAGCTAAGTCCCTTTCCGAATGT

AATGTAAAGGCACCAACAACCTACAAAGACATCGCCGGAAGTGATGTCTGCATCGTTACCG
----- 360
TTACATTTCCGTGGTTGTTGATGTTTCTGTAGCGGCCTTCACTACAGACGTAGCAATGGC

CCGGTGTATCCCAAACACTCAGTTACCTCATAAACTATAGTTAAATATATAATTAACCTCC
----- 420
GGCCACATAGGGTTTGTGAGTCAATGGAGTATTTGATATCAATTTATATATTAATTGAGG

CTAATTATATACCGAATAGCCTAGTTGATAGTATACTATTGACAGTACCTCCTGGTACAC
----- 480
GATTAATATATGGCTTATCGGATCAACTATCATATGATAACTGTCATGGAGGACCATGTG

GGTTCGAACCCCCCTACAACAAATTCTAAACTATCATCTCCATAACAATAGTTAATATT
----- 540
CCAAGCTTGGGGGGATGTTGTTTAAGATTTTGATAGTAGAGGTATTGTTATCAATTATAA

CAATACCAGTAGTTAATATTAATAGTTAATACCAATAGTTAAGAGTTAACACTAAATACA
----- 600
GTTATGGTCATCAATTATAATTATCAATTATGGTTATCAATTCTCAATTGTGATTTATGT

```

AATAGTTAATAGTTAATGTATGGATTGAAAATATAGTTGGCGAAGGCTCCTGCGAAATCG
----- 660
TTATCAATTATCAATTACATACCTAACTTTTATATCAACCGCTTCCGAGGACGCTTTAGC

AATGAGGAGTGGAATCGTGACGACTTGGTTGCGTTTAACGCTAAGATAATAACGGAGGTG
----- 720
TTACTCCTCACCTTAGCACTGCTGAACCAACGCAAATTGCGATTCTATTATTGCCTCCAC

GCTGAGAATATAAAAAAGTATGCCCCAAAGGCGTTTGTAATAGTGATTACAAATCCGATG
----- 780
CGACTCTTATATTTTTTCATACGGGGTTTCCGCAAACATTATCACTAATGTTTAGGCTAC

AATGTTATGGTCCACTTAATGTTGAAGGTGACTGGTTTTTCAAAGAACATGGTCGTGGGT
----- 840
TTACAATACCAGGTGAATTACAACCTCCACTGACCAAAAAGTTTCTTGTAACAGCACCCA

ATGGGTGGCTTATTAGACTCCTCGAGGATGAACTGTTACATTGCTGAGAAGTTAGGCGTT
----- 900
TACCCACCGAATAATCTGAGGAGCTCCTACTTGACAATGTAACGACTCTTCAATCCGCAA

AACCCGAAGTACGTCCACGGCAGTGTTATTGGCGCACATGGTGATAGTATGATCCCACTA
----- 960
TTGGGCTTCATGCAGGTGCCGTCACAATAACCGCGTGTAACCACTATCATACTAGGGTGAT

GTGTCCCGCTCCACAGTCTACGGCATAACCAATCCTCGACTTTGTAGAAAAGGGTACCTG
----- 1020
TGGGTACTTCTATAATTCCCTCTAACTCCTTGCATGGTAATGGAGTCGGTAACTTTATGAC

ACCCATGAAGATATTAAGGAGATTGAGGAACGTACCATTACCTCAGCCATTGAAATACTG
----- 1080
TTCAACATGCCGAGTCCTAGAAGAATGAAGCGTGGCCGTTGCCGGCGTTAACTCTACCGG

AAGTTGTACGGCTCAGGATCTTCTTACTTCGCACCGGCAACGGCCGCAATTGAGATGGCC
----- 1140
TTCAACATGCCGAGTCCTAGAAGAATGAAGCGTGGCCGTTGCCGGCGTTAACTCTACCGG

TCGGCCTATCTTAATGATAAGAAATCTGTGTTCCCGTGCTCCTGTTACCTCGAAGGACAG
----- 1200
AGCCGGATAGAATTACTATTCTTTAGACACAAGGGCACGAGGACAATGGAGCTTCCTGTC

```

TACGGACATAAAGAAGTCTACTGCGGCACTCCCGCAGTCATTGGCGCCAACGGAGTAGAG
----- 1260
ATGCCTGTATTTCTTCAGATGACGCCGTGAGGGCGTCAGTAACCGCGGTTGCCTCATCTC

AAGGTACCCGAACTCAAACCTCACACCACAAGAACAACAGAAATTTCAATGACTCAATCAAA
----- 1320
TTCCATGGGCTTGAGTTTGAGTGTGGTGTCTTGTGTCTTTAAGTTACTGAGTTAGTTT

GAAATCAGACGACTAGAACTCACTCATCAAATAA
----- 1353
CTTTAGTCTGCTGATCTTAGTGAGTAGTTTATT

      ← TpLDHR

```

Şekil 3.4. *TpLDH* enzimini kodlayan genin dizi analizi ile elde edilen nükleotid dizisi, *TpLDHF* ve *TpLDHR* primerleri ok ile gösterilmiştir. Doğru bir şekilde sekanslanamayan kısımlar koyu olarak gösterilmiştir.

3.6. Yönlendirilmiş Mutagenezle İntronların Çıkarılması ve Fragmentlerin Elde Edilmesi

Tam uzunluğu 1353 bp olan *TpLDH* geninin intronlarıyla beraber elde edilmesinin ardından, intronları yönlendirilmiş mutagenezle çıkarılmıştır. Bunun için 2 aşamalı PCR gerçekleştirilmiştir. İntronların çıkarılması sonucu eksonlardan oluşan 3 DNA fragmenti elde edilmiştir. Bu fragmentler A, B ve C fragmentleri olarak adlandırılmıştır. A fragmentinin uzunluğu 121 bp, B fragmentinin uzunluğu 128 bp ve C fragmentinin uzunluğu ise 717 bp'dir. PCR için *TpLDHF*, *TpLDHEX1R*, *TpLDHEX2F*, *TpLDHEX2R*, *TpLDHEX3F* ve *TpLDHR* primerleri kullanılmış ve beklenen büyüklükte DNA bantları görülmüştür.

Aşağıdaki tablolarda her bir fragmentin elde edilmesine yönelik PCR bileşenleri ve miktarları verilmiştir.

