

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***PLASMODIUM VIVAX* LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNDEKİ AKTİF
BÖLGE HALKASININ VE KOFAKTÖR BAĞLANMA BÖLGESİNİN DİĞER
APİKOMPLEKSAN LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMLERİ İLE
KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**

DOKTORA TEZİ

Venhar ÇELİK

**Anabilim Dalı: Biyoloji
Programı: Moleküler Biyoloji**

MAYIS-2010

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***PLASMODIUM VIVAX* LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNDEKİ
AKTİF BÖLGE HALKASININ VE KOFAKTÖR BAĞLANMA
BÖLGESİNİN DİĞER APİKOMPLEKSAN LAKTAT DEHİDROGENAZ
ENZİMLERİ İLE KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**

DOKTORA TEZİ

Venhar ÇELİK

(04110201)

Anabilim Dalı: Biyoloji

Programı: Moleküler Biyoloji

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 12 Mayıs 2010

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***PLASMODIUM VIVAX* LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNDEKİ
AKTİF BÖLGE HALKASININ VE KOFAKTÖR BAĞLANMA
BÖLGESİNİN DİĞER APİKOMPLEKSAN LAKTAT DEHİDROGENAZ
ENZİMLERİ İLE KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**

DOKTORA TEZİ

Venhar ÇELİK

(04110201)

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 12 Mayıs 2010
Tezin Savunulduğu Tarih: 11 Haziran 2010**

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Dilek TURGUT-BALIK (Y.T.Ü.)

Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ (K.T.Ü.)

Prof. Dr. Orhan ERMAN (F.Ü.)

Prof. Dr. Fikret KARATAŞ (F.Ü.)

Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU (F.Ü.)

MAYIS-2010

Bu doktora tez çalışması özlem ve saygı ile andığım

dedem Adıgüzel ÜNLÜ'ye ithaf edilmiştir...

ÖNSÖZ

Tez çalışmasının yürütülmesi esnasında değerli fikir ve önerilerinden yararlandığım danışman hocam Doç. Dr. Dilek TURGUT-BALIK'a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Lisans ve lisansüstü eğitimini aldığım Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne ve doktora çalışmalarımın bir kısmını yürüttüğüm Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmasının yürütülmesine finansal destek sağlayan TÜBİTAK, FÜBAP ve Yıldız Teknik Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmasına “Moleküler Biyoloji Proje Yarışması Birincilik Ödülü” vererek destek sağlayan Prizma Laboratuar Ürünleri Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti.'ne teşekkür ederim.

Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Orhan ERMAN'a desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her sürecinde hissettiğim sonsuz sevgi ve destekleri için aileme çok teşekkür ederim.

Venhar ÇELİK

Elazığ-2010

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	VII
ABSTRACT	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
TABLolar LİSTESİ	XVI
KISALTMALAR ve SİMGELER	XIX
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Plasmodium</i> 'ların Yaşam Döngüsü	2
1.2. Antimalarialar	3
1.3. Tez Çalışmasının Model Apikompleksan Organizmaları	6
1.3.1. <i>Toxoplasma gondi</i> ve Toxoplasmosis	6
1.3.2. <i>Eimeria tenella</i> ve Koksidirosis	7
1.3.3. <i>Theileria parva</i> ve Şark Sahili Humması	7
1.4. L-Laktat Dehidrogenaz Enzimi	8
1.4.1. Laktat Dehidrogenaz Enziminin Aktif Bölgesi ve Katalitik Mekanizması	9
1.4.2. Laktat Dehidrogenaz Enziminin Kofaktör Bağlanma Bölgesi	12
1.4.3. Laktat Dehidrogenaz Enziminin Substrat Bağlanma Bölgesi (Katalitik Bağlanma Bölgesi)	14
1.5. Plazmodiyal Laktat Dehidrogenaz Enzimi	15
1.6. Model Apikompleksanların Laktat Dehidrogenaz Enzimleri	18
1.6.1. <i>Toxoplasma gondii</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimi	18
1.6.2. <i>Eimeria tenella</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimi	19
1.6.3. <i>Theileria parva</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimi	19
1.7. Plazmodiyal ve Model Apikompleksan Laktat Dehidrogenaz Enzimlerinin Yapısal ve Kinetik Olarak Karşılaştırmalı Analizi	20
1.7.1. Aktif Bölgedeki Yapısal Farklılık	21
1.7.2. Kofaktör Bağlanma Bölgesindeki Yapısal Farklılık	22
1.7.3. İndirgenmiş Substrat İnhibisyonu	24

	<u>Sayfa No</u>
1.7.4. Substrat Özgüllüğü	25
1.7.5. Kofaktör Özgüllüğü	27
1.7.6. İnhibitör Çalışmaları	29
1.8. Tez Projesinin Tasarımı ve Hedef Seçimi	31
2. MATERYAL ve METOT	33
2.1. Materyal	33
2.1.1. Ekspresyon Vektörü	34
2.1.2. DNA Örneği	34
2.1.3. <i>Escherichia coli</i> Soyu	35
2.1.4. Bakteriyolojik Gelişim İçin Besiyerleri ve Solüsyonlar	35
2.1.5. Stok Solüsyonlar, Çalışma Solüsyonları ve Tamponlar	37
2.1.6. Primerler	43
2.1.6.1. 5' Uç Primeri	43
2.1.6.2. 3' Uç Primerleri	43
2.1.6.3. Yönlendirilmiş Mutagenez Primerleri	43
2.1.6.4. Dizi Analizi Primerleri	45
2.2. Metot	47
2.2.1. Primerlerin Tasarlanması	47
2.2.2. Plazmid DNA İzolasyonu	48
2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Yönlendirilmiş Mutagenez	48
2.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi	51
2.2.4.1. Etidyum Bromür ile Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi	51
2.2.4.2. Kristal Viyole ile Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi	52
2.2.5. DNA'nın Jelden Geri Kazanılması	52
2.2.6. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile DNA'nın Kesilmesi (Digest)	53
2.2.7. Klonlanacak Olan DNA ve Vektör DNA'sının Birleştirilmesi (Ligasyon)	53
2.2.8. Kalsiyum Klorür Etkileşimi ile Kompetant <i>E. coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması	54
2.2.9. Transformasyon	54
2.2.10. Koloni PCR	54
2.2.11. Stok Kültürün Hazırlanması	55
2.2.12. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	55

	<u>Sayfa No</u>
2.2.13. Western Blot ile Mutant PvLDH Proteinlerinin Belirlenmesi	57
2.2.14. Mutant Laktat Dehidrogenaz Enzimlerinin Aktivitelerinin Ölçülmesi	57
2.2.15. Mutant PvLDH Proteinlerinin Saflaştırılması	58
2.2.15.1. Mutant PvLDH Proteinlerinin Saflaştırılması İçin Protokol 1	58
2.2.15.2. Mutant PvLDH Proteinlerinin Saflaştırılması İçin Protokol 2	59
2.2.16. Mutant PvLDH Proteinlerinin Amonyum Sülfat ile Çöktürülmesi ve Diyalizi	60
2.2.17. Mutant PvLDH Proteinlerinin Molekül Ağırlıklarının ve Ekstinksiyon Katsayılarının Hesaplanması	60
2.2.18. Saflaştırılmış Mutant PvLDH Proteinlerinin Konsantrasyonlarının Hesaplanması	60
2.2.19. Mutant PvLDH Enzimlerinin Steady-State Kinetik Ölçümlerinin Yapılması	61
3. BULGULAR ve TARTIŞMA	62
3.1. İnsan, <i>Plasmodium vivax</i> ve Model Apikompleksan Laktat Dehidrogenaz Enzimlerinin Aminoasit Düzeyinde Karşılaştırmalı Analizi	62
3.2. <i>Plasmodium vivax</i> 'ın Laktat Dehidrogenaz Enzimindeki Aktif Bölge Halkasının Yönlendirilmiş Mutagenез Çalışmaları ile Analizi	65
3.2.1. PvLDH Enziminin Aktif Bölge Halkasındaki Pentapeptid İnsersiyonunun Tg1LDH'daki İnsersiyona Benzetilmesi ve Analiz Edilmesi	66
3.2.1.1. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Genlerinin A ve B Fragmentlerinin Elde Edilmesi	66
3.2.1.2. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Genlerinin Tam Uzunluklarının Elde Edilmesi	69
3.2.1.3. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Genlerinin ve pKK223-3 Vektörünün Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesilmesi	70
3.2.1.4. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Genlerinin pKK223-3 Ekspresyon Vektörüne Aktarılması	71
3.2.1.5. Rekombinant PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 DNA'larının <i>E. coli</i> JM105 Hücrelerine Transformasyonu	72
3.2.1.6. Koloni PCR ile Sonuçların Doğrulanması	72
3.2.1.7. Dizi Analizi ile Sonuçların Doğrulanması	73

	<u>Sayfa No</u>
3.2.1.8. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Genlerinin Ekspresyonlarının Yapılması	76
3.2.1.9. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Proteinlerinin Aktivitelerinin Kontrol Edilmesi	82
3.2.1.10. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Proteinlerinin Saflaştırılması İçin Protokol Optimizasyonu	84
3.2.1.10.1. PvLDH Proteininin Saflaştırılması İçin Protokol 1'in Optimizasyonu	85
3.2.1.10.2. PvLDH Proteininin Saflaştırılması İçin Protokol 2'nin Kullanılması	95
3.2.1.10.3. PvLDH Enziminin Kinetik Analizi	96
3.2.1.11. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Proteinlerinin Saflaştırılması	99
3.2.1.12. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Proteinlerinin Konsantrasyonlarının Hesaplanması	101
3.2.1.13. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Enzimlerinin Kinetik Analizi	102
3.2.2. PvLDH Enziminin Aktif Bölge Halkasındaki Pentapeptid İnsersiyonunun EtLDH'daki İnsersiyona Benzetilmesi ve Analiz Edilmesi	106
3.2.3. PvLDH Enziminin Aktif Bölge Halkasındaki Pentapeptid İnsersiyonunun TpLDH'daki İnsersiyona Benzetilmesi ve Analiz Edilmesi	119
3.3. Plasmodium vivax'ın Laktat Dehidrogenaz Enzimindeki Kofaktör Bağlanma Bölgesinin Yönlendirilmiş Mutagenез Çalışmaları ile Analizi	133
3.3.1. PvLDH Enziminin Kofaktör Bağlanma Bölgesindeki Leu ₁₆₃ Aminoasidinin Model Apikompleksanların LDH'ındaki Met ₁₆₃ ile Değiştirilmesi ve Analiz Edilmesi	134
3.3.2. PvLDH Enziminin Kofaktör Bağlanma Bölgesindeki Leu ₁₆₃ Aminoasidinin İnsan LDH'ındaki Ser ₁₆₃ ile Değiştirilmesi ve Analiz Edilmesi	142
4. SONUÇ	148
KAYNAKLAR	160
ÖZGEÇMİŞ	---

ÖZET

Sıtma, dünya popülasyonunun neredeyse yarısını tehdit eden parazitik bir hastalıktır. Hastalığa, aynı zamanda *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Theileria*, *Cryptosporidium* ve *Babesia* gibi diğer bazı patojenleri içeren Apikompleksa şubesine ait *Plasmodium* cinsinin üyeleri sebep olmaktadır.

Birçok endemik bölgede sıtmaya karşı gittikçe artan ilaç direncinin ortaya çıkması yeni antimalarial ilaçların geliştirilmesinin gerekliliğini vurgulamaktadır. *Plasmodium*'un metabolik yollarının araştırılması parazitin glikolitik yolunda kullanılan laktat dehidrogenaz enzimini işaret etmektedir. Önceki çalışmalarımızda *Plasmodium*'un iki farklı türünün laktat dehidrogenaz geni klonlanmış, protein ifade edilmiş ve enzim yapısı çözülmüştür. Enziminin yapısal ve kinetik olarak değerlendirilmesi, insandaki eşdeğerine göre belirgin bir şekilde farklı özelliklere sahip olduğunu göstermiştir ve enzim aktivitesinin engellenmesiyle eritrositlerde parazitin öldüğü rapor edilmiştir. Bu çalışmada, *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenaz enziminin yapıya dayalı ilaç tasarım çalışmaları için potansiyel bir hedef olarak belirlenen aktif bölge halkası ve kofaktör bağlanma bölgesi *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella* ve *Theileria parva*'daki enzimlerin aynı bölgelerine benzetilerek analiz edilmiştir.

Bütün aminoasit değişimleri yönlendirilmiş mutagenез ile yapılmıştır. Mutant genlerin ekspresyon vektörü pKK233-3'e klonlanması standart metotlarla sağlanmıştır. Bütün mutant proteinlerin *E. coli*'de ekspresyonu yapılmış ve protein ekspresyonu Western blot ile doğrulanmıştır. Ekspresyonu yapılan mutant proteinler daha sonra Ni-NTA agaroz kullanılarak saflaştırılmış ve herbir mutant proteinin yapılan Steady-State kinetik analizleri yabancı tip *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenaz enziminin analiz sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Plasmodium vivax'ın aktif bölge halkası, *Toxoplasma gondii* ve *Eimeria tenella* laktat dehidrogenaz enzimlerindeki aynı bölgelere benzetildiği zaman, aminoasit değişimi ile enzimatik aktivitenin kaybolmadığı, fakat enzimin substratına ilgisinin azaldığı ve katalitik hızının düştüğü gözlenmiştir. *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenaz enzimini *Theileria parva* laktat dehidrogenaz enzimine benzetmek için yapılan aminoasit değişimi enzimin substratına ilgisinde hiçbir değişikliğe neden olmamıştır; ancak katalitik aktivite hızı artmıştır. Bu sonuçlar, yeni antiparazitik ilaç geliştirilmesinde Apikompleksan laktat

dehidrogenazlar boyunca aktif bölge halkasının can alıcı ve ideal bir bölge olduğunu göstermiştir. Çalışmanın ikinci kısmında, 163. pozisyondaki lösin aminoasidi methionin aminoasidi ile değiştirilerek *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenaz enziminin kofaktör bağlanma bölgesi diğer Apikompleksan laktat dehidrogenaz enzimlerindeki eşdeğerleri ile karşılaştırılmıştır. Lösin163Methionin değişimi yaptıktan sonra enzim aktivitesi korunmuş olmakla birlikte enzimin subtrat affinitesi ve katalitik hızı belirgin bir şekilde azalmıştır. Lösin aminoasidi aynı pozisyonda bir serin ile değiştirildiği zaman enzim aktivitesini kaybetmiştir.

Bütün bu sonuçlar aktif bölge halkasının yanısıra Apikompleksanların laktat dehidrogenazlarındaki kofaktör bağlanma bölgesinin de yapıya dayalı ilaç tasarım çalışmaları için ideal bir hedef olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Sıtma, *Plasmodium vivax*, Apikompleksan, Laktat Dehidrogenaz, Aktif Bölge, Kofaktör Bağlanma Bölgesi, Yönlendirilmiş Mutagenез, Steady-State Kinetiği

ABSTRACT

Comparative Analysis of Active Site Loop and Cofactor Binding Site of *Plasmodium vivax* Lactate Dehydrogenase Enzyme with Other Apicomplexan Lactate Dehydrogenase Enzymes

Malaria is a parasitic disease that threatens almost half of the global population. It is caused by the members of the *Plasmodium* genus in the Apicomplexa phylum that also includes some other pathogens, *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Theileria*, *Cryptosporidium* and *Babesia*.

Increasing occurrence of drug resistance against malaria in many endemic areas emphasizes the need for the development of new antimalarial drugs. Mining of the metabolic pathways of the *Plasmodium* pointed the enzyme lactate dehydrogenase used in the glycolytic pathway of the parasite. Lactate dehydrogenase gene has been cloned from two different species of *Plasmodium*, the protein overexpressed and the enzyme's structure solved in our previous studies. Structural and kinetic evaluation of the enzyme indicated that it has strikingly different properties compared to its human counterpart, and inhibition of the activity of the enzyme has been reported to kill the parasite in the erythrocyte. In this study, the active site loop that has been identified as a potential target for the structure based drug design studies and the cofactor binding site of the enzyme were analysed in *Plasmodium vivax* lactate dehydrogenase by mimicking the enzyme's same regions from *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella* and *Theileria parva*.

All of the amino acid exchanges were made by site-directed mutagenesis. Cloning of the mutant genes into the expression vector pKK223-3 were performed by standard methods. All of the mutant proteins were expressed in *E. coli* and the expression of the proteins were confirmed by Western blotting. The overproduced mutant proteins were then purified by using Ni-NTA agarose and Steady-State kinetic analysis was performed on each mutant protein and compared with the analysis results of the wild type *Plasmodium vivax* lactate dehydrogenase enzyme.

It was observed that making residue exchanges in the active site loop of the *Plasmodium vivax* lactate dehydrogenase was possible without losing enzymatic activity but enzyme's affinity to its substrate was decreased and catalysis rate was reduced when

the same region from *Toxoplasma gondii* and *Eimeria tenella* lactate dehydrogenases were mimicked. Making amino acid exchange on *Plasmodium vivax* lactate dehydrogenase to mimick *Theileria parva* lactate dehydrogenase has caused almost no change on the affinity of the enzyme to its substrate but improved the catalytic activity rate. These results indicate the active site loop being a crucial and ideal region across the Apicomplexan lactate dehydrogenases in the development of new antiparasitic drugs. In the second part of the study, the cofactor binding site of *Plasmodium vivax* lactate dehydrogenase was compared to its equivalent in the other Apicomplexan lactate dehydrogenases by replacing leucine residue at position 163 by a methionine amino acid as in the other Apicomplexan enzymes. Although the enzymatic activity was maintained after making Leucine163Methionine exchange, substrate affinity and catalytic rate of the enzyme were decreased dramatically. The enzyme has lost its activity when the leucine residue was replaced by a serine at the same position.

All these results indicate active site loop as well as the cofactor binding site of the lactate dehydrogenase of Apicomplexans could be an ideal target for the structure based drug design studies.

Key Words: Malaria, *Plasmodium vivax*, Apicomplexan, Lactate Dehydrogenase, Active Site, Cofactor Binding Site, Site-Directed Mutagenesis, Steady-State Kinetics

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. <i>Plasmodium</i> 'ların yaşam döngüsü	3
Şekil 1.2. Mevcut antimalariallara karşı ortaya çıkan direncin gösterilmesi	5
Şekil 1.3. LDH enzimi tarafından L-laktatın pirüvata oksidasyonu/pirüvatın laktata redüksiyonu	8
Şekil 1.4. Laktat dehidrogenaz enziminin katalitik döngüsü	10
Şekil 1.5. Laktat dehidrogenaz enziminin aktif bölgesinde yer alan aminoasitlerin gösterilmesi	11
Şekil 1.6. Laktat dehidrogenaz enziminin Rossmann katını gösteren yapısı	12
Şekil 1.7. LDH dizisi belirlenen ilk organizma olan köpekbalığı, insan, <i>Plasmodium</i> ve diğer Apikompleksanların laktat dehidrogenaz enzimlerinin kofaktör bağlanma bölgelerinin ve "Fingerprint" bölgelerinin aminoasit dizisi	13
Şekil 1.8. Laktat dehidrogenaz enziminin substrat etkileşimine katılan aminoasitleri	15
Şekil 1.9. Laktat dehidrogenaz enziminin aktif bölge halkasının aminoasit dizisi	21
Şekil 1.10. pLDH ve memeli LDH'nda substrat bağlanma bölgesi ve aktif bölge halkasına bitişik yarığın varlığının gösterilmesi	22
Şekil 1.11. Laktat dehidrogenaz enziminin 163. pozisyonundaki aminoasit farklılığının gösterilmesi	22
Şekil 1.12. İnsan LDH'ı, pLDH ve Tg1LDH'ın 163. pozisyonundaki aminoasitlerinin NADH ile olan farklı etkileşimlerinin gösterilmesi	23
Şekil 1.13. İnsan LDH'mın NADH kofaktörünün ve plazmodiyal LDH'ın NADH kofaktörünün pozisyon farklılıklarının gösterilmesi	23
Şekil 2.1. PvLDH geninin organizasyonu ve pKK223-3 vektörünün haritası	34
Şekil 2.2. PvLDH enzimini kodlayan genin nükleotid dizisi ve enzimin aminoasit dizisi	45
Şekil 2.3. PCR ile yönlendirilmiş mutagenезin gerçekleştirilmesi	51
Şekil 3.1. Köpekbalığı, insan, <i>P. vivax</i> ve diğer Apikompleksanların LDH enzimlerinin aminoasit dizisi	64

Şekil 3.2.	<i>PvLDH</i> 'ın aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun <i>Tg1LDH</i> 'dakine benzetilmesi	66
Şekil 3.3.	<i>PvLM1Tg1</i> 'in A ve B fragmentlerinin elde edilmesi	68
Şekil 3.4.	<i>PvLM1Tg1</i> ve <i>PvLM2Tg1</i> genlerinin tam uzunluğunun elde edilmesi	70
Şekil 3.5.	<i>PvLM1Tg1</i> ve <i>PvLM2Tg1</i> genlerinin ve pKK223-3 vektörünün restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi sonrası jelde görüntülenmesi	71
Şekil 3.6.	Koloni PCR sonrası pozitif ve negatif sonuçların jelde görüntülenmesi	73
Şekil 3.7.	<i>PvLM1Tg1</i> geninin 5'→3' zincirinin ve 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu	74
Şekil 3.8.	<i>PvLM2Tg1</i> geninin 5'→3' zincirinin ve 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu	75
Şekil 3.9.	<i>PvLM1Tg1</i> genini içeren 0-2 saatlik <i>E. coli</i> JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili	77
Şekil 3.10.	<i>PvLM1Tg1</i> genini içeren 3 saatlik-bir gecelik <i>E. coli</i> JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili	77
Şekil 3.11.	<i>PvLM2Tg1</i> genini içeren 3 saatlik-bir gecelik <i>E. coli</i> JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili	79
Şekil 3.12.	<i>PvLM1Tg1</i> genini içeren <i>E. coli</i> JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının protein profillerinin ayrı ayrı gösterilmesi	80
Şekil 3.13.	<i>PvLM2Tg1</i> genini içeren <i>E. coli</i> JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının protein profillerinin ayrı ayrı gösterilmesi	80
Şekil 3.14.	<i>PvLM1Tg1</i> ve <i>PvLM2Tg1</i> proteinlerinin Western blot ile gösterilmesi	82
Şekil 3.15.	Deneme 1 ile saflaştırılmış <i>PvLDH</i> proteininin SDS-PAGE ile analizi	86
Şekil 3.16.	Deneme 2 ile saflaştırılmış <i>PvLDH</i> proteininin SDS-PAGE ile analizi	88
Şekil 3.17.	Deneme 3 ile saflaştırılmış <i>PvLDH</i> proteininin SDS-PAGE ile analizi	89
Şekil 3.18.	Deneme 4 ile saflaştırılmış <i>PvLDH</i> proteininin SDS-PAGE ile analizi	91
Şekil 3.19.	Deneme 5 ile saflaştırılmış <i>PvLDH</i> proteininin SDS-PAGE ile analizi	92
Şekil 3.20.	Deneme 6 ile saflaştırılmış <i>PvLDH</i> proteininin SDS-PAGE ile analizi	94
Şekil 3.21.	Protokol 2 ile saflaştırılmış <i>PvLDH</i> proteininin SDS-PAGE ile analizi	95
Şekil 3.22.	<i>PvLDH</i> 'ın Steady-State kinetik davranışı	98

Şekil 3.23.	Protokol 2 ile saflaştırılmış PvLM1Tg1 proteininin SDS-PAGE ile analizi	100
Şekil 3.24.	Protokol 2 ile saflaştırılmış PvLM2Tg1 proteininin SDS-PAGE ile analizi	101
Şekil 3.25.	PvLM1Tg1'in Steady-State kinetik davranışı	103
Şekil 3.26.	PvLM2Tg1'in Steady-State kinetik davranışı	104
Şekil 3.27.	<i>PvLDH</i> 'ın aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun <i>EtLDH</i> 'dakine benzetilmesi	106
Şekil 3.28.	Koloni PCR sonrası pozitif sonuçların jelde görüntülenmesi	107
Şekil 3.29.	PvLM1Et geninin 5'→3' zincirinin ve 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu	108
Şekil 3.30.	PvLM2Et geninin 5'→3' zincirinin ve 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu	108
Şekil 3.31.	PvLM1Et genini içeren 3 saatlik-bir gecelik <i>E. coli</i> JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili	109
Şekil 3.32.	PvLM2Et genini içeren 3 saatlik-bir gecelik <i>E. coli</i> JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili	109
Şekil 3.33.	PvLM1Et genini içeren <i>E. coli</i> JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının protein profillerinin ayrı ayrı gösterilmesi	110
Şekil 3.34.	PvLM2Et genini içeren <i>E. coli</i> JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının protein profillerinin ayrı ayrı gösterilmesi	111
Şekil 3.35.	PvLM1Et ve PvLM2Et proteinlerinin Western blot ile gösterilmesi	111
Şekil 3.36.	Protokol 2 ile saflaştırılmış PvLM1Et proteininin SDS-PAGE ile analizi	114
Şekil 3.37.	Protokol 2 ile saflaştırılmış PvLM2Et proteininin SDS-PAGE ile analizi	114
Şekil 3.38.	PvLM1Et'nin Steady-State kinetik davranışı	116
Şekil 3.39.	PvLM2Et'nin Steady-State kinetik davranışı	117
Şekil 3.40.	<i>PvLDH</i> 'ın aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun <i>TpLDH</i> 'dakine benzetilmesi	119
Şekil 3.41.	PvLM1Tp ve PvLM2Tp genlerinin tam uzunluğunun elde edilmesi	120

Şekil 3.42.	PvLM1Tp ve PvLM2Tp genlerinin ve pKK223-3 vektörünün restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi sonrası jelde görüntülenmesi	120
Şekil 3.43.	Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş PvLM1Tp ve PvLM2Tp genlerinin ve pKK223-3 vektörünün yaklaşık konsantrasyonlarının ölçülmesi için jelde görüntülenmesi	121
Şekil 3.44.	Koloni PCR sonrası pozitif ve negatif sonuçların jelde görüntülenmesi	122
Şekil 3.45.	PvLM1Tp geninin 5'→3' zincirinin ve 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu	123
Şekil 3.46.	PvLM2Tp geninin 5'→3' zincirinin ve 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu	123
Şekil 3.47.	PvLM1Tp genini içeren 3 saatlik-bir gecelik <i>E. coli</i> JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili	124
Şekil 3.48.	PvLM2Tp genini içeren 3 saatlik-bir gecelik <i>E. coli</i> JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili	124
Şekil 3.49.	PvLM1Tp genini içeren <i>E. coli</i> JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının protein profillerinin ayrı ayrı gösterilmesi	125
Şekil 3.50.	PvLM2Tp genini içeren <i>E. coli</i> JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının protein profillerinin ayrı ayrı gösterilmesi	125
Şekil 3.51.	PvLM1Tp ve PvLM2Tp proteinlerinin Western blot ile gösterilmesi ...	126
Şekil 3.52.	Protokol 2 ile saflaştırılmış PvLM1Tp proteininin SDS-PAGE ile analizi	128
Şekil 3.53.	Protokol 2 ile saflaştırılmış PvLM2Tp proteininin SDS-PAGE ile analizi	129
Şekil 3.54.	PvLM1Tp'nin Steady-State kinetik davranışı	130
Şekil 3.55.	PvLM2Tp'nin Steady-State kinetik davranışı	132
Şekil 3.56.	PvLDH'nin kofaktör bağlanma bölgesindeki Leu ₁₆₃ aminoasidinin model Apikompleksanlardaki Met ₁₆₃ aminoasidi ile değiştirilmesi	134
Şekil 3.57.	PvL163M geninin A ve B fragmentlerinin yaklaşık konsantrasyonlarının ölçülmesi için jelde görüntülenmesi	135
Şekil 3.58.	Koloni PCR sonrası pozitif ve negatif sonuçların jelde görüntülenmesi	136

Şekil 3.59.	PvL163M geninin 5'→3' zincirinin ve 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu	136
Şekil 3.60.	PvL163M genini içeren 3 saatlik-bir gecelik <i>E. coli</i> JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili	137
Şekil 3.61.	PvL163M genini içeren <i>E. coli</i> JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının protein profillerinin ayrı ayrı gösterilmesi	138
Şekil 3.62.	PvL163M proteininin Western blot ile gösterilmesi	138
Şekil 3.63.	Protokol 2 ile saflaştırılmış PvL163M proteininin SDS-PAGE ile analizi	140
Şekil 3.64.	PvL163M'in Steady-State kinetik davranışı	141
Şekil 3.65.	PvLDH'nin kofaktör bağlanma bölgesindeki Leu ₁₆₃ aminoasidinin insan LDH'ndaki Ser ₁₆₃ aminoasidi ile değiştirilmesi	142
Şekil 3.66.	PvL163S geninin tam uzunluğunun kristal viyole ile boyalı % 1'lik agaroz jelde görüntülenmesi ve etidyum bromür ile boyalı % 1'lik agaroz jelde görüntülenmesi	143
Şekil 3.67.	PvL163S geninin 5'→3' zincirinin ve 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu	144
Şekil 3.68.	PvL163S genini içeren 3 saatlik-bir gecelik <i>E. coli</i> JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili	145
Şekil 3.69.	PvL163S genini içeren <i>E. coli</i> JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının protein profillerinin ayrı ayrı gösterilmesi	145
Şekil 3.70.	İndüklenmiş PvL163S genini içeren bir gecelik <i>E. coli</i> JM105 hücrelerinin pelet fazındaki PvL163S proteininin Western blot ile gösterilmesi	146
Şekil 4.1.	PvLDH mutant proteinlerinin 1 mM pirüvat konsantrasyonundaki aktivitelerinin gösterilmesi	152
Şekil 4.2.	PvLDH mutant proteinlerinin 10 mM pirüvat konsantrasyonundaki aktivitelerinin gösterilmesi	153
Şekil 4.3.	Saflaştırılmış PvLDH ve mutant proteinlerin saflaştırma fraksiyonlarının aktivite değerlerinin gösterilmesi	154

TABLOLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1.1. Günümüzde kullanılan mevcut antimalarialar	4
Tablo 1.2. Plazmodiyal LDH (<i>Pf</i> LDH, <i>Pv</i> LDH, <i>Pl</i> LDH, <i>Pm</i> LDH), <i>Toxoplasma gondii</i> LDH1 ve LDH2 ve insan LDH'lerinin (LDH-M ve LDH-H) substrat özgüllüklerinin karşılaştırılması	26
Tablo 1.3. Plazmodiyal LDH (<i>Pf</i> LDH, <i>Pv</i> LDH, <i>Pl</i> LDH, <i>Pm</i> LDH), <i>Toxoplasma gondii</i> LDH1 ve LDH2 ve insan LDH'lerinin (LDH-M ve LDH-H) kofaktör özgüllüklerinin karşılaştırılması	28
Tablo 2.1. <i>Pv</i> LDH geninin üzerinde yapılan yönlendirilmiş mutagenizler için kullanılan primer çiftleri	49
Tablo 3.1. İnsan LDH'nin kas (İnsan-m) ve kalp (İnsan-h) izomerleri, <i>P. vivax</i> (<i>Pv</i> LDH) ve model Apikompleksanlar <i>Toxoplasma gondii</i> (<i>Tg</i> 1LDH), <i>Eimeria tenella</i> (<i>Et</i> LDH) ve <i>Theileria parva</i> (<i>Tp</i> LDH)'nın laktat dehidrogenaz enzimlerinin aminoasit düzeyinde yüzde benzerlikleri ...	63
Tablo 3.2. <i>P. vivax</i> ve diğer Apikompleksanların LDH enzimlerinin aktif bölge halkasındaki aminoasitlerin yüzde benzerlikleri	65
Tablo 3.3. <i>Pv</i> LM1 <i>Tg</i> 1 proteininin aktivitesinin ölçülmesi	83
Tablo 3.4. <i>Pv</i> LM2 <i>Tg</i> 1 proteininin aktivitesinin ölçülmesi	84
Tablo 3.5. <i>Pv</i> LDH'nin Deneme 1 ile saflaştırılma protokolü	85
Tablo 3.6. <i>Pv</i> LDH'nin Deneme 2 ile saflaştırılma protokolü	87
Tablo 3.7. <i>Pv</i> LDH'nin Deneme 3 ile saflaştırılma protokolü	89
Tablo 3.8. <i>Pv</i> LDH'nin Deneme 4 ile saflaştırılma protokolü	90
Tablo 3.9. <i>Pv</i> LDH'nin Deneme 5 ile saflaştırılma protokolü	92
Tablo 3.10. <i>Pv</i> LDH'nin Deneme 6 ile saflaştırılma protokolü	93
Tablo 3.11. <i>Pv</i> LDH enziminin aktivitesinin NADH'nin NAD ⁺ 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranının takip edilerek ölçülmesi	97
Tablo 3.12. <i>Pv</i> LDH'nin Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar	97
Tablo 3.13. <i>Pv</i> LDH'nin Steady-State kinetik sabiteleri	98

Tablo 3.14. PvLM1Tg1 enziminin aktivitesinin NADH'ın NAD ⁺ 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranının takip edilerek ölçülmesi	102
Tablo 3.15. PvLM1Tg1'in Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar	102
Tablo 3.16. PvLM1Tg1'in PvLDH ile karşılaştırmalı Steady-State kinetik sabiteleri	103
Tablo 3.17. PvLM2Tg1 enziminin aktivitesinin NADH'ın NAD ⁺ 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranının takip edilerek ölçülmesi	104
Tablo 3.18. PvLM2Tg1'in Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar	105
Tablo 3.19. PvLM2Tg1'in PvLDH ve PvLM1Tg1 ile karşılaştırmalı Steady-State kinetik sabiteleri	105
Tablo 3.20. PvLM1Et proteininin aktivitesinin ölçülmesi	112
Tablo 3.21. PvLM2Et proteininin aktivitesinin ölçülmesi	113
Tablo 3.22. PvLM1Et enziminin aktivitesinin NADH'ın NAD ⁺ 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranının takip edilerek ölçülmesi	115
Tablo 3.23. PvLM1Et'nin Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar	115
Tablo 3.24. PvLM1Et'nin PvLDH ile karşılaştırmalı Steady-State kinetik sabiteleri	116
Tablo 3.25. PvLM2Et enziminin aktivitesinin NADH'ın NAD ⁺ 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranının takip edilerek ölçülmesi	117
Tablo 3.26. PvLM2Et'nin Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar	118
Tablo 3.27. PvLM2Et'nin PvLDH ve PvLM1Et ile karşılaştırmalı Steady-State kinetik sabiteleri	118
Tablo 3.28. PvLM1Tp proteininin aktivitesinin ölçülmesi	127
Tablo 3.29. PvLM2Tp proteininin aktivitesinin ölçülmesi	127