Tablo 3.2. A fragmentinin elde edilmesi için gerçekleştirilen PCR bileşenleri ve miktarları

PCR Reaksiyonunun Bileşenleri	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar
Steril dH ₂ O	-	26 µL
GoTaq Tamponu	5X	10 µL
MgCl ₂	25 mM	3 µL
dNTPs	2 mM	5 µL
<i>TpLDHF</i>	20 pmol/ µL	2.5 µL
<i>TpLDHEX1R</i>	20 pmol/ µL	2.5 µL
<i>TpLDH</i> in pGEM-T	50 ng/ µL	0.5 µL
GoTaq DNA polimeraz	5 u/ µL	0.5 µL
Toplam		50 µL

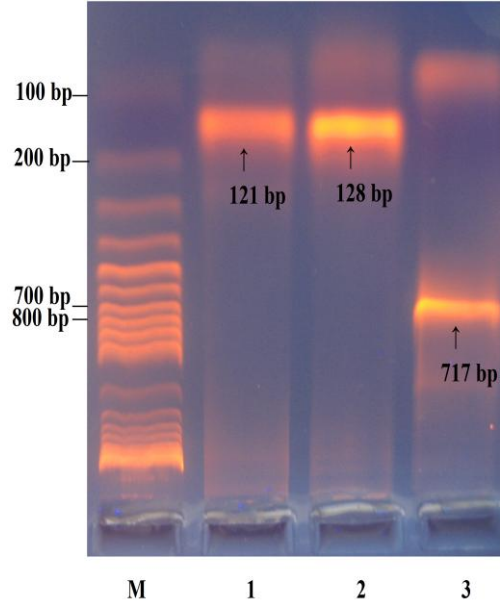
Tablo 3.3. B fargmentinin elde edilmesi için gerçekleştirilen PCR bileşenleri ve miktarları

PCR Reaksiyonunun Bileşenleri	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar
Steril dH ₂ O	-	26 µL
GoTaq Tamponu	5X	10 µL
MgCl ₂	25 mM	3 µL
dNTPs	2 mM	5 µL
<i>TpLDHE</i> x2F	20 pmol/ µL	2.5 µL
<i>TpLDHE</i> x2R	20 pmol/ µL	2.5 µL
<i>TpLDH</i> in pGEM-T	50 ng/ µL	0.5 µL
GoTaq DNA polimeraz	5 u/ µL	0.5 µL
Toplam		50 µL

Tablo 3.4. C fargmentinin elde edilmesi için gerçekleştirilen PCR bileşenleri ve miktarları

PCR Reaksiyonunun Bileşenleri	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar
Steril dH ₂ O	-	26 µL
GoTaq Tamponu	5X	10 µL
MgCl ₂	25 mM	3 µL
dNTPs	2 mM	5 µL
<i>TpLDHE</i> x3R	20 pmol/ µL	2.5 µL
<i>TpLDHR</i>	20 pmol/ µL	2.5 µL
<i>TpLDH</i> in pGEM-T	50 ng/ µL	0.5 µL
GoTaq DNA polimeraz	5 u/ µL	0.5 µL
Toplam		50 µL

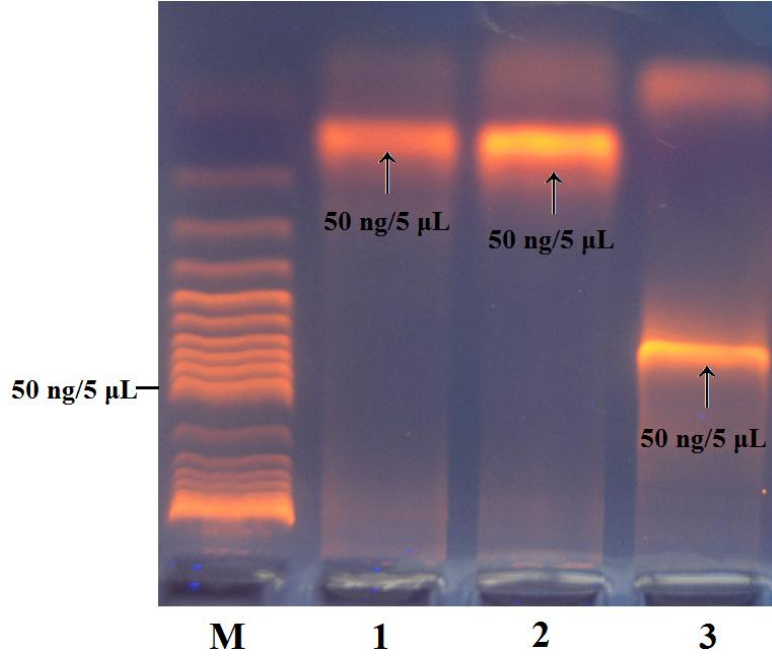
Amplifikasyon koşulları; 94 °C'de 1.5 dakika, 55 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 2 dakika ve 30 döngü olarak gerçekleştirildi. Elde edilen ürünlerin tamamı % 1'lik agaroz jel hazırlanıp, 60 mA'de koşturuldu. A fragmenti için 121 bp, B fragmenti için 128 bp, ve C fragmenti içinde beklenen uzunluk olan 717 bp uzunluğunda bantlar görüldü. Fragmentlere ait bantların yer aldığı jel görüntüsü Şekil 3.5.'te yer almaktadır.



Şekil 3.5. PCR ile A, B ve C fragmentlerinin elde edilmesi. M: Markır; 1: A fragmenti (Ekson 1); 2: B fragmenti (Ekson 2); 3: C fragmenti (Ekson 3)

3.7. *Tp*LDH Geninin Tam Uzunluğunun İntronsuz Olarak Elde Edilmesi

Agaroz jelden PCR ürünleri, QIAGEN PCR saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırıldı. A, B ve C fragmentleri *Tp*LDH geninin üç parçası olup bu üç fragment birleştirilerek *Tp*LDH geninin intronsuz elde edilmesi amaçlanmıştır. İlk olarak gerekli reaksiyon bileşenlerinin miktarı belirlenmiştir. Bunun için jelden saflaştırılan A, B ve C fragmentleri tekrar jelde yürütülüp konsantrasyonları belirlenmiştir. Fragmentlere ait konsantrasyonlar Şekil 3.6.'da yer almaktadır.



Şekil 3.6. *TpLDH* genine ait A, B ve C fragmentlerinin jelden saflaştırılması sonucu elde edilen konsantrasyonları. M: Markır; 1: A fragmenti; 2: B fragmenti; 3: C fragmenti

TpLDH'ın A, B ve C fragmentlerini birleştirmek için iki basamaklı PCR yapılmıştır. PCR bileşenleri ve miktarları Tablo 3.6.'da verilmiştir.

PCR Basamak I:

Tablo 3.5. PCR basamak I'de yer alan reaksiyon bileşenleri ve miktarları

PCR Reaksiyonunun Bileşenleri	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar
Steril dH ₂ O	-	0.5 µL
GoTaq Tamponu	5X	5 µL
MgCl ₂	25 mM	1.5 µL
dNTPs	2 mM	2.5 µL
<i>TpLDH</i> A fragmenti	50 ng/5 µL	5 µL
<i>TpLDH</i> B fragmenti	50 ng/5 µL	5 µL
<i>TpLDH</i> C fragmenti	50 ng/5 µL	5 µL
GoTaq DNA polimeraz	5 u/ µL	0.5 µL
Toplam		25 µL

Amplifikasyon koşulları; 94 °C'de 2 dakika, 50 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika ve 7 döngü olarak gerçekleştirildi.

Basamak I'in bitmesinin ardından aşağıda verilen basamak II bileşenleri PCR tüplerine ilave edilerek reaksiyon gerçekleştirilmiştir. II. basamağa ait PCR bileşenleri ve miktarları Tablo 3.8.'de verilmiştir.

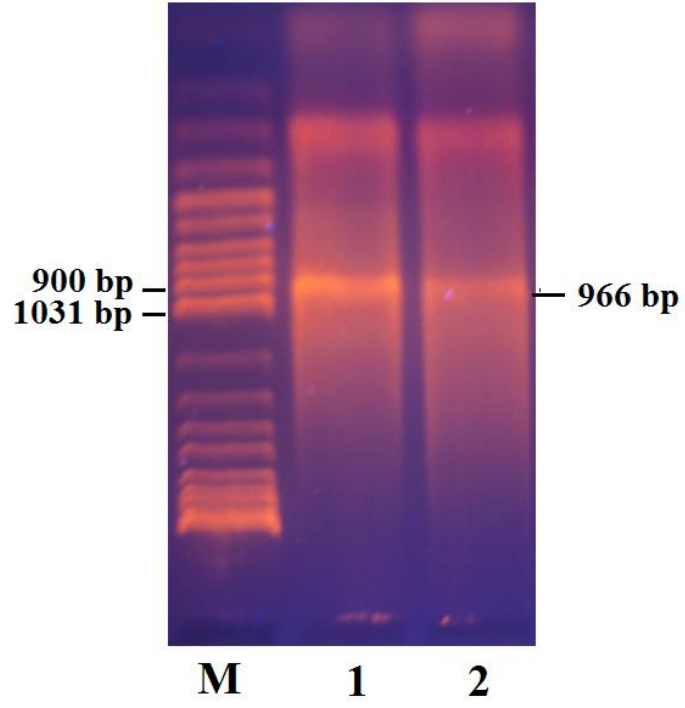
PCR basamak II

Tablo 3.6. PCR basamak II'de yer alan reaksiyon bileşenleri ve miktarları

PCR Reaksiyonunun Bileşenleri	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar
Steril dH ₂ O	-	0.5 µL
GoTaq Tamponu	5X	5 µL
MgCl ₂	25 mM	1.5 µL
dNTPs	2 mM	2.5 µL
<i>Tp</i> LDHF	50 ng/5 µL	5 µL
<i>Tp</i> LDHR	50 ng/5 µL	5 µL
GoTaq DNA polimeraz	5 u/ µL	0.5 µL
Toplam		25 µL

Amplifikasyon koşulları; 94 °C'de 1.5 dakika, 55 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 2 dakika ve 25 döngü olarak gerçekleştirildi.

PCR basamak I'de A, B ve C fragmentleri birleştirilmiş olup, *Tp*LDH geni tam uzunlukta tek parça olarak elde edilmiştir. PCR'ın II. basamağında ise *Tp*LDH geninin amplifikasyonu amaçlandığı için, bütün genin amplifikasyonunu sağlayacak *Tp*LDHF ve *Tp*LDHR uç primerleri kullanılmıştır. PCR ile elde edilen *Tp*LDH geni % 1'lik agaroz jele yüklenip, 60 mA'de koşturuldu. Elektroforez sonunda elde edilen bantların doğru büyüklükte olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. A, B ve C fragmentlerinin PCR ile birleştirilmesi sonucu intronsuz *TpLDH* geninin elde edilmesi.
M: Markır; 1 ve 2: İntronsuz *TpLDH* geni

4. SONUÇ ve TARTIŞMA

Theileria parva, *Theileria* cinsinin ekonomik olarak önemli olan iki türünden birisi olup, kene kaynaklı Şark Sahili Humması (East Coast Fever, ECF) adı verilen hastalık etmenidir. Parazitin neden olduğu hastalık, dünyadaki evcil ve yabani hayvanların geniş bir kısmını etkilemektedir. Bu parazit omurgalı konak sığır için ileri derecede patojen olup, ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

Hastalık kene kaynaklı olduğu için konak-*Theileria*-kene üçlüsü arasındaki herhangi bir zincir halkasının kırılmasının ECF'nin engellenmesini sağlayacağı düşünülmektedir. Kene kontrolü için kullanılan akarisitlerin yüksek maliyeti ve geniş bir kısmına direncin hızlı bir şekilde gelişmesi ve buna bağlı olarak akarisit direnci ile mücadele için daha yeni ve daha pahalı olanlarına ihtiyaç duyulması önemli bir problemdir [49, 55, 56]. Bununla birlikte *T. parva*'ya karşı güvenli ve etkili bir aşı da bulunmamaktadır [49, 38]. Hastalığın tedavisinde kullanılan antitheileriallar mevcut olup, bu ilaçların bazılarının parazitin belirli formları üzerinde etkili olmaması, ilaç temininin zorluğu ve maliyeti önemli problemler arasındadır [32]. Günümüzde kullanılan en önemli kemoterapötik ajan olan buparvaquone'un sığırlar için etkili bir antitheilerial olduğu *in vitro* ve *in vivo* olarak geniş bir şekilde gösterilmiştir [50, 52, 53]. Ancak yakın zamanda bu antitheileriala karşı da direnç geliştiği rapor edilmiştir [54]. Dolayısıyla etkili, ucuz ve güvenle kullanılabilecek yeni bir antitheileriala acil ihtiyaç duyulmaktadır [42].