Tablo 3.30. PvLM1Tp enziminin aktivitesinin NADH'ın NAD ⁺ 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranının takip edilerek ölçülmesi	130
Tablo 3.31. PvLM1Tp'nin Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar	131
Tablo 3.32. PvLM1Tp'nin <i>PvLDH</i> ile karşılaştırmalı Steady-State kinetik sabiteleri	131
Tablo 3.33. PvLM2Tp enziminin aktivitesinin NADH'ın NAD ⁺ 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranının takip edilerek ölçülmesi	131
Tablo 3.34. PvLM2Tp'nin Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar	132
Tablo 3.35. PvLM2Tp'nin <i>PvLDH</i> ve PvLM1Tp ile karşılaştırmalı Steady-State kinetik sabiteleri	133
Tablo 3.36. PvL163M proteininin aktivitesinin ölçülmesi	139
Tablo 3.37. PvL163M enziminin aktivitesinin NADH'ın NAD ⁺ 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranının takip edilerek ölçülmesi	140
Tablo 3.38. PvL163M'in Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar	141
Tablo 3.39. PvL163M'in <i>PvLDH</i> ile karşılaştırmalı Steady-State kinetik sabiteleri	142
Tablo 3.40. PvL163S proteininin aktivitesinin ölçülmesi	147
Tablo 4.1. <i>PvLDH</i> 'ın aktif bölge halkasının ve kofaktör bağlanma bölgesinin yapısal değişikliğe olan tolerans durumu	151
Tablo 4.2. <i>PvLDH</i> 'ın aktif bölge halkası mutagenезlerinin Steady-State kinetik sabiteleri	156
Tablo 4.3. <i>PvLDH</i> 'ın kofaktör bağlanma bölgesi mutagenезlerinin Steady-State kinetik sabiteleri	158

KISALTMALAR ve SİMGELER

A	: Absorbans
aa	: Aminoasit
A/Ala	: Alanin
AIDS	: Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu
APAD⁺	: 3-asetilpiridin adenin dinükleotit
APADH	: 3-asetilpiridin adenin dinükleotidin indirgenmiş formu
ATP	: Adenozin trifosfat
bp	: Baz çifti
C/Cys	: Sistein
cm	: Santimetre
CV	: Kristal viyole
D/Asp	: Aspartik asit-Aspartat
Da	: Dalton
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidin
dH₂O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotidtrifosfat
E/Glu	: Glutamik asit-Glutamat
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Ethilendiamintetraasetik asit
eH₂O	: Elgastat H ₂ O
EtBr	: Etidyum bromür
<i>E. tenella</i>	: <i>Eimeria tenella</i>
EtLDH	: <i>Eimeria tenella</i> laktat dehidrogenaz
F/Phe	: Fenilalanin
g	: Gram
G/Gly	: Glisin
H/His	: Histidin
I/Ile	: İzolösin
IPTG	: Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside

K/Lys	: Lysin
kb	: Kilobaz
k_{cat}	: Katalizleme kinetiği-Geri dönüşüm sabiti
k_{cat}/K_m	: Katalitik verimlilik-Özgüllük sabiti
kDa	: Kilodalton
K_i	: İnhibisyon sabiti
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
l	: Litre
L/Leu	: Lösin
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LMW	: Low Molecular Weight-Düşük moleküler ağırlık
M	: Molar
M/Met	: Methionin
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MW	: Molecular Weight-Moleküler ağırlık
N/Asn	: Asparajin
NAD⁺	: Nikotiamid adenin dinükleotid
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotidin indirgenmiş formu
ng	: Nanogram
Ni-NTA	: Nikel-nitrilotriasetikasit
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
P/Pro	: Prolin
PBS	: Phosphate Buffered Saline-Fosfat tamponlu tuz
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pLDH	: Plazmodiyal laktat dehidrogenaz
<i>P. falciparum</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Pf</i>LDH	: <i>Plasmodium falciparum</i> laktat dehidrogenaz
<i>Pfu</i> DNA Polimeaz	: <i>Pyrococcus furiosus</i> DNA Polimeraz

<i>P. knowlesi</i>	: <i>Plasmodium knowlesi</i>
PkLDH	: <i>Plasmodium knowlesi</i> laktat dehidrogenaz
<i>P. malariae</i>	: <i>Plasmodium malariae</i>
PmLDH	: <i>Plasmodium malariae</i> laktat dehidrogenaz
pmol	: Pikomol
<i>P. ovale</i>	: <i>Plasmodium ovale</i>
PoLDH	: <i>Plasmodium ovale</i> laktat dehidrogenaz
<i>P. vivax</i>	: <i>Plasmodium vivax</i>
PvLDH	: <i>Plasmodium vivax</i> laktat dehidrogenaz
Q/Gln	: Glutamin
R/Arg	: Arjinin
RCF	: Relative centrifugal force-Rölatif santrifüj gücü
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Revolutions per minute-Rotorun dakikadaki dönme hızı
S/Ser	: Serin
SAB	: Sample Application Buffer-Örnek uygulama tamponu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi
T/Thr	: Treonin
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
Taq DNA Polimeaz	: <i>Thermus aquaticus</i> DNA Polimeraz
TEA	: Trietanolamin
TEMED	: NNN'N'-Tetramethilenethilendiamin
<i>T. gondii</i>	: <i>Toxoplasma gondii</i>
Tg1LDH	: <i>Toxoplasma gondii</i> laktat dehidrogenaz 1 izoenzimi
Tg2LDH	: <i>Toxoplasma gondii</i> laktat dehidrogenaz 2 izoenzimi
<i>T. parva</i>	: <i>Theileria parva</i>
TpLDH	: <i>Theileria parva</i> laktat dehidrogenaz
u	: Ünite
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
V/Val	: Valin
V_{max}	: Maksimum hız

W/Trp	: Triptofan
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
Y/Tyr	: Tirozin
Å	: Angstrom
°C	: Santigrat derece
□	: Ekstinksiyon katsayısı
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar

1. GİRİŞ

Sıtmayı ortadan kaldırmak için yüzyıldan daha fazla bir süre çaba harcanmış olmasına rağmen, hastalık dünyanın tropikal ve subtropikal ülkelerinin halk sağlığını ve ekonomik gelişmesini tehdit eden asıl ve büyüyen bir faktör olmaya devam etmektedir [1, 2]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre sıtma, AIDS ve tüberküloz ile birlikte dünyanın en önemli enfeksiyon hastalıklarından biridir [2, 3]. Dünya popülasyonunun yaklaşık olarak yarısı, sıtmanın bulaştırıldığı bölgelerde yaşamaktadır. Her yıl yaklaşık 250 milyon sıtma vak'ası görülmekte ve 1 milyon civarında ölümün gerçekleştiği tahmin edilmektedir [3].

Sıtma, enfekte dişi anofel sivrisineklerinin kan emerken taşıdıkları sporozoitleri konak canlıya transfer etmesi ile bulaşan bir enfeksiyon hastalığıdır. Hastalığa Apikompleksa şubesine ait olan *Plasmodium* türleri sebep olmaktadır [4].

Plasmodium türleri insandan başka maymun, kemirgen, yaras ve diğer memeliler, kuşlar ve sürüngenlerde de enfeksiyona sebep olabilir. İnsanda sıtmaya sebep olan türler; *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* ve *P. malariae*'dir. Son zamanlarda maymun sıtma paraziti *P. knowlesi* insanlarda da tespit edilmiş olup, insanı enfekte eden beşinci tür olarak gösterilmektedir [5, 6].

P. falciparum diğer türlere göre çok daha ciddi ve ilerleyen bir hastalığa neden olup, çoğunlukla hastanın komaya girmesine ve birkaç gün içinde ölümüne yol açar. Dünyadaki ve Türkiye'deki en yaygın tür olan *P. vivax* ise ağır hastalığa sebep olmakla beraber nadiren öldürücüdür. *P. ovale* yalnızca Batı Afrika'da görülür ve bu tür ile enfekte kişilerde hastalık hafif seyreder. *P. malariae*'nin olgusuna pek rastlanılmamaktadır ve bu tür ile enfekte kişilerde ateş nöbetleri görülmekle beraber yaşamı tehdit etmez [7, 8]. Bunun nedeni parazitin anofellerdeki evrimini uzun sürede gerçekleştirmesi nedeni ile sporogoni tamamlanamadan anofellerin yaşamlarını yitirmeleridir [9]. *P. knowlesi*'nin ise insan sağlığı için ciddi bir tehdit olduğu ve ölüme neden olabileceği düşünülmektedir [5, 6].

Savaş, iç karışıklık, çevresel değişiklikler, iklim değişiklikleri, seyahatler ve popülasyon artışı sıtmanın yayılmasını etkileyen faktörlerdir [10]. Özellikle *Plasmodium*'ların antimalariallara karşı, anofel sivrisineklerin ise insektisitlere karşı direnç kazanmaları ve sıtmaya karşı etkili olabilecek koruyucu bir aşının henüz bulunamamış olması [3, 11] sıtma ile mücadeleyi daha da karmaşık hale getirmektedir. *Plasmodium*'ların bilinen antimalariallara karşı direnç kazanmış olması uzun ömürlü, ucuz ve güvenle

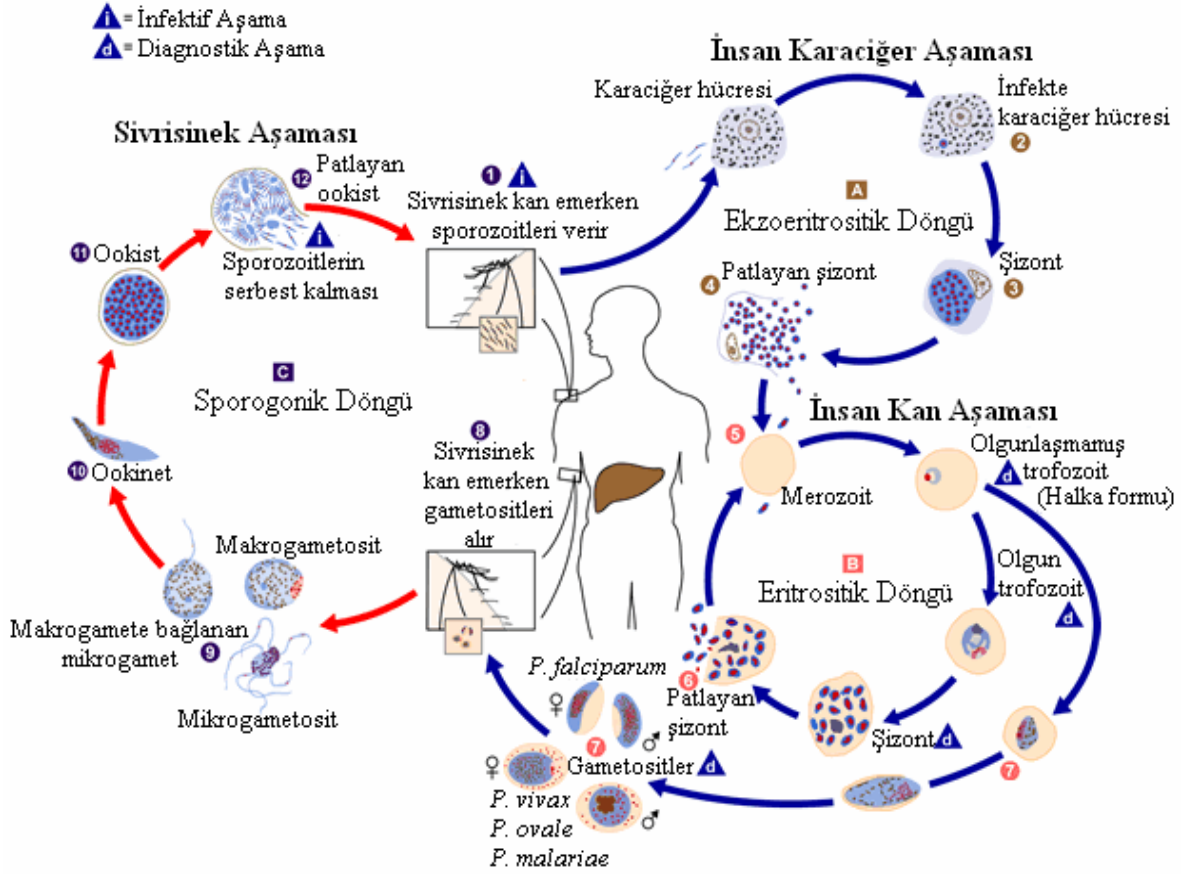
kullanılabilecek yeni ilaçların geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Bu amaçla Türkiye’deki en yaygın tür olan *P. vivax*’ın laktat dehidrogenaz enzimi (PvLDH) hedef enzim olarak seçilmiştir. Bu enzim, glikoliz reaksiyonunun son enzimi olup *Plasmodium*’un yaşam döngüsü için gereklidir [12]. Yapılan çalışmalar bu enzimin aktivitesinin engellenmesinin parazitin yaşamının sonlandırılmasını sağladığını göstermektedir [13, 14]. Ancak aynı enzim hem insanda hem de parazitte bulunduğu için insan LDH’nin etkilenmeden kalması gerekmektedir. Yapılan çalışmalar, plazmodiyal LDH’nin insandaki eşdeğeri olan LDH’dan elektroforetik, kinetik ve yapısal olarak farklı olduğunu göstermektedir [12, 13, 15-19].

Bu tez çalışmasında, *Plasmodium*’ların insan LDH’ından farklı olan yapısal ve kinetik özellikleri dikkate alınarak, bu özelliklerde kritik rol oynadığı bilinen *Plasmodium vivax* LDH’nin aktif bölge ve kofaktör bağlanma bölgesindeki önemli bazı aminoasitlerin sıtmaya karşı etkin olacak yeni ilaç tasarım çalışmalarına sağlayacağı katkının test edilmesi ve bu aminoasitlerin proteine kazandırdığı özelliklerin araştırılması için diğer Apikompleksanlar olan *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella* ve *Theileria parva*’nın LDH enzimleri model alınarak PvLDH enziminin analizinin yapılması amaçlanmıştır.

1.1. *Plasmodium*’ların Yaşam Döngüsü

Plasmodium, Apikompleksa şubesi; Sporozoa sınıfı; Coccidia alt sınıfı; Haemosporida takımı; Plasmodiidae üyesi olup yaşam döngüsü infekte dişi anofel sivrisineği tarafından konağa verilen sporozoitlerin kana geçmesi ile başlar (Şekil 1.1.). Kandaki sporozoitler, karaciğer parankim hücrelerine girerler ve şizontları oluştururlar. Ekzoeritrositik şizogoni adı verilen bu dönemde şizontlar hızla bölünerek merozoitleri oluştururlar. Karaciğer parankim hücrelerini parçalayan merozoitler kana geçerler. Böylece eritrositik şizogoni dönemi başlar. Eritrositlere giren merozoitler trofozoit halini alırlar. Trofozoitler genç şizontlara dönüşürler. Daha sonra olgun şizontlar oluşur ve merozoitlere bölünür. Eritrositlerin parçalanmasıyla merozoitler serbest kalır. Merozoitler eritrositlere girerek yeni eritrositik şizogoni dönemini başlatırlar. Bu döngü 2–3 defa devam eder. Hastalık ilerledikçe eritrositlerin içine giren bazı merozoitler gametositleri oluştururlar. Konak tarafından yeni bir dişi anofel sivrisineğine verilen gametositler (mikrogametosit ve makrogametosit) sivrisineğin midesinde hızla gametlere dönüşürler. Mikrogametinin makrogamete bağlanmasıyla döllenme başlar ve zigot oluşur. Zigot daha sonra fusiform şeklindeki ookinet yapısını oluşturur. Sivrisineğin mide epitel duvarına bağlanan ookinet

olgunlaşarak ookisti oluşturur. Olgunlaşan ookist binlerce sporozoiti oluşturur. Sporozoitler yeni konaklara verilmek üzere sivrisineğin tükrük bezine yerleşirler [20].



Şekil 1.1. Plasmodium'ların yaşam döngüsü [21].

1.2. Antimalariallar

Sıtmanın tedavisinde kullanılacak ideal bir ilaç, parazitin tüm yaşam evrelerine etki edebilmeli ve özellikle sağlık hizmetlerinin yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde kullanılabilmesi için tek dozda etkili olmalıdır [8, 22]. Henüz böyle bir ilaç geliştirilememiş olup [23] günümüzde kullanılan ilaçların büyük bir kısmı sıtma parazitlerinin farklı yaşam evrelerini hedeflemektedir [23, 24].

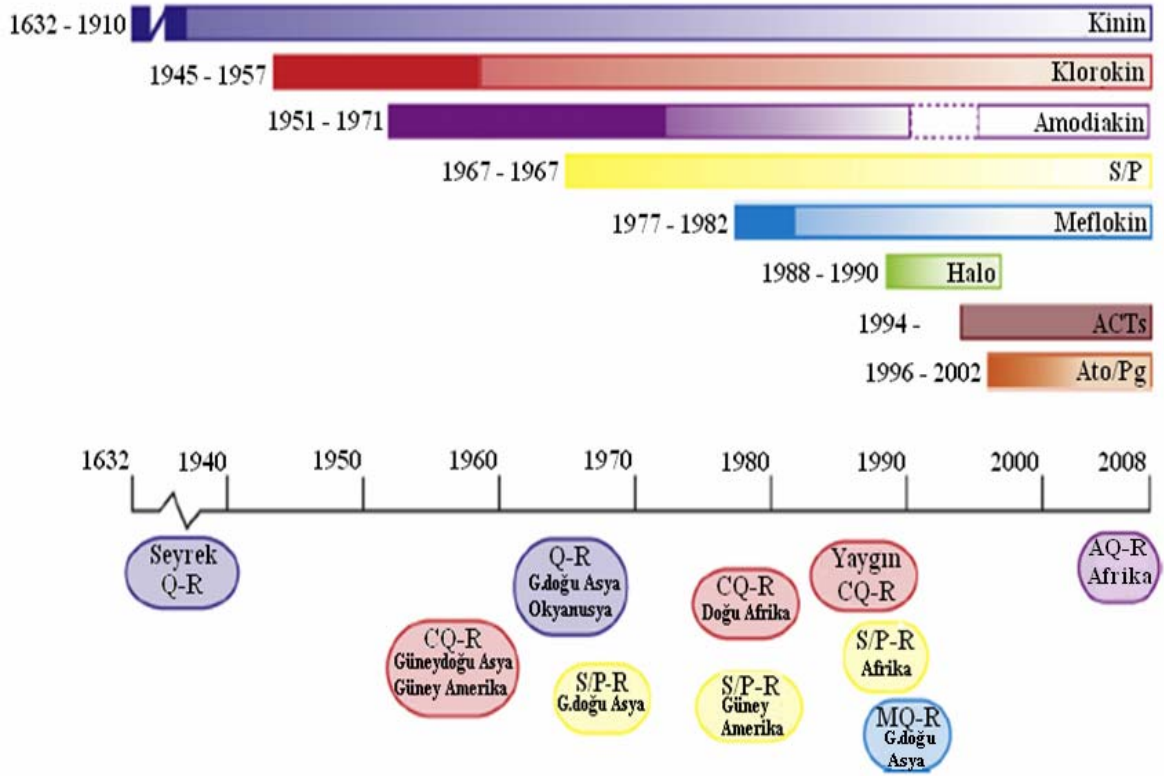
Mevcut ilaçların etki ve direnç mekanizmalarının anlaşılması onların doğru kullanılmasına ve orjinal hedeflerle yeni tedavi edici ilaçların bulunmasına imkân sağlamaktadır [25]. Günümüzde sıtmanın tedavisinde kullanılan antimalarial ilaçlar ve etki mekanizmaları Tablo 1.1.'de özetlenmiştir:

Tablo 1.1. Günümüzde kullanılan mevcut antimalarialar. DHPS: Dihidropteroat sentaz; PABA: P-aminobenzoik asit; DHF: Dihidrofolat; THF: Tetrahidrofolat; DHFR: Dihidrofolat redüktaz; DHODaz: Dihidropteroat dehidrogenaz [23, 25].

Antimalarial	Yolak	Hedef	Etki Mekanizması	Seçicilik
Tip-1 Antifolatlar: Sülfonlar, sülfonamidler	Nükleik asit metabolizması	DHPS tarafından katalizlenen PABA+pteridin'den dihidropteroat oluşumu	PABA'yı taklit eder: DHPS'nin aktif bölgesi için yarışır	Parazit, sentezler veya folat prekürsörlerinden alırken; memeli, de novo sentezleyemez ve diyet ile alması gerekir
Tip-2 Antifolatlar: Primethamin, biguanidler (Proguanil)	Nükleik asit metabolizması	DHF ve THF'nin (timidilat, pürin nükleotidleri ve belirli aminoasitlerin kofaktörü) DHFR tarafından NADPH bağlı redüksiyonu	DHF'yi taklit eder: DHFR'nin aktif bölgesi için yarışır	Parazit, sentezler veya folat prekürsörlerinden alırken; memeli, de novo sentezleyemez ve diyet ile alması gerekir
Naftokinonlar (Atovakon)	Nükleik asit metabolizması	Mitokondriyal fonksiyonlar (Elektron taşıma zinciri), Pirimidin sentezinin engellenmesi	DHODaz'ı inhibe eder; ubikinonu (Koenzim Q) taklit eder: Kompleks III için yarışır	Parazit enzimi için farklı bağlanma özelliği
Tip-1 Kinolinler: Klorokin, amodiakin	Heme detoksifikasyonu	Heme kristalizasyonu	Hemozoin oluşumunun engellenmesi/sonlandırılması	Parazite özgü mekanizma
Tip-2 Kinolinler: Kinin, kinidin, meflokin, halofantrin	Heme detoksifikasyonu	Heme kristalizasyonu	Hemozoin oluşumunun engellenmesi/sonlandırılması	Parazite özgü mekanizma
Artemisinin ve türevleri: Artesunat, artemether, arteether, dihidroartemisinin	Oksidatif stres ?	Bilinmeyen hedeflerin alkilasyonu ? Hidroksilasyon ?	Ferrus protoporfirin IX ile bağlanarak peroksidin aktivasyonu boyunca serbest radikal oluşumu	Parazite özgü ortam (Fe ⁺² , besin vakuolu)

İlaç direncinin, sıtma kontrolü için önemli bir engel olduğu tanımlanmıştır. Tek bir ilaca direnç genellikle fizyolojik adaptasyon veya spontan gen mutasyonları gibi çeşitli mekanizmalardan dolayı görülür [26]. İlaç direnci ile ilgili genlerin belirlenmesi, direncin nasıl ortaya çıktığının bilinmesi ve direnç mekanizmasının anlaşılması açısından önemlidir [25, 26]. Ancak sıtma parazitinin moleküler biyolojisi ve biyokimyası ile ilgili önemli ilerlemeler olmasına rağmen yaygın olarak kullanılan ilaçlara direnci bilinen sadece birkaç gen belirlenmiştir [23, 26].

Sıtma parazitlerinin mevcut ilaçlara direnç kazanması dünyanın birçok yerindeki önemli bir sağlık problemidir [3, 8]. Şekil 1.2.'de bu ilaçların direnç durumları gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Mevcut antimalariallara karşı ortaya çıkan direncin gösterilmesi. Her renkli çubuk bir antimalarial monoterapisini veya kombinasyonunu temsil etmektedir. Her çubuğun sağındaki yıllar antimalarialın bulunduğu ve direncin ilk rapor edildiği tarihleri göstermektedir. Zaman çizgisi altındaki oval kutular farklı coğrafik bölgelere yayılan direncin yaklaşık periyotlarını göstermektedir. S/P: Sülfadoksin/Primethamin; Halo: Halofantrin; ACTs: Artemisine dayalı kombinasyon terapileri; Ato/Pg: Atovakon/Proguanil; Q: Kinin; CQ: Klorokin; MQ: Meflokin; AQ: Amodiakin; R: Direnç [23].

Kinin, klorokin ve sülfadoksin/primethamin ilaçlarına direnç rapor edilmesine rağmen etkileri devam etmektedir [23, 27]. Halofantrinin yan etkilerinden dolayı 1998'den itibaren kullanımı sınırlandırılmıştır. Amodiakin, ciddi yan etkilerinden dolayı 1990'da uygun antimalariallar listesinden çıkarılmıştır. Fakat bu ilacın faydaları, risklerine göre daha fazla olduğundan 1996'da yeniden listeye alınmıştır [23]. Artemisinin, tek başına kullanıldığı zaman *in vivo* olarak yarılanma ömrünün kısa olmasından dolayı düşük tedavi oranı göstermiştir. 1994'den itibaren artemisinin ve türevleri kombinasyon terapilerinde kullanılmıştır [23, 28]. Diğer antimalariallara rağmen şimdiye kadar artemisinin hiçbir klinik direnci rapor edilmemiştir [23, 29, 30]. Ancak deneysel olarak artemisine dirençli laboratuvar modelleri oluşturulması [31, 32] parazitin direnç kazanma riskini

göstermektedir [33]. Dolayısıyla sıtma ile mücadelede mevcut antimalariaların etkinliğini zamanla kaybetmesi, yeni antimalariaların geliştirilmesini gerekli kılmıştır.

1.3. Tez Çalışmasının Model Apikompleksan Organizmaları

1.3.1. *Toxoplasma gondii* ve Toxoplasmosis

Toxoplasma gondii, Apikompleksa şubesi; Sporozoa sınıfı; Coccidia alt sınıfı; Eucoccidiida takımı; Sarcocystidae ailesi ve *Toxoplasma* cinsinin tek türü olup [34] insan dahil memelilerden kuşlara kadar çok sayıda canlı türünün infeksiyonuna sebep olan zorunlu hücre içi bir protozoondur [35]. *Toxoplasma* infeksiyonu toxoplasmosis, dünyada ve ülkemizde yaygın ve sık rastlanan bir infeksiyon olup, dünya nüfusunun üçte birinin *T. gondii* ile infekte olduğu bildirilmektedir [36, 37]. Zoonoz karakterinden dolayı insanlar için taşıdığı önemin yanı sıra, hayvancılık sektöründe de ekonomik yönden büyük önem taşımaktadır [38]. Bununla birlikte toxoplasmosisin günümüzde etkin bir tedavisi bulunmamaktadır [37, 39].

T. gondii'nin yaşam döngüsünde birbirlerine göre önemli morfolojik farklılıkları olan takizoit, bradizoit (doku kistlerinde) ve sporozoit (ookistlerde) formları bulunmaktadır [40]. *T. gondii*'yi diğer protozoonlardan ayıran özellik sahip olduğu üç formun da hem son konak kediler, hem de ara konak olan insan ve diğer memeliler, kuşlar ve kemirgenler için infektif olmasıdır. Parazitin infektif formlarından birinin ara konak veya son konak tarafından alınması sonucu infeksiyon oluşmaktadır. Etkenler ara konakların çekirdeksiz hücreleri hariç tüm organ ve doku hücrelerinde çoğalmaktadırlar [36]. İnsan ve diğer ara konaklarda parazit hızlı bölünen takizoit formu ve yavaş çoğalan bradizoit formu olmak üzere iki aseksüel form oluşturmaktadır. Akut toxoplasmosis, takizoitlerin varlığı ile karakterize edilirken, takizoitler bradizoitlere farklılaştığı zaman infeksiyon kronik olmaktadır [41]. Doku kistleri içindeki bradizoitler konağın immün cevabından korunmaktadır. İmmün sistemin baskılandığı AIDS ve kanser hastalarında ve organ transplantasyonu gerçekleştirilen insanlarda bradizoitler tekrar takizoitlere farklılaşarak hastalığın ağır seyrine ve ölüme neden olmaktadır [42, 43]. Ayrıca hamilelik esnasında toxoplasmosis anneden fetusa transplasental yolla geçerek ölü ve düşük doğumlara ya da yeni doğanda çeşitli anomalilere sebep olmaktadır [36, 37, 41].

1.3.2. *Eimeria tenella* ve Koksidiyosis

Koksidiyosis, özellikle kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde en sık karşılaşılan ve ciddi ekonomik kayıplara yol açan protozoal bir hastalık olup aynı zamanda kanlı ishal olarak da tanımlanmaktadır [44]. Hastalık etmeni, Apikompleksa şubesi; Sporozoa sınıfı; Coccidia alt sınıfı; Eucoccidiida takımı; Eimeriidae ailesi ve *Eimeria* cinsi üyeleridir. *Eimeria tenella* bu cinsin şiddetli lezyonlara yol açan türlerinden biridir [45].

Koksidiyosis, sadece hayvan sağlığı için bir tehdit olmayıp, aynı zamanda kümes hayvanları ve diğer hayvanların endüstriyel üretiminde de önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Mevcut antikoksidiyaller ile etkin tedavinin zor olması, bu ilaçların kullanımındaki artan düzenlemeler ve yasaklar ve aynı zamanda artan direnç yeni ilaçların geliştirilmesini gerekli kılmaktadır [45, 46].

Eimeria'nın yaşam döngüsü seksüel ve aseksüel aşamaları içermektedir. Konak tarafından alınan sporozoit, bağırsak epitel hücrelerine girdikten sonra hücre içinde büyümeye başlar. Etmen, bağırsak epitel hücreleri içerisinde çoğaldığından mukozaya tahrip olur ve kanama oluşur. Parazitin şizogoni ve gametogoni aşamalarından sonra oluşan oosit, hücreyi terk ederek konağın bağırsak boşluğuna düşer ve oradan dışkı ile dışarı çıkar. Sıcaklık, rutubet, oksijen etkisi ile oositin içindeki zigot önce mayoz yolla bölünür. Bu çoğalmaya sporogoni adı verilir. Sonuç olarak; sporlanmış oositte sporositler ve bunların içinde sporozoitler oluşur. Sporlanmış oosit, yem ya da su ile başka bir konak hayvan tarafından alındığı zaman sindirim sisteminde sporozoitler serbest hale gelir ve bağırsak epitel hücrelerine girerek enfeksiyonu yeniden başlatır [44].

1.3.3. *Theileria parva* ve Şark Sahili Humması

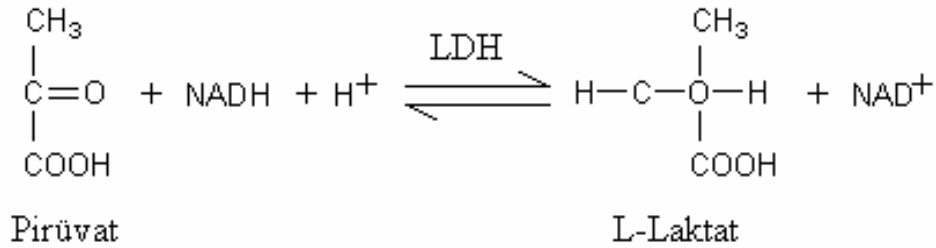
Theileria parva, Apikompleksa şubesi; Sporozoa sınıfı; Piroplasmida takımı; Theileridae ailesi ve *Theileria* cinsi üyesi olup, Şark Sahili Humması (East Coast Fever, ECF) etmenidir. Hastalık, omurgalı konak sığır için ileri derecede patojen olup, önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır [47, 48].

Hastalığın tedavisinde kullanılan antitheileriallar mevcut olup, bu ilaçların bazılarının parazitin belirli formları üzerinde etkili olmaması, ilaç temininin zorluğu ve maliyeti önemli problemler arasındadır [49].

Theileria parva'nın yaşam döngüsü, Ixodidae'ye ait *Rhipicephalus appendiculatus* ile omurgalı konak sığır arasında geçer [50]. İnfekte kene tarafından omurgalı konağa verilen sporozoitler konak lenfositlerine girerek şizontları oluşturur. Lenfosit içindeki parazitin varlığı konak hücrenin transformasyonunu ve proliferasyonunu uyarır [51, 52]. Hastalığın patojenitesi şizont aşaması ile ilgilidir. Şizont, konak hücre ile eş zamanlı bölünerek şizont ile infekte lenfositler bütün dokulara yayılırlar [47, 52]. Şizontların bir kısmı merozoitlere şekillenir. Merozoitler de eritrositlere girerek piroplasm formlarını oluştururlar. İnfekte konaktan kan emen keneler kanla birlikte eritrositler içindeki piroplasmaları da alırlar. Parazit, kene bağırsağında gametogoni ve sonrasında tükürük bezlerinde sporogoni dönemini geçirir ve sporozoitleri meydana getirir [48, 49].

1.4. L-Laktat Dehidrogenaz Enzimi

Laktat dehidrogenaz enzimi (LDH; EC 1.1.1.27: L-Lactate: NAD⁺ oxidoreductase), kofaktör nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺)/ nikotinamid adenin dinükleotidin indirgenmiş formu (NADH) aracılığı ile L-laktatın pirüvata oksidasyonunu veya pirüvatın laktata redüksiyonunu katalizler [53]. Glukoz katabolizması ve glukoneogenezde [54] gerçekleşen bu reaksiyon aşağıda şematize edilmiştir (Şekil 1.3.):



Şekil 1.3. LDH enzimi tarafından L-laktatın pirüvata oksidasyonu/pirüvatın laktata redüksiyonu

Pirüvatın laktata redüksiyonu yönündeki reaksiyon anaerobik glikolizin son basamağı olup bu aşamada üretilen NAD⁺, bu metabolik yolun daha önceki bir aşamasında görevli olan gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonun kofaktörü olarak kullanılır. Dolayısıyla LDH, anaerobik glikolizin hem son basamağını temsil etmesi, hem de sabit bir NAD⁺ kaynağı sağlaması açısından önemli bir enzimdir [55].

LDH, molekül ağırlığı 140.000 dalton olan tetramerik bir yapıya sahiptir. Bu yapı, enzimin fizyolojik şartlar altında daha kararlı olmasını sağlamakta olup, tetramer yapının her altbirimi birbirinden katalitik olarak bağımsızdır [56].