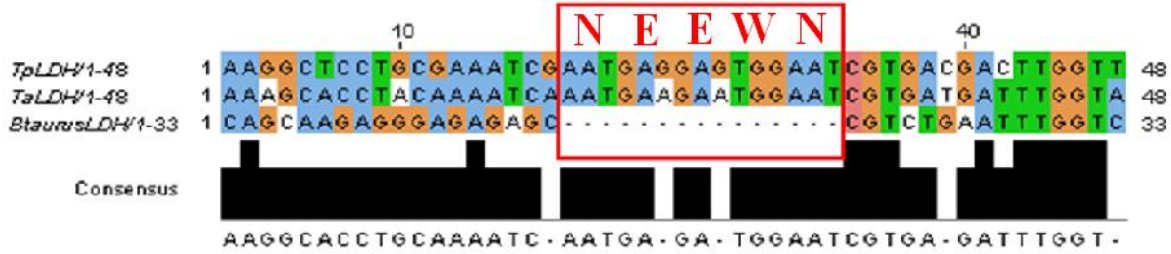
T. parva'nın hayati fonksiyonu için önemli olabilecek enerji metabolizmasının potansiyel zayıf noktaları yeni bir antitheilerial tasarımı için kemoterapötik hedef olabilir [87]. Ancak *T. parva* şizontlarının uzun bir süre infekte edilmiş hücrelerden kontamine olmadan kültüre alınmasının imkansız olması, maliyet, izolasyon prosedürlerinin uzunluğu gibi problemler, şizontlardaki enerji metabolizmasının enzimleri üzerinde çalışmalar yapılmasını geciktirmiştir [87, 88]. Dolayısıyla *T. parva* şizontlarında glikolitik enzimlerin varlığı sadece elektroforetik çalışmalarla gösterilebilmiştir. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda *T. parva* şizontlarında glikolitik enzimlerin yüksek aktiviteye sahip oldukları ve en yüksek aktiviteyi laktat dehidrogenaz enziminin gösterdiği belirlenmiştir [88]. Bu durum, *T. parva* şizontlarının enerji üretimi için temel yol olarak glikolize bağlı olması açısından diğer bir Apicompleksan olan *Plasmodium*'lardaki [91] eritrositik aşamaya benzediğini göstermiştir [88].

Bununla birlikte, *T. parva*'nın izolasyon problemlerinin aşılması [90] ve sonrasında genom projesinin tamamlanması [35] ile parazitin metabolizması ile ilgili önemli veriler elde edilmiştir. Buna göre parazit, glikoliz ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsü için gerekli enzimlerin tamamını kodlamaktadır [35]. Elde edilen veriler *T. parva*'nın, *Plasmodium* ve diğer Apikompleksanlar gibi [102-104] geleneksek bir TCA döngüsüne sahip olmadığını göstermektedir [25]. Bu yüzden *T. parva*'nın TCA döngüsünün fonksiyonel olup olmadığı bilinmemektedir [35]. Dolayısıyla parazit, ihtiyaç duyduğu bütün enerjiyi glikoliz ile sağlamaktadır. Bunun için glikoliz, *T. parva*'nın yaşam döngüsü için gerekli olup, glikoliz enzimleri antitelmial tasarım çalışmaları için cazip bir hedef olabilir. Bu tez çalışmasında *T. parva*'nın glikoliz reaksiyonunun son basamağında görevli olan laktat dehidrogenaz enzimi hedef enzim seçilmiştir.

Bu tez çalışmasında ECF'ye karşı etkin olacak yeni ilaç tasarımlarına katkıda bulunmak amacıyla *T. parva*'nın laktat dehidrogenaz enzimi kodlayan gen ilk defa izole edilmiş olup, klonlanmıştır. Bu durum, *T. parva*'nın genom projesi tamamlanmış olmakla birlikte, bu güne kadar karakterizasyonu ile ilgili ilave çalışmaların bulunmadığı laktat dehidrogenaz enzimi hedef alınarak yapılacak olan ilaç tasarım çalışmaları için ilk olması açısından son derece önemlidir.

T. parva için yapıya dayalı ilaç tasarım çalışmalarında, parazitin metabolik enzimlerinin araştırılması önem arzeder. Bunun için gen izolasyonu, klonlanması ve daha sonrasında ekspresyonunun yapılması ileri araştırmaların temelini oluşturmaktadır. Bu yüksek lisans tez çalışmasında hedef seçilen *TpLDH* geninin izolasyonu ve pGEM-T vektörüne klonlanması standart metodlarla gerçekleştirilmiştir. Buna göre *TpLDH* geni 1353 bp uzunluğundadır. NCBI'dan (NCBI Reference Sequence: NC_007344) elde edilen verilerden yola çıkarak [106], genin sırasıyla 121 bp, 128 bp, 717 bp uzunluğunda 3 eksondan ve 116 bp ile 271 bp uzunluğunda 2 introna sahip olduğu belirlenmiştir. *TpLDH* geni, ATG başlama kodonu ile başlayan ve TAA sonlanma kodonuyla biten, 321 amino asitlik proteini kodlayan, 966 baz çiftlik açık okuma çerçevesi içermektedir [35]. Ayrıca *TpLDH* geni, konak organizma *Bos taurus*'un LDH geni ile karşılaştırılmıştır. Buna göre *TpLDH* geni *Bos taurus*'un LDH genine göre aynı pozisyonda amino asit insersiyonları veya delesyonları içermektedir. İnsersiyonlardan en dikkat çeken Ser-91 ve Arg-92 arasında Asn-91A, Glu-91B, Glu-91C, Trp-91D, Asn-91E'ten oluşan ilave beş amino asit dizisidir [Şekil 4.1.]. Apikompleksanlardan olan *Toxoplasma*, *Babesia*, *Eimeria* ve

Plasmodium türlerine ait LDH'ların aktif bölge halkasında da 5 ilave amino asitin yer aldığı ortaya çıkmıştır [97-100]. Ancak bu dizi Apikompleksan türleri arasında farklılık göstermektedir. Bu bölge enzim inhibitörleri için tutunma bölgesi oluşturmakta ve enzim inhibitörleri için cazip bir hedef oluşturmaktadır [97-100]. Bu veriler doğrultusunda, *TpLDH* enzimininde aynı özelliklere sahip olması, *TpLDH* ve omurgalı konak LDH'ı arasında yüksek seçicilik gösteren inhibitörler bulunabileceği ve omurgalı konağa zarar vermeden parazitin yok edilebileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.1. *T. parva* (*TpLDH*), *T. annulata* (*TaLDH*, *TaLDH*, NCBI Reference Sequence: XM_948495.1) ve *Bos taurus* (*BtaurusLDH*, NCBI Reference Sequence: NM_174099.2) laktat dehidrogenaz enzimlerinin karşılaştırılması

Klonlanan *TpLDH* geninin intronlarını çıkarmak için yönlendirilmiş mutagenез metodu kullanılmıştır. Genel olarak genlerde baz değişikliği, insersiyon, delesyon gibi değişiklikler için kullanılan yönlendirilmiş mutagenез, bu tez çalışmasında intronların çıkarılması için kullanılmıştır. İtronların çıkarılmasının ardından eksonlar birleştirilmiştir. Sonuçta *TpLDH* geni 966 bp uzunluğunda intronsuz olarak elde edilmiştir. Dolayısıyla izolasyon ve klonlamadan sonraki aşama olan ekspresyon için intronların çıkarılması gerçekleştirilmiştir. Ancak intronsuz *TpLDH* geninin ekspresyon vektörüne aktarılması aşamasında problemler yaşanmış ve ekspresyon aşamasına geçilememiştir. *TpLDH* geninin ekspresyon vektörüne aktararak proteinin ifadesinin yapılabilmesi için optimizasyon çalışmaları devam etmektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında *TpLDH* geninin izolasyonunun ve klonlamasının gerçekleştirilmiş olması, proteinin karakterizasyonu ile ilgili ilave çalışmaların yürütülmesini sağlaması açısından son derece önemlidir. Bu sayede ilaç tasarımı için kemoterapötik hedef olarak gösterilen *TpLDH* enziminin moleküler yapısı ve fonksiyonu

hakkında geniş bilgiler elde edilmiş olacaktır. Elde edilecek bu verilerin, parazitin enerji metabolizmasında önemli bir yere sahip olan bu enzime karşı, seçici inhibitörlerin tasarımına olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] **Cavalier-Smith, T.**, 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Mol Biol Rev*; 57, 953-994.
- [2] **Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, I. J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, F. G.**, 1980. A newly revised classification of protozoa, *J. protozool*, 27, 37-58.
- [3] **Shaw, M.K.**, 1997. The same but different: the sporozoite entry into bovine cells, *International Journal for Parasitology*, 27, 457-474.
- [4] **Charleston WA.**,1994. *Toxoplasma* and other protozoan infections of economic importance in New Zealand, *New Zealand journal of zoology*, 21, 67-81.
- [5] **Hommel, M., Gilles, H.M.**, 2005. *Malaria, Topley and Wilston's Microbiology and Microbial Infections*, 10th Edition. Parasitology (Eds) FEG Cx, Derek Wakelin, Stephen H. Gillespie and DD Despommier, ASM Press.
- [6] **Kaya G.**, 2001. An Overview of Classification of the Phylum Apicomplexa, *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 7, 223-8.
- [7] **Schmunis GA and Lopez-Antunano FJ.**, 2005. *World-wide importance of parasites*, Topley Wilston's Microbiology and Microbial Infections 10 Edition. Parasitology (Eds) FEG Cox, Derek Wakelin, Stephen H. Gillespie and DD Despommier. ASM Press.
- [8] **Levine, N.D.**, 1985. Veterinary Protozoology. Iowa State Universty press, Ames, pp. 35-45.
- [9] **Soulsby, J.L.**, 1986. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals , Seventh Edition, Bailliere Tindal, London.
- [10] **Altay, K. , Aktaş, M.**, 2004. Sığır theileriosis, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 182, 79-86.
- [11] www.theileria.org/pictures/largemap.gif
- [12] **Uilenberg, G.**, 1995. International collaborative research:significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health., *Vet. Parasitol.*, 57, 19-41.
- [13] **Heussler, V.T.**, 2002. *Theileria survival strategies and host cell transformation*, pp. 69-84, In: Dirk A.E. Dobbelaere and Declan J. McKeever (Edit.). *Word Class Parasites Volume: 3 Theileria.*, Kluwer Academic Publishers, Boston., Dordrecht, London.

- [14] **Norval, R. A. I., Perry, B. D., Young, A. S.,** 1992. *The Epidemiology of Theileriosis in Africa*, pp. 481, Academic Press, London.
- [15] **Shah-Fischer, M. and Say, R.,**1989. *Manuel of tropical veterinary parasitology*, , pp. 407-408, English Edition, Published by C.A.B. International.
- [16] **Sugimoto, C., Kawazu, S., Sato, M., Kamio, T., Fujisaki, K.,** 1992. Preliminary biochemical characterization of “veil” structure purified from *Theileria sergenti*-, *T. buffeli*- and *T. orientalis* infected bovine erithrocytes, *Parasitol*, 104, 207-213.
- [17] **Sugimoto, C., Fujisak, K.,** 2002. Non-transforming *Theileria* parasites of ruminants, pp. 93-106, In: Dirk A.E. Dobbelaere and Declan J. McKeever (Edit.). Word Class Parasites Volume: 3 *Theileria*. Boston, Dordrecht, London. Kluwer Academic Publishers.
- [18] **Mehlhorn, H.,** 2001. Encyclopedic reference of parasitology: Biyology, Structure, Function, Second Edition, Berlin, Heidelberg, Springer.
- [19] **Mimioğlu, M., Göksu, K., Sayın, F.,** 1969. Veteriner ve Tıbbi protozooloji. Cilt 2. Ank. Üniv. Vet. Fak. Yay. No: 248. Ankara. Ank. Üniv. Basımevi.
- [20] **Göksu K.,** 1985. Theileriosisın klinik sendromlarıyla ilgili gelişmeler. “Theileriosis” F. Sayın (Ed.), Türk. Parasitol. Dern. Yay. No: 5. İzmir, Bilgehan Basımevi, sayfa :97-109.
- [21] **Young, A.S., Purnell, R.E., Payne, R.C., Brown, C.G.D., Kanhai, G.K.,** 1978. Studies on the transmission and course of infection of a Kenyan strain of *Theileria mutans*, *Parasitol*, 76, 99-115.
- [22] **Uilenberg, G.,** 1981. *Theileria* species of domesticated livestock.“Advences in the control of theileriosis” İrvin AD, Cunningham MP ve Young AS (Eds.). London. Hague Martinus Nijhoff Publishers,.
- [23] **Collins, N.E., Allsopp, M.T. E. P., Allsopp, B.A.,** 2002, Molecular diagnosis of theileriosis and heartwater in bovines in Africa, *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, 217-224.