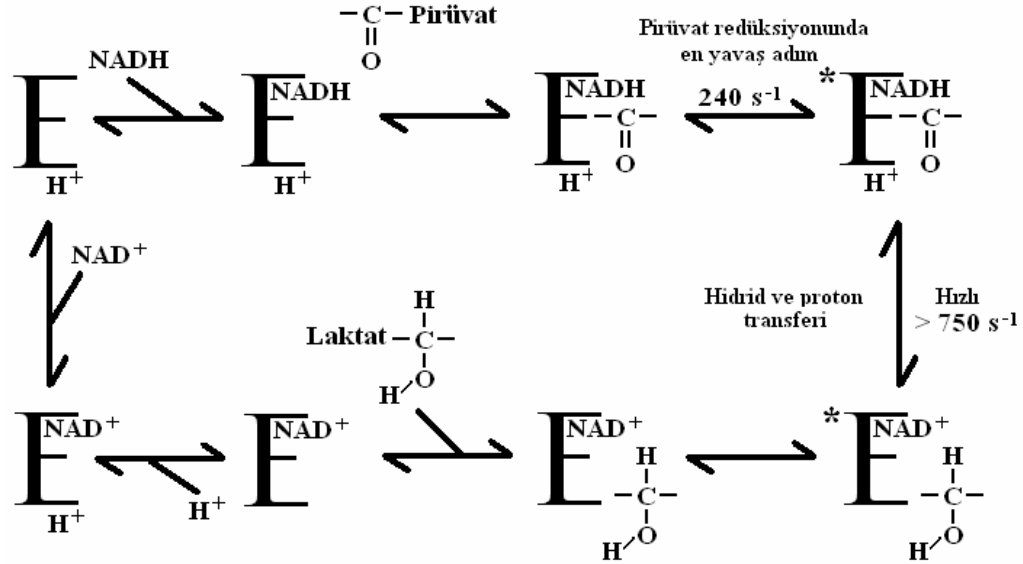
Yüksek organizmalarda LDH enzimi sırasıyla A, B ve C genleri tarafından kodlanan yapısal olarak benzer M, H ve X altbirimlerine sahiptir [56]. Bunlardan M ve H altbirimlerinin üç boyutlu yapıları, hibrid tetramer oluşumunu sağlayacak kadar benzerdir [53, 57]. Enzim, bu iki farklı altbirimin farklı konfigürasyonlarda dizilimi neticesinde oluşan 5 izoenzime sahip olup LDH-1 (H_4), LDH-2 (H_3M), LDH-3 (H_2M_2), LDH-4 (HM_3) ve LDH-5 (M_4) formları olarak ifade edilmektedir [57]. Bu izoenzimler kimyasal kompozisyon, kinetik ve immünolojik özellikleri ile birbirinden ayırt edilebilirler [53]. Özellikle H_4 ve M_4 formları farklı kinetik özelliklere sahiptir [57]. H_4 formu kalp gibi aerobik dokularda bol bulunurken, M_4 formu iskelet kası gibi anaerobik dokularda bol bulunur. X_4 formu ise sadece testis ve sperm hücrelerinde bulunur [53]. X altbirimi, M ve H altbirimleri ile *in vivo* şartlarda fonksiyonel bir hibrid oluşturmadığından [53, 58] LDH enziminin X_4 formu somatik hücrelerden etkili bir şekilde ayrılmaktadır [58]. Çeşitli dokuların izoenzim kompozisyonundaki farklılık metabolik ihtiyaçlarından kaynaklanmaktadır [53]. Ayrıca bazı canlılar, LDH enzimi farklı genler tarafından kodlanan E ve F formlarına da sahiptir [53].

1.4.1. Laktat Dehidrogenaz Enziminin Aktif Bölgesi ve Katalitik Mekanizması

LDH enziminin her bir altbirimi; kofaktör tanınmasında ve bağlanmasında görevli bir dinükleotid bağlanma bölgesi ile substrat bağlanması ve katalizlemeden sorumlu katalitik bölge olmak üzere iki domain içerir. Dinükleotid bağlanma bölgesi bazı dehidrogenazlarda yüksek derecede benzerlik gösterirken, katalitik bölge yapısal olarak daha fazla değişkenlik göstermektedir [55, 59]. Laktat dehidrogenazın aktif bölgesi her iki domain tarafından sağlanan aminoasitlerden oluşmakta olup iki domain arasındaki arayüze yerleşmiştir [60-63].

Laktat dehidrogenaz enzimi NADH'nın indirgenmiş nikotinamid grubunun *pro-R* yüzünden pirüvatın C_2 karbonuna bir hidrid iyonunun (H^-) ve aktif bölge aminoasidi His₁₉₅'den pirüvatın karbonil oksijen atomuna bir enzim protonunun (H^+) doğrudan transferini katalizleyerek laktat ve NAD^+ üretilmesini sağlar [64]. Laktat dehidrogenaz

enziminin katalitik döngüsü kinetik olarak belirlenebilen sekiz adımda gerçekleşmekte olup Şekil 1.4.'de şematize edilmiştir.



Şekil 1.4. Laktat dehidrogenaz enziminin katalitik döngüsü. E ve *E enzimin farklı formları olup E inaktif formu ve *E konformasyonel değişim altında olan aktif formu temsil eder [64].

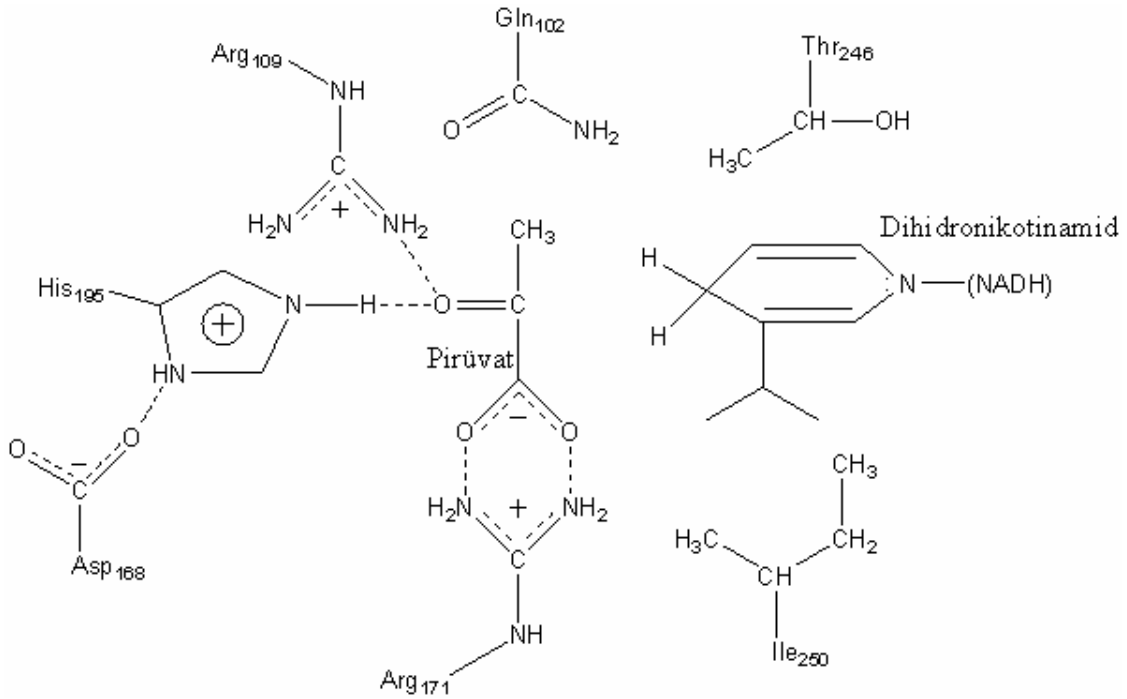
Enzim, substrata (pirüvat veya laktat) sadece kofaktör varlığında bağlanır [55, 57]. Bu yüzden katalitik mekanizma ilk olarak LDH-NADH ikili kompleksin oluşumu ile başlar ve ardından substratın bağlanması ile LDH-NADH-Pirüvat üçlü kompleksi oluşur. Substrat bağlanma cebi proteinin yüzeyinden $\sim 10\ \text{\AA}$ içeriye doğru gömülmüş olarak bulunur [53, 63, 65]. Substrat, enzimin aktif bölgesine yeteri kadar yaklaştığı pozisyona ulaştığı zaman bir dizi olay meydana gelir [66]. Hidrid transferi olmadan önce ortamdaki reaktantları örtmek için aktif bölge halkası (mobile loop, substrate specificity loop) substrat bağlanma cebi üzerine kapanır [67].

Substratın bağlanmasında ve sonrasında katalizlenmesinde rol oynayan aminoasitler (Arg₁₇₁, Arg₁₀₉, Asp₁₆₈, Thr₂₄₆) yapısal [57, 68, 69], kimyasal [70, 71] ve kinetik olarak [72] analiz edilmiştir. His₁₉₅, bir proton alıcısı/vericisi gibi davranır ve aynı zamanda aktif bölge içerisinde substrata yönelir. His₁₉₅'in imidazol grubu protonlanmadıkça LDH'ın enzim-NADH-pirüvat (ya da pirüvat analogu ile enzim-NADH-okamat) kompleksini oluşturamadığı gösterilmiştir. Asp₁₆₈, His₁₉₅'in protonlanmış formunu kararlı hale getirmek için onunla etkileşir [73]. Böylece Asp₁₆₈/His₁₉₅ proton verici çifti hidrid transferini kolaylaştırmak için pirüvatın keton fonksiyonel grubuna bir proton transfer eder [59]. Bu

işlem aynı zamanda Arg₁₀₉ yardımı ile gerçekleşir. Arg₁₀₉, keto-asidin karbonil bağını polarize etmesi için yardım eder ve böylece oksijene proton transferini ve karbona hidrid transferini sağlar [72]. Kristal yapı Arg₁₀₉'dan başka aynı zamanda 171. pozisyonda yer alan Arg aminoasidinin de aktif bölgede yer aldığını göstermiştir. Arg₁₇₁ tarafından sağlanan pozitif yük ile substratın negatif yükü dengelenir [74]. Arg₁₇₁, substratın etkili yönelmesini sağlayarak substrat-karboksilat ile iki noktada güçlü bir etkileşim sağlar [75]. Thr₂₄₆, substrat ayırımından sorumludur. Üç boyutlu yapıda Thr₂₄₆ aminoasidi substratın karboksil grubu ile hidrojen bağı oluşturur [69]. Hidrid transferinin ardından aktif bölge halkası yeniden açılarak laktat ve NAD⁺ serbest kalır [76].

Aktif bölgede yer alan diğer bir aminoasit Gln₁₀₂, Thr₂₄₆ gibi substrat ayırımından sorumludur. Yine Ile₂₅₀ ise Arg₁₇₁-substrat etkileşimini kuvvetlendiren ve NAD⁺'a göre NADH'ı stabilize eden hidrofobik bir ortam sağlar (Şekil 1.5.) [64].

His₁₉₅, Asp₁₆₈, Arg₁₀₉ ve Arg₁₇₁'in bilinen tüm LDH dizilerinde tamamen korunmuş olması bu aminoasitlerin, enzimin fonksiyonunda hayati rolleri olduğunu göstermiştir. Bu aminoasitlerin katalitik mekanizma için önemi yönlendirilmiş mutagenез çalışmaları ile de gösterilmiştir [72, 73, 77, 78].



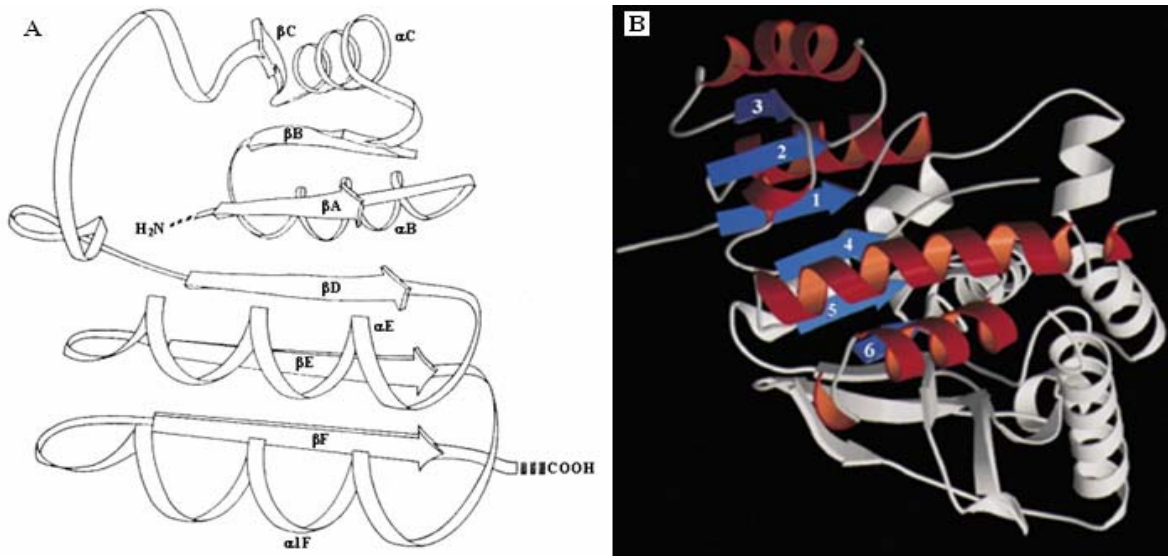
Şekil 1.5. Laktat dehidrogenaz enziminin aktif bölgesinde yer alan aminoasitlerin gösterilmesi [64].

1.4.2. Laktat Dehidrogenaz Enziminin Kofaktör Bağlanma Bölgesi

Nükleotid bağlanma bölgesi, bir kofaktör bağlanma bölgesi olup “Rossmann katı” olarak bilinen dinükleotid bağlanma motifinden oluşur. Bu motifin ilk karakterizasyonu üç boyutlu yapısı çözülmüş laktat dehidrogenaz [79], malat dehidrogenaz [80], alkol dehidrogenaz [81] ve gliseraldehit-3P dehidrogenazın [82] kofaktör bağlanma bölgesindeki yapısal korunumu tanımlayan Michael G. Rossmann tarafından rapor edilmiştir [83, 84]. Bu dört dehidrogenazın yapısal dinükleotid bağlanma motifinin tanımlanmasından sonra birçok dinükleotid bağlanma proteininin üç boyutlu yapısının karakterize edilmesi “Rossmann katı” tanımının genişlemesine neden olmuştur [61, 85, 86].

Kofaktör bağlanma bölgesinin polipeptid zincirleri içerisindeki pozisyonları farklı olup laktat dehidrogenaz enziminde bu bölge 22. ve 164. aminoasitler arasındaki pozisyonda bulunur. Yine kofaktör bağlanma bölgesinin aminoasit sayısı farklı proteinler için değişmekle birlikte laktat dehidrogenaz enzimi için 145 aminoasittir [60].

“Klasik” Rossmann katı, laktat dehidrogenazı içeren proteinler için tanımlanmıştır [61, 87]. Laktat dehidrogenazın kofaktör bağlanma bölgesinde sekonder yapının temel elementleri, bir yüzde toplanmış iki sarmal (α B ve α C) ve diğer yüzde toplanmış üç sarmal (α D, α E, α F) ile altı paralel zincirin (β A, β B, β C, β D, β E, β F) geniş bir katmanını içeren bir çift $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ biriminden oluşur (Şekil 1.6.).



Şekil 1.6. Laktat dehidrogenaz enziminin Rossmann katını gösteren yapısı. **A:** α B, α C, α E, α F sarmalları ve β A, β B, β C, β D, β E, β F paralel zincirlerin gösterilmesi. **B:** Paralel zincirlerin numara ile gösterilmesi [60, 88].

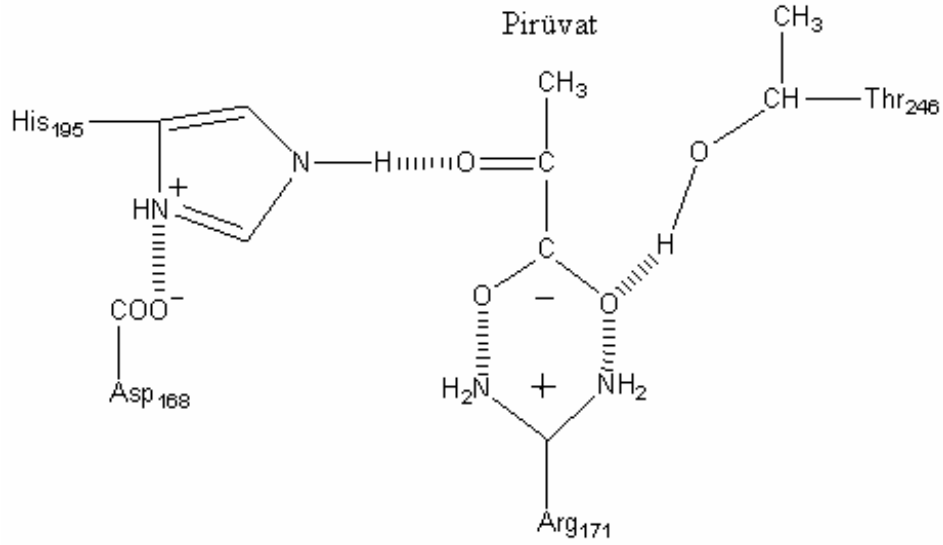
Kofaktör bağlanma bölgesindeki ilk $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ birimi bir “fingerprint” bölgesi içerir. Farklı enzimlerin kofaktör bağlanma domainlerinde çok az dizi benzerliği olmasına rağmen yüksek derecede korunmuş bazı aminoasitler “fingerprint” bölgesinde bulunur [61]. Özellikle bu bölge, kofaktör bağlanma bölgesinin varlığının tespiti için önemlidir. Bu bölge içinde fosfat bağlanma bölgesi olarak tanımlanan ve sekonder yapı elementlerinin sıkı paketlenmesini sağlayan korunmuş GXGXXG dizisi (X herhangi bir aminoasidi temsil eder), altı farklı pozisyonda sekonder yapı elementlerinin etkileşimi için önemli küçük hidrofobik aminoasitler, “fingerprint” bölgesinin ikinci β zincirinde (“fingerprint” bölgesinin sonunda) korunmuş negatif yüklü Asp (D) veya Glu (E) aminoasidi ve “fingerprint” bölgesinin ilk β zincirinde (“fingerprint” bölgesinin başında) genellikle korunmuş pozitif yüklü Arg (R) veya Lys (K) aminoasidi bulunur [54, 61, 85, 87].

“Fingerprint” bölgesi için korunmuş olan ilk üç özellik M.G. Rossmann [61, 83, 84] tarafından orjinal olarak tanımlanırken son özellik bazı proteinlerde farklılık gösterebilmektedir [61]. Şekil 1.7.’de görüldüğü gibi “fingerprint” bölgesinin başında pozitif yüklü Arg (R) veya Lys (K) aminoasidinden farklı olarak Leu (L) aminoasidi bulunmaktadır.

1.4.3. Laktat Dehidrogenaz Enziminin Substrat Bağlanma Bölgesi (Katalitik Bağlanma Bölgesi)

Laktat dehidrogenazlarda katalitik bağlanma bölgesinin rolü, substrat koordinasyonu ve katalizleme için gerekli aminoasitleri sağlamaktır [62]. Katalitik bağlanma bölgesi herbiri üç ipliğe sahip olan (β G, β H, β 3J ve β K, β L, β M) iki tabakanın dışında paketlenmiş olan dört heliks (α 2F, α 1G, α 2G, α H) içerir [90].

Substrat, NADH’ın nikotinamid halkasının A yüzüne bağlanır. Substrat, Arg₁₇₁’in NH₁, NH₂ ve substrat karboksili arasında iki kola ayrılan iyon çifti tarafından aktif bölge içerisine bağlanır. Aynı zamanda substrat karboksili ve Thr₂₄₆ aminoasidi arasında bir hidrojen bağı oluşur. Substratın bağlanması, His₁₉₅ aminoasidi ve substrat karboksili arasında bir hidrojen bağının oluşumu ile tamamlanır. Aynı zamanda bir hidrojen bağı, His₁₉₅ ve Asp₁₆₈ arasında olur (Şekil 1.8.) [53, 60].



Şekil 1.8. Laktat dehidrogenaz enziminin substrat etkileşimine katılan aminoasitleri [90].

1.5. Plazmodiyal Laktat Dehidrogenaz Enzimi

Yeni antimalarial hedefler keşfetmek amacıyla parazitin yaşam döngüsü için gerekli olan mekanizmaları belirlemek önemlidir. Özellikle *Plasmodium*'un eşeysiz üreme aşamasındaki anaerobik glukoz metabolizması son yıllarda dikkat çekici bir hedef olmuştur [91].

Yapılan önceki çalışmalara göre sıtma parazitleri eritrositik aşamada tam bir sitrik asit döngüsü ve aktif bir mitokondriden yoksundur [92, 93]. Malaria Genom Projesi ile ilk *Plasmodium* genomunun açıklanması sonucu [1] yapılan proteomik analizler ile *P. falciparum*'da sitrik asit döngüsü ve diğer mitokondriyal işlemlere katılan enzimler belirlenmiştir [94]. Bununla beraber sitrik asit döngüsünün glikoliz ürünlerinin oksidasyonu için kullanılıp kullanılmadığı bilinmemektedir [1]. Buna göre sıtma parazitleri metabolizmaları için gerekli olan ATP ihtiyacını glikoliz ile sağlarlar [1, 95]. Glukoz, *Plasmodium* parazitleri için önemli bir enerji kaynağıdır [91]. İnfekte eritrositlerde glukoz tüketimi infekte olmayanlara göre 100 kat daha fazladır [96, 97] ve glukoz metabolizmasının temel ürünü L-laktattır [98].

Plasmodium'un glikolitik enzimleri hem yeni antimalarialar için hedef moleküller olarak, hem de kandaki parazitemi oranının belirlenmesinde birer indikatör olarak tanımlanmıştır [16, 95, 99]. *Plasmodium*'ların glikolitik enzimlerinin çoğu klonlanmış, ekspresyonları yapılmış ve kristalografik olarak analiz edilmiştir. Bunlardan bazıları;

aldolaz [100-102], trioz-fosfat izomeraz [103, 104], fosfogliserat kinaz [105, 106], fosfogliserat mutaz [107] ve laktat dehidrogenazdır [18, 19, 98, 108-111].

Laktat dehidrogenaz, glikolitik yolun son enzimidir ve glikoliz için devamlı bir NAD⁺ kaynağı olması açısından parazitin yaşam döngüsü için gereklidir [112]. Yapılan çalışmalar bu enzimin aktivitesinin engellenmesinin parazitin yaşamının sonlandırılmasını sağladığını göstermektedir [13].

Plazmodiyal laktat dehidrogenaz genleri insanı infekte eden türler olan *Plasmodium falciparum*'ın Honduras I [18], K1 (Tayland) ve PF FCBR (Kolombiya) soylarından [19], *Plasmodium vivax*'ın Belem [110] ve Salvador I [98] soylarından, *Plasmodium ovale*'nin Harding soyundan [98] ve *Plasmodium malariae*'nin Uganda soyundan [98] izole edilip klonlanmıştır. Yine sıtma araştırmalarında model olarak kullanılan *Plasmodium berghei* [113] ve *Plasmodium reichenowi* [114] türlerinin sırasıyla ANKA ve Oscar soylarından da izole edilip klonlanmıştır. Ayrıca LDH geni kısmi olarak *Plasmodium yoelii nigeriensis* alt türünden de izole edilmiştir [115]. Bununla beraber son zamanlarda yayınlanan makalelerde [5, 6] insanı infekte eden beşinci tür olarak gösterilen *Plasmodium knowlesi*'nin H soyunun [116] ve *Plasmodium yoelii yoelii*'nin 17XNL soyunun [117] genom projelerinin tamamlanmasıyla LDH genleri belirlenmiştir. Bütün bu türlerin farklı soylarının LDH genleri sürekli olarak klonlanmaktadır. Ayrıca farklı *Plasmodium* türlerinin devam eden genom projeleri tamamlandıkça bu türlere ait LDH genleri de belirlenmektedir. Buna göre plazmodiyal laktat dehidrogenaz geni 316 aminoasitlik bir proteini kodlayan 951 baz çiftlik açık okuma çerçevesini içermektedir [19, 110].

İnsanı infekte eden *Plasmodium* türleri olan *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* –ve son zamanlarda *P. knowlesi*-'nin laktat dehidrogenaz genleri (sırasıyla *PfLDH*, *PvLDH*, *PoLDH*, *PmLDH*, *PkLDH*) aminoasit düzeyinde % 88-97 (*PfLDH/PvLDH*: % 90; *PfLDH/PoLDH*: % 91; *PfLDH/PmLDH*: % 92; *PfLDH/PkLDH*: % 90; *PvLDH/PoLDH*: % 88; *PvLDH/PmLDH*: % 90; *PvLDH/PkLDH*: % 97; *PoLDH/PmLDH*: % 92; *PoLDH/PkLDH*: % 88; *PmLDH/PkLDH*: % 89) ve nükleotid düzeyinde % 75-84 (*PfLDH/PvLDH*: % 75; *PfLDH/PoLDH*: % 81; *PfLDH/PmLDH*: % 84; *PfLDH/PkLDH*: % 78; *PvLDH/PoLDH*: % 76; *PvLDH/PmLDH*: % 77; *PvLDH/PkLDH*: % 83; *PoLDH/PmLDH*: % 82; *PoLDH/PkLDH*: % 77; *PmLDH/PkLDH*: % 79) arasında benzerlik göstermektedir [19, 98, 110, 116]. *P. falciparum* ve *P. vivax* laktat dehidrogenaz enzimlerinin X ışını kristalografisi [109, 111], *P. ovale* ve *P. malariae* laktat dehidrogenaz enzimlerinin homoloji modelleme çalışmaları [98] ilk dört

Plasmodium türünün laktat dehidrogenaz enzimlerinin yapısal olarak da yüksek derecede benzer olduğunu göstermiştir. *Plasmodium knowlesi*'nin laktat dehidrogenaz enziminin üç boyutlu yapısı ise henüz bilinmemektedir.

Plazmodiyal LDH enzimleri kendi içlerinde yüksek derecede benzer olmakla birlikte insan ve diğer organizmaların LDH'larına göre farklılıklar göstermektedir. LDH enziminin aktif bölgesinin tanımlanmasında rol alan Gln₁₀₂ aminoasidi [98] bütün LDH enzimlerinde korunmuş olmakla birlikte plazmodiyal LDH enzimlerinde Lys₁₀₂ ile yer değiştirmektedir [19, 98, 110, 113, 114, 116, 117]. Yine kofaktör bağlanma bölgesinin tanımlanması için önemli olan Thr₂₄₆ ve Ile₂₅₀ aminoasitleri [98] bütün LDH enzimlerinde korunmuş olmakla birlikte plazmodiyal LDH enzimlerinde her ikisi de Pro ile yer değiştirmektedir [19, 98, 110, 113, 114, 116, 117].

Plazmodiyal LDH'larda insan LDH'na göre dört pozisyonda aminoasit eksikliği ve iki pozisyonda da aminoasit fazlalığı belirlenmiştir. Glu₄₈, Gly₂₁₇, Gln₂₂₄/Asn₂₂₄ (insan-m/insan-h) ve Asp₂₈₃/Asn₂₈₃ (insan-m/insan-h) eksik olan dört aminoasittir. Ala₇₃ ve Ser₇₄ arasında ilave bir Tyr bulunmaktadır. Aynı zamanda Ser₁₀₈ ve Arg₁₀₉ arasında ilave 5 aminoasit (D_{108A}, K_{108B}, E_{108C}, W_{108D}, N_{108E}) bulunmaktadır [19, 98, 110, 113, 114, 116-119].

Yapılan çalışmalar plazmodiyal laktat dehidrogenaz enziminin (pLDH) elektroforetik, kinetik ve yapısal olarak insan LDH'ından farklı olduğunu göstermiştir. Bu farklılıklar şunlardır:

1. İnsan LDH'ından farklı olarak pLDH, yüksek pirüvat konsantrasyonunda inhibe olmamaktadır [12].
2. İnsan LDH'ından farklı olarak pLDH, 3-asetilpiridin adenin dinükleotit (APAD⁺) adlı kofaktörü 0,5 M laktat konsantrasyonunda daha hızlı kullanabilme yeteğine sahiptir [16].
3. pLDH'nın gossilik nitril diasetat ve türevleri tarafından inhibisyona insan LDH'ından daha duyarlı olduğu bildirilmiştir [13, 17].
4. İnsan LDH'ından farklı olarak pLDH, aktif bölge halkasında ilave 5 aminoasit (aspartik asit, lisin, glutamik asit, triptofan, asparajin (DKEWN)) içermektedir [18, 19, 98, 110].

Bütün bu farklılıklar yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmalarına temel teşkil etmektedir.

1.6. Model Apikompleksanların Laktat Dehidrogenaz Enzimleri

1.6.1. *Toxoplasma gondii* Laktat Dehidrogenaz Enzimi

Toxoplasma gondii, yaşam döngüsünün takizoit ve bradizoit aşamalarında sırasıyla LDH1 ve LDH2 olarak ifade edilen laktat dehidrogenaz enziminin iki izoenzimine (*Tg1LDH* ve *Tg2LDH*) sahiptir [120]. Bu izoenzimleri kodlayan genler ve onların ürünleri parazitin farklılaşması sırasında metabolik değişimin kontrolü için önemlidir [41].

LDH1 ve LDH2 izoenzimlerini kodlayan genlerin ekspresyonları gelişimsel olarak düzenlenmektedir. LDH1 geninin mRNA'sı bradizoit ve takizoit aşamalarının her ikisinde de belirlenirken, LDH2 geninin mRNA'sı sadece bradizoit aşamasında belirlenmiştir. LDH1 gen ürünü sadece takizoit aşamasında eksprese edilirken, LDH2 gen ürünü yalnız bradizoit aşamasında eksprese edilmektedir [41, 120]. Dolayısıyla parazitin takizoit formundan bradizoit formuna değişimi sırasında LDH2 mRNA'sının post-transkripsiyonel indüksiyonunun neticesinde LDH1 mRNA'sı ile yer değiştirdiği düşünülmektedir [120].

Toxoplasma gondii, farklılaşma sırasında ortam şartlarına uyum sağlamak için morfolojisini ve enerji metabolizmasını değiştirmektedir. Bradizoit aşamasında glikoliz tek enerji kaynağı olmakla birlikte, takizoit aşamasında oksidatif fosforilasyon ve glikolizin her ikisi de fonksiyoneldir [41, 121]. Dolayısıyla LDH, kronik toxoplasmosis için ilaç tasarımı ve geliştirilmesi açısından iyi bir hedef olabilir. Bununla birlikte parazitin büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan LDH1 ve LDH2 ekspresyonunun engellenmesi parazitin virulansının zayıflamasını sağladığından doku kist oluşumunu engelleyen ilaçların tasarlanması için iyi bir hedef olabilir [41].

LDH1 ve LDH2 izoenzimlerini kodlayan genler % 64 oranında nükleotid dizi benzerliği gösterirken bu genlerin ürünleri % 71 oranında aminoasit dizi benzerliği göstermektedir. LDH1 ve LDH2 genleri aynı pozisyonda sırasıyla 538 ve 588 nükleotid uzunluğunda bir intron bölgesine sahiptirler [120]. LDH1 geni 329 aminoasitlik proteini kodlayan 990 baz çiftlik açık okuma çerçevesini içerirken, LDH2 geni 326 aminoasitlik proteini kodlayan 981 baz çiftlik açık okuma çerçevesini içermektedir. Dolayısıyla LDH1 enzimi LDH2 enziminden 3 aminoasit daha uzun olup tahmin edilen molekül ağırlıkları sırasıyla 35.550 Da ve 35.342 Da'dur. Her iki LDH izoenzimini kodlayan gen de tek kopya olup *Toxoplasma gondii* genomunun farklı bölgelerine yerleşmişlerdir [120].

1.6.2. *Eimeria tenella* Laktat Dehidrogenaz Enzimi

Eimeria tenella laktat dehidrogenaz enzimi (EtLDH), 331 aminoasit içeren 34.965 Da molekül ağırlığında bir polipeptiddir. Enzimi kodlayan gen *Eimeria tenella*'dan başka aynı zamanda diğer iki önemli *Eimeria* türü olan *E. acervulina* ve *E. maxima*'dan da klonlanmıştır. Bu iki türün laktat dehidrogenaz enzimi ise sırasıyla 35.857 Da ve 35.951 Da molekül ağırlıklı 330 aminoasit içeren polipeptidlerdir. Her üç *Eimeria* enziminin aminoasit dizisi arasındaki homoloji (% 66, 70 ve 80) düşük olup filogenetik farklılık göstermektedir [122].

Klonlama ve Southern blot çalışmaları, *Eimeria*'nın tek bir laktat dehidrogenaz enzimi içerdiğini göstermiştir [122-124]. Yine farklı parazitik aşamalarda yapılan Western blot ve jelde enzimatik LDH ölçümü çalışmaları ile parazitin aynı zamanda bütün yaşam döngüsü aşamalarında tek bir LDH enzimi içerdiği tespit edilmiştir [122].

Benzer ya da farklı altbirimleri içeren bir tetramer olarak fonksiyonel aktivite gösteren LDH enziminin [56] *Eimeria*'daki altbirimlerini araştırmak için *Eimeria tenella*'nın bütün yaşam döngüsü aşamalarındaki (sporozoit, merozoit, şizont) aktif LDH enziminin jel üzerindeki elektroforetik göç modeli araştırılmıştır. Buna göre parazitin bütün yaşam döngüsünde homotetramer olarak aktif olan tek bir LDH geni bulunmaktadır [122].

Eimeria, yaşam döngüsü sırasında aerobik ve anaerobik çevre şartlarında bulunmakla birlikte LDH enzimi sadece anaerobik respirasyon sırasında gerekli olduğu için parazitin çeşitli yaşam döngüsü aşamalarındaki LDH ekspresyon modeli araştırılmıştır. Bunun için model olarak alınan *Eimeria tenella*'nın farklı yaşam döngüsü aşamalarındaki RNA'sının Northern blot ile analiz çalışmaları LDH transkriptinin sadece şizont aşamasında bulunduğunu göstermiştir. LDH mRNA'sı sadece şizont aşamasında bulunmakla birlikte enzimin bütün aşamalarda eşit düzeyde bulunduğu Western blot ile gösterilmiştir [122].

1.6.3. *Theileria parva* Laktat Dehidrogenaz Enzimi

Diğer parazitik protozoonlara karşı orjinal ilaçların tasarımı için hedef olarak biyokimyasal yolların potansiyel zayıf noktaları araştırılmış olmakla birlikte *Theileria parva*'da kapsamlı çalışmalar uygulanmamıştır. Böyle önemli yollar hakkında gerekli bilgi eksikliği *T. parva*'ya karşı ucuz kemoterapik ajanların araştırılmasında hızlı ilerlemeyi engellemiştir [50].

T. parva şizontlarının uzun bir süre infekte edilmiş hücrelerden kontamine olmadan kültüre alınmasının imkânsız olması, maliyet, izolasyon prosedürlerinin uzunluğu gibi problemler, şizontlardaki enerji metabolizmasının enzimleri üzerinde çalışmalar yapılmasını geciktirmiştir [50]. Dolayısıyla *T. parva* şizontlarında laktat dehidrogenaz enzimi ve diğer glikolitik enzimlerin varlığı sadece elektroforetik çalışmalarla gösterilebilmiştir [125].

İzolasyon problemlerinin aşılması [126] ve sonrasında *Theileria parva* genom projesinin tamamlanması [47] ile laktat dehidrogenaz geni tespit edilmiştir. Buna göre laktat dehidrogenaz geni, 321 aminoasitlik proteini kodlayan 966 baz çiftlik açık okuma çerçevesini içermektedir [47]. Gen klonlanmış olmamakla birlikte, *Theileria parva* laktat dehidrogenaz enziminin (*TpLDH*) yapısı ve karakterizasyonu ile ilgili ilave çalışmalar da bulunmamaktadır. Bununla birlikte 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 [92] benzediğini göstermiştir [50].