- [24] **McKeever, D.J., Morrison, W.I.,** 2002. Epidemiological significance of strain-specific immunity to *Theileria parva*, pp. 41-54, In: Dirk A.E. Dobbelaere and Declan J. McKeever (Edit.). Word Class Parasites Volume: 3 *Theileria*. Boston. Dordrecht. London. Kluwer Academic Publishers.
- [25] **Bishop, R., Geysen, D., Skilton, R., Odongo, D., Nene, V., Allsopp, B., Mbogo, S., Spooner, P., Morzaria, S.,** 2002. Genomic polimorphism, sexual recombination and molecular epidemiology of *Theileria parva*, , pp. 23-40, In: Dirk A.E. Dobbelaere and Declan J. McKeever (Edit.). Word Class Parasites Volume: 3 *Theileria*. Boston. Dordrecht. London. Kluwer Academic Publishers.

- [26] **Stagg, D.A., Young, A.S., Leitch, B.L., Grootenhuys, J.G; Dolan, T.T.**, 1983. Infection of mammalian cells with *Theileria* species. *Parasitol.*; 86, 243–254.
- [27] **Karaer , Z.**, 1985. Theileriosisün bulaşması ile ilgili gelişmeler. “Theileriosis” F. Sayın (Ed.). Türk. Parasitol. Dern. Yay. No: 5. İzmir. Bilgehan Basımevi, 47-76.
- [28] **Saruhan, B.**, 2007. Theileriosisli sığırlarda buparvaquone (Buparvon)'un teröpatik etkinliğı, Yüksek Lisans Tezi , Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [29] **Samad, M.A., Dhar, S., Gautam, O.P., Kaura, Y.K.**, 1983. T- and B-lymphodi cell population in calves immunized against *Theileria annulata*, *Veterinary Parasitology*, 13: 109-114.
- [30] **Mehlhorn, H., Schein, E.**, 1984. The piroplasms: life cycle and sexual stages, *Adv. Parasitol.* 23, 37–103.
- [31] **D. A. Dobbelaere et al .**, 2004. The strategies of the *Theileria* parasite: a new twist in host–pathogen interactions., *Curr Opin Immunol.*, 16, 524-533.
- [32] **Gardner, M.J., Bishop, R., Shah, T., De Villiers, E.P., Carlton, J.M., Hall, N., Ren, Q., Paulsen, I.T., Pain, A., Berriman, M., Wilson, R.J.M., Sato, S., Ralph, S.A., Mann, D.J., Xiong, Z., Shallom, S.J., Weidman, J., Jiang, L., Lynn, J., Weaver, B., Shoaibi, A., Domingo, A.R., Wasawo, D., Crabtree, J., Wortman, J.R., Haas, B., Angiuoli, S.V., Creasy, T.H., Lu, C., Suh, B., Silva, J.C., Utterback, T.R., Feldblyum, T.V., Pertea, M., Allen, J., Nierman, W.C., Taracha, E.L.N., Salzberg, S.L., White, O.R., Fitzhugh, H.A., Morzaria, S., Venter, J. C., Fraser, C.M., Nene, V.**, 2005. Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes, *Science*, 309, 134-137.
- [33] **Olwach J. M., Reyers, B., Engelbrecht, F.A., Erasmus B.F.N.**, 2007. Climate cahange and tick-born disease, Theileriosis (East Coast Fever) in sub-Africa, *Journal of Arid Environments* 72, 108-120.
- [34] **Simuunzaa, M., Weira, W., Courcierc, E., Tait, A., Shielsa, B.**, 2010. Epidemiological analysis of tick-borne diseases in Zambia, *Veterinary Parasitology* 175, 331–342.
- [35] **Osman, S.A., Al-Gaabary, M.H.**, 2007. Clinical, haematological and therapeutic studies on tropical theileriosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Egypt, *Veterinary Parasitology*, 146, 337-340.
- [36] **Mara S.L. Rocchi, K.T., Ballingall, N.D. MacHugh, Declan J., McKeever.**, 2006. The kinetics of *Theileria parva* infection and lymphocyte transformation in vitro *Int J Parasitol*; 36(7): 771–778.

- [37] **Conrad, P. A., Denham D., Brown D.,** 1986. Intraerythrocytic multiplication of *Theileria parva* in vitro: an ultrastructural study. *Int. J. Parasitol.* 16, 223–229.
- [38] **Martim A.C., Kariuki D.P., Young A.S., Mutugi J.J.,** 1988. The importance of the carrier state of *Theileria parva* in the epidemiology of theileriosis and its control, by immunization. National Veterinary Research Centre, Kenya Agricultural Research Institute.
- [39] **Pain, A., Renauld, H., Berriman, M., Murphy, L., Yeats, C.A., Weir, W., Kerhornou, A., Aslett, M., Bishop, R., Bouchier, C., Cochet, M., Coulson, R.M.R., Cronin, A., De Villiers, E.P., Fraser, A., Fosker, N., Gardner, M., Goble, A., Griffiths-Jones, S., Harris, D.E., Katzer, F., Larke, N., Lord, A., Maser, P., McKellar, S., Mooney, P., Morton, F., Nene, V., O’Neil, S., Price, C., Quail, M.A., Rabbinoiwitsch, E., Rawlings, N.D., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Shah, T., Squares, R., Squares, S., Tivey, A., Walker, A.R., Woodward, J., Dobbelaere, D.A.E., Langsley, G., Rajandream, M.A., McKeever, D., Shiels, B., Tait, A., Barrell, B., Hall, N.,** 2005. Genome of the host-cell transforming parasite *Theileria annulata* compared with *T. parva*, *Science*, 309, 131-133.
- [40] **Anders, R. F.,** 1886. *Parasite Immunol.* 8, 529.
- [41] **Lizundia, R., Werling, D., Langsley, G., Ralph, S.A.,** 2009. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* p. 1213–1217.
- [42] **Speybroeck, N., Marcotty, T., Aerts, M., Dolan, T., Williams, B., Lauer, J., Molenberghs, G., Burzykowski, Tomasz., Mulumba, M., Berkvens, D.,** 2008. Titrating *Theileria parva*: Single stocks against combination of stocks *Experimental Parasitology* 118 , 522–530.
- [43] **McKeever, D.J.,** 2006. *Theileria parva* and the bovine CTL response: down but not out?, *Parasite Immunol.*, 28(7): 339–345.
- [44] **Katzer, F., Ngugi, D., Walker A.R., McKeever, D.J.,** 2010. Genotypic diversity, a survival strategy for the apicomplexan parasite *Theileria parva*, *Veterinary Parasitology* 167, 236–243.
- [45] **Seitzer, U., Jabbar, A.,** 2008. Tropical theileriosis: Cytotoxic T lymphocyte response to vaccination, *Vaccine* 26, 24–28.
- [46] **Walker, A.R.,** 2007. Theileriosis and the tick control conundrum: A better way forward?, *The Veterinary Journal*, 173, 248-249.
- [47] **McHardy, N., Wekesa, L.S., Hudson, A.T., Randall, A.W.,** 1985. Antitheilerial activity of BW720C (buparvaquone): A comparison with parvaquone, *Research in Veterinary Science*, 39, 29-33.

- [48] **Rintelen, M., Schein, E., Ahmed, J.S.,** 1990. Buparvaquone but not cyclosporin A prevents *Theileria annulata*-infected bovine, lymphoblastoid cells from stimulating uninfected lymphocytes, *Trop Med Parasitol* 41, 203-207.
- [49] **Singh, K., Thakur, M., Raghav, P.R.S., Varshney, B.C.,** 1993. Chemotherapeutic trials with four drugs in crossbred calves experimentally infected with *Theileria annulata*, *Research in Veterinary Science*, 54, 68-71.
- [50] **Dolan, T.T., Injairu, R., Gisemba, F., Maina, J.N., Mbadi, G., Mbwiria, S.K., Mulela, G.H.M., Othieno, D.A.O.,** 1992. A clinical trial of buparvaquone in the treatment of East Coast fever, *Veterinary Record*, 130, 536-538.
- [51] **Mhadhbi, M., Naouach, A., Boumiza, A., Chaabani, M.F., BenAbderazzak, S., Darghouth, M.A.,** 2010. In vivo evidence for the resistance of *Theileria annulata* to buparvaquone, *Veterinary Parasitology*, 169, 241-247.
- [52] **Willadsen, P.,** 2006, Tick control: Thoughts on a research agenda, *Veterinary Parasitology*, 138, 161-168.
- [53] **Jonsson, N.N., Hope, M.,** 2007. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*, *Veterinary Parasitology*, 146, 193-198.
- [54] **Willadsen P.,** 2004. Anti-tick vaccines, *Parasitology*, 129, 367-87.
- [55] **Holbrook, J.J., Liljas, A., Steindel, S.J., Rossman, M.G.,** 1975. *The Enzymes*. pp.191-292, Paul D. Boyer (Edit.), Vol. XI, Part A, Third Edition, Academic Press, New York.
- [56] **Koolman, J., Röhm., H.K.,** 2005. Color atlas of biochemistry, Second Edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.
- [57] **Markert, C.L., Möller, F.,** 1959. Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic, and species patterns, *PNAS*, 45, 753-763.
- [58] **Varley H., Gowenlock A., Bell M ,** 1981. *Practical Clinical Biochemistry*, pp 714, 5 th Edition, Vol. 1, William Heinemann medical books, London.
- [59] **Yu, Y., Deck, J.A, Hunsaker, L.A., Deck, L.M., Royer, R.E, Golberg, E., Vander Jagt, D.L.,** 2001. Selective active site inhibitors of human lactate dehydrogenase A₄, B₄, and C₄, *Biochemical Pharmacology*, 62, 81-89.
- [60] **Bakır, S.,** 1984. Lactat dehidrogenaz tayini için klinik uygulamaya uygun yöntem araştırılması, *Yüksek Lisans tezi*, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [61] **Price, N.C., Stevens, L.,** 1989. *Fundamentals of Enzymology*, Second Edition, Oxford University Press, New York.

- [62] **Fersht, A.**, 1985. *Structures and Mechanism of Selected Enzymes*, W.H. Freeman and Company, New York.
- [63] **Musick, W.D.I., Rossman, M.G.**, 1979. The tentative amino acid sequencing of lactate dehydrogenase C₄ by X-ray diffraction analysis, *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 7621-7623.
- [64] **Garvie, E.**, 1980. Bacterial lactate dehydrogenases, *Microbiological Reviews* 44, 106-139.
- [65] **Rao, S.T., Rossman, M.G.**, 1973. Comparison of super-secondary structure in proteins, *Journal of Molecular Biology*, 76, 241-250.
- [66] **Birktoft, J.J., Banaszak, L.J.**, 1983. The presence of histidine-aspartic acid pair in the active site of 2-hydroxyacid dehydrogenases, *The journal of Chemistry*, 258, 472-482.
- [67] **Ohlsson, I., Nordström, B., Brändén, C.I.**, 1974. Structural and functional similarities within the coenzyme binding domains of dehydrogenases, *Journal of Molecular Biology*, 89, 339-354 .
- [68] **Kutzenko, A.S., Lamzin, V.S., Popov, V.O.**, 1998. Conserved super secondary structural motif in NAD-dependent dehydrogenases, *Febs Letters*, 423, 105-109.
- [69] **Deng, H., Zheng, J., Clark, A., Holbrook, Callender, R., Burgner II, J.W.**, 1994. Source of catalysis in lactate dehydrogenase system. Ground-state interaction in enzyme-substrate complex, *Biochemistry*, 33, 2297-2305.
- [70] **Grau, U.M., Trommer, W.E., Rossman, M.G.**, 1981. Structure of the active ternary complex of pig heart lactate dehydrogenase with S-lac-NAD at 2.7 resolution, *Journal of Molecular Biology*, 151, 289-307.
- [71] **Wigley, D.B., Gamblin, S.J., Turkenburg, J.P., Piontek, K., Muirhead, H., Holbrook, J.J.**, 1992. Structure of a ternary complex of an allosteric lactate dehydrogenase from *Bacillus Stearothermophilus* at 2.5 Å⁰ resolution, *Journal of Molecular Biology*, 223, 317-335.
- [72] **Clarke, A.R., Wigley, D.B., Chia, W.N., Barstow, D., Atkinson, T., Holbrook, J.J.**, 1986. Site-directed mutagenesis reveals role of mobile arginine in lactate dehydrogenase catalysis, *Nature*, 324, 699-702.
- [73] **Holbrook, J.J., Gutfreund, H.**, 1975. Approaches to the Study of Enzyme Mechanisms Lactate Dehydrogenase, *FEBS Letters*, volume 31 number:2.
- [74] **McClendon, S., Zhadin, N., Callender, R.**, 2005. The approach to the Michaelis complex in lactate dehydrogenase: The substrate binding pathway, *Biophysical Journal*, 89, 2024-2032.