1.7. Plazmodiyal ve Model Apikompleksan Laktat Dehidrogenaz Enzimlerinin Yapısal ve Kinetik Olarak Karşılaştırmalı Analizi

Karşılaştırmalı analiz, ortak hedef belirleme açısından önemli olup [51, 52] *Plasmodium vivax* ve diğer *Plasmodium* cinsi üyelerinin laktat dehidrogenaz enzimleri, Apikompleksan şubesinin diğer üyesi *Theileria parva* ve aynı şubenin *Coccidia* alt sınıfı üyeleri *Eimeria tenella* ve *Toxoplasma gondii*'nin laktat dehidrogenaz enzimleri ile yapısal ve kinetik olarak karşılaştırılmıştır. Bununla birlikte bu organizmaların LDH enzimlerinin insan LDH'ı ve diğer bilinen LDH'lara göre farklılıkları incelenmiştir. Buna göre plazmodiyal ve diğer Apikompleksan laktat dehidrogenaz enzimleri LDH'ı bilinen diğer canlı gruplarına göre yapısal ve kinetik farklılıklar göstermektedir:

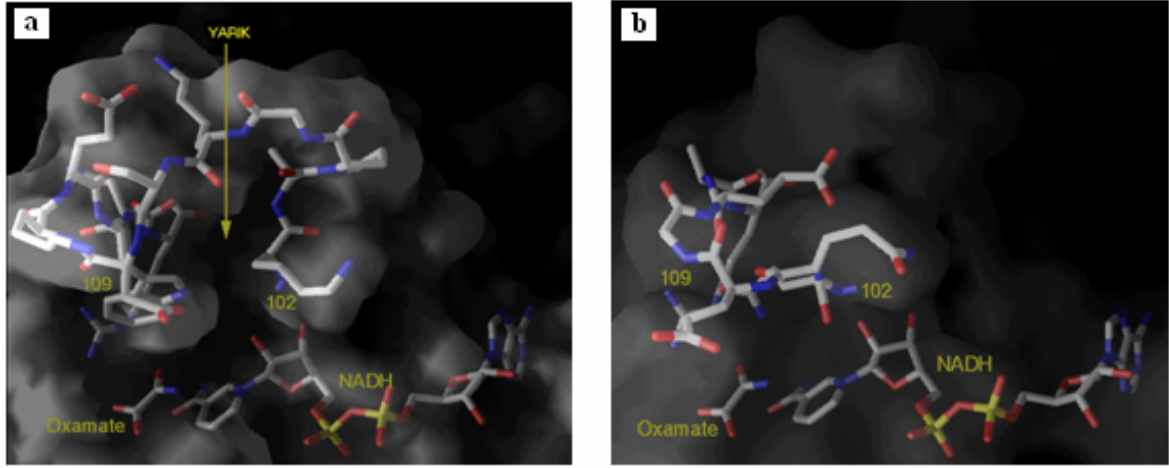
1.7.1. Aktif Bölgedeki Yapısal Farklılık

Laktat dehidrogenaz enziminin aktif bölge halkası 98. ve 110. aminoasitler arasında yer almaktadır [127]. Plazmodiyal LDH enzimi, insan LDH'ı ve diğer bilinen LDH'lar ile karşılaştırıldığında gözlenen en önemli farklılık plazmodiyal LDH enziminin, aktif bölge halkasındaki Ser₁₀₈ ve Arg₁₀₉ arasında bir pentapeptid insersiyonu (D_{108A}, K_{108B}, E_{108C}, W_{108D}, N_{108E}) içermesidir [18, 19, 98, 110, 113, 114, 116, 117]. Plazmodiyal LDH'lardaki pentapeptid insersiyonu tez çalışmasının model Apikompleksanları *Toxoplasma gondii* [76, 120], *Eimeria tenella* [122] ve *Theileria parva* [47] LDH enzimlerinde de bulunmakla beraber aminoasit dizileri farklılık göstermektedir (Şekil 1.9.).

	98	102	109
köpekb-m	AGAR	QQ-EGES	RL
BsLDH	AGAN	QK-PGET	RL
insan-m	AGAR	QQ-EGES	RL
insan-h	AGVR	QQ-EGES	RL
PfLDH	AGFT	KA-PGKSDKEWNRD	
PvLDH	AGFT	KA-PGKSDKEWNRD	
PolLDH	AGFT	KA-PGKSDKEWNRD	
PmLDH	AGFT	KV-PGKSDKEWNRD	
PkLDH	AGFT	KA-PGKSDKEWNRD	
Tg1LDH	AGLT	KV-PGKPDSEWSRN	
EtLDH	AGIT	KA-AGKSDQEWSRK	
TpLDH	AGLA	KA-PAKSNEEWNRD	

Şekil 1.9. Laktat dehidrogenaz enziminin aktif bölge halkasının aminoasit dizisi. 104. aminoasit tanımlanmamıştır. Altı çizili olarak gösterilen 102. aminoasit substrat özgüllüğünün belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Koyu renkli olarak gösterilen 109. aminoasit katalitik aminoasittir. köpekb-m: Köpekbalığı LDH'ı kas formu, BsLDH: *Bacillus stearothermophilus* LDH, insan-m: İnsan LDH'ı kas formu, insan-h: İnsan LDH'ı kalp formu, PfLDH: *Plasmodium falciparum* LDH, PvLDH: *P. vivax* LDH, PolLDH: *P. ovale* LDH, PmLDH: *P. malariae* LDH, PkLDH: *P. knowlesi* LDH, Tg1LDH: *Toxoplasma gondii* LDH1, EtLDH: *Eimeria tenella* LDH, TpLDH: *Theileria parva* LDH

X ışını kristalografisi ve homoloji modelleme çalışmaları ile bu 5 aminoasit (D_{108A}, K_{108B}, E_{108C}, W_{108D}, N_{108E}) ilavesinin plazmodiyal enzimin aktif bölge halkasına yakın yüzeyinde çok belirgin bir yarık oluşturduğu (Şekil 1.10.a.), fakat insandaki eşdeğeri olan LDH'da ise aynı bölgede hiçbir ilave aminoasit olmadığı için sözkonusu yarığın olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 1.10.b.) [98, 109, 111, 113, 128].



Şekil 1.10. pLDH ve memeli LDH'nda substrat bağlanma bölgesi ve aktif bölge halkasına bitişik yarığın varlığının gösterilmesi. **a:** pLDH'nin 108. ve 109. aminoasitleri arasındaki ilave 5 aminoasidin oluşturduğu yarık. **b:** Memeli LDH'nda aynı pozisyonda ilave 5 aminoasit bulunmadığı için enzim yüzeyinde bir yarık bulunmamaktadır [109].

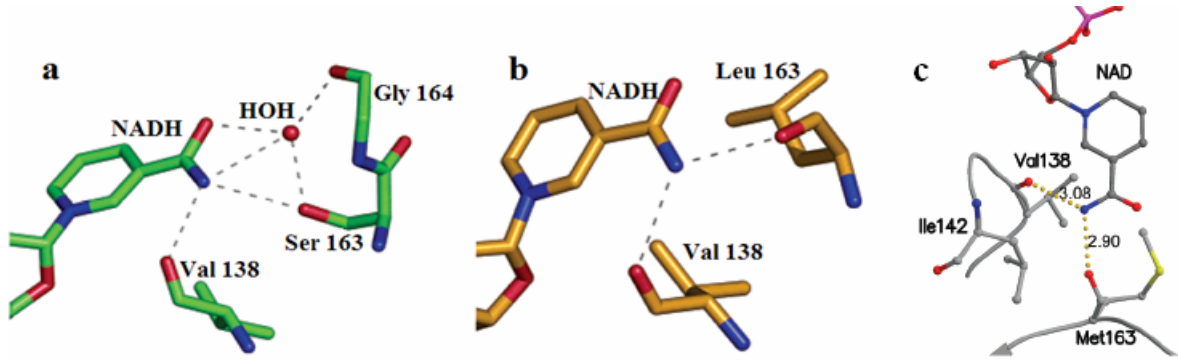
1.7.2. Kofaktör Bağlanma Bölgesindeki Yapısal Farklılık

X ışını kristalografisi çalışmaları ile belirlenen diğer bir yapısal farklılık, plazmodiyal LDH'larda NADH kofaktörünün insan LDH'ına göre substrata ve enzim aktif bölgesine ~ 1 Å daha yakın olmasıdır. Bu durum, insan ve *Plasmodium* LDH'nin 163. pozisyonunda bulunan farklı aminoasitlerin NADH ile olan farklı etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır (Şekil 1.11.) [109].

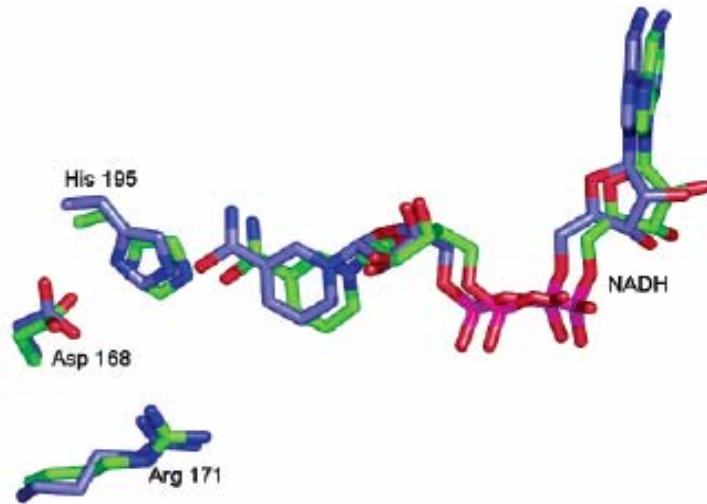
	163
köpekb-m	IIIG <u>S</u> GCNLD
insan-m	VIG <u>S</u> GCNLD
insan-h	VIG <u>S</u> GCNLD
PfLDH	IIIG <u>L</u> GGVLD
PvLDH	IIIG <u>L</u> GGVLD
PoLDH	IVG <u>L</u> GGVLD
PmLDH	IVG <u>L</u> GGVLD
PkLDH	IIIG <u>L</u> GGVLD
Tg1LDH	ICG <u>M</u> ACMLD
EtLDH	VCG <u>M</u> AGVLD
TpLDH	VVG <u>M</u> GGLLD

Şekil 1.11. Laktat dehidrogenaz enziminin 163. pozisyonundaki aminoasit farklılığının gösterilmesi. köpekb-m: Köpekbalığı LDH'ı kas formu, insan-m: İnsan LDH'ı kas formu, insan-h: İnsan LDH'ı kalp formu, PfLDH: *Plasmodium falciparum* LDH, PvLDH: *P. vivax* LDH, PoLDH: *P. ovale* LDH, PmLDH: *P. malariae* LDH, PkLDH: *P. knowlesi* LDH, Tg1LDH: *Toxoplasma gondii* LDH1, EtLDH: *Eimeria tenella* LDH, TpLDH: *Theileria parva* LDH

İnsan LDH’ında Ser₁₆₃, bir H₂O molekülü ve NADH’nin nikotinamid grubu arasında bir hidrojen bağı etkileşimi vardır (Şekil 1.12.a.) [128]. Fakat plazmodiyal LDH’larda Leu₁₆₃’ün belkemiği karbonil grubu, NADH’nin nikotinamid grubu ile hidrojen bağı yapmaktadır. Bu hidrojen bağının oluşması Leu₁₆₃’ün belkemiği peptidinin 180 °C’lik bir açı ile dönmesiyle sağlanmaktadır (Şekil 1.12.b.) [98, 109, 111, 113]. NADH kofaktörünün pozisyonunu değiştiren bu fenomen (Şekil 1.13.) aynı zamanda 163. pozisyonda korunmuş methionin içeren *Toxoplasma gondii* (Şekil 1.12.c.) [76] ve *Eimeria tenella* [122] LDH enzimlerinde de görülmektedir. *Theileria parva* LDH enziminde ise Met₁₆₃ korunmuş olmakla birlikte [47] üç boyutlu yapısı bilinmediği için enzimin aynı yapısal farklılığı gösterip göstermediği bilinmemektedir.



Şekil 1.12. İnsan LDH’ı (a), pLDH (b) ve Tg1LDH’nin (c) 163. pozisyonundaki aminoasitlerinin NADH ile olan farklı etkileşimlerinin gösterilmesi [76, 109, 111]. Hidrojen bağları kesik çizgiler halinde gösterilmiştir. İnsan LDH’ında su molekülü kırmızı küre olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.13. İnsan LDH’nin NADH kofaktörünün (mavi) ve plazmodiyal LDH’nin NADH kofaktörünün (yeşil) pozisyon farklılıklarının gösterilmesi. İnsan LDH’nin kofaktörü plazmodiyal LDH’nin kofaktörüne göre ~1 Å yer değiştirmiştir [109, 111].

Hem enzimin aktif bölge halkasına yakın bölgesindeki primer dizi ve sekonder yapıdaki değişiklik ve hem de NADH kofaktörünün pozisyonundaki değişiklik aktif bölgede genişlemiş bir hacim ile sonuçlanmaktadır [14, 112, 113].

1.7.3. İndirgenmiş Substrat İnhibisyonu

Substrat inhibisyonu bütün LDH enzimlerinin ortak özelliğidir [12, 76, 98, 121]. Bu inhibisyon için kabul edilen mekanizma, NAD^+ serbest kalmadan önce LDH- NAD^+ ikili kompleksine pirüvatın enol formunun bağlanması ve böylece aktif bölgede pirüvat ve kofaktörün oksidize formu arasında kovalent bir kompleksin oluşması ile ilgilidir [129-131]. Dolayısıyla NAD^+ 'ın serbest kalma hızı önemlidir [76, 121]. LDH'ların çoğunda kofaktörün karboksiamid grubu ile etkileşen Ser₁₆₃ aminoasidi korunmuştur [128]. Substrat inhibisyonu göstermeyen veya indirgenmiş substrat inhibisyonu gösteren plazmodiyal LDH'larda bu pozisyon Leu₁₆₃ ile yer değiştirmiştir [18, 19, 98, 110, 113, 114, 116, 117]. Kofaktörün substrata ve enzim aktif bölgesine daha yakın olduğu bu yapısal farklılık fonksiyonel olarak da önemlidir ve enzimin katalizleme kinetiğini ve substrat inhibisyonu özelliğini değiştirmektedir. Dolayısıyla plazmodiyal LDH'lar ortamdaki substrat fazlalığından etkilenmemektedir veya indirgenmiş bir substrat inhibisyonu göstermektedir [97, 109, 111, 113]. Plazmodiyal LDH'lardan *PoLDH* ve *PmLDH*, yüksek pirüvat konsantrasyonunda bile substrat inhibisyonu göstermezken, *PfLDH* ve *PvLDH* 20 mM pirüvat konsantrasyonunda çok az, 50 mM pirüvat konsantrasyonunda ise zayıf bir substrat inhibisyonu göstermektedir [98]. Bununla birlikte insan LDH'nda çok düşük pirüvat konsantrasyonunda bile inhibisyon görülmektedir [132, 133]. *PvLDH* için NADH ile pirüvatın K_i değeri (25 mM) [111], *PfLDH*'ın (82 mM, 140 mM) [111, 134] ve *Tg1LDH*'ın (31 mM) [76] K_i değerine göre düşüktür. Ancak bütün bu değerler insan LDH'nın iki izoenziminin K_i değerlerine göre (LDH-M K_i : 3.9; LDH-H K_i : 0.77) [132, 133] belirgin bir şekilde farklılık göstermektedir. Kofaktör olarak APADH kullanıldığı zaman ise K_i değeri (*PfLDH*: 2.4 mM; *PvLDH*: 2.2 mM; *Tg1LDH*: 25 mM) küçülmektedir [76, 111].

163. pozisyonun önemi Ser163Leu mutagenesi ile substrat inhibisyon özelliğini kaybeden bazı LDH enzimlerinde gösterilmiştir [132, 133, 135]. *Toxoplasma gondii* LDH1 ve LDH2 enzimlerinde 163. pozisyonunda Met₁₆₃ bulunmaktadır. Bununla beraber *Toxoplasma gondii* LDH1'de substrat inhibisyonu gözlenirken, *Toxoplasma gondii*

LDH2’de görülmemiştir [121]. Yine *Eimeria tenella* ve *Theileria parva* LDH enzimlerinin kinetik karakterizasyonları bilinmediği için korunmuş Met₁₆₃ aminosidinden kaynaklanan yapısal değişikliğin substrat inhibisyonu üzerindeki etkisi bilinmemektedir.

1.7.4. Substrat Özgüllüğü

Plazmodiyal LDH ve diğer Apikompleksan LDH enzimleri, bilinen bütün LDH dizilerinde tamamen korunmuş olan His₁₉₅, Asp₁₆₈, Arg₁₀₉ ve Arg₁₇₁ katalitik aminoasitlerini içermektedir. Bu yüzden bu LDH’ların katalitik mekanizmasının Bölüm 1.4.1.’de anlatılan LDH’ların genel katalitik mekanizmasına benzediği düşünülmektedir [136]. Plazmodiyal LDH ve diğer Apikompleksan LDH’larda aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun bu enzimlerin substrat özgüllüğünü diğer LDH’lara göre değiştirip değiştirmediği sorusu ortaya çıkmaktadır. Örneğin; *Bacillus stearothermophilus*’un LDH enzimine dört aminoasit ilavesi ile aktif bölge halkasının uzatılması pirüvat ile aktivite kaybına yol açarken fenilpirüvat ile aktiviteyi korumuştur. Böylece bu LDH bir fenillaktat dehidrogenaza çevrilmiştir [137]. Ancak doğal olarak geniş bir aktif bölge halkasına sahip olan plazmodiyal LDH’lar fenilpirüvatı kullanamazken [136], insan LDH’nın iki izoenzimi (LDH-M ve LDH-H) [136] ve *T. gondii*’nin LDH izoenzimleri (LDH1 ve LDH2) [121] bu substratı kullanabilmektedir (Tablo 1.2.). Pirüvat, hidroksipirüvat ve 2-ketobutirat substratları için ise bu enzimlerin tamamı benzer substrat özgüllüğü göstermektedir. Dolayısıyla *T. gondii* LDH1 ve LDH2 izoenzimleri ve insan LDH’nın LDH-M ve LDH-H izoenzimleri, plazmodiyal LDH’a göre daha geniş bir substrat özgüllüğü göstermektedir [121, 136].

Plazmodiyal LDH, insan LDH’nın LDH-M ve LDH-H izoenzimlerine göre sınırlı bir substrat özgüllüğü göstermesine rağmen, k_{cat}/K_m değerlerine göre yüksek katalitik etkisi ile pirüvat için yüksek bir özgüllük göstermektedir [136]. Yine *T. gondii* LDH1’in en iyi substratı pirüvat iken, *T. gondii* LDH2’nin en iyi substratı fenilpirüvattır. Böylece *T. gondii* LDH1 ve LDH2’de, plazmodiyal LDH’lardan daha geniş bir substrat özgüllüğü göstermektedir [121]. Dolayısıyla aktif bölge halkasındaki dizi benzerliklerine rağmen plazmodiyal LDH’ların substrat özgüllüğü *T. gondii* LDH1 ve LDH2 enzimlerinden farklılık göstermektedir [121].

Tablo 1.2. Plazmodiyal LDH (*Pf*LDH, *Pv*LDH, *Po*LDH, *Pm*LDH), *Toxoplasma gondii* LDH1 ve LDH2 ve insan LDH'lerinin (LDH-M ve LDH-H) substrat özgülüklerinin karşılaştırılması. [(1): Ref. No: 111, (2): Ref. No: 98, (3): Ref. No: 136, (4): Ref. No: 134, (5): Ref. No: 138, (6): Ref. No: 76, (7): Ref. No: 121, (8): Ref. No: 132, (9): Ref. No: 133]. *(NA: no activity). *Pf*LDH için 10 kat artırılmış enzim ile 10 mM substratta aktivite belirlenememiştir. **İnsan LDH-M ve LDH-H için aktivite 10 mM substratta belirlenmiştir.

Enzim	Steady-State Kinetik Sabitesi	Pirüvat	Laktat	Hidroksi pirüvat	2-ketobutirat	Fenilpirüvat
<i>Pf</i> LDH	K_m (μ M)	51 $\pm$ 2 ⁽¹⁾				
		30 $\pm$ 3 ⁽²⁾	12000 $\pm$ 400 ⁽²⁾			
		30 ⁽³⁾	12000 ⁽³⁾	290 ⁽³⁾	470 ⁽³⁾	
		55 $\pm$ 7 ⁽⁴⁾	47 $\pm$ 8x10 ³ ⁽⁴⁾		600 ⁽⁴⁾	
		54 $\pm$ 3.3 ⁽⁵⁾	5166 $\pm$ 99.6 ⁽⁵⁾			
	k_{cat} (min ⁻¹)	1.9x10 ³ ⁽¹⁾				
		(8.9 $\pm$ 0.3)x10 ³ ⁽²⁾	(3.9 $\pm$ 0.2)x10 ³ ⁽²⁾			
		2.7x10 ⁴ ⁽³⁾	1.7x10 ⁴ ⁽³⁾	2.7x10 ³ ⁽³⁾	1.1x10 ⁴ ⁽³⁾	NA* ⁽³⁾
		5.8x10 ³ ⁽⁴⁾	2.4x10 ³ ⁽⁴⁾		4.8x10 ³ ⁽⁴⁾	
		(2.2 $\pm$ 0.08)x10 ⁴ ⁽⁵⁾	(0.55 $\pm$ 0.02)x10 ⁴ ⁽⁵⁾			
	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹)	3.8x10 ⁷ ⁽¹⁾				
<i>Pv</i> LDH	K_m (μ M)	3.0x10 ⁸ ⁽²⁾	3.3x10 ⁵ ⁽²⁾			
		9.0x10 ⁸ ⁽³⁾	1.4x10 ⁶ ⁽³⁾	9.3x10 ⁶ ⁽³⁾	2.3x10 ⁷ ⁽³⁾	
	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹)	1.1x10 ⁸ ⁽⁴⁾	5.1x10 ⁴ ⁽⁴⁾		8.0x10 ⁶ ⁽⁴⁾	
<i>Po</i> LDH	K_m (μ M)	4.1x10 ⁸ ⁽⁵⁾	1.1x10 ⁶ ⁽⁵⁾			
	k_{cat} (min ⁻¹)					
<i>Pm</i> LDH	K_m (μ M)	52 $\pm$ 2 ⁽¹⁾	10200 $\pm$ 700 ⁽²⁾			
		17 $\pm$ 1 ⁽²⁾				
	k_{cat} (min ⁻¹)	1.9x10 ³ ⁽¹⁾	(7.6 $\pm$ 0.2)x10 ³ ⁽²⁾			
<i>Tg1</i> LDH	K_m (μ M)	3.8x10 ⁷ ⁽¹⁾				
		4.4x10 ⁸ ⁽²⁾	1.4x10 ⁵ ⁽²⁾			
	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹)					
<i>Tg2</i> LDH	K_m (μ M)	71 $\pm$ 4 ⁽²⁾	93000 $\pm$ 900 ⁽²⁾			
		(1.6 $\pm$ 0.03)x10 ⁴ ⁽²⁾	(1.5 $\pm$ 0.08)x10 ³ ⁽²⁾			
	k_{cat} (min ⁻¹)					
<i>İnsan</i> LDH-M	K_m (μ M)	2.3x10 ⁸ ⁽²⁾	1.6x10 ⁴ ⁽²⁾			
	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹)					
<i>İnsan</i> LDH-H	K_m (μ M)	140 $\pm$ 18 ⁽²⁾	11300 $\pm$ 400 ⁽²⁾			
		(7.5 $\pm$ 0.3)x10 ³ ⁽²⁾	(2.3 $\pm$ 0.07)x10 ³ ⁽²⁾			
	k_{cat} (min ⁻¹)					
<i>Tg1</i> LDH	K_m (μ M)	5.4x10 ⁷ ⁽²⁾	2.0x10 ⁵ ⁽²⁾			
	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹)					
<i>Tg2</i> LDH	K_m (μ M)	359 ⁽⁶⁾				
		120 ⁽⁷⁾	8000 ⁽⁷⁾	770 ⁽⁷⁾	740 ⁽⁷⁾	690 ⁽⁷⁾
	k_{cat} (min ⁻¹)	3.8x10 ³ ⁽⁶⁾				
<i>İnsan</i> LDH-M	K_m (μ M)	3.5x10 ⁴ ⁽⁷⁾	1.6x10 ³ ⁽⁷⁾	3.0x10 ³ ⁽⁷⁾	5.4x10 ³ ⁽⁷⁾	3.0x10 ³ ⁽⁷⁾
		1.1x10 ⁷ ⁽⁶⁾				
	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹)	2.9x10 ⁸ ⁽⁷⁾	2.0x10 ⁵ ⁽⁷⁾	4.0x10 ⁶ ⁽⁷⁾	7.3x10 ⁶ ⁽⁷⁾	4.3x10 ⁶ ⁽⁷⁾
<i>İnsan</i> LDH-H	K_m (μ M)	800 ⁽⁷⁾	54000 ⁽⁷⁾	22000 ⁽⁷⁾	6500 ⁽⁷⁾	2400 ⁽⁷⁾
		4.6x10 ³ ⁽⁷⁾	5.8x10 ³ ⁽⁷⁾	1.1x10 ⁴ ⁽⁷⁾	1.6x10 ⁴ ⁽⁷⁾	5.7x10 ⁴ ⁽⁷⁾
	k_{cat} (min ⁻¹)					
<i>İnsan</i> LDH-M	K_m (μ M)	5.8x10 ⁶ ⁽⁷⁾	1.1x10 ⁵ ⁽⁷⁾	5.0x10 ⁵ ⁽⁷⁾	2.5x10 ⁶ ⁽⁷⁾	2.4x10 ⁷ ⁽⁷⁾
	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹)					
<i>İnsan</i> LDH-H	K_m (μ M)	170 ⁽³⁾	11000 ⁽³⁾	1400 ⁽³⁾	6000 ⁽³⁾	
		158 ⁽⁸⁾				
	k_{cat} (min ⁻¹)	1.8x10 ⁴ ⁽³⁾	4.9x10 ³ ⁽³⁾	2.0x10 ⁴ ⁽³⁾	9.2x10 ⁴ ⁽³⁾	150** ⁽³⁾
<i>İnsan</i> LDH-M	K_m (μ M)	1.6x10 ⁴ ⁽⁸⁾				
		1.1x10 ⁸ ⁽³⁾	4.3x10 ⁵ ⁽³⁾	1.4x10 ⁷ ⁽³⁾	1.5x10 ⁷ ⁽³⁾	
	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹)	1.0x10 ⁸ ⁽⁸⁾				
<i>İnsan</i> LDH-H	K_m (μ M)	55 ⁽³⁾	13000 ⁽³⁾	320 ⁽³⁾	1000 ⁽³⁾	
		58 ⁽⁹⁾				
	k_{cat} (min ⁻¹)	1.3x10 ⁴ ⁽³⁾	3.0x10 ³ ⁽³⁾	1.6x10 ⁴ ⁽³⁾	1.0x10 ⁴ ⁽³⁾	350** ⁽³⁾
<i>İnsan</i> LDH-M	K_m (μ M)	8.6x10 ³ ⁽⁹⁾				
		2.4x10 ⁸ ⁽³⁾	2.4x10 ⁵ ⁽³⁾	5.1x10 ⁷ ⁽³⁾	9.9x10 ⁶ ⁽³⁾	
	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹)	1.5x10 ⁸ ⁽⁹⁾				

1.7.5. Kofaktör Özgüllüğü

Plazmodiyal LDH ve diğer Apikompleksan LDH enzimleri ve insan LDH'nın LDH-M ve LDH-H izoenzimleri için kofaktör olarak NAD^+ ve NAD^{+} 'ın nikotinamid halkasının 3-asetilpiridin (APAD^+), nikotinik asit, thionikotinamid veya 3-piridinaldehid ile değiştirildiği türevlerinden oluşan NAD^+ analogları karşılaştırılmıştır. APAD^+ (3-asetilpiridin adenin dinükleotid) dışındaki diğer üç NAD^+ analogu, LDH için kofaktör olmayıp NAD^{+} 'ın bağlanmasında yarışmalı inhibitörlerdir. Sadece NAD^+ ve APAD^+ bu LDH enzimlerinin kofaktörleridir [121, 136]. Plazmodiyal LDH, NAD^+ kofaktörüne göre APAD^+ ile daha yüksek aktivite göstermektedir ve insan LDH'ına göre yüksek laktat konsantrasyonunda APAD^+ kofaktörünü daha hızlı kullanabilmektedir [16, 109, 111, 136]. Tablo 1.3.'de de görüldüğü gibi plazmodiyal LDH ve *T. gondii* LDH1 ve LDH2 enzimleri için APAD^+ ile k_{cat} değeri NAD^+ ile elde edilen k_{cat} değerinden daha büyük olmasına rağmen, insan LDH-M ve LDH-H izoenzimlerinde tam tersi görülmektedir. Bu kinetik farklılık sıtmanın klinik tanısı için önemlidir [16, 139].

APAD^{+} 'ın bağlanmasıyla ilişkili olan yüksek entropi, LDH katalizlemesinde hız sınırlayıcı adım olarak kabul edilen aktif bölge halkasının konformasyonel değişiminin hızına bağlı olarak, APAD^+ kofaktörü NAD^+ ile yer değiştirdiği zaman halkanın daha hızlı açılması ya da APAD^{+} 'ın yüksek oksidasyon potansiyelinden dolayı hidrid transferinin NAD^{+} 'a göre daha hızlı olması, iki kofaktör arasındaki bu kinetik farklılığı açıklamaktadır [76, 98, 111]. Bununla birlikte plazmodiyal LDH ve insan LDH'nın APAD^{+} 'ı kullanma yeteneğindeki farklılık 163. pozisyonunda bulunan farklı aminoasitlerin kofaktör ile olan farklı etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır. APAD^{+} 'da nikotinamid halkasındaki karboksiamidin amid grubu, bir metil grubu ile yer değiştirmiştir. İnsan LDH'ında NAD^{+} 'ın amid grubu, Ser₁₆₃ ve bir su molekülü ile hidrojen bağlı ağ oluşturmakla birlikte APAD^{+} 'ın metil grubu ile bu hidrojen bağının oluşması engellenmektedir. Neticede APAD^+ , insan LDH'ı için zayıf bir kofaktördür. Plazmodiyal LDH'larda ise Leu₁₆₃ APAD^+ ile hidrojen bağı oluşturabilmektedir [109, 111]. İnsan LDH-H₄ ve LDH-M₄ ve *Bacillus stearothermophilus*'un Ser163Leu mutant LDH'larının yabanıl tiplere göre APAD^{+} 'ı çok daha etkin bir şekilde kullanmaları APAD^{+} 'ı kullanma yeteneğinde bu pozisyonun önemini göstermektedir [132, 133, 135]. APAD^+ ile hidrojen bağı oluşturulması 163. pozisyonunda methionin taşıyan *T. gondii* LDH1 ve LDH2 enzimleri için de geçerlidir. Bu iki enzim izoenzimi plazmodiyal LDH'larda olduğu gibi NAD^+ kofaktörüne göre APAD^+ ile daha

yüksek aktivite göstermektedir [76, 121]. 163. pozisyonda methionin taşıyan diğer Apikompleksanlar olan *Eimeria tenella* ve *Theileria parva* LDH enzimlerinin kofaktör özgüllükleri ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Tablo 1.3. Plazmodiyal LDH (*Pf*LDH, *Pv*LDH, *Po*LDH, *Pm*LDH), *Toxoplasma gondii* LDH1 ve LDH2 ve insan LDH'lerinin (LDH-M ve LDH-H) kofaktör özgüllüklerinin karşılaştırılması. [(1): Ref. No: 136, (2): Ref. No: 98, (3): Ref. No:111, (4): Ref. No: 134, (5): Ref. No: 138, (6): Ref. No: 121].

Enzim	Steady-State Kinetik Sabitesi	NADH	NAD ⁺	APADH	APAD ⁺
<i>Pf</i> LDH	K_m (μM)	7 ⁽¹⁾	86 ⁽¹⁾	22±6 ⁽³⁾	123 ⁽¹⁾
		7±0.8 ⁽²⁾	86±10 ⁽²⁾		123±4 ⁽²⁾
		26±1 ⁽³⁾			
		11±2 ⁽⁴⁾	180±24 ⁽⁴⁾		
		14.3±1 ⁽⁵⁾	88.7±1.4 ⁽⁵⁾		178.7±7.5 ⁽⁵⁾
	k_{cat} (min ⁻¹)	2.7x10 ⁴⁽¹⁾	1.7x10 ⁴⁽¹⁾		5.1x10 ⁴⁽¹⁾
		(8.9±0.4)x10 ³⁽²⁾	(3.9±0.2)x10 ³⁽²⁾		(1.5±0.2)x10 ⁴⁽²⁾
		5.8x10 ³⁽⁴⁾	2.4x10 ³⁽⁴⁾		
		(2.2±0.08)x10 ⁴⁽⁵⁾	(0.55±0.02)x10 ⁴⁽⁵⁾		(3.2±0.02)x10 ⁴⁽⁵⁾
	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹)	3.9x10 ⁹⁽¹⁾	2.0x10 ⁸⁽¹⁾		4.1x10 ⁸⁽¹⁾
1.3x10 ⁹⁽²⁾		4.5x10 ⁷⁽²⁾		1.2x10 ⁸⁽²⁾	
5.3x10 ⁸⁽⁴⁾		1.3x10 ⁷⁽⁴⁾			
1.5x10 ⁹⁽⁵⁾		6.2x10 ⁷⁽⁵⁾		1.8x10 ⁸⁽⁵⁾	
<i>Pv</i> LDH	K_m (μM)	7±1.1 ⁽²⁾	155±8 ⁽²⁾	24±1 ⁽³⁾	182±13 ⁽²⁾
		22±1 ⁽³⁾			
	k_{cat} (min ⁻¹)	(7.6±0.2)x10 ³⁽²⁾	(1.4±0.2)x10 ³⁽²⁾		(2.0±0.04)x10 ⁴⁽²⁾
	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹)	4.4x10 ⁷⁽²⁾	9.0x10 ⁶⁽²⁾		1.1x10 ⁸⁽²⁾
<i>Po</i> LDH	K_m (μM)	14±0.9 ⁽²⁾	311±17 ⁽²⁾		408±26 ⁽²⁾
	k_{cat} (min ⁻¹)	(1.6±0.03)x10 ⁴⁽²⁾	(1.5±0.3)x10 ³⁽²⁾		(9.2±0.3)x10 ³⁽²⁾
	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹)	2.3x10 ⁹⁽²⁾	4.8x10 ⁶⁽²⁾		2.3x10 ⁷⁽²⁾
<i>Pm</i> LDH	K_m (μM)	9±0.7 ⁽²⁾	143±11 ⁽²⁾		168±12 ⁽²⁾
	k_{cat} (min ⁻¹)	(7.5±0.2)x10 ³⁽²⁾	(2.3±0.05)x10 ³⁽²⁾		(1.4±0.03)x10 ⁴⁽²⁾
	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹)	5.4x10 ⁷⁽²⁾	1.6x10 ⁷⁽²⁾		8.0x10 ⁷⁽²⁾
<i>Tg1</i> LDH	K_m (μM)	4.2 ⁽⁶⁾	348 ⁽⁶⁾		50 ⁽⁶⁾
	k_{cat} (min ⁻¹)	3.7x10 ⁴⁽⁶⁾	1.3x10 ³⁽⁶⁾		3.4x10 ⁴⁽⁶⁾
	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹)	8.8x10 ⁹⁽⁶⁾	3.7x10 ⁶⁽⁶⁾		6.8x10 ⁸⁽⁶⁾
<i>Tg2</i> LDH	K_m (μM)	1.9 ⁽⁶⁾	640 ⁽⁶⁾		78 ⁽⁶⁾
	k_{cat} (min ⁻¹)	4.3x10 ³⁽⁶⁾	4.5x10 ²⁽⁶⁾		1.3x10 ⁴⁽⁶⁾
	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹)	2.3x10 ⁹⁽⁶⁾	7.0x10 ⁵⁽⁶⁾		1.7x10 ⁸⁽⁶⁾
İnsan LDH-M	K_m (μM)	5 ⁽¹⁾	93 ⁽¹⁾		56 ⁽¹⁾
	k_{cat} (min ⁻¹)	1.8x10 ⁴⁽¹⁾	4.9x10 ³⁽¹⁾		2.4x10 ²⁽¹⁾
	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹)	3.6x10 ⁹⁽¹⁾	5.3x10 ⁷⁽¹⁾		4.2x10 ⁶⁽¹⁾
İnsan LDH-H	K_m (μM)	8 ⁽¹⁾	37 ⁽¹⁾		37 ⁽¹⁾
	k_{cat} (min ⁻¹)	1.3x10 ⁴⁽¹⁾	3.0x10 ³⁽¹⁾		1.7x10 ²⁽¹⁾
	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹)	1.6x10 ⁹⁽¹⁾	8.1x10 ⁷⁽¹⁾		4.6x10 ⁶⁽¹⁾

1.7.6. İnhibitör Çalışmaları

Laktat dehidrogenaz inhibisyonu çalışmalarının büyük bir kısmı pamuk çekirdeğinden izole edilen doğal bir ürün olan gossipol ile yapılmıştır [136]. İnhibitör çalışmaları, gossipol ve türevlerinin, plazmodiyal ve diğer Apikompleksan LDH'larına NADH bağlanmasının yarışmalı inhibitörleri olduklarını göstermiştir [13, 98, 121, 140, 141]. Ancak gossipolün düşük mikromolar konsantrasyonda hem plazmodiyal LDH'ı hem de insan LDH'ını seçici olmadan inhibe ettiği rapor edilmiştir [54, 67]. Ayrıca gossipol yüksek dozda sitotoksiktir. Bu toksisite, molekülün yapısında bulunan aldehid gruplarının proteinlerin serbest amino grupları ile Schiff bazları oluşturmaları ile alakalıdır [142, 143]. Moleküler modelleme çalışmaları, gossipol türevi gossilik laktonun ve gossilik nitril 1,1' diasetatın *P. falciparum* LDH'nın aktif bölge halkasına yakın olan pirüvat/nikotinamid-riboz bölgesine bağlandığını göstermiştir [144]. LDH'nın insan ve *Plasmodium* formları arasında belirgin bir fark sağlayan aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun oluşturduğu yarık [109, 111], enzimin *Plasmodium* formu için gossilik nitril 1,1' diasetatın seçiciliğini açıklamaktadır [136, 144]. Gossipol türevlerinin *P. falciparum* LDH'ı dışında diğer *Plasmodium* türlerindeki LDH'lara bağlanma modeli de nispeten aynı olup [98] *Plasmodium*'lar ile yapılan bu çalışmayı aynı yarık bölgesine sahip olan Apikompleksanlar için de genellemek mümkündür [141]. Örneğin; *Plasmodium* LDH'ını spesifik olarak inhibe eden bileşiklerin *Eimeria tenella* ile de çapraz reaksiyon vermesi gerektiği düşünülmektedir [140]. Diğer Apikompleksan *Toxoplasma gondii*'nin LDH1 ve LDH2 enzimleri de gossipol ve türevleri ile inhibe olmaktadır. Ancak LDH2 enzimi, LDH1'e göre bu inhibitörlere daha duyarlıdır [121]. İlave olarak LDH2 enziminin inhibitörlere duyarlılığı *Plasmodium* LDH'ına benzemektedir [121, 136].

Gossipol analogu 2,3-Dihidroksi-1-naftoik asid ailesinden 8-deoksihemigossilik asid türevleri insan LDH'ına göre *Plasmodium* LDH'ını seçici bir şekilde inhibe etmektedir [54, 67, 136]. Dihidroksinaftoik asid serisi *Toxoplasma gondii*'nin LDH1 ve LDH2 enzimlerinin de yarışmalı inhibitörleridir [121]. LDH1 ve LDH2 enzimlerinin bu inhibitörlere duyarlılığı *Plasmodium* LDH'ı ile karşılaştırıldığı zaman, gossipol türevlerinde görüldüğü gibi LDH2, *Plasmodium* LDH'ına benzemekle birlikte LDH1'den daha duyarlıdır [121, 136].

Antimalarial ilaç klorokinin parazit üzerindeki etki mekanizması bilinmemekle birlikte, sonrasında *Plasmodium* LDH'ına bağlandığı rapor edilmiştir [145]. Ancak plazmodiyal

LDH'nin aktivitesini inhibe ettiği bulunamamıştır. *P. falciparum* LDH ve klorokin arasındaki kompleksin kristallografik yapısı klorokinin kısmen *P. falciparum* LDH'nin kofaktör bağlanma bölgesi içine yerleştiğini ve üçlü kompleks yapıda kofaktörün adenil halkasınıninkine benzer bir pozisyonu işgal ettiğini göstermiştir. Dolayısıyla klorokin *Plasmodium* LDH enzim aktivitesinin NADH'a göre yarışmalı inhibitörü olduğu belirlenmiştir [146]. Klorokin diğer Apikompleksanların LDH enzimleri üzerindeki etkisi henüz rapor edilmemiştir.

Oxamat, pirüvatın yapısal analogu olup *Plasmodium falciparum* LDH'ı için yüksek affinite göstermektedir [54, 127]. Bu bileşik LDH'a pirüvatın bağlanmasının yarışmalı inhibitörüdür [147] ve milimolar aktiviteye sahiptir [54]. Bazı oxamat türevleri seçici *Pf*LDH inhibitörleridir [147]. *Plasmodium*'da olduğu gibi, oxamat türevleri *Toxoplasma gondii*'nin LDH1 ve LDH2 enzimlerinin de yarışmalı inhibitörleridir. Bununla birlikte bu inhibitörlerin yapısındaki değişimlere LDH1 ve LDH2 enzimleri çok az duyarlı olmasına rağmen plazmodiyal LDH duyarlı değildir [121].

Plasmodium falciparum LDH'ı ile yapılan kristallografik çalışmalar azol-bazlı bileşiklerin NAD⁺ kofaktörünün nikotinamid halkasının yanına yerleşerek enzimin aktif bölgesine seçici olarak doğrudan bağlandığını göstermiştir. Bu bağlanma onların *P. falciparum* LDH'ına karşı inhibitör aktivitesi ve insan LDH'ına karşı azaltılmış aktivitesiyle ilişkilidir [14, 142]. Yapılan çalışmalar azol-bazlı bileşiklerin *Plasmodium* LDH'ını insan LDH'ından yaklaşık olarak 100 kat daha düşük konsantrasyonda inhibe ettiğini göstermiştir. Bununla birlikte bu bileşiklerin diğer Apikompleksanlara karşı hiçbir parazitik aktivitesi henüz rapor edilmemiştir [14].

Plazmodiyal LDH ile yapılan inhibitör çalışmaları insan LDH'ına göre yapısal ve kinetik farklılık sağlayan aktif bölge halkasının ve kofaktör bağlanma bölgesinin seçici inhibitörler için bir tutunma bölgesi oluşturduğunu göstermiştir. Dolayısıyla *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenaz enzimindeki aktif bölge halkasının sahip olduğu pentapeptid insersiyonunun ve kofaktör bağlanma bölgesindeki L₁₆₃ aminoasidinin yapısal değişiklikleri tolere edip etmediğinin test edilmesi bütün *Plasmodium*'lar için etkili ve seçici bir inhibitör tasarımı için önemlidir.

1.8. Tez Projesinin Tasarımı ve Hedef Seçimi

Sıtmanın tedavisinde kullanılan antimalariallara karşı direncin ortaya çıkması ve yayılması yeni antimalarialların geliştirilmesini gerekli kılmıştır. *Plasmodium*'ların ideal ilaç hedefleri olarak parazitin infeksiyonu, canlılığı, çoğalması için gerekli olan ve konaktaki eşdeğerinin olmadığı veya konaktaki eşdeğeri ile yapı ve fonksiyon farklılıklarından dolayı ayırt edici bir mekanizmanın belirlendiği, *Plasmodium*'lar için özel hücresel ve metabolik ihtiyaç niteliğine sahip hedefler düşünülmektedir [148]. Bu amaçla *Plasmodium vivax*'ın laktat dehidrogenaz enzimi hedef olarak seçilmiştir.

Plazmodiyal LDH, insan LDH'ına göre aktif bölge halkasında çok sayıda aminoasit değişikliği içermektedir. Bunlar arasında önemli aminoasitler olan Gln₁₀₂, Thr₂₄₆ ve Ile₂₅₀ sırasıyla Lys₁₀₂, Pro₂₄₆ ve Pro₂₅₀ aminoasitleri ile yer değiştirmiştir. Bununla birlikte aktif bölge halkası insan LDH'ına göre pentapeptid insersiyonu içermektedir [109, 111]. *Plasmodium* LDH'nın aktif bölgesindeki bu değişikliklere bağlı olarak, insan LDH'ına göre yüksek derecede seçici bir inhibitör geliştirilmesi için aktif bölge halkası cazip bir hedef olarak görülmektedir [98]. Moleküler modelleme çalışmaları gossipol türevi gossipilik nitril 1,1' diasetatın *Plasmodium* LDH'nın hem nikotinamid hem de pirüvat bağlanma bölgelerine bağlandığını göstermiştir [144]. LDH'nın insan ve *Plasmodium* formları arasında belirgin bir fark sağlayan aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun oluşturduğu yarık [109, 111], enzimin *Plasmodium* formu için bu gossipol türevinin seçiciliğini açıklamaktadır [136, 144].

Yapıya dayalı antimalarial tasarım çalışmalarında *Plasmodium* LDH'nın aktif bölgesi kadar kofaktör bağlanma bölgesi de dikkat çekmektedir. Plazmodiyal LDH'nın, insan LDH'ına göre kofaktör bağlanma bölgesindeki S₁₆₃ aminoasidinin yerine L₁₆₃ aminoasidini taşıması NADH kofaktörünün pozisyonunda değişikliğe neden olmaktadır [18, 19, 98, 110, 113, 114, 116, 117]. Bu farklılık, enzimin katalizleme kinetiğini ve substrat inhibisyonu özelliğini değiştirmektedir [98, 109, 111, 113]. Yapılan çalışmalar, enzimin kofaktör bağlanma bölgesinin yarışmalı inhibitörleri olan 8-deoksihemigossipilik asid türevlerinin insan LDH'ına göre *Plasmodium* LDH'ını seçici bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir [54, 67, 136].

Plazmodiyal LDH'ların aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun oluşturduğu yarık ve kofaktör bağlanma bölgesindeki aminoasit değişikliğine bağlı olarak NADH kofaktörünün pozisyonundaki değişiklik aktif bölgede genişlemiş bir hacim ile

sonuçlanmaktadır [14, 112, 113]. İnsan LDH'ına göre PvLDH'ın yapısal ve kinetik farklılığını sağlayan bu iki bölge seçici inhibitörler için bir tutunma bölgesi oluşturması ve enzimin substrat fazlalığını tolere etmesinde önemli bir rol oynamaktadır [111]. Dolayısıyla *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenaz enzimindeki aktif bölge halkasının sahip olduğu pentapeptid insersiyonunun ve kofaktör bağlanma bölgesindeki L₁₆₃ aminoasidinin yapısal değişiklikleri tolere edip etmediğinin test edilmesi bütün *Plasmodium*'lar için etkili ve seçici bir inhibitör tasarımı için önemlidir. *Plasmodium*'lar dışında aynı zamanda diğer Apikompleksanlara özgü olan bu bölge, çeşitli enzim inhibitörlerini barındırma ve enzim aktivitesini durdurarak parazitin ölümüne sebep olma potansiyeline sahip olduğu için *Plasmodium*'larla birlikte Apikompleksanlar için de genel ilaç tasarım çalışmalarında hedef bölge olarak kullanılabilip kullanılamayacağı konusunda bu tez çalışmasında açıklamalar getirilmesi hedeflenmiştir. Bunun için insanda ve ekonomik olarak önemli olan hayvanlarda ciddi infeksiyonlara yol açan üç Apikompleksan türü olan *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella* ve *Theileria parva*'nın LDH enzimleri model olarak seçilmiştir. Bu tez çalışmasında, PvLDH enziminin kofaktör bağlanma bölgesindeki L₁₆₃ aminoasidinin ve aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun bu üç Apikompleksanın aminoasitleri ile değiştirilmesi sonucu enzimin bu değişiklikleri tolere edip etmediğinin ve yapılan değişikliğin enzim kinetiğini nasıl etkilediğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan *Taq* DNA Polimeraz enzimi, tampon çözeltisi ve $MgCl_2$ solüsyonu Promega (USA)'dan; *Pfu Turbo* DNA Polimeraz enzimi ve tampon çözeltisi Stratagene (USA)'den; DNA'nın kesilmesi için kullanılan *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ve tampon çözeltileri, ligasyon için kullanılan T4 DNA Ligaz enzimi ve tampon çözeltisi Promega (USA)'dan temin edilmiştir.

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

Agaroz jel elektroforezi sonrasında DNA bantlarının molekül ağırlıkları ve konsantrasyonunun tayininde kullanılan “Hyper Ladder I” Bionline (USA)'dan, “Lambda DNA Hind III Digest” Amersham Pharmacia Biotech (USA)'den, “GeneRuler SM1338 Marker” Fermentas (Lithuania)'dan, “100 bp DNA Ladder G2101 Molecular Weight Marker” Promega (USA)'dan temin edilmiştir. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) sonrasında protein bantlarının molekül ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılan “Low Molecular Weight (LMW) Calibration Kit” Amersham Pharmacia Biotech (USA)'den, “Protein Molecular Weight Marker-SM0431” Fermentas (Lithuania)'dan; Western blot sonrasında protein bantlarının molekül ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılan “SDS 7B” Sigma (USA)'dan temin edilmiştir.

Western blot aşamasında kullanılan primer antikor için yabancı tip SDK1 *PfLDH* proteini ile hazırlanan emülsiyonun Yeni Zelanda beyaz tavşanlarına enjeksiyonu ile elde edilmiş olan antikor temin edilmiş [149], sekonder antikor Goat Anti-Rabbit IgG ise Bio-Rad (UK)'dan ticari olarak temin edilmiştir.

Ekspresyonu yapılan proteinin saflaştırılması için kullanılan Ni-NTA Agaroz, QIAGEN (Almanya)'den sağlanmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan diğer bütün kimyasallar BDH, Sigma, Bio-Rad, Roche ve Merck'ten sağlanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonlarında ve DNA dizi analizinde kullanılan primerler MWG-Biotech (Almanya)

2.1.3. *Escherichia coli* Soyu

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

2.1.4. Bakteriyolojik Gelişim İçin Besiyerleri ve Solüsyonlar

Çift Kuvvetli Yeast Ekstrakt-Tripton (2xYT) Buyyon

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

Otoklav ile 121 °C’de 15 dakika sterilizasyon yapılır.

Çift Kuvvetli Yeast Ekstrakt-Tripton (2xYT) Agar

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

Otoklav ile 121 °C’de 15 dakika sterilizasyon yapılır.

Luria-Bertani (LB) Buyyon

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

Otoklav ile 121 °C’de 15 dakika sterilizasyon yapılır.

Luria-Bertani (LB) Agar

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

Otoklav ile 121 °C’de 15 dakika sterilizasyon yapılır.

2xMinimal Tuz

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

Minimal Agar

2xMinimal Tuz*	500 ml/l
% 3,3 Agar*	500 ml/l
% 20 Glukoz**	10 ml/l
% 20 MgSO ₄ .7H ₂ O**	1 ml/l
% 0,1 Tiamin Hidroklorür**	0,5 ml/l

* Otoklav ile 121 °C’de 15 dakika sterilizasyon yapılır.

** 0,2 µm çaplı filtre ile sterilize edilir.

Ampisilin

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

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)

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

2.1.5. Stok Solüsyonlar, Çalışma Solüsyonları ve Tamponlar

50xTAE Tampon Çözeltisi (Tris-Asetat-EDTA)

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

dH₂O ile 1xTAE’ye seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlanır.

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

Sükroz	4 g/10 ml
2 M Trizma Base	0,5 ml/10 ml
0,5 M EDTA	2 ml/10 ml
Bromfenol Mavisi	4 mg/10 ml

Kristal Viyole (CV) Solüsyonu

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

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

Gliserol	500 µl/ml
1xTAE	500 µl/ml
Kristal Viyole	10 µg/ml

CaCl₂ Solüsyonu

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

* Stok 1 M Tris HCl (pH: 7.6) çözeltisinden alınır.

Otoklav ile 121 °C’de 15 dakika sterilizasyon yapılır.

SDS-PAGE Jelleri İçin Örnek Uygulama Tamponu (SDS-PAGE-SAB)

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

5xTank Tamponu

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

dH₂O ile 1xTank tamponuna seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlanır ve 5 defa aynı tampon kullanılabilir.

% 30 Akrilamid/Bis Çalışma Solüsyonu

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

Protein Boyama Solüsyonu

% 0,1 Coomassie Brilliant Mavisi

% 40 Methanol

% 10 Glasiyal Asetik Asit

Boya Uzaklaştırıcı (Destaining) Solüsyon

% 5 Methanol

% 7 Asetik Asit

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

Transfer Tamponu

39 mM Glisin

48 mM Trizma Base

1,3 mM SDS

% 20 Methanol

PBS (Phosphate Buffered Saline, Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi)

0,15 M NaCl 900 ml/l

0,1 M Na₂HPO₄ (pH: 7.4) 100 ml/l

PBS Tween 20

PBS 1000 ml

Tween 20 2 ml

% 5'lik Süt tozu

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

Hücre Lizis Tamponu

50 mM NaH₂PO₄
1500 mM NaCl
50 mM İmidazol
20 mM β-Merkaptoethanol
pH: 8.0

Bu tampon “Protein Saflaştırma Protokolü 1” için kullanılmıştır.

Kolon Yıkama Tamponu 1

50 mM NaH₂PO₄
1500 mM NaCl
70 mM İmidazol
pH: 8.0

Bu tampon “Protein Saflaştırma Protokolü 1” için kullanılmıştır.

Kolon Yıkama Tamponu 2

50 mM NaH₂PO₄
1500 mM NaCl
80 mM İmidazol
pH: 8.0

Bu tampon “Protein Saflaştırma Protokolü 1” için kullanılmıştır.

Kolon Yıkama Tamponu 3

50 mM NaH₂PO₄

1500 mM NaCl

90 mM İmidazol

pH: 8.0

Bu tampon “Protein Saflaştırma Protokolü 1” için kullanılmıştır.

Protein Elüsyon Tamponu 1

50 mM NaH₂PO₄

700 mM NaCl

200 mM İmidazol

pH: 8.0

Bu tampon “Protein Saflaştırma Protokolü 1” için kullanılmıştır.

0,5 M KH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH: 7.5)

0,5 M Na₂HPO₄ (pH: 7.5)

0,5 M KH₂PO₄ ile pH ayarlanır.

Hücre Lizisi ve Kolon Yıkama Tamponu

% 10 0,5 M KH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH: 7.5)

% 10 Gliserol

300 mM NaCl

20 mM İmidazol

Bu tampon “Protein Saflaştırma Protokolü 2” için kullanılmıştır.

Protein Elüsyon Tamponu 2

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

% 10 Gliserol

300 mM NaCl

250 mM İmidazol

Bu tampon “Protein Saflaştırma Protokolü 2” için kullanılmıştır.

Bis-Tris Solüsyonu

0,02 M Bis-Tris

0,05 M KCl

pH: 6.0

Kinetik Ölçüm İçin Pirüvat Çalışma Solüsyonu

2,916 M pirüvat eH_2O 'da (elgastat H_2O) çözülür. 1/3 oranında dilüsyon serileri (972 μM , 324 μM , 108 μM , 36 μM , 12 μM , 4 μM) hazırlanır. Kinetik ölçüm için taze hazırlanmış pirüvat dilüsyon serisi kullanılır.

Kinetik Ölçüm İçin Stok NADH Solüsyonu

200 mM NADH eH_2O 'da (elgastat H_2O) çözülür. -80 °C'de saklanır. Kullanılmadan önce 1/10 oranında seyreltilerek 20 mM konsantrasyonda NADH solüsyonu hazırlanır.

Kinetik Ölçüm Tamponu

50 mM Trizma Base

50 mM KCl

pH: 7.5

Taze Millipore saf su ile hazırlanır.

2.1.6. Primerler

*Pv*LDH enzimini kodlayan genin amplifikasyonu, genin aktif bölge halkası ve kofaktör bağlanma bölgesindeki yönlendirilmiş mutagenез çalışmaları ve altklonlama sonrası DNA dizi analizi için aşağıdaki spesifik primerler kullanılmıştır.

Şekil 2.2.'de *Pv*LDH enzimini kodlayan genin nükleotid dizisi ve mutagenез çalışmaları için kullanılan primerlerin ve DNA dizi analizi primerlerinin gen üzerindeki yerleri belirtilmiştir.

2.1.6.1. 5' Uç Primeri

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

2.1.6.2. 3' Uç Primerleri

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

Pv15: 5' TTT TCT GCA GTT AGT GAT GGT GAT GGT GAT GAA TGA GCG CCT
PstI Stop 6xHis Tag
TCA TCC 3'

2.1.6.3. Yönlendirilmiş Mutagenез Primerleri

PvLM1Tg1F: 5' GGA AAG AGC GAC **TCC** GAA TGG AAC CG 3'
K→S

PvLM1Tg1R: 5' CGG TTC CAT TCG **GAG** TCG CTC TTT CC 3'
K→S

PvLM2Tg1F: 5' GGA AAG AGC GAC TCC GAA TGG AGC CGA GAT GAT TTA C 3'
K→S N→S

PvLM2Tg1R: 5' GTA AAT CAT CTC GGC TCC ATT CGG AGT CGC TCT TTC C 3'
N→S K→S

PvLM1EtF: 5' GGA AAG AGC GAC CAA GAA TGG AAC CG 3'
K→Q

PvLM1EtR: 5' CGG TTC CAT TCT TGG TCG CTC TTT CC 3'
K→Q

PvLM2EtF: 5' GGA AAG AGC GAC CAA GAA TGG TCG CGA GAT GAT TTA C 3'
K→Q N→S

PvLM2EtR: 5' GTA AAT CAT CTC GCG ACC ATT CTT GGT CGC TCT TTC C 3'
N→S K→Q

PvLM1TpF: 5' CCA GGA AAG AGC AAT AAG GAA TGG AAC 3'
D→N

PvLM1TpR: 5' GTT CCA TTC CTT ATT GCT CTT TCC TGG 3'
D→N

PvLM2TpF: 5' CCA GGA AAG AGC AAT GAG GAA TGG AAC CGA G 3'
D→N K→E

PvLM2TpR: 5' CTC GGT TCC ATT CCT CAT TGC TCT TTC CTG G 3'
K→E D→N

PvL163MF: 5' TAA AAT CAT CGG AAT GGG TGG TGT GCT AG 3'
L→M

PvL163MR: 5' CTA GCA CAC CAC CCA TTC CGA TGA TTT TA 3'
L→M

PvL163SF: 5' TAA AAT CAT CGG ATC GGG TGG TGT GCT AG 3'
L→S

PvL163SR: 5' CTA GCA CAC CAC CCG ATC CGA TGA TTT TA 3'
L→S

2.1.6.4. Dizi Analizi Primerleri

Pv16: 5' CCC CAA GGA AAG GCA CTA GA 3'

Pv17: 5' CCA TTT CGA TGA TGG CAG C 3'

```
(Pv7)→
ATGACGCCGAAACCCAAAATTGTGCTCGTCGGGTCGGGCATGATCGGAGGCGTGATGGCC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACTGCGGCTTTGGGTTTTAACACGAGCAGCCCGTACTAGCCTCCGCACTACCGG
aa:  MetThrProLysProLysIleValLeuValGlySerGlyMetIleGlyGlyValMetAla
      M  T  P  K  P  K  I  V  L  V  G  S  G  M  I  G  G  V  M  A

ACGCTGATTGTGCAGAAGAACCTGGGGGACGTAGTGATGTTTGACGTAGTGAAAAACATG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
TGCGACTAACACGTCTTCTTGGACCCCCCTGCATCACTACAACTGCATCACTTTTGTAC
aa:  ThrLeuIleValGlnLysAsnLeuGlyAspValValMetPheAspValValLysAsnMet
      T  L  I  V  Q  K  N  L  G  D  V  V  M  F  D  V  V  K  N  M

(Pv16)→
CCCCAAGGAAAGGCACTAGATACGTCTCACTCGAATGTGATGGCTTATTCCAATTGCAAG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GGGGTTTCCTTTCCGTGATCTATGCAGAGTGAGCTTACACTACCGAATAAGGTAAACGTTT
aa:  ProGlnGlyLysAlaLeuAspThrSerHisSerAsnValMetAlaTyrSerAsnCysLys
      P  Q  G  K  A  L  D  T  S  H  S  N  V  M  A  Y  S  N  C  K

GTGACTGGCTCGAACTCGTATGATGACTTGAAGGGAGCCGACGTGGTGATCGTCACTGCG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CACTGACCGAGCTTGAGCATACTACTGAACTCCCTCGGCTGCACCACTAGCAGTGACGC
aa:  ValThrGlySerAsnSerTyrAspAspLeuLysGlyAlaAspValValIleValThrAla
      V  T  G  S  N  S  Y  D  D  L  K  G  A  D  V  V  I  V  T  A
```

Şekil 2.2. PvLDH enzimini kodlayan genin nükleotid dizisi ve enzimin aminoasit dizisi [110]. Çalışmada kullanılan primerlerin gen üzerindeki konumları gölgelendirilerek gösterilmiştir.

```

(PvLM1Tg1F, PvLM2Tg1F, PvLM1EtF, PvLM2EtF, PvLM1TpF, PvLM2TpF)→
GGATTTACTAAAGCACCAGGAAAGAGCGACAAGGAATGGAACCGAGATGATTTACTCCCC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCTAAATGATTTTCGTGGTCCTTTCTCGCTGTTCTTACCTTGGCTCTACTAAATGAGGGG
aa: GlyPheThrLysAlaProGlyLysSerAspLysGluTrpAsnArgAspAspLeuLeuPro
    G F T K A P G K S D K E W N R D D L L P
←(PvLM1Tg1R, PvLM2Tg1R, PvLM1EtR, PvLM2EtR, PvLM1TpR, PvLM2TpR)

TTGAATAACAAAATTATGATTGAGATTGGGGGACATATTAAGAACCTTTGCCCCAATGCC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
AACTTATTGTTTTAATACTAACTCTAACCCCTGTATAATTCTTGAAACGGGGTTACGG
aa: LeuAsnAsnLysIleMetIleGluIleGlyGlyHisIleLysAsnLeuCysProAsnAla
    L N N K I M I E I G G H I K N L C P N A

TTTATCATTGTGGTGACGAACCCAGTGGACGTGATGGTGCAGTTACTCTTCGAGCATTCC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
AAATAGTAACACCACTGCTTGGGTCACCTGCACTACCACGTCAATGAGAAGCTCGTAAGG
aa: PheIleIleValValThrAsnProValAspValMetValGlnLeuLeuPheGluHisSer
    F I I V V T N P V D V M V Q L L F E H S

(PvL163MF, PvL163SF)→
GGAGTCCCAAAAAATAAAATCATCGGATTAGGTGGTGTGCTAGATACATCTAGACTGAAA
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
CCTCAGGGTTTTTTATTTTAGTAGCCTAATCCACCACACGATCTATGTAGATCTGACTTT
aa: GlyValProLysAsnLysIleIleGlyLeuGlyGlyValLeuAspThrSerArgLeuLys
    G V P K N K I I G L G G V L D T S R L K
←(PvL163MR, PvL163SR)

TATTACATATCGCAGAAGTTGAACGTCTGCCCAGAGATGTTAATGCACTCATTGTCTGGT
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
ATAATGTATAGCGTCTTCAACTTGACAGCGGGCTCTCTACAATTACGTGAGTAACAGCCA
aa: TyrTyrIleSerGlnLysLeuAsnValCysProArgAspValAsnAlaLeuIleValGly
    Y Y I S Q K L N V C P R D V N A L I V G

GCACATGGGAACAAGATGGTTCTCTGAAAAGGTACATCACAGTTGGAGGTATCCCATTG
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
CGTGTACCCTTGTTCTACCAAGAGGACTTTTCCATGTAGTGTCAACCTCCATAGGGTAAC
aa: AlaHisGlyAsnLysMetValLeuLeuLysArgTyrIleTyrValGlyGlyIleProLeu
    A H G N K M V L L K R Y I T V G G I P L

CAAGAATTTATTAATAACAAAAAGATTACAGATGAAGAAGTGGAAGGCATATTTGATCGC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
GTTCTTAAATAATTATTGTTTTTCTAATGTCTACTTCTTCACCTTCCGTATAAACTAGCG
aa: GlnGluPheIleAsnAsnLysLysIleThrAspGluGluValGluGlyIlePheAspArg
    Q E F I N N K K I T D E E V E G I F D R

```

Şekil 2.2.’nin devamı. PvLDH enzimini kodlayan genin nükleotid dizisi ve enzimin aminoasit dizisi [110]. Çalışmada kullanılan primerlerin gen üzerindeki konumları gölgelendirilerek gösterilmiştir.

```

ACTGTCAACACTGCTTTGGAGATTGTGAACCTCCTTGCCTCTCCTTATGTTGCCCCAGCT
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
TGACAGTTGTGACGAAACCTCTAACACTTGGAGGAACGGAGAGGAATACAACGGGGTCGA
aa: ThrValAsnThrAlaLeuGluIleValAsnLeuLeuAlaSerProTyrValAlaProAla
T V N T A L E I V N L L A S P Y V A P A

GCTGCCATCATCGAAATGGCCGAATCTTATTTGAAGGATATAAAGAAAGTGCTTGTGTGT
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
CGACGGTAGTAGCTTTACCGGCTTAGAATAAACTTCCTATATTTCTTTACGAACAAACA
aa: AlaAlaIleIleGluMetAlaGluSerTyrLeuLysAspIleLysLysValLeuValCys
A A I I E M A E S Y L K D I K K V L V C
← (Pv17)

TCCACTCTACTAGAGGGACAATACGGCCACAGCAACATCTTTGGTGGTACTCCTCTCGTT
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
AGGTGAGATGATCTCCCTGTTATGCCGGTGTCTGTTGTAGAAACCACCATGAGGAGAGCAA
aa: SerThrLeuLeuGluGlyGlnTyrGlyHisSerAsnIlePheGlyGlyThrProLeuVal
S T L L E G Q Y G H S N I F G G T P L V

ATCGGGGGCACCGGAGTTGAGCAAGTCATCGAGTTGCAGCTGAATGCCGAGGAGAAGACC
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
TAGCCCCCGTGGCCTCAACTCGTTCAGTAGCTCAACGTCGACTTACGGCTCCTCTTCTGG
aa: IleGlyGlyThrGlyValGluGlnValIleGluLeuGlnLeuAsnAlaGluGluLysThr
I G G T G V E Q V I E L Q L N A E E K T

AAGTTCGACGAGGCAGTTGCGGAGACTAAAAGGATGAAGGCGCTCATTTAA
901 -----+-----+-----+-----+-----+ 951
TTCAAGCTGCTCCGTCAACGCTCTGATTTTCCTACTTCCGCGAGTAAATT
aa: LysPheAspGluAlaValAlaGluThrLysArgMetLysAlaLeuIleEnd
K F D E A V A E T K R M K A L I
← (Pv13, Pv15)

```

Şekil 2.2.'in devamı. *Pv*LDH enzimini kodlayan genin nükleotid dizisi ve enzimin aminoasit dizisi [110]. Çalışmada kullanılan primerlerin gen üzerindeki konumları gölgelendirilerek gösterilmiştir.

2.2. Metot

2.2.1. Primerlerin Tasarlanması

*Pv*LDH ve diğer mutagenез genlerinin amplifikasyonu, *Pv*LDH geninin aktif bölge halkası ve kofaktör bağlanma bölgesindeki yönlendirilmiş mutagenез çalışmaları ve altklonlama sonrası DNA dizi analizi için spesifik primerler kullanılmıştır. Amplifikasyon ve yönlendirilmiş mutagenез primerleri tasarlanırken, altklonlama yapılan pKK223-3 vektöründe eşdeğer dizisi olmayan, sadece gene özgül olan diziler primer dizisi olarak

tasarlanmıştır. Amplifikasyon primerlerinin dizileri, gene özgül dizilerle birlikte restriksiyon endonükleaz enzimlerinin (*EcoRI* ve *PstI*) kesim bölgelerine ait diziler, 6xHis Tag etiketi, stop kodonu gibi ilave dizileri de içermektedir. Yönlendirilmiş mutagenез primerleri mutagenез bölgelerinde *PvLDH* geninin aminoasit kodonu yerine değiştirilmek istenen aminoasidin kodonu yerleştirilerek tasarlanmıştır. DNA dizi analizi için kullanılan primerler ise her iki yönde sekanslama ile genin tam uzunluğunun elde edileceği gen bölgeleri seçilerek tasarlanmıştır. PCR sırasında kullanılacak primer çiftlerinin erime sıcaklıklarının (T_m , Melting Temperature) birbirine denk ya da yakın olması sağlanmıştır. Bu primer çiftleri arasında dimer oluşumuna yol açacak bir eşlenikliğin ya da primerlerin kendi içlerinde saç tokası oluşturmaya neden olacak karşılıklı bir eşlenikliğin olmamasına dikkat edilmiştir.