- [75] **Clarke , A.R., Wilks, H.M., Barstow, D.A., Atkinson, T., Chia, W.N., Holbrook, J.J.,** 1988. An investigation of contribution made by the carboxylate group of an active site histidine aspartate couple to binding and catalysis in lactate dehydrogenase, *Biochemistry*, 27, 1617-1622.
- [76] **Shoemark, D.K.,** 2000. The kinetic characterization of lactate dehydrogenase enzyme from *Plasmodium falciparum*, *Doctor of Philosophy Thesis*, Department of Biochemistry University of Bristol, UK.
- [77] **Cortes, A., Emergy, D.C., Halsall, D.J., Jackson, R.M., Clarke , A.R. nd Holbrook, J.J.,** 1992. Charge balance in the α -Hydroxyacid dehydrogenase vacuole: an acid test, *Protein Science*, 892-901.
- [78] **Holbrook, J.J., Stinson, R.A.,** 1973. The use of ternar complex to study ionizations and isomerizations during catalysis by lactate dehydrogenase, *Biochemical Journal*, 131, 739-748.
- [79] **Hung, S.S., Parkinson, J.,** 2010. Post-genomics resources and tools for studying apicomplexan metabolism, *Trends in Parasitology*, xx, 1-10 (In Press).
- [80] **Kiama, T.N., Kiaira, J.K., Konji, V.N., Mosoke, A.J.,** 1999. Enzyme of glucose and glycerol catabolism in *in vitro*-propagated *Theileria parva* schizonts, *The Veterinary Journal*, 158, 221-227.
- [81] **Dunn, C.R., Wilks, H.M., Halsal, D.J., Atkinson, T., Calarke, A.R., Muirhead, H., Holbrook, J.J.,** 1991. Desing and Synthesis of new enzymes based on lactate dehydrogenase framework, *Philosophical Transaction s of The Royal Society London B*, 332, 177-184.
- [82] **Goddeeris, B.M., Dunlap, S., Innes, E.A., Mckeever, D.J.,** 1991. A simple and efficient method for purifying and quantifiying schizont from *Theileria parva*- infected cells, *Parasitology Research*, 15, 482-484.
- [83] **Sherman, I.W.,** 1979. Biochemistry of *Plasmodium* (Malaria Parasites), *Microbiological Reviews*, 43, 453-495.
- [84] <http://www.mwg-biotech.com/> 15 Haziran2011.
- [85] <http://www.fermentas.com.tr/> Fermantas ürünleri. 17 Mayıs 2011.
- [86] <http://www.iontek.com.tr/> Primer siparişinin ve DNA dizi analizinin gerçekleştiği yer. 9 Mayıs 2011.
- [87] <http://www.promega.com/> Promega ürün kodları. 13 Haziran 2011.
- [88] **Sambrook, J. and Russell, D.W.,** 2001, *Molecular Cloning A Laboratory Manual I-II-III*, Third Edit., CSHL Press, New York.
- [89] QIAGEN, QIAquick®Spin Handbook, 2002, Cat. No: 28704, Germany, 34p.

- [90] QIAGEN, QIAprep®Miniprep Handbook, 2003, Cat. No: 27104, Germany, 46p.
- [91] **Horton, R.M, et al.**, 1993. *Methods in Enzymology*, 217, 270-279.
- [92] **Foth, B.J., Stimmler, L.M., Handman, E., Crabb, B.S., Hodder, A.N., McFadden, G.I.**, 2005, The malaria parasite *Plasmodium falciparum* has only one pyruvate dehydrogenase complex, which is located in the apicoplast, *Molecular Microbiology*, 55, 39-53.
- [93] **Ralph, S.A.**, 2005, Strange organelles-*Plasmodium* mitochondria lack a pyruvate dehydrogenase complex, *Molecular Microbiology*, 55, 1-4.
- [94] **Pino, P., Foth, B.J., Kwok, L.Y., Sheiner, L., Schepers, R., Soldati, T., Soldati-Favre, D.**, 2007, Dual targeting of antioxidant and metabolic enzymes to the mitochondrion and the apicoplast of *Toxoplasma gondii*, *PLoS Pathogens*, 3:8, 1092-1108.
- [95] **Lau, A.O.T.**, 2009, An overview of the *Babesia*, *Plasmodium* and *Theileria* genomes: A comparative perspective, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 164, 1-8.
- [96] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> TpLDH genine ait veriler. 3 Nisan 2011.
- [97] **Bork, S., Okamura, M., Boonchit, S., Hirata, H., Yokoyama, N., Igarashi, I.**, 2004. Identification of *Babesia bovis* l-lactate dehydrogenase as a potential chemotherapeutical target against bovine babesiosis, *Molecular & Biochemical Parasitology*, 136, 165–172.
- [98] **Kavanagh, L.K., Elling, R.A., Wilson, D.K.**, 2004. Structure of *Toxoplasma gondii* LDH1: Active-Site Differences from Human Lactate Dehydrogenases and the Structural Basis for Efficient APAD+ Use, *Biochemistry*, 43 (4), 879-889.
- [99] **Dunn, C.R., Banfield, M.J., Barker, J.J., Higham, C.W., Moreton, K.M., Turgut-Balik, D., Brady, R.L. and Holbrook, J.J.**, 1996. The Structure of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* Reveals a New Target for Anti-malarial Design, *Nature Structural Biology*, 3, 11, 912-915.
- [100] **Schaap, D., Arts, G., Kroeze, J., Niessen, R., Roosmalen-Vos, S.V., Spreeuwenberg, K., Kuiper, C.M., Beek-Verhoeven, N.V.D., Kok, J.J., Knegt, R.M.A., Vermeulen, A.N.**, 2004. An *Eimeria* vaccine candidate appears to be lactate dehydrogenase; characterization and comparative analysis, *Parasitology*, 128, 603–61.

ÖZGEÇMİŞ

Irmak İÇEN

Doğum Tarihi : 15 Aralık 1985

Doğum Yeri : Diyarbakır

Görevi : Araştırma Görevlisi

İş Adres : Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 3. Kat, No: 302, Elazığ

Telefon : +90 424 237 00 00 / 38 07

Fax : +90 424 233 00 62

E-mail : irmak.icen@hotmail.com
iicen@firat.edu.tr

(2010-2011) : Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eğitimi

Tez Konusu : *Theileria parva*'nın Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin İzolasyonu, Klonlanması ve Ekspresyonu

Danışman : Prof. Dr. Ömer MUNZUROĞLU

(2004-2008) : Dicle Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde Lisans Eğitimi

(1997-2003) : Ortaokul ve Lise Eğitimi