2.2.2. Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid DNA içeren *E. coli* bakteri soyu 100 µg/ml ampisilin içeren çift kuvvetli (2x) YT agar besiyerinde bir gece geliştirilir. Seçilen kolonilerden bir tanesi steril bir kürdan yardımıyla 100 µg/ml ampisilin içeren 5 ml 2xYT buyyona aktarılır ve bir gece 37 °C'de ve 100 rpm'de inkübe edilir. 1,4 ml bir gecelik kültür 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınır ve DNA QIAprep® Miniprep Kit (QIAGEN) kullanılarak izole edilir [152].

2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Yönlendirilmiş Mutagenез

Yönlendirilmiş mutagenез, Eppendorf Mastercycler Personal Thermalcycler cihazı kullanılarak PCR metodu ile iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak *PvLDH*'ın mutagenез bölgeleri ile çakışan iki mutant DNA fragmenti (A ve B fragmentleri) elde edilmiştir. Bunun için *PvLDH* geninin zincirlerine komplementer Pv7 ve Pv13 (veya Pv15) uç primerleri ile uygun mutagenез primerleri olmak üzere 4 primer kullanılmıştır (Tablo 2.1.). A fragmentini elde etmek için 5' Uç Primeri-Mutagenез Primeri 2 primer çifti, B fragmentini elde etmek için Mutagenез Primeri 1-3' Uç Primeri primer çifti kullanılmıştır (Şekil 2.3.).

PCR şartları aşağıda verilmiştir:

10x <i>Pfu</i> Tamponu	5 µl (enzim ile beraber verilmiştir.)
dNTP'ler	5 µl (stok; final konsantrasyonu 2 mM olan dNTP karışımı)
5' Primeri	2,5 µl (stok; 20 pmol/µl)
3' Primeri	2,5 µl (stok; 20 pmol/µl)
Kalıp DNA	1,5 µl
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	0,5 µl (stok; 2,5 u/µl)
Steril dH ₂ O	33 µl (son hacim 50 µl olacak şekilde bırakılır.)

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

Tablo 2.1. *PvLDH* geninin üzerinde yapılan yönlendirilmiş mutagenезler için kullanılan primer çiftleri

<i>PvLDH</i> Mutagenezi	A Fragmenti İçin Primer Çifti	B Fragmenti İçin Primer Çifti
	5' Primeri-3' Primeri	5' Primeri-3' Primeri
PvL163M	Pv7 ve PvL163MR	PvL163MF ve Pv13/Pv15
PvL163S	Pv7 ve PvL163SR	PvL163SF ve Pv13/Pv15
PvLM1Tg1	Pv7 ve PvLM1Tg1R	PvLM1Tg1F ve Pv13/Pv15
PvLM2Tg1	Pv7 ve PvLM2Tg1R	PvLM2Tg1F ve Pv13/Pv15
PvLM1Et	Pv7 ve PvLM1EtR	PvLM1EtF ve Pv13/Pv15
PvLM2Et	Pv7 ve PvLM2EtR	PvLM2EtF ve Pv13/Pv15
PvLM1Tp	Pv7 ve PvLM1TpR	PvLM1TpF ve Pv13/Pv15
PvLM2Tp	Pv7 ve PvLM2TpR	PvLM2TpF ve Pv13/Pv15

PCR'ın tamamlanmasının ardından A ve B fragmentleri %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. DNA bantlarını içeren jel dilimleri QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) kullanılarak saflaştırılmıştır [153]. Jelden saflaştırılan DNA fragmentlerinin yaklaşık konsantrasyonları agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir.

İkinci aşama olarak %1'lik agaroz jelden saflaştırılan mutant DNA'nın A ve B fragmentlerini birleştirmek için PCR yapılmıştır. Konsantrasyonları esas alınarak

belirlenen miktarlarda kullanılan A ve B fragmentleri ile son hacim 25 µl olacak şekilde gerçekleştirilen PCR şartları aşağıda verilmiştir:

10x <i>Pfu</i> Tamponu	2,5 µl (enzim ile beraber verilmiştir.)
dNTP'ler	2,5 µl (stok; final konsantrasyonu 2 mM olan dNTP karışımı)
A Fragmenti	X µl
B Fragmenti	X µl
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	0,5 µl (stok; 2,5 u/µl)
Steril dH ₂ O	X µl (son hacim 25 µl olacak şekilde bırakılır.)

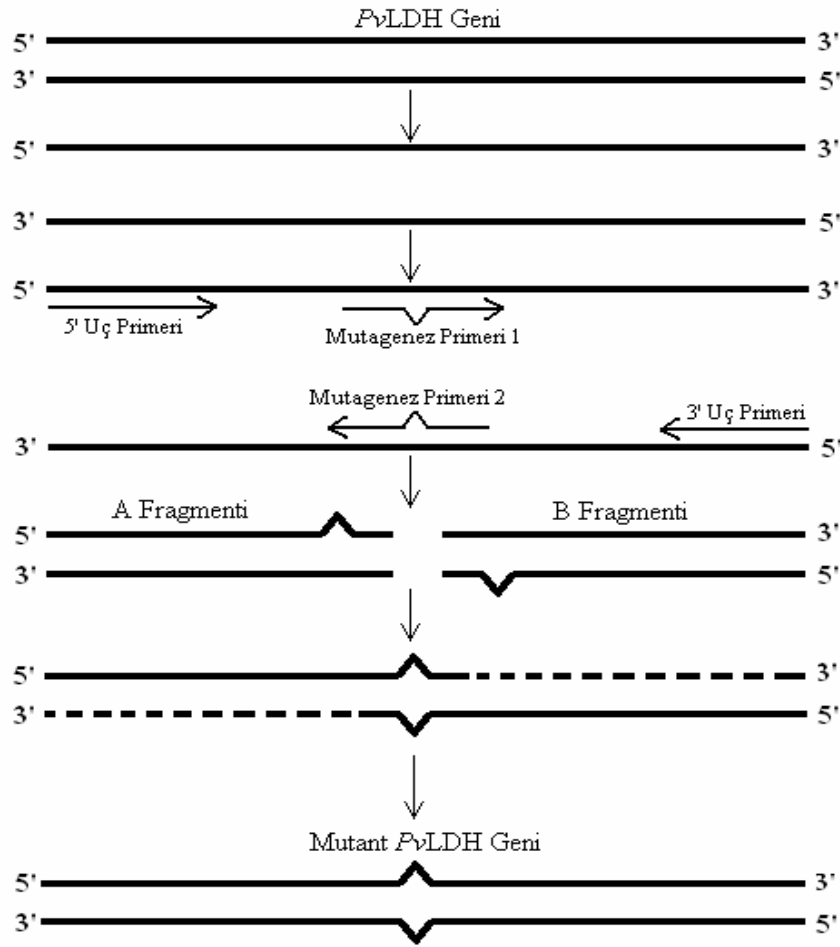
Amplifikasyon 94 °C'de 2 dakika, 50 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika ve 7 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

Bunu takiben uç primerlerin (Pv7 ve Pv13/Pv15) ve diğer PCR bileşenlerinin aşağıdaki miktarlarda ilavesi ile reaksiyon 50 µl'ye tamamlanmıştır:

10x <i>Pfu</i> Tamponu	2,5 µl (enzim ile beraber verilmiştir.)
dNTP'ler	2,5 µl (stok; final konsantrasyonu 2 mM olan dNTP karışımı)
5' Primeri	2,5 µl (stok; 20 pmol/µl)
3' Primeri	2,5 µl (stok; 20 pmol/µl)
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	0,5 µl (stok; 2,5 u/µl)
Steril dH ₂ O	14,5 µl (son hacim 25 µl olacak şekilde bırakılır.)

Amplifikasyon 94 °C'de 1,5 dakika, 55 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2,5 dakika ve 20 döngü olarak yapılmıştır.

PCR ile yönlendirilmiş mutagenез işlemi Şekil 2.3.'de verilmiştir:



Şekil 2.3. PCR ile yönlendirilmiş mutagenезin gerçekleştirilmesi [90].

2.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi BIO-RAD Sub-Cell® GT horizontal jel elektroforez sistemi ile gerçekleştirilmiş olup amaca bağlı olarak iki farklı şekilde boyanmış olan jel elektroforezi yapılmıştır:

2.2.4.1. Etidyum Bromür ile Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi

Bütün analitik amaçlı elektroforez çalışmalarında etidyum bromür (EtBr) ile boyanan agaroz jel kullanılmıştır. Bunun için;

% 1 agaroz içeren 1xTAE tampon çözeltisi kaynatılır. Oda sıcaklığında 55-65 °C'ye kadar soğutulur. Bu esnada jelin döküleceği jel tepsi hazırlanır, taraklar yerine

yerleştirilir. Jeli tepsiye dökmeden önce son konsantrasyon 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür ilave edilir. Jel tepsiye dökülür ve katılaşması beklenir. Katılaştıktan sonra tarak çıkarılır. Jel üzerindeki kuyucuklara bırakılacak olan DNA örneklerine 2 µl EtBr-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 gerçekleştirilir. Jel ortamında, DNA'lar moleküler ağırlıklarına bağlı olarak bir ayırma tabi tutulurlar. Elektroforez sonrası DNA bantları, 254-312 nm dalga boyunda UV (ultraviyole) transilluminatöründe görüntülenir. Etidyum bromür, DNA'ya bağlanarak UV ışık altında flouresan etki göstermektedir. Bu sayede çok düşük miktarlardaki DNA'nın bile varlığını belirlemek mümkün olmaktadır [154].

2.2.4.2. Kristal Viyole ile Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi

Bütün preparatif amaçlı elektroforez çalışmalarında kristal viyole ile boyanan agaroz jel kullanılmıştır. Bunun için;

% 1 agaroz içeren 1xTAE tampon çözeltisi kaynatılır. Oda sıcaklığında 55-65 °C'ye kadar soğutulur. Bu esnada jelin döküleceği jel tepsi hazırlanır, taraklar yerine yerleştirilir. Jeli tepsiye dökmeden önce son konsantrasyon 2 µg/ml olacak şekilde kristal viyole ilave edilir. Jel tepsiye dökülür ve katılaşması beklenir. Katılaştıktan sonra tarak çıkarılır. Jel üzerindeki kuyucuklara bırakılacak olan DNA örneklerine CV-SAB tamponundan 2 µl ilave edilir. Elektroforez 2 µg/ml kristal viyole içeren 1xTAE tampon çözeltisi ile 40-60 mA'da gerçekleştirilir. Elektroforez süresince DNA bantlarının ayırımı izlenir. Bantlar jelin 2/3'ünü ilerleyinceye kadar elektroforez işlemine devam edilir. DNA bantları beyaz ışık kutusunda görüntülenir [155, 156].

2.2.5. DNA'nın Jelden Geri Kazanılması

Elektroforez sonrası jelden dilimler halinde kesilen spesifik DNA bantları 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine bırakılmıştır ve DNA, QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) kullanılarak saflaştırılmıştır [153].

2.2.6. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile DNA'nın Kesilmesi (Digest)

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

	<u>DNA Örneği</u>	<u>pKK223-3</u>
DNA	30 µl	5 µg
10xTampon H (enzim ile beraber verilmiştir.)	4 µl	1 µl
<i>EcoRI</i> (12 u/µl)	2 µl	2 µl
<i>PstI</i> (10 u/µl)	2 µl	2 µl
Steril dH ₂ O	2 µl	X µl (10 µl olacak şekilde)

Reaksiyon 37 °C'deki su banyosunda 1,5 saat olarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra DNA örnekleri kristal viyole ile boyalı jelde yürütülmüştür ve QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) kullanılarak jelden saflaştırılmıştır [153].

2.2.7. Klonlanacak Olan DNA ve Vektör DNA'sının Birleştirilmesi (Ligasyon)

DNA örnekleri, *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildikten sonra örneklerin konsantrasyonu dikkate alınarak ligasyon yapılmıştır.

Ligasyon reaksiyonu ve bileşenleri aşağıda verilmiştir:

10xLigasyon Tamponu	1 µl
İnsert	100 ng
Vektör	100 ng
T4 DNA Ligaz (3 u/µl)	1 µl
Steril dH ₂ O	X µl

Ligasyon reaksiyonu toplam 10 µl olacak şekilde steril dH₂O ilave edilmiştir. Ligasyon, örnekler 4 °C'de bir gece bekletilerek gerçekleştirilmiştir.

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

E. coli hücreleri 2xYT agarda 37 °C’de bir gece inkübe edilir. İnkübasyon sonrası tek bir koloni steril bir kürdan yardımı ile alınır, 5 ml 2xYT buyyon içerisine atılır ve 37 °C’de 100 rpm’de çalkalamalı etüvde bir gece inkübe edilir. Bir gecelik kültürden 500 µl alınarak 250 ml’lik erlendeki 50 ml 2xYT buyyona inoküle edilir. OD₆₀₀’deki hücre yoğunluğu 0,3-0,4 arasında bir değere ulaşınca kadar inkübe edilir. Kültür belirtilen yoğunluğa ulaşınca iki Qakridge tüpüne bölünür. 25 ml’lik kültürün her biri 5.000 rpm’de 5 dakika boyunca 4 °C’de santrifüjlenerek hücreler çöktürülür. Süpernatant (üstte kalan sıvı faz) dökülür. Pelet (altta kalan çökelti) üzerine 25 ml CaCl₂ solüsyonu ilave edilir. 30 dakika buz içerisinde bekletilir. 5.000 rpm’de 5 dakika 4 °C’de santrifüj edilir. Bu aşamada tüpleri sarsmamaya dikkat edilir. Süpernatant dökülür. Pelete 1 ml CaCl₂ solüsyonu ilave edilir. 1,5-2 saat buz içerisinde bekletilen hücreler ya hemen transformasyonda kullanılır ya da daha sonra kullanılmak üzere sıvı nitrojen içerisinde gliserol stoğu hazırlanarak -80 °C’de saklanır [154].

2.2.9. Transformasyon

Ligasyonu yapılmış örneğin üzerine hazırlanan kompetant hücreden 200 µl ilave edilir ve karıştırılır. 30 dakika buzda bekletilir. Daha sonra 42 °C’deki su banyosunda 90 saniye süreyle sıcak şoku uygulanır. Bu aşamada tüpler kesinlikle sarsılmamalıdır. Derhal 300 µl 2xYT buyyon ilave edilir. Çok iyi bir şekilde karıştırılır. 30 dakika 37 °C’de gerçekleştirilen inkübasyon sonrası 100 µl/ml ampisilin içeren 2xYT agar besiyeri içeren petrilere ekim yapılır [154].

2.2.10. Koloni PCR

Altıklonlama sonrası besiyeri üzerinde gelişen kolonilere iki ayrı steril kürdan yardımı ile dokunulur. Kürdanlardan birisi 100 µl/ml ampisilin içeren 2xYT 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. Kürdan, koloni kalıntısı tamamen ayrılınca kadar su içerisinde karıştırılır. Daha

sonra örnek 10 dakika kaynatılır, 13.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilir [154]. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatantın 10 µl’si kalıp olarak kullanılarak aşağıda şartları verilen reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

10x <i>Taq</i> tamponu	5 µl (enzim ile beraber verilmiştir.)
MgCl ₂	3 µl (stok; 25 mM)
dNTP’ler	5 µl (stok; final konsantrasyonu 2 mM olan dNTP karışımı)
Pv7 primeri	2,5 µl (stok; 20 pmol/µl)
Pv13/Pv15 primeri	2,5 µl (stok; 20 pmol/µl)
Kalıp DNA	10 µl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	0,5 µl (stok; 5 u/µl)
Steril dH ₂ O	21,5 µl (son hacim 50 µl olacak şekilde bırakılır.)

Amplifikasyon 94 °C’de 1,5 dakika, 55 °C’de 2 dakika, 72 °C’de 2 dakika ve 20 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

Koloni PCR’dan pozitif sonuç alınması durumunda inkübasyona bırakılan kültürden hem stok kültür hazırlanmış hem de plazmid DNA hazırlanarak örnekler DNA dizilemesine gönderilmiştir.

2.2.11. Stok Kültürün Hazırlanması

Bir mikrosantrifüj tüpüne 0,2 µm çaplı filtre ile sterilize edilmiş % 50 gliserolden 300 µl bırakılır. Üzerine 700 µl bakteri kültürü bırakılır. Kültür ve gliserolün homojen bir şekilde karışması için mikrosantrifüj tüpü vortekslenir ve derhal sıvı nitrojen içerisine atılır. Stok kültür donduktan sonra -80 °C’de saklanır [154].

2.2.12. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

SDS-PAGE, BIO-RAD Mini-PROTEAN® 3 Cell jel elektrofrez sistemi kullanılarak yapılmıştır. Proteinleri ayırmak için kullanılan ayırma jeli ve yükleme jeli aşağıdaki gibi hazırlanmıştır [157]:

Ayırma jeli (% 12)

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

Yükleme jeli (% 4)

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

Örnekler jele yüklenmeden önce eşit miktarda SDS-PAGE-SAB boyası ilave edilerek 5 dakika kaynatılır. Elektroforez için 1xTank tamponu kullanılır ve bromfenol mavisi jelin sonuna gelinceye kadar 20 mA’da akım uygulanır. Elektroforez sonrası jel, 37 °C’de 1 saat süreyle boyanır ve sonrasında protein bantları görünür hale gelinceye kadar boya uzaklaştırıcı solüsyon ile yıkanır. Jeller, fotoğrafları alındıktan sonra jel kurutma sistemi ile kurutularak saklanır [157].

SDS-PAGE metodu, aynı zamanda hücre ekstraktlarının genel analizini yapmak için kullanılmıştır. Bunun için 500 µl hücre kültürü 13.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek pelet 50 µl dH₂O ile çözülür. Eşit hacimde SDS-PAGE-SAB boyasının ilavesinden sonra 5 dakika kaynatılır ve elektroforez işlemi yapılır [154].

2.2.13. Western Blot ile Mutant PvLDH Proteinlerinin Belirlenmesi

Blotlama öncesinde, Bölüm 2.2.13.'de anlatıldığı gibi SDS-PAGE ile proteinlerin jelde ayrılması sağlanır. Immobilon-P transfer membranı (Millipore) jel büyüklüğünde kesilir. Filtre kağıtları ve fiberpedlerle birlikte 1 saat transfer tamponu içerisinde bekletilir. Elektroforez sonrasında jel 15 dakika transfer tamponu içerisinde bekletilir. Western blot tekniğine özgü kasetin kapağı açılır. Alt tarafa sırasıyla fiberped ve filtre kağıdı ve onun üzerine jel yerleştirilir. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek membran ve tekrar bir filtre kağıdı yerleştirilir. En son yeni bir fiberped bırakılır. Kasetin kapağı kapatılır ve elektroforez tankına yerleştirilir. Tankta buz ünitesi yerleştirildikten sonra transfer tamponu ile doldurulur ve güç kaynağına bağlanarak 100 V'da 1 saat akım verilir. Blotlama manyetik karıştırıcı üzerinde gerçekleştirilerek ısının dağılması sağlanır. Blotlama sonrası membran, PBS Tween 20'de 10 dakika yıkanır. % 5'lik yağsız süt tozu içerisinde 4 °C'de bir gece bloklama yapılır. Bloklamadan sonra PBS Tween 20'de 10 dakika yıkanır. % 5'lik süt tozu ile 1/2.000 oranında seyreltilmiş primer antikor ilave edilir. Oda sıcaklığında 1 saat bekletilir. 10 dakika PBS Tween 20'de yıkama işlemi 3 defa tekrar edilir. % 5'lik süt tozu ile 1/12.000 oranında seyreltilmiş sekonder antikor ilave edilir. Oda sıcaklığında 1 saat bekletilir. Yine aynı şekilde 10 dakika PBS Tween 20'de yıkama işlemi 3 defa tekrar edilir. Yıkama sonrasında 60 mg 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), 100 ml PBS, 100 µl H₂O₂ içerisinde bantlar belirinceye kadar bekletilir. Daha sonra dH₂O içerisine alınarak reaksiyon durdurulur [149, 154].

2.2.14. Mutant Laktat Dehidrogenaz Enzimlerinin Aktivitelerinin Ölçülmesi

Mutant PvLDH genini içeren *E. coli* hücreleri 100 µg/ml ampisilin içeren 2xYT buyyon içerisinde 37 °C'de ve 100 rpm'de bir gece inkübe edilir. Bir gecelik kültürün 500 µl'si 100 µg/ml ampisilin içeren 50 ml 2xYT buyyon içerisine inoküle edilir ve 37 °C'de 100 rpm'de OD₆₀₀: 0,6'ya ulaşmaya kadar inkübe edilir. 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) ilavesinden sonra belirli aralıklarla (1 saat, 2 saat, 3 saat, 5 saat, bir gecelik) kültür örnekleri alınır [108].

1 ml kültür 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Pelet 500 µl, 50 mM TEA, pH: 7.5 içerisinde çözülür. Hücreler, sonikatör (Bandelin Sonopuls, Almanya) ile güç % 20'de iki

defa 10 saniye parçalanır. 5 dakika buz içerisinde bekletilir. 13.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant LDH aktivitesinin ölçümü için temiz bir tüpe alınır [108].

Mutant *Pv*LDH enzimlerinin aktivitelerinin ölçülmesi, UNICAM UV-Visible spektrofotometre kullanılarak NADH’nin NAD⁺a çevrilmesi ile 340 nm’deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranı takip edilerek yapılır. Bütün reaksiyonlar 50 mM KCl içeren 20 mM Bis-Tris solüsyonu, pH: 6.0 ile 25 °C’de gerçekleştirilir. Reaksiyon için 500 mM pirüvat ve 50 mM NADH kullanılır. 1 ml’lik küvete enzim ve NADH solüsyonları bırakılır ve en son pirüvat ilavesi ile reaksiyon başlatılır. Aktivite, 10 mM ve 1 mM pirüvat konsantrasyonlarında ölçülür [108]. LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiştir. Elde edilen sonuçlar temel biyoistatistik programlarının kombinasyonunu içeren Prism 5.0 yazılımı (GraphPad) kullanılarak analiz edilmiştir [158].

2.2.15. Mutant *Pv*LDH Proteinlerinin Saflaştırılması

Mutant *Pv*LDH proteinlerinin saflaştırılması için iki farklı protokol kullanılmıştır:

2.2.15.1. Mutant *Pv*LDH Proteinlerinin Saflaştırılması İçin Protokol 1

Bu protokol, bu çalışma gibi yine 104T215 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında tamamlanan bir yüksek lisans tez çalışması ile bu tez arasında proje gereği ortak olarak yürütülmüştür.

Saflaştırma öncesi mutant *Pv*LDH genini içeren *E.coli* hücreleri 100 µg/ml ampisilin içeren 2xYT buyyon içerisinde 37 °C’de ve 100 rpm’de bir gece inkübe edilir. Bir gecelik kültür, 100 µg/ml ampisilin içeren 50 ml 2xYT buyyon içerisine 1:60 oranında (833 µl) inoküle edilir. OD₆₀₀’deki hücre yoğunluğu 0,6’ya ulaşınca kadar inkübe edilir. Kültür belirtilen hücre yoğunluğuna ulaşınca final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG ilave edilir. IPTG ile indüklenmiş kültür 37 °C’de ve 100 rpm’de bir gece inkübe edilir. Bir gecelik indüklenmiş kültür örnekleri 4000 RCF’de 15 dakika santrifüj edilir [159]. Süpernatant dökülür. Pelet, 4 ml hücre lizis tamponunda çözülür. Hücreler, sonikatör (Bandelin Sonopuls, Almanya) ile güç % 20’de 10 saniye aralıklarla altı defa 10’ar saniye parçalanır. 5 dakika buz içerisinde bekletilir. 14.000 RCF’de 20 dakika 4 °C’de santrifüj edilir. Süpernatant (CL, cell lysate) alınır ve SDS-PAGE analizi için bir miktar ayrılır.

Kolon resini Ni-NTA agaroz ve süpernatant 1:4 oranında karıştırılır. Karışım 4 °C'de 1 saat süreyle arasına karıştırılarak bekletilir. Bu sırada pistonu çıkarılmış 20 ml'lik bir şırıngaya bir kat filtre kağıdı yerleştirilir ve uç kısmına bir tubing geçirilir. Bu şekilde hazırlanan kolon sert bir yüzeye sabitlenir. Ni-NTA agaroz-süpernatant karışımı kolona aktarılır. Resin tamamen çökelinceye kadar (yaklaşık 30 dakika) kolonun uç kısmındaki tubing kapalı bir şekilde tutulur. Daha sonra kolonun ucundaki tubingin ağzı açılır. Kolondan akan süzüntüden (FT, flow-through) SDS-PAGE analizi için örnek alınır. Kolon sırasıyla ikişer resin hacmi kolon yıkama tamponu 1, 2 ve 3 ile yıkanır. Yıkama fraksiyonları (W1, wash 1; W2, wash 2; W3, wash 3) SDS-PAGE analizi için saklanır. Yıkama sonrası 9 kez ½ resin hacmi protein elüsyon tamponu 1 ile saf protein örneği kolondan toplanır [160].

2.2.15.2. Mutant PvLDH Proteinlerinin Saflaştırılması İçin Protokol 2

Mutant PvLDH genini içeren *E.coli* hücreleri 100 µg/ml ampisilin içeren 2xYT buyyon içerisinde 37 °C'de ve 180 rpm'de bir gece inkübe edilir. 100 µg/ml ampisilin içeren 500 ml 2xYT buyyon içerisine bir gecelik kültürden 2 ml inoküle edilir. OD₆₀₀'deki hücre yoğunluğu 0,6'ya ulaşınca kadar inkübe edilir. Kültür belirtilen hücre yoğunluğuna ulaşınca final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG ilave edilir. IPTG ile indüklenmiş kültür 37 °C'de ve 180 rpm'de bir gece inkübe edilir. Bir gecelik indüklenmiş kültür örnekleri 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant dökülür. Pelet, 6 ml hücre lizisi ve kolon yıkama tamponunda çözülür. Hücreler, sonikatör (Bandelin Sonopuls, Almanya) ile güç % 60'da 30 saniye aralıklarla dokuz defa 10'ar saniye parçalanır. 14.000 rpm'de 1 saat 4 °C'de santrifüj edilir. Süpernatant (CL; cell lysate) alınır ve SDS-PAGE analizi için bir miktar ayrılır. Pistonu çıkarılmış 5 ml'lik bir şırıngaya cam yünü yerleştirilir ve uç kısmına bir tubing geçirilir. Bu şekilde hazırlanan kolon sert bir yüzeye sabitlenir. Kolona 4 ml Ni-NTA agaroz resin bırakılır. Kolon, 10 kat resin hacmi (40 ml) kadar hücre lizisi ve kolon yıkama tamponu ile dengelenir. Süpernatant kolona yüklenir. Kolondan akan süzüntü fraksiyonlarından (FT1, flow-through 1; FT2, flow-through 2; FT3, flow-through 3) SDS-PAGE analizi için örnek alınır. Kolon, 10 kat resin hacmi (40 ml) kadar hücre lizisi ve kolon yıkama tamponu ile yıkanır. Yıkama fraksiyonları (W1, wash 1; W2, wash 2; W3, wash 3) SDS-PAGE analizi için saklanır. Yıkama sonrası 11 defa 1'er ml protein elüsyon tamponu 2 ile saf protein örneği kolondan toplanır [74].

2.2.16. Mutant PvLDH Proteinlerinin Amonyum Sülfat ile Çöktürülmesi ve Diyalizi

Ni-NTA agaroz ile saflaştırılan proteinleri konsantre etmek için amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Bunun için saflaştırma sonrası elde edilen saf protein örneğine 0,5 g/ml konsantrasyonda amonyum sülfat ilave edilir. Protein örneği amonyum sülfat çözününceye kadar yavaşça karıştırılır. Daha sonra 4 °C’de bir gece bekletilir. Ertesi gün 14.000 rpm’de 25 dakika 4 °C’de santrifüj edilir. Süpernatant dökülür. Pelet, 1 ml bis-tris solüsyonunda, pH: 6.0 çözülür. Protein örneği, tuz ve diğer küçük molekülleri uzaklaştırmak için diyaliz membranına bırakılır. Diyaliz membranı, içerisine bir spatül aktif kömür tozu ilave edilmiş bis-tris solüsyonuna, pH: 6.0 atılır. Protein örneği 4 °C’de bir gece bis-tris solüsyonuna, pH: 6.0 karşı diyaliz edilir. Ertesi gün diyaliz membranı yeni bir bis-tris solüsyonu, pH: 6.0 içerisinde 2 saat 4 °C’de bekletilir. Konsantre edilen protein örneği bir şırınga yardımıyla diyaliz membranından alınır [90, 154].

2.2.17. Mutant PvLDH Proteinlerinin Molekül Ağırlıklarının ve Ekstinksiyon Katsayılarının Hesaplanması

Saflaştırılan mutant proteinlerin konsantrasyonlarının hesaplanması için molekül ağırlıklarının ve ekstinksiyon katsayılarının (ϵ , Extinction Coefficient) bilinmesi gerekmektedir. Bunun için bu iki değerin hesaplaması yapılmıştır. Yabanıl PvLDH ve mutant PvLDH proteinlerinin molekül ağırlıklarının ve ekstinksiyon katsayılarının (Molar Absorpsiyon Katsayısı, Molar Absorption Coefficient) hesaplanması için web tabanlı “Peptide Property Calculator” isimli program kullanılmıştır [161]. Hesaplama, programa veri olarak girilen aminoasit dizisine dayanılarak yapılmıştır.

2.2.18. Saflaştırılmış Mutant PvLDH Proteinlerinin Konsantrasyonlarının Hesaplanması

Saflaştırılmış mutant PvLDH proteinlerinin molar ekstinksiyon katsayıları ve molekül ağırlıkları kullanılarak absorbans spektroskopisi ile konsantrasyonlarının hesaplanmasında Beer-Lambert Kanunu esas alınmıştır. Bunun için saf protein solüsyonlarının 280 nm’deki absorbans değerleri (A_{280}) okunmuştur. Elde edilen bu değerlerle birlikte saflaştırılmış

molar ekstinksiyon katsayıları (ϵ) ve molekül ağırlıkları (MW) kullanılarak aşağıdaki formüllerle protein konsantrasyonu (c) hesaplanmıştır [162]:

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

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

Yukarıdaki formüllerde verilen L değeri ışık yolu uzunluğu (light path length) olup birimi cm'dir. Bununla birlikte standart spektrofotometreler 1 cm genişliğinde örnek kuvetlerinin kullanımı için uygun olduğundan L değeri genellikle 1 cm'dir.

Yapılan çalışmalarda A_{280} değerinin spektrofotometre ile ölçümünde 1 cm genişliğinde kuvartz kuvet kullanıldığı için protein konsantrasyonu aşağıdaki formüllerle hesaplanmıştır:

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

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

2.2.19. Mutant PvLDH Enzimlerinin Steady-State Kinetik Ölçümlerinin Yapılması

Aktivitesi tespit edilen mutant PvLDH enzimlerin Steady-State kinetik ölçümleri 340 nm'de UNICAM UV-Visible spektrofotometre kullanılarak NADH'ın NAD^{+} 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$) absorbans değişim oranı takip edilerek yapılmıştır. Bütün reaksiyonlar 50 mM Trizma Base ve 50 mM KCl içeren kinetik ölçüm tamponu, pH: 7.5 ile 25 °C'de gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için farklı pirüvat konsantrasyonları (20 μM , 60 μM , 180 μM , 540 μM , 1.6 mM, 4.86 mM, 14.58 mM, 20.4 mM, 29 mM) ve 200 μM NADH kullanılmıştır. 1 ml'lik küvete enzim ve NADH solüsyonları bırakılmış ve en son pirüvat ilavesi ile reaksiyon başlatılmıştır. Bütün kinetik ölçümler 3 defa tekrar edilmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak Grafit 3.0 [163] isimli program ile k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m ve V_{max} değerleri elde edilmiştir.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, *Plasmodium vivax*'ın laktat dehidrogenaz enzimindeki aktif bölge halkasının ve kofaktör bağlanma bölgesinin diğer Apikompleksanlardan model olarak seçilen *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella* ve *Theileria parva*'nın laktat dehidrogenaz enzimlerindeki aynı bölgeler ile karşılaştırmalı analizinin yapılması amaçlanmıştır. Bunun için PvLDH enziminin aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun ve kofaktör bağlanma bölgesindeki L₁₆₃ aminoasidinin bu üç Apikompleksanın aminoasitleri ile değiştirilmesi sonucu enzimin bu değişiklikleri tolere edip etmediği ve yapılan değişikliklerin enzim kinetiğini nasıl etkilediği araştırılmıştır.

Yapılan çalışmalarda, *Plasmodium vivax*'ın laktat dehidrogenaz enziminin aktif bölgesindeki ve kofaktör bağlanma bölgesindeki önemli bazı aminoasitleri, diğer Apikompleksanlardan model olarak seçilen *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella* ve *Theileria parva*'nın laktat dehidrogenaz enzimlerindeki aminoasitleri ile yönlendirilmiş mutagenез metodu kullanılarak değiştirilmiş; mutant PvLDH genlerinin ekspresyon vektörüne altklonlaması yapılarak *E. coli* JM105 hücrelerine transformasyonundan sonra protein üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen mutant PvLDH proteinleri saflaştırılmış ve kinetik analizleri yapılarak PvLDH'nin aktif bölge halkasında ve kofaktör bağlanma bölgesinde yapılan değişikliklere karşı toleransı araştırılmıştır.

3.1. İnsan, *Plasmodium vivax* ve Model Apikompleksan Laktat Dehidrogenaz Enzimlerinin Aminoasit Düzeyinde Karşılaştırmalı Analizi

Karşılaştırmalı analiz, ortak hedef belirleme açısından önemli olup [51, 52] *P. vivax*'ın LDH enzimi, Apikompleksan şubesinin diğer üyesi *Theileria parva* ve aynı şubenin *Coccidia* alt sınıfı üyeleri *Eimeria tenella* ve *Toxoplasma gondii*'nin LDH enzimleri ile aminoasit düzeyinde karşılaştırılmıştır.

İnsan, *Plasmodium vivax* ve tez çalışmasının model Apikompleksanları *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella* ve *Theileria parva*'nın laktat dehidrogenaz enzimlerinin aminoasit düzeyinde yüzde benzerlikleri ilaç tasarım çalışmalarında ortak hedef belirleme açısından önemli olup Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. İnsan LDH'nin kas (İnsan-m) ve kalp (İnsan-h) izomerleri, *P. vivax* (PvLDH) ve model Apikompleksanlar *Toxoplasma gondii* (Tg1LDH), *Eimeria tenella* (EtLDH) ve *Theileria parva* (TpLDH)'nin laktat dehidrogenaz enzimlerinin aminoasit düzeyinde yüzde benzerlikleri

İnsan-m	X					
İnsan-h	75	X				
PvLDH	27	29	X			
Tg1LDH	29	28	50	X		
EtLDH	29	28	50	55	X	
TpLDH	30	28	47	46	46	X
Aminoasit (%)	İnsan-m	İnsan-h	PvLDH	Tg1LDH	EtLDH	TpLDH

İnsan LDH izomerleri, *Plasmodium vivax*'ın LDH enzimi ve tez çalışmasının model Apikompleksanlarının LDH enzimlerinin aminoasit düzeyindeki benzerliklerinin yüzdesi düşüktür. *Plasmodium vivax*'ın insan LDH izomerleri ile benzerlikleri % 29'u geçmemektedir. Bununla beraber üç model Apikompleksanın LDH enzimlerinin kendi içlerinde benzerlikleri % 46-55 arasındadır. *Plasmodium vivax*'ın LDH enzimi, *Toxoplasma gondii* ve *Eimeria tenella*'nın LDH enzimleri ile % 50 oranında benzerlik gösterirken, *Theileria parva*'nın LDH enzimi ile % 47 oranında daha düşük benzerlik göstermektedir.

Aynı türlerin LDH enzimlerinin 98. ve 110. aminoasitler arasında yer alan aktif bölge halkasındaki aminoasitleri karşılaştırılmıştır (Şekil 3.1.). Karşılaştırma neticesinde gözlenen en önemli farklılık, insan LDH'ından farklı olarak *Plasmodium vivax*'ın LDH enziminin ve model Apikompleksanların LDH enzimlerinin aktif bölge halkasındaki Ser₁₀₈ ve Arg₁₀₉ arasında bir pentapeptid insersiyonu içermesidir [47, 110, 120, 122]. *Plasmodium vivax* ve diğer model Apikompleksanların LDH enzimlerinin aktif bölge halkasında Ala₉₈, Gly₉₉, Lys₁₀₂, Lys₁₀₇, Glu_{108C}, Trp_{108D} ve Arg₁₀₉ aminoasitleri tamamen korunmuştur. Özellikle bu tez çalışmasında çalışılan aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonu arasında yer alan Glu_{108C}, Trp_{108D} aminoasitleri dikkat çekmektedir. Bu ilave 5 aminoasit arasında diğer üç aminoasit türler arasında değişiklik göstermesine rağmen, Glu_{108C}, Trp_{108D} aminoasitleri *Plasmodium* türleri ve model alınan Apikompleksanlarla birlikte aynı zamanda LDH dizisi bilinen diğer Apikompleksanlarda da tamamen korunmuştur. *P. vivax*'ın ve tez çalışmasının model Apikompleksanlarının LDH enzimlerinin aktif bölge halkasındaki aminoasitlerin benzerliklerinin yüzdesi Tablo 3.2.'de gösterilmiştir. Genel aminoasit benzerliği ile kıyaslandığı zaman aktif bölge halkasındaki aminoasit benzerliğinin bu türler arasında oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

	1	2729	32	48	53	61	65	72	76	
köpekb-m	ATLKDKLIGHLATSQEPRSYNKITVVGVGAVGMACAISILMKDLADEVALVDVDMEDKLGEMMDLQHGSLFL.	HTAKIVSGKDYSVSAGSKLVV								
insan-m	ATLKDQLIYNL.LKEEQTPQNKITVVGVGAVGMACAISILMKDLADELALVDVIEDKLGEMMDLQHGSLFL.	RTPKIVSGKDYNTANSKLVI								
insan-h	ATLKEKLIAPVAEEEEATVPNNKITVVGVGQVGMACAISILGKSLADELALVDVLEDKLGEMMDLQHGSLFL.	QTPKIVADKDYSVTANSKIVV								
<i>Pv</i> LDH	MTPPKIVLVGSGMIGGVMATLIVQKNLGD.VVMFDDVKNMPQGKALDTSNVMAYSNCKVTGSNSYDDLKGADVVI									
<i>Tg</i> LDH	MAPALVQRRKKVAMIGSGMIGGTMGYLCALRELAD.VVLYDVVKGMPEGKALDDSQATSIADTNVSVTSANQYEKIAGSDVVI									
<i>Et</i> LDH	MAVFEKVRPKIALVGSGMIGGTMGFLCSLRELGD.VVLFDDVVPNMPAGKALDLCHTAADNGVRVQGANASYASLEGADVVI									
<i>Tp</i> LDH	MSGIRRKLIISLIGSGNIGGIMGYLSQLTELAD.TVFFDIVPNIGAGKSLDIMHANSIQGKAYKCKGTNNYKDIAGSDVCI									
	98	109	110	116	140	143	156	163	168	171
köpekb-m	ITAGARQQEGES.....RLNLVQRNVNIFKFIIIPNIVKHSPDCIILVVSNPVDVLTYYVAVKLSGLPMHRIIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHS									
insan-m	ITAGARQQEGES.....RLNLVQRNVNIFKFIIIPNVVKYSPNCKLLIVSNPVDILTYYVAVKISGFPKNRVIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHP									
insan-h	VTAGVRQQEGES.....RLNLVQRNVNVFKFIIIPQIVKYSPDCIILVVSNPVDILTYYVTWKLKSGLPKHRVIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHP									
<i>Pv</i> LDH	VTAGFTKAPGKSDKEWNRDLDLLPLNNKIMIEIGGHIKNCNAPFIIIVVTNPVDVLMVQLLFEHSGVPKNKIIGLGGVLDTSRLKYYISQKLVNCP									
<i>Tg</i> LDH	VTAGLTKVPGKPDSEWSRNDLLPFNSKIIREIGQNIKKYCPKTFIIIVVTNPDLDCMVKMCEASGVPTNMICGMACMLDSGRFRYVADALSVP									
<i>Et</i> LDH	ITAGITKAAGKSDQEWSRKDLDPVNVKILREVGAAIKQFCPHAFVINITNPDLDMVAALREAAGLPAARVCGMAGVLD SARFRRLADRLGVSP									
<i>Tp</i> LDH	VTAGLAKAPAKSNEEWNRDLDLVAFNAKIIITEVAENIKKYAPKAFVIVITNPMDVMVHMLKVTGFSKNMVVGMGGLLDSSRMNCYIAEKLGVNP									
	188	195	204	217	224	237	246	250	270	
köpekb-m	CSCHGWVIGEHGDSVPSVWSGMWNA...LKEHLPELGTNKDKQDWKKLHKDVVDSAYEVIKLGKGYTSAIGLSVADLAETIMKNLCRVHPVSTM									
insan-m	LSCHGWVLGEHGDSSVPVWSGMNVAGVSLKTLHPDLGTDKDKQWKEVHKQVVESAYEVIKLGKGYTSAIGLSVADLAESIMKNLRRVHPVSTM									
insan-h	SSCHGWILGEHGDSSVAVWSGVNVAGVSLQELNPENMGTDNDSSENWKEVHKMVVESAYEVIKLGKGYTNWAIGLSVADLIESMLKNLSRIHPVSTM									
<i>Pv</i> LDH	RDVNALIVGAHGNKMLLLKRYITVGGIPLQEFINNK.KITDEE.VEGIFDRTVNTALEIVNLLASPYVAPAAAIEMAESYLKDIKKVLVCSTL									
<i>Tg</i> LDH	RDVQATVIGTHGDCMVPLVRYITVNGYPIQKFIKDGVVTEKQLEEIAEHTKVSNGEIVRFLGQGSAYYAPAAASAVAMATSFLNDEKRVIPCSVY									
<i>Et</i> LDH	RDVQAMVLGVHGDNMVPLSRFATVNGVPLGELARQGWISEAEIREVERQTRAAGGDIVRLLGQGSAYFAPGAAAVAMAEAYLKDQKRVFVCSCY									
<i>Tp</i> LDH	KYVHGSVIGAHGDSMIPLVSRSTVYGIPILDFVEKGYLTHEDIKEIEERTITSAIEILKLYGSGSSYFAPATAAIEMASAYLNDKKSVPFCSCY									
	283	290	311	318	322					
köpekb-m	VKDFYGIKDNVFLSLPCVLNDHGISNIVKMKLKPDEEQQLQKSATTLWDIQKDLKF.									
insan-m	IKGLYGIKDDVFLSVPCILGQNGISDLVKVTLTSEEEARLKKSAATLWGIQKELQF.									
insan-h	VKMGYGIENEVFLSLPCILNARGLTVINQKLKDDVAQLKKSAATLWDIQKDLKDL									
<i>Pv</i> LDH	LEGQYGH.S.NIFGGTPLVIGGTGVEQVIELQLNAEEKTKFDEAVAETKRMKALI									
<i>Tg</i> LDH	CNGEYGLK.DMFIGLPAVIGGAGIERVIELELNEEKKQFQKSVDVDMALNKAVAALQA.									
<i>Et</i> LDH	LEGPYGV.R.GHCLGVPCVVGAGGVERVIELPLDAREAQLLQASIDEVREMHRLAAADAAAE									
<i>Tp</i> LDH	LEGQYGHK.EVYCGTPAVIGANGVEKVLELKLTPQEQQKFNDSEIKRIRLESNIK.									

Şekil 3.1. Köpekbalı, insan, *P. vivax* ve diğer Apikompleksanların LDH enzimlerinin aminoasit dizisi. köpekb-m: Köpekbalı LDH'ı kas formu, insan-m: İnsan LDH'ı kas formu, insan-h: İnsan LDH'ı kalp formu, *Pv*LDH: *P. vivax* LDH, *Tg*LDH: *Toxoplasma gondii* LDH1, *Et*LDH: *Eimeria tenella* LDH, *Tp*LDH: *Theileria parva* LDH

Tablo 3.2. *P. vivax* ve diğer Apikompleksanların LDH enzimlerinin aktif bölge halkasındaki aminoasitlerin yüzde benzerlikleri. *PvLDH*: *P. vivax* LDH, *Tg1LDH*: *Toxoplasma gondii* LDH1, *EtLDH*: *Eimeria tenella* LDH, *TpLDH*: *Theileria parva* LDH

<i>PvLDH</i>	X			
<i>Tg1LDH</i>	65	X		
<i>EtLDH</i>	71	65	X	
<i>TpLDH</i>	71	53	65	X
Aminoasit (%)	<i>PvLDH</i>	<i>Tg1LDH</i>	<i>EtLDH</i>	<i>TpLDH</i>

Plasmodium vivax'ın LDH enzimi ve tez çalışmasının model Apikompleksanları *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella* ve *Theileria parva*'nın laktat dehidrogenaz enzimlerindeki aktif bölge halkasının yanısıra kofaktör bağlanma bölgesindeki aminoasitler karşılaştırıldığı zaman bu aminoasitlerin korunum gösterdiği ya da yüksek benzerlik oranına sahip olduğu görülmektedir. Özellikle kofaktör bağlanma bölgesinin α sarmalları ve β paralel zincirlerini oluşturan aminoasitlerinin çoğu bu Apikompleksan türlerinde yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Ancak *Plasmodium vivax*'ın LDH enziminin kofaktör bağlanma bölgesindeki Leu₁₆₃ aminoasidi diğer model Apikompleksanlarda Met₁₆₃ aminoasidi ile yer değiştirmiştir. Dolayısıyla yapılan karşılaştırmalı analiz sonrasında *PvLDH* enziminin aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun ve kofaktör bağlanma bölgesindeki L₁₆₃ aminoasidinin model Apikompleksanların laktat dehidrogenaz enzimlerindeki aminoasitleri ile değiştirilerek enzimin kinetik aktivitesini nasıl etkilediğinin araştırılmasına karar verilmiştir.

3.2. *Plasmodium vivax*'ın Laktat Dehidrogenaz Enzimindeki Aktif Bölge Halkasının Yönlendirilmiş Mutageniz Çalışmaları ile Analizi

Tez çalışmasının bu aşamasında, sıtmaya karşı etkin olacak yeni ilaç tasarım çalışmalarına sağlayacağı katkının test edilmesi için *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenaz enziminin aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun (Asp_{108A}, Lys_{108B}, Glu_{108C}, Trp_{108D}, Asn_{108E}) proteine kazandırdığı yapısal ve kinetik özelliklerin araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için *PvLDH*'ın aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonu, tez çalışması için model alınan Apikompleksanlar olan *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella* ve *Theileria parva* LDH enzimlerindeki eşdeğer bölgelere ayrı ayrı benzetilmiş ve bu değişikliklerin enzim üzerindeki etkileri test edilmiştir.

3.2.1. PvLDH Enziminin Aktif Bölge Halkasındaki Pentapeptid İnsersiyonunun Tg1LDH'daki İnsersiyona Benzetilmesi ve Analiz Edilmesi

PvLDH enziminin aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonu ilk olarak model Apikompleksan *Toxoplasma gondii*'nin LDH1 izoenzimindeki (Tg1LDH) pentapeptid insersiyonuna benzetilmiştir (Şekil 3.2.). Bunun için her aşamada sadece bir aminoasit değiştirilmiştir. PvLDH geninin/enziminin pentapeptid insersiyonu iki aşamada tamamen modeline benzetilmiş ve her aşamadan sonra yapılan değişiklik analiz edilmiştir. Elde edilen mutant PvLDH genleri/enzimleri sırasıyla PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 olarak adlandırılmıştır.

	98	108	109
İnsan-m	A G A R Q Q - E G E S R L		
İnsan-h	A G V R Q Q - E G E S R L		
PvLDH	A G F T K A - P G K S D K E W N R D		
Tg1LDH	A G L T K V - P G K P D S E W S R N		
PvLM1Tg1	A G F T K A - P G K S D <u>S</u> E W N R D		
PvLM2Tg1	A G F T K A - P G K S D <u>S</u> E W <u>S</u> R D		

Şekil 3.2. PvLDH'nin aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun Tg1LDH'dakine benzetilmesi. Değiştirilen aminoasitler koyu renkli ve altı çizili olarak gösterilmiştir. (104. aminoasit tanımlanmamıştır).

3.2.1.1. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Genlerinin A ve B Fragmentlerinin Elde Edilmesi

Yönlendirilmiş mutagenезin ilk aşaması olan A ve B fragmentlerini elde etmek için mutagenез primerleri ile birlikte Pv7 ve Pv13 (veya Pv15) uç primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır. PvLM1Tg1 geninin A ve B fragmentleri için PvLM1Tg1F/PvLM1Tg1R mutagenез primer çifti, PvLM2Tg1 geninin A ve B fragmentleri için PvLM2Tg1F/PvLM2Tg1R mutagenез primer çifti kullanılmıştır. Yine 3' uç primeri olarak Pv13 veya Pv15 kullanılmıştır. Her iki primer, genin aynı bölgesi için tasarlanmış olup Pv15 primeri Pv13'den farklı olarak stop kodonundan önce 6 adet histidin kodonu taşımaktadır. Böylece Pv15 primeri ile amplifikasyonu yapılan mutant genin ekspresyonu sonrası elde edilen protein 6xHis Tag etiketi taşıdığı için nikel kolonlarında saflaştırılması mümkün olmuştur.

PCR için *Taq* DNA Polimeraz enzimi yerine *Pfu* DNA Polimeraz enziminin kullanılması tercih edilmiştir. *Pfu* DNA Polimeraz enzimi, 5'→3' polimeraz ve 5'→3' eksonükleaz aktivitelerinin yanında 3'→5' eksonükleaz aktivitesine de (proofreading aktivitesi) sahiptir. Bu nedenle *Pfu* DNA Polimeraz enzimi kullanılarak amplifikasyon sırasında yanlış baz eşleşmesinden kaynaklanabilecek hataların eksonükleaz aktivitesi ile düzeltilmesi ve böylece mutagenез bölgesi dışında genin hiçbir yerinde baz değişikliği olmaması istenmiştir.

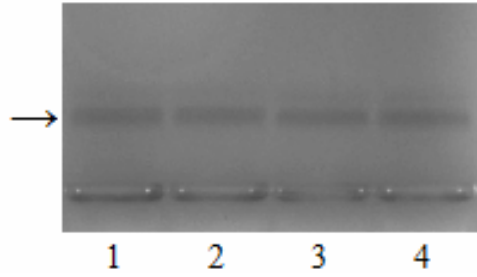
A ve B fragmentlerini elde etmek için gerçekleştirilen PCR için 5 µl 10x*Pfu* Tamponu, 0,2 mM dNTP karışımı, 50 pmol herbir primer çifti, 1,5 µl *Pv*LDH ve 1,25 u *Pfu* DNA Polimeraz enzimi bırakılarak steril dH₂O ile reaksiyon 50 µl'ye tamamlanmıştır. Amplifikasyon 94 °C'de 1,5 dakika, 58 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 2 dakika ve 20 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

PCR için DNA kaynağı olarak yabancı tip *Pv*LDH'ı içeren rekombinant plazmid DNA kullanılarak ve yabancı tip *Pv*LDH'a özgü spesifik primerlerin bağlanması için (annealing) orta sıcaklık oldukça yüksek (58 °C) tutularak birden fazla bant elde edilmesi önlenmiş ve sadece doğru A ve B bantlarının elde edilmesi sağlanmıştır.

*Pf*LDH ve mutagenезleri ile yapılan altklonlama çalışmaları sırasında etidyum bromür ile boyalı jellerde yürütülen DNA örnekleri için ortaya çıkan klonlama problemlerinin [156, 164] bu altklonlama çalışmaları sırasında da devam edebileceği düşünülerek PCR ile elde edilen *Pv*LM1Tg1 ve *Pv*LM2Tg1 A ve B fragmentlerinin elektroforezi için kristal viyole ile boyalı % 1'lik agaroz jel tercih edilmiştir. Agaroz jel elektroforezi analitik bir metot olarak kullanılmakla beraber aynı zamanda PCR, restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim, ligasyon ve diğer klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere spesifik DNA fragmentlerinin saflaştırılması için preparatif olarak da kullanılmaktadır [154]. Bu yöntem çok duyarlı ve etkili olmakla beraber bir mutajen olan etidyum bromür ile muameleyi ve zararlı UV ışığını kullanmayı gerektirir. Etidyum bromür, DNA'nın baz çiftleri arasına yerleşerek çift sarmalı gerer. Bu durum replikasyon sırasında ilave baz oluşumuna neden olabilir. Ayrıca DNA'yı görünür hale getirmek için kullanılan UV ışık da DNA üzerinde bilinmeyen mutasyonlara yol açabilir [154]. Bu amaçla etidyum bromüre alternatif olarak kristal viyole ile boyanan agaroz jeller kullanılmıştır [155, 156, 164]. Etidyum bromüre benzer bir yolla DNA'ya bağlanan kristal viyole de mutajen olmakla beraber etidyum bromür kadar zararlı olmadığı düşünülmektedir. Kristal viyole ile boyanmış olan jelde yürütülen DNA fragmentleri UV ışık gibi zararlı olmayan basit bir

ışık kutusu kullanılarak görüntülenebilmektedir. Kristal viyole, etidyum bromürden daha az duyarlı olmakla beraber nispeten daha az toksik olması, DNA için tehlikeli olan UV ışığını gerektirmemesi dolayısıyla bütün preparatif amaçlı elektroforez çalışmalarında daha kullanışlı olacağına karar verilmiş ve bütün preparatif amaçlı jel elektroforezinde kristal viyole ile boyanan agaroz jeller kullanılmıştır. Bununla beraber analitik amaçlı elektroforez çalışmalarında ise etidyum bromür ile boyanan agaroz jellerin kullanımına devam edilmiştir.

Hem PvLM1Tg1 hem de PvLM2Tg1'in elde edilen A ve B fragmentleri kristal viyole ile boyalı % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Her iki mutant gen için sırasıyla 299 baz çifti (bp) ve 310 bp büyüklüğünde A fragmenti ve 721 bp büyüklüğünde B fragmenti elde edilmiş olup PvLM1Tg1 için doğru büyüklükteki bantlar (PvLM2Tg1 için gösterilmemiştir) Şekil 3.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. PvLM1Tg1'in A ve B fragmentlerinin elde edilmesi. Hatlar: 1 ve 2: PvLM1Tg1'in A fragmentleri; 3 ve 4: PvLM1Tg1'in B fragmentleri

Kristal viyole ile boyalı jelde DNA bantları, etidyum bromür ile boyalı jeldeki kadar net olmamakla birlikte elektroforez ilerledikçe kaybolabildiğinden jel üzerinde uzun süreli yürütme yapılmasından kaçınılmıştır. Bu nedenle PvLM1Tg1 geninin A ve B fragmentleri farklı büyüklüklerde olmasına rağmen DNA bantları fazla açılmadığı için jel üzerinde aynı hizada görülmektedir. A ve B fragmentleri jelden kesilerek saflaştırıldıktan sonra konsantrasyon ölçümü için etidyum bromür ile boyalı jelde yürütülürken aynı zamanda büyüklükleri de doğrulanmıştır.

3.2.1.2. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Genlerinin Tam Uzunluklarının Elde Edilmesi

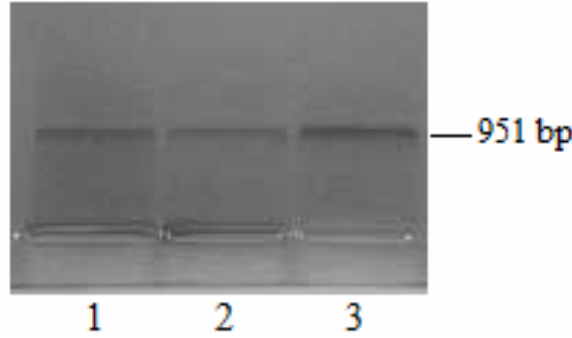
Kristal viyole ile boyalı agaroz jelden saflaştırılan PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 genlerinin A ve B fragmentleri *PvLDH* geninin iki parçası olup bu iki fragment birleştirilerek PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 genlerinin tam uzunluğunun elde edilmesi amaçlanmıştır. A ve B fragmentlerini birleştirmek için iki basamaklı PCR yapılmıştır. Basamak I için 5 µl 10x*Pfu* Tamponu, 0,1 mM dNTP karışımı, 5-50 ng herbir A ve B fragmenti ve 1,25 u *Pfu* DNA Polimeraz enzimi bırakılarak steril dH₂O ile reaksiyon 25 µl'ye tamamlanmıştır. Amplifikasyon 94 °C'de 2 dakika, 50 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika ve 7 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

A ve B fragmentlerinin elde edilmesi sırasında kullanılan forward (F) ve reverse (R) mutagenез primerleri (PvLM1Tg1F ve PvLM2Tg1F primerleri forward primerler; PvLM1Tg1R ve PvLM2Tg1R primerleri reverse primerler olup, diğer mutagenезlerin forward ve reverse primerleri de aynı şekilde sırasıyla F ve R ile kodlanmıştır.) aynı bölge için tasarlanan birbirinin komplementeri primerler olduğu için aynı zamanda A fragmentinin 3' ucunda ve B fragmentinin 5' ucunda bulunan birkaç nükleotidlik kısımda birbirine komplementerdir. Bu nedenle Basamak I'de denatürasyonun ardından sıcaklığın düşmesiyle birlikte A ve B fragmentlerinin herbir zinciri bu kısımlardan birbirine bağlanmakta ve sonraki aşamada ortamdaki dNTP'ler kullanılıp zincir komplementeri enzimatik olarak tamamlanmaktadır.

Basamak I'in bitmesinin ardından tam uzunlukta elde edilen genin amplifikasyonu için Basamak II gerçekleştirilmiştir. Bunun için Basamak I'deki PCR tüplerine 2,5 µl 10x*Pfu* Tamponu, 0,1 mM dNTP karışımı, 50 pmol herbir primer çifti, ve 1,25 u *Pfu* DNA Polimeraz enzimi bırakılarak steril dH₂O ile reaksiyon 25 µl'ye tamamlanmıştır. Amplifikasyon 94 °C'de 1,5 dakika, 55 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2,5 dakika ve 20 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

PCR ile elde edilen tam uzunluktaki PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 genleri kristal viyole ile boyalı % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Şekil 3.4.'de hat 1 ve 2'de PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 genlerine ait bantlar görülmektedir. Kristal viyole ile boyalı jelde, DNA bantlarının büyüklüğünü tespit etmek için referans olarak kullanılan markır CV jellerin duyarlılık sorunundan dolayı görülemediğinden kullanılamamaktadır. Bunun için hat 3'de bu iki mutant gen ile aynı büyüklükte olan *PvLDH* geni (951 bp) markır yerine referans

olarak yürütülmüştür. Görüldüğü gibi her iki mutant gen *PvLDH* ile aynı hizada olup tam uzunlukta ve doğru büyüklükte elde edilmiştir.



Şekil 3.4. *PvLM1Tg1* ve *PvLM2Tg1* genlerinin tam uzunluğunun elde edilmesi. Hatlar: 1: *PvLM1Tg1* geni; 2: *PvLM2Tg1* geni; 3: *PvLDH* geni

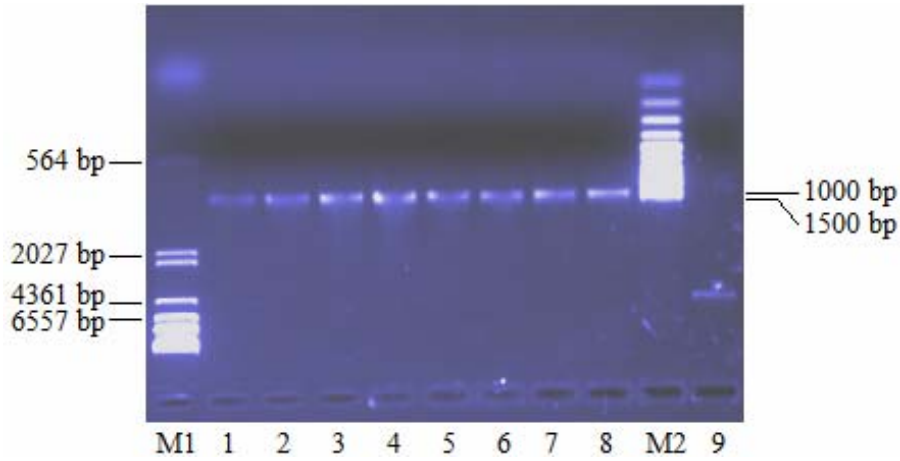
3.2.1.3. *PvLM1Tg1* ve *PvLM2Tg1* Genlerinin ve pKK223-3 Vektörünün Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesilmesi

PCR sonrası elde edilen *PvLM1Tg1* ve *PvLM2Tg1* genleri, pKK223-3 ekspresyon vektörünün çoklu klonlama bölgesinde taşıdığı restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kesim bölgelerinden ikisi olan *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kesim bölgelerini içeren *Pv7* ve *Pv15* primerleri ile amplifiye edildiği için genin baş ve son kısmı bu enzimlerin kesim bölgelerini taşımaktadır. Bu nedenle *PvLM1Tg1* ve *PvLM2Tg1* genleri ve aynı zamanda genlerin aktarılacağı pKK223-3 ekspresyon vektörü *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş ve yapışkan uçlar oluşturularak ligasyona hazır duruma getirilmiştir.

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim sonrası *PvLM1Tg1* ve *PvLM2Tg1* genleri ve pKK223-3 ekspresyon vektörü kristal viyole ile boyalı % 1'lik agaroz jel üzerinde yürütülmüş ve DNA bantları jelden kesilerek saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonrası DNA örnekleri konsantrasyon ölçümü için etidyum bromür ile boyalı % 1'lik agaroz jelde yürütülürken aynı zamanda Şekil 3.5.'de görüldüğü gibi doğru büyüklükte oldukları da onaylanmıştır.

Restriksiyon endonükleazlarla kesim sonrası *PvLM1Tg1* ve *PvLM2Tg1* genlerinin dışında kalan nükleotidler uzaklaştırılmakta ve sadece yaklaşık olarak 15 nükleotidlik bir kısalma meydana gelmektedir. % 1'lik agaroz jelde bu farkı gözlemek mümkün

olmamaktadır. Bununla birlikte 4584 bp büyüklüğündeki pKK223-3 ekspresyon vektörü kesim sonrası hem yaklaşık olarak 18 nükleotidlik bir fragmentini kaybetmekte hem de kesim öncesi jelde farklı hızlarda göç eden süper sarmal, gevşek sarmal ve lineer formları kesim sonrasında sadece lineer formda olduğundan jel üzerinde tek bir bant olarak görülmektedir. Dolayısıyla Şekil 3.5.'de görüldüğü gibi vektörün de kesilmiş olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 3.5. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 genlerinin ve pKK223-3 vektörünün restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi sonrası jelde görüntülenmesi. Hatlar: M1: Markır (Lambda DNA Hind III Digest); M2: Markır (100 bp DNA Ladder G2101); 1-4: PvLM1Tg1 geni; 5-8: PvLM2Tg1 geni; 9: pKK223-3

3.2.1.4. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Genlerinin pKK223-3 Ekspresyon Vektörüne Aktarılması

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim sonrasında yapışkan uçlara sahip PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 genlerini T4 DNA ligaz enzimi yardımı ile pKK223-3 vektörüne aktarmak için ligasyon reaksiyonu Bölüm 2.2.7.'de anlatıldığı gibi yapılarak rekombinant PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 DNA'ları elde edilmiştir. pKK223-3 vektörü bir ekspresyon vektörü olmakla birlikte oldukça güçlü bir promotor olan P_{tac} promotorunu taşımaktadır. Dolayısıyla altklonlama yapılmasının ardından ilgili genin proteininin ekspresyonunun yapılması açısından bu vektörün seçilmesi önemlidir.

3.2.1.5. Rekombinant PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 DNA'larının *E. coli* JM105 Hücrelerine Transformasyonu

Ligasyon sonrası elde edilen rekombinant DNA örneklerini ve pozitif kontrol olarak hiçbir restriksiyon enzimi ile kesilmemiş olan 100 ng pKK223-3 vektörünü *E. coli* soyu JM105 hücrelerine aktarmak için bu hücreler transformasyon için hazırlandıktan sonra rekombinant PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 DNA'larının Bölüm 2.2.9.'da anlatıldığı gibi transformasyonu gerçekleştirilmiştir.

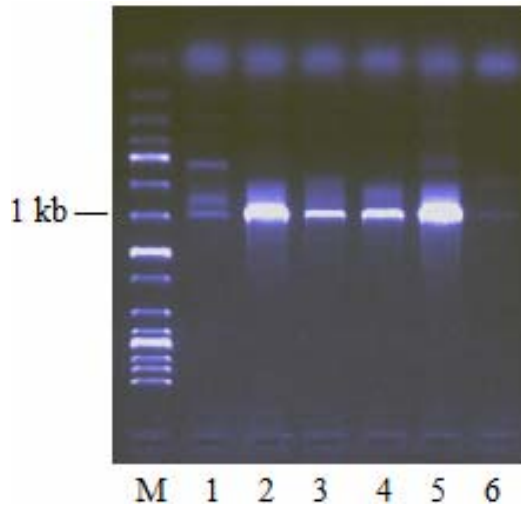
Yapılan çalışmalarda kullanılan farklı besiyerlerinin transformasyon sonucunu ya da verimini etkilediği gözlenmiştir. Kompetant hücre hazırlamak üzere *E. coli* JM105 hücreleri çift kuvvetli Yeast Ekstrakt-Tripton (2xYT), Luria-Bertani (LB) ya da minimal agarda geliştirilmiştir. Bütün bu besiyerleri ile geliştirilen *E. coli* JM105 hücreleri ile transformasyonda başarı sağlanmasına rağmen bazı durumlarda ilk iki besiyeri ile sonuç alınamamıştır. Transformasyon problemlerinin yaşandığı bu durumlarda *E. coli* JM105 hücreleri özellikle minimal agarda geliştirildikten sonra kompetant hücreler hazırlanmış ve transformasyon gerçekleştirilmiştir. Minimal agarın etkili bir transformasyon için önemli olan F' epizomunu taşıyan bakteriler için seçici bir besiyeri olduğu [154] için transformasyon başarısını etkilediği düşünülmüştür. Bu yüzden stok kültürdeki *E. coli* JM105 hücrelerinin spontan olarak F' epizomunu kaybedebileceği ihtimali dikkate alınarak kompetant hücre hazırlamak için stok kültürden yapılan aşılama özellikle minimal agar tercih edilmiştir.

3.2.1.6. Koloni PCR ile Sonuçların Doğrulanması

Transformasyon sonrası seçilen bazı kolonilerin DNA dizilemesine gönderilmeden önce ön onay amacı ile PvLM1Tg1/PvLM2Tg1 genine sahip olup olmadıklarını anlamak için koloni PCR'ları yapılmıştır. Bunun için genin tam uzunluğunu amplifiye edecek olan Pv7 ve Pv15 uç primerleri kullanılmıştır. Koloni PCR sonrası jel üzerinde klonlanan genin büyüklüğünde bir bant görülmesi seçilen koloninin doğru büyüklükteki geni taşıdığını göstermektedir. Kesin sonuca DNA dizi analizi ile karar verilmektedir.

Şekil 3.6.'da Pv7 ve Pv15 uç primerleri ile yapılan koloni PCR sonrası pozitif ve negatif sonuçlar görülmektedir. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 genlerinin her ikisi için de bu primerlerle yaklaşık olarak 1 kb (kilobaz) büyüklüğünde bantlar beklenmiştir. Hat 1-3'de

PvLM1Tg1 için koloni PCR sonuçları görülmektedir. Hat 1’de beklenen büyüklükte zayıf bir bant görülmekle birlikte yabancı bantlar da görülmektedir. Bu bantlar, koloni PCR için kullanılan primerlerin bakteriyel kökenli DNA’yı tanıyarak amplifiye etmesinden kaynaklanabilir. Koloni PCR sonrası yabancı bantların elde edilmesi pozitif sonuç için bir engel olmamakla birlikte doğru büyüklükteki bandın zayıf olması pozitif sonucun güvenilirliğini azaltmaktadır. Hat 2 ve 3’de ise sadece 1 kb büyüklüğünde bant elde edilmiş olup, yabancı bant bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu pozitif sonuçların alındığı kolonilerin PvLM1Tg1 genini taşıması muhtemeldir. Hat 4-6’da ise PvLM2Tg1 için koloni PCR sonuçları görülmektedir. Hat 4 ve 5’de pozitif sonuç alınmakla birlikte hat 6’da görülen çok zayıf bant doğru büyüklükte olmasına rağmen negatif sonuç olarak kabul edilmiştir. Muhtemel pozitif sonuçların kesin olarak doğrulanması için pozitif sonuç alınan kolonilerden izole edilen plazmid DNA’lardan dizi analizi yaptırılmıştır.



Şekil 3.6. Koloni PCR sonrası pozitif ve negatif sonuçların jelde görüntülenmesi. Hatlar: M: Markır (GeneRuler SM1338); 1-3: PvLM1Tg1 geni için pozitif ve negatif sonuçlar; 4-6: PvLM2Tg1 geni için pozitif ve negatif sonuçlar

3.2.1.7. Dizi Analizi ile Sonuçların Doğrulanması

Klonlama sonrası PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 genlerinin DNA dizi analizi, Iontek (Türkiye) firmasına yaptırılmıştır. DNA dizi analizi için yine Iontek (Türkiye) firmasına sentezletilen Pv16 primeri ile klonlanan genlerin 5'→3' zincirlerinin sekansı, Pv17 primeri ile de 3'←5' zincirlerinin sekansı yaptırılmıştır. Böylece yapılan çift yönlü sekanslama ile

genlerin hem tam uzunluğunun dizisi, hem de her iki DNA zincirinin dizisi kontrol edilmiştir.

PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1'in 5'→3' zincirlerinin dizi analizi sonuçlarını kontrol etmek için Chromas Lite programı kullanılmıştır. Elde edilen dizi analizi sonuçları FASTA formatına çevrilmiş ve web tabanlı ClustalW2 programı kullanılarak *PvLDH* geni ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma neticesinde PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1'in 5'→3' zincirlerinin dizisi *PvLDH*'a göre kontrol edilmiştir.

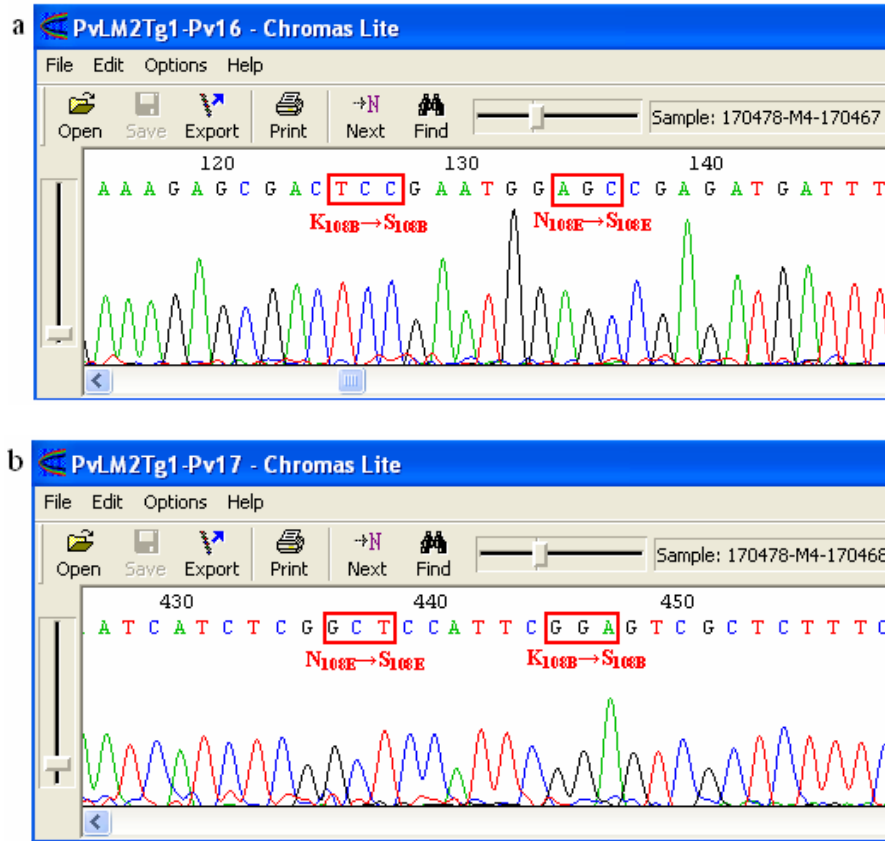
PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1'in 3'←5' zincirlerinin dizi analizi sonuçlarını kontrol etmek için ise dizi önce komplementer zincirine çevrilmiştir. Daha sonra bu dizinin FASTA formatı oluşturularak ClustalW2 programıyla *PvLDH* geni ile karşılaştırılmıştır. Yapılan dizi karşıştırmaları ile hem istenilen mutagenезlerin yapıp yapılmadığı hem de genin geriye kalan bölümlerinde olası bir dizi hatasının olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Şekil 3.7.'de mutant *PvLDH* geni PvLM1Tg1'in çift yönlü dizileme sonuçları görülmektedir. PvLM1Tg1'in her iki zincirinde gerçekleştirilen mutagenез kırmızı çerçeve ile gösterilmiştir. Buna göre 5'→3' zincirindeki AAG kodonu TCC kodonuna çevrilerek K_{108B}→S_{108B} mutagenезi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7.a.). Aynı zamanda komplementer zincirde de bu mutagenезin doğru olarak gerçekleştirildiği görülmektedir (Şekil 3.7.b.).



Şekil 3.7. PvLM1Tg1 geninin (a) 5'→3' zincirinin ve (b) 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu

Şekil 3.8.'de ise mutant *PvLDH* geni *PvLM2Tg1*'in çift yönlü dizileme sonuçları görülmektedir. *PvLM2Tg1*'in her iki zincirinde mutagenез doğru bir şekilde gerçekleştirilmiş olup (Şekil 3.8. a ve b) kırmızı çerçeve ile gösterilmiştir. Buna göre *PvLM1Tg1*'de yapılan AAG→TCC kodon değişikliğine ilave olarak AAC kodonu AGC kodonuna çevrilmiştir. Böylece pentapeptid insersiyonunda D_{108A}K_{108B}E_{108C}W_{108D}N_{108E}→D_{108A}S_{108B}E_{108C}W_{108D}S_{108E} mutagenезi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.8. *PvLM2Tg1* geninin (a) 5'→3' zincirinin ve (b) 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu

Hem *PvLM1Tg1* hem de *PvLM2Tg1*'in dizi analizi sonuçları ile genin tamamının dizisi ve mutagenез bölgeleri kontrol edilmiş ve gende herhangi bir dizi hatası olmadığı ve mutagenезlerin doğru bir şekilde yapıldığı gözlenmiştir.

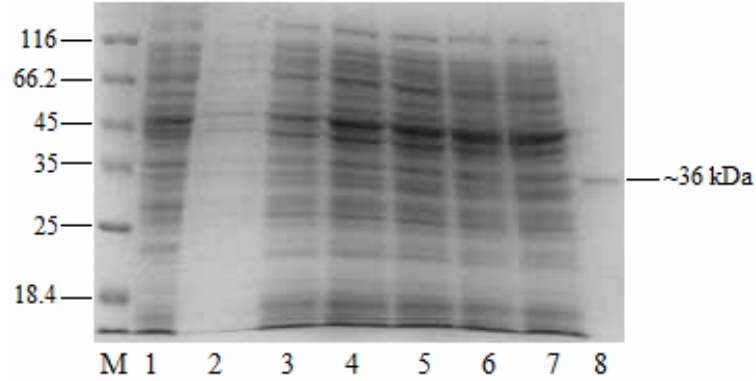
3.2.1.8. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Genlerinin Ekspresyonlarının Yapılması

Yönlendirilmiş mutagenез ile PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 genleri elde edilip altkonlamaları yapıldıktan sonra bu mutant genlerin aktarıldıkları *E. coli* JM105 hücrelerinde ilgili mutant proteinlerin üretilip üretilmediklerini kontrol etmek için, her bir geni içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin ekstraktının SDS-PAGE ile genel protein analizi yapılmıştır. Bunun için besiyeri ortamındaki hücreler logaritmik faza (OD₆₀₀: 0,6) ulaşınca indükleyici madde olarak IPTG ilave edilerek genin ekspresyonu teşvik edilmiştir. Yapılan çalışmalara göre PvLDH, *E. coli* JM105 hücrelerinde en yüksek aktiviteyi 1 mM IPTG konsantrasyonunda göstermiştir [165, 166]. Dolayısıyla bu çalışmada da aynı IPTG konsantrasyonu kullanılmıştır. İndüklenmiş kültür örneklerine paralel olarak aynı zamanda indüklenmemiş kültür örnekleri de geliştirilmiştir. Bu aşamadan sonra belirli aralıklarla (1 saat, 2 saat, 3 saat, 5 saat, bir gecelik) alınan kültür örneklerinin ekspresyonu SDS-PAGE ile jel üzerinde kontrol edilmiştir.

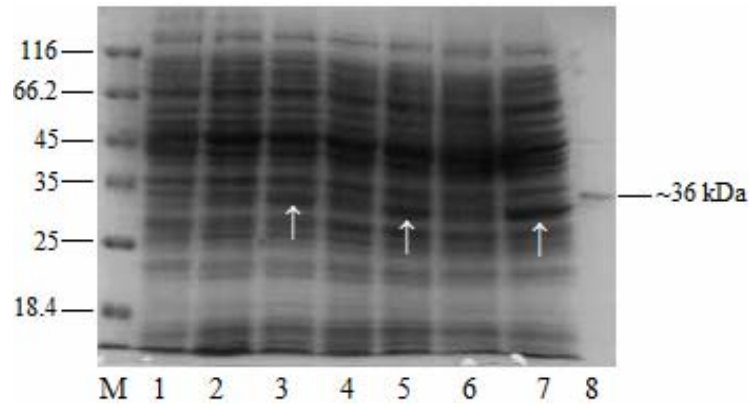
Şekil 3.9.'da ve Şekil 3.10.'da PvLM1Tg1 genini içeren *E. coli* JM105 hücre ekstraktının genel protein profili görülmektedir. Şekil 3.9.'daki jelde PvLM1Tg1 genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin ilk aşılama sonrası örneği (T₀), logaritmik fazdaki (T_{log}) örneği, indükleme sonrası 1 saatlik (T₁) ve 2 saatlik (T₂) örnekleri yürütülmüştür. Şekil 3.10.'daki jelde ise PvLM1Tg1 genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin geriye kalan indükleme sonrası 3 saatlik (T₃), 5 saatlik (T₅) ve bir gecelik (T_{0/N}) örnekleri yürütülmüştür. PvLM1Tg1 geninin ekspresyonu ile elde edilen protein bandını bakteri soyuna ait olan protein profilinden ayırt edebilmek için herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücresi kontrol olarak her iki jelde de yürütülmüştür. PvLM1Tg1 proteininin büyüklüğünü daha iyi tespit edebilmek için her iki jelde aynı zamanda insan LDH-M izomerinin ~36 kDa büyüklüğündeki proteini yürütülmüştür. Bu protein bandı dikkate alındığı zaman yürütülen bütün örneklerde bu büyüklükteki bandın hemen altı hizasında sabit bir bant görülmektedir. Bu bant PvLM1Tg1 proteini olup Şekil 3.10.'da “↑” ile gösterilmiştir. Ancak PvLM1Tg1 genini içermeyen *E. coli* JM105 hücrelerinde bu bant bulunmamaktadır. Bu farklılık, LDH protein bandının *E. coli* JM105 bakteri soyuna ait olmayıp bu hücreye aktarılan PvLM1Tg1 geninin ekspresyon ürünü olduğunu doğrulamaktadır.

Bununla birlikte Şekil 3.9.'da görüldüğü gibi T₀, T_{log}, T₁ ve T₂ dönemlerindeki örneklerde PvLM1Tg1 protein bandı görülmemiştir. Bu durum protein ekspresyonunun

zayıf olmasından ileri gelmektedir [108, 110, 149]. Ayrıca ekspresyonu oldukça zayıf olan bu mutant LDH proteininin hücre yoğunluğunun da az olduğu bu dönemlerde jel üzerinde görülmemesinin normal olduğu düşünülmüştür. PvLM1Tg1 proteinin ekspresyonu T₃ döneminden itibaren görülmekte olup, en iyi protein ekspresyonu bir gecelik örneklerde gözlenmiştir (Şekil 3.10.).



Şekil 3.9. PvLM1Tg1 genini içeren 0-2 saatlik *E. coli* JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili. Hatlar: M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: Herhangi bir genin aktarılmadığı JM105 hücrelerinin genel protein profili; 2: PvLM1Tg1 genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T₀ protein profili; 3: PvLM1Tg1 genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T_{log} protein profili; 4 ve 5: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Tg1 genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T₁ protein profili; 6 ve 7: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Tg1 genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T₂ protein profili; 8: İnsan LDH-M saf proteini



Şekil 3.10. PvLM1Tg1 genini içeren 3 saatlik-bir gecelik *E. coli* JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili. Hatlar: M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: Herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili; 2 ve 3: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Tg1 genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T₃ protein profili; 4 ve 5: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Tg1 genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T₅ protein profili; 6 ve 7: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Tg1 genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T_{ON} protein profili; 8: İnsan LDH-M saf proteini

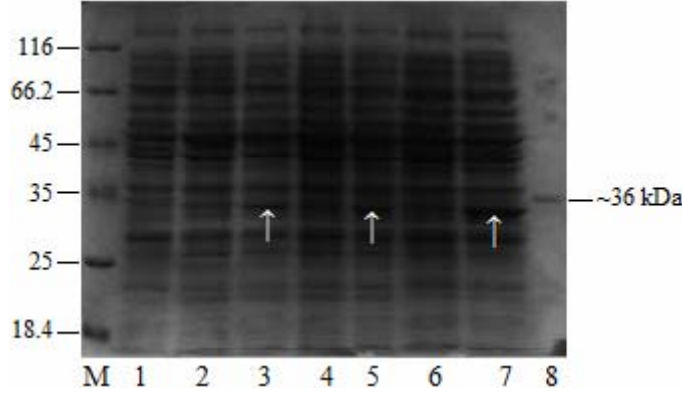
Hem *Pf*LDH, hem de *Pv*LDH proteinlerinin *E. coli*'deki ekspresyonlarının zayıf olduğu bilinmektedir [108, 110, 149]. Bu nedenle *PvLM1Tg1* proteinin ekspresyonunun indüklenerek protein üretiminin artırılması amaçlanmıştır. Bölüm 3.2.1.4.'de anlatıldığı gibi *PvLM1Tg1* geni bir ekspresyon vektörü olan pKK223-3 vektörüne klonlanmıştır. Bu vektör P_{tac} adı verilen güçlü bir promotor bölgesi taşımaktadır. Tac promotoru/operatörü (P_{tac}) ekspresyon sistemi için yaygın olarak kullanılmaktadır. P_{tac} 'ın ekspresyonu *lacI* proteini tarafından baskılanmaktadır. Ortamda laktozun yokluğunda *lacI* proteini operatör bölgeye bağlanarak protein transkripsiyonunu engellemektedir. Ortamda laktoz varsa, laktoz, *lacI* repressörüne bağlanarak protein transkripsiyonuna izin verilmektedir. IPTG, laktoz analogu olup *lacI* repressörüne bağlanarak transkripsiyonu indüklemektedir [154]. Bu nedenle P_{tac} ekspresyonu, derepressör IPTG konsantrasyonu ile bağlantılıdır. Buna bağlı olarak P_{tac} 'ın gerisinde bulunan klonlanmış gen ürününün ekspresyon miktarı IPTG konsantrasyonu ile değişebilmektedir.

IPTG'nin *PvLM1Tg1* geninin ekspresyonu üzerindeki indükleyici etkisini görmek için Şekil 3.9.'da ve Şekil 3.10.'da aynı zamanda hem IPTG ile indüklenen hem de indüklenmeyen genlerin ekspresyon sonrası protein bantları karşılaştırılmış ve IPTG ile indüklenmiş *PvLM1Tg1* geninde ekspresyonun arttığı gözlenmiştir. IPTG ile muamele edilen ve edilmeyen *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profilleri karşılaştırıldığı zaman bazı protein bantlarının ekspresyon düzeylerinin her ikisinde farklı olduğu görülmüştür. Birbirine eşdeğer protein bantları IPTG ile muamele edilen *E. coli* JM105 hücrelerinin protein profilinde büyük bir bant olarak görülürken, IPTG ile muamele edilmeyen hücrelerin protein profilinde diğerine göre daha zayıf olduğu tespit edilmiştir. Bu proteinlerin ekspresyon farkı dikkate alınarak IPTG'nin, *PvLM1Tg1* geninden farklı olarak, *E. coli* JM105 bakteri soyuna ait bazı genler üzerinde de indükleyici etki yaptığı tespit edilmiştir. Protein saflaştırma aşamasında spesifik olarak *Pv*LDH proteinleri saflaştırılacağından, bu tür proteinlerin ifadelerinin artmış olması bir önem taşımamaktadır.

PvLM1Tg1 mutant proteinin ekspresyon analizinden sonra, *Pv*LDH enziminin aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun model Apikompleksan *Toxoplasma gondii*'nin LDH1 izoenzimindeki (*Tg1LDH*) pentapeptid insersiyonuna tamamen benzetildiği *PvLM2Tg1* mutagenезinin de protein ekspresyon analizi yapılmıştır. Şekil 3.11.'de bu ekspresyon analizinin yapıldığı SDS-PAGE jeli görülmektedir.

PvLM2Tg1 mutant proteinin eksprese edildiği *E. coli* JM105 hücrelerinin indükleme sonrası 3. saatinden itibaren (T_3 dönemi) proteinin ekspresyonu jel üzerinde görülebildiği

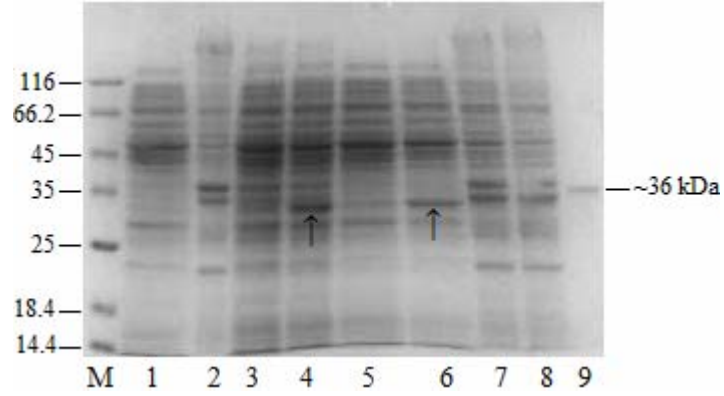
için bu sürecin öncesindeki örneklerin SDS-PAGE görüntüsü gösterilmemiştir. Şekil 3.11.'de PvLM2Tg1 genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin indüklenme sonrası 3 saatlik (T_3), 5 saatlik (T_5) ve bir gecelik ($T_{O/N}$) örnekleri yürütülmüştür.



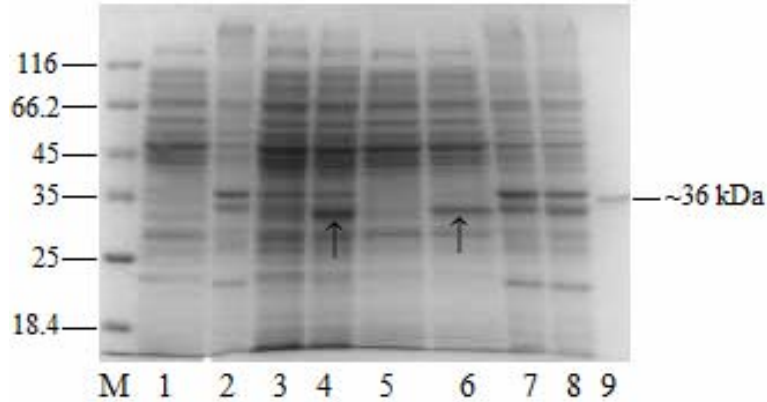
Şekil 3.11. PvLM2Tg1 genini içeren 3 saatlik-bir gecelik *E. coli* JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili. Hatlar: M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: Herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili; 2 ve 3: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Tg1 genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T_3 protein profili; 4 ve 5: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Tg1 genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T_5 protein profili; 6 ve 7: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Tg1 genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin $T_{O/N}$ protein profili; 8: İnsan LDH-M saf proteini

PvLM2Tg1'in ekspresyon analizi yapılan jel görüntüsüne göre, PvLM1Tg1 proteininin ekspresyonunda olduğu gibi, yine en iyi protein ekspresyonu bir gecelik ve indüklenmiş örnekte gözlenmiştir. Ancak her iki proteininde zayıf ekspresyonundan dolayı indüklenme yapılmadığı zaman protein bantları $T_{O/N}$ örneklere rağmen jelde net olarak gözlenememiştir.

PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 proteinlerinin ekspresyonları kontrol edildikten sonra bu proteinlerin çözünebilir formda olup olmadıklarını belirlemek için, her iki proteinin de eksprese edildikleri hücre ekstraktlarının süpernatant ve pelet fazlarının ayrı ayrı incelenmesine karar verilmiştir. Bunun için her bir mutant geni içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve peleti Bölüm 2.2.14.'de belirtilen şekilde hazırlandıktan sonra jelde ayrı ayrı yürütülmüştür. Aktif protein hücre içerisinde çözünebilir yapıda olup süpernatant fazı içerisinde bulunurken, inaktif protein çözünemeyen yapıda pelet fazı içerisinde yer almaktadır. Dolayısıyla bu fazların protein profillerinde PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 proteinlerinin bulunup bulunmadığına bakmak için jel üzerinde yürütülmüştür (Şekil 3.12. ve Şekil 3.13.).



Şekil 3.12. PvLM1Tg1 genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının protein profillerinin ayrı ayrı gösterilmesi. Hatlar: M: Markır (Protein MW- SM0431); 1 ve 2: Herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazları; 3 ve 4: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Tg1 genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili; 5 ve 6: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Tg1 genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı; 7 ve 8: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Tg1 genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin pelet fazı; 9: İnsan LDH-M saf proteini



Şekil 3.13. PvLM2Tg1 genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının protein profillerinin ayrı ayrı gösterilmesi. Hatlar: M: Markır (Protein MW-SM0431); 1 ve 2: Herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazları; 3 ve 4: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Tg1 genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili; 5 ve 6: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Tg1 genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı; 7 ve 8: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Tg1 genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin pelet fazı; 9: İnsan LDH-M saf proteini

Şekil 3.12. ve Şekil 3.13.’deki jel görüntüsünde PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 proteinleri “↑” ile gösterilmiştir. Hat 1 ve 2’de herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarında bu proteinlerin bantları ile aynı hizada hiçbir bant bulunmamaktadır. Bu farklılık, genel protein profilinde gözlemlendiği gibi süpernatant ve pelet fazlarının protein profillerinde de LDH protein bandının *E. coli* JM105 bakteri soyuna ait olmayıp PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 genlerinin herbirinin ekspresyon ürünü

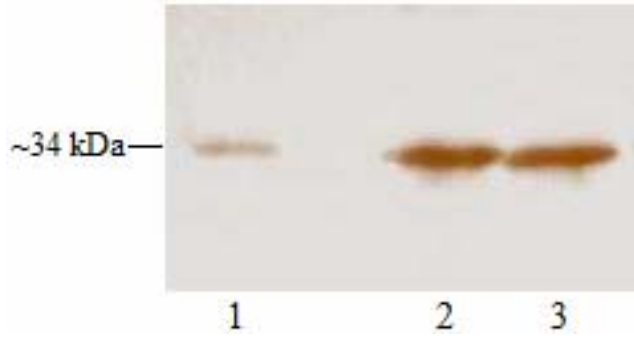
olduğunu doğrulamaktadır. Her iki jel görüntüsünde de görüldüğü gibi PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 genlerinin herbirinin aktarıldığı *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profilinde görülen mutant proteinlerin bantları, süpernatant ve pelet fazları ayrı ayrı incelendiği zaman sadece süpernatant fazında görülmektedir. Pelet fazında ise bu protein bandı görülmemektedir. Dolayısıyla hem PvLM1Tg1 proteininin hem de PvLM2Tg1 proteininin çözünebilir formda ekspresyonu yapılmıştır. Ancak zayıf ekspresyondan dolayı her iki protein de genel protein profili ve süpernatant profilinin sadece indüklenmiş fazlarında görülmüştür.

Şekil 3.12. ve Şekil 3.13.'deki jel görüntüsünde, insan LDH proteininin büyüklüğü ile karşılaştırılan PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 protein bantları süpernatant fazında görülmüş olmakla birlikte bu bantların ilgili mutant proteinlerin bantları olup olmadıklarının kesin olarak belirlenmesi gerektiği düşünülmüştür. Bunun için bu proteinlerin varlığını doğrulamak için Western blot yapılmasına karar verilmiştir. Ancak ilk olarak Western blot aşamasında PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 protein bantlarını tanıması için kullanılacak olan primer antikora karar verilmesi gerekmiştir. Yapılan çalışmalarda *Pf*LDH proteininin SDK1 mutant proteini ile hazırlanan primer antikorunun [149], *Pv*LDH proteini ile çapraz reaksiyon gerçekleştirdiği gözlenmiştir [166, 167]. Dolayısıyla *Pf*LDH primer antikorunun mutant *Pv*LDH proteinlerini de tanıyacağı düşünülmüştür. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 proteinlerinin Western blot çalışmaları için bu *Pf*LDH primer antikorunun kullanılmasına karar verilmiştir. Bununla birlikte bu antikorun mutant *Pv*LDH proteinleri ile reaksiyon vermemesi durumunda B planı olarak *Pv*LDH proteininin saflaştırılması ve bu protein ile hazırlanan emülsiyonun Yeni Zelanda beyaz tavşanlarına enjeksiyonundan sonra alınacak kan serumundan poliklonal antikorun elde edilmesi amaçlanmıştır.

PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 proteinlerinin Western blot çalışması Bölüm 2.2.13.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.14.'de gösterilmiştir.

Şekil 3.14.'de görülen Western blot membranında hat 1'de *Pv*LDH proteini pozitif kontrol olarak gösterilmiştir. Görüldüğü gibi *Pf*LDH'nin poliklonal antikoru, *Pv*LDH proteinini de tanıyarak çapraz reaksiyon gerçekleştirdiği için hat 1'de *Pv*LDH protein bandı (~34 kDa) görülmektedir. Hat 2 ve 3'de ise sırasıyla PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 bantları bulunmaktadır. Bu bantlar pozitif kontrol *Pv*LDH proteini ile aynı hizada olup *Pf*LDH'nin poliklonal antikoru, bu mutant proteinleri de tanımaktadır. *Pf*LDH poliklonal antikorunun *Pv*LDH proteinini tanıması, iki LDH arasındaki benzerlik oranının yüksek olmasından (% 90 aminoasit benzerliği) kaynaklanırken, mutant *Pv*LDH proteinleri

PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 proteinlerini tanımasının ise antikorun bağlandığı epitopun mutant *PvLDH* proteinlerinde değiştirilmemiş olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Dolayısıyla bundan sonraki PvLM1Et, PvLM2Et ve PvLM1Tp, PvLM2Tp mutagenizlerinde de aynı bölge hedef alındığı için bu mutant proteinler için de *PfLDH* poliklonal antikorunun kullanılmasına karar verilmiştir. Bu durumda *PvLDH* proteini kullanılarak poliklonal antikor elde edilmesine gerek kalmamıştır.



Şekil 3.14. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 proteinlerinin Western blot ile gösterilmesi. Hatlar: 1: İndüklenmiş *PvLDH* genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı; 2: İndüklenmiş PvLM1Tg1 genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı; 3: İndüklenmiş PvLM2Tg1 genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı

3.2.1.9. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Proteinlerinin Aktivitelerinin Kontrol Edilmesi

PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 proteinlerini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin hem genel protein analizleri, hem de süpernatant ve pelet fazlarının ayrı ayrı analizleri ile ekspresyonları kontrol edilmiştir. Ayrıca Western blot ile bu proteinlerin *E. coli* JM105 hücrelerindeki ekspresyonları kesin olarak doğrulanmıştır. Elde edilen bu sonuçlara göre, PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 proteinlerinin *E. coli* JM105 bakteri soyunda çözünebilir formda ekspresyonu yapılmaktadır. Ancak çözünebilir formda eksprese edilmelerine rağmen bu proteinlerin aktif olup olmadıklarını kesin olarak belirlemek için spesifik LDH aktivitelerinin ölçülmesi amaçlanmıştır. Ekspresyonları yapılan proteinler saflaştırıldıktan sonra aktiviteleri ve diğer kinetik tayinleri yapılacak olmasına rağmen genel hücre ekstraktlarından hazırlanan süpernatant fazı ile ön aktivite kontrolü yapılmıştır.

Bölüm 2.2.14.'de anlatılan şekilde PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 genlerinin herbirini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı hazırlanmıştır. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 proteinlerinin kinetik olarak tayini ve aktivitesinin ölçülmesi bu süpernatant

fazı kullanılarak ve NADH'nın 340 nm'deki absorpsiyonu takip edilerek yapılmıştır. Tablo 3.3.'de görüldüğü gibi PvLM1Tg1 proteini aktif olup K_{108B}→S_{108B} aminoasit değişikliği PvLDH proteininin aktivitesinde hiçbir değişiklik yapmamıştır. PvLDH proteini aktif bölge halkasındaki bir aminoasit değişikliğine karşı toleranslıdır. Tablo 3.4.'de görüldüğü gibi aynı zamanda PvLM2Tg1 proteini de aktif olup D_{108A}K_{108B}E_{108C}W_{108D}N_{108E}→D_{108A}S_{108B}E_{108C}W_{108D}S_{108E} değişikliği ile PvLDH proteininin aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun tamamen Tg1LDH'dakine benzetilmesi proteinin tolere edebileceği bir değişikliktir. Her iki proteinin de ileri kinetik analizlerinin yapılması daha açıklayıcı bilgiler verecektir.

Tablo 3.3.'de görüldüğü gibi PvLM1Tg1 geninin indüklenmesi logaritmik fazın 3. saatinde aktiviteyi yaklaşık olarak 2 kat artırırken bir gecelik örneklerde 3 kat artırmıştır. Pirüvat konsantrasyonunun azalması ile indüklenme, indüklenmemiş ve indüklenmiş örneklerdeki bu aktivite farkını artırmıştır. Yine pirüvat konsantrasyonunun artışı bütün örneklerde aktiviteyi etkilemezken, bir gecelik indüklenmiş örneklerde ise aktiviteyi azaltmıştır. En yüksek aktivite 1 mM pirüvat konsantrasyonu ile bir gecelik indüklenmiş örneklerde görülmüştür. PvLM1Tg1 genini içermeyen *E. coli* JM105 hücrelerinde ise herhangi bir LDH aktivitesi gözlenmemiştir. Bu da gözlenen LDH aktivitesinin klonlanan gene ait olduğunu göstermiştir.

Tablo 3.3. PvLM1Tg1 proteininin aktivitesinin ölçülmesi. (LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiş olup bu değerlerin ortalaması verilmiştir).

$\Delta A_{340}/\text{dakika}$			OD ₆₀₀ (Seyreltme Faktörü: 1/10)	10 mM Pirüvat	1 mM Pirüvat
PvLM1Tg1 genini içeren <i>E. coli</i> JM105	İndüklenmemiş	3 saat	0,181	0,067	0,071
	İndüklenmiş		0,174	0,121	0,194
	İndüklenmemiş	Bir gece	0,369	0,174	0,231
	İndüklenmiş		0,324	0,574	0,827
<i>E. coli</i> JM105	3 saat		0,217	0,020	0,021
	Bir gece		0,388	0,080	0,039

Tablo 3.4.'de PvLM2Tg1 proteininin aktivite sonuçları görülmekte olup bu mutant protein için de PvLM1Tg1 proteininkine benzer sonuçlar alınmıştır.

Tablo 3.4. PvLM2Tg1 proteininin aktivitesinin ölçülmesi. (LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiş olup bu değerlerin ortalaması verilmiştir).

$\Delta A_{340}/\text{dakika}$			OD ₆₀₀ (Seyreltme Faktörü: 1/10)	10 mM Pirüvat	1 mM Pirüvat
PvLM2Tg1 genini içeren <i>E. coli</i> JM105	İndüklenmemiş	3 saat	0,181	0,039	0,044
	İndüklenmiş		0,175	0,145	0,193
	İndüklenmemiş	Bir gece	0,359	0,190	0,191
	İndüklenmiş		0,332	0,621	0,823
<i>E. coli</i> JM105	3 saat		0,217	0,020	0,021
	Bir gece		0,388	0,080	0,039

Hem PvLM1Tg1 proteininin hem de PvLM2Tg1 proteininin indüklenmiş örneklerde aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. İndüklenmiş ve indüklenmemiş örneklerin OD₆₀₀'deki hücre konsantrasyonlarının değişmediği dikkate alındığı zaman her iki proteinin aktivitesindeki bu artışın gen ekspresyonundaki artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ayrıca His Tag etiketinin protein ekspresyonunu ve aktivitesini etkilemediği bilinmektedir [134, 138, 160]. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 proteinleri de 6xHis Tag etiketi taşımakta olup aktif olarak ekspresyonları yapılmıştır.

3.2.1.10. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Proteinlerinin Saflaştırılması İçin Protokol Optimizasyonu

Rekombinant proteinlerin saflaştırılması, ayrıntılı karakterizasyonları için gerekmektedir. Bu tez çalışmasında elde edilen PvLM1Tg1, PvLM2Tg1 ve daha sonra bahsedilecek olan diğer mutant PvLDH proteinleri Steady-State kinetik analizlerinin yapılması için saflaştırılmıştır. Ancak mutant PvLDH proteinlerinin saflaştırılmasının öncesinde, protokolün optimize edilmesi gerekmiştir. Saflaştırma protokolünün optimizasyonu için yapılan bütün saflaştırma denemelerinde protein örneği olarak yabancı PvLDH kullanılmıştır.

PvLDH proteinin saflaştırılması için nikel-nitritotriasetikasit (Ni-NTA) metal-affinite kromatografi matriksi Ni-NTA agaroz kullanılmıştır. Matriksi oluşturan Ni-NTA, nikel iyonunun koordinasyon alanındaki altı ligand bağlanma bölgesinin dördüne bir tetradentat şelat oluşturunca adsorban olan NTA ligandının bağlandığı bir yapı olup, geriye kalan iki

serbest bölge altı adet ardışık histidin aminoasidi (6xHis Tag) ile etiketlenmiş protein tarafından işgal edilmektedir [160].

PvLDH ve diğer mutant proteinlerin 6xHis Tag ile etiketlenmeleri Ni-NTA'ya bağlanmalarını kolaylaştıracağı için altıklonlama sırasında bütün insertlerin 3' ucuna altı adet ardışık histidin aminoasidini kodlayan nükleotid dizisi ilave edilmiştir. Böylece ekspresyon sonrası, C-terminali 6xHis Tag ile etiketlenmiş proteinler elde edilmiştir. Kesilmiş protein (truncated protein) ürünlerini elemine ederek sadece tam uzunluktaki proteinlerin saflaştırılmasını mümkün kılmak için 6xHis Tag etiketinin C-terminaline yerleştirilmesi tercih edilmiştir [134, 160].

3.2.1.10.1. *PvLDH* Proteininin Saflaştırılması İçin Protokol 1'in Optimizasyonu

PvLDH proteinin Ni-NTA agaroz ile saflaştırılması için ilk olarak Bölüm 2.2.15.1.'deki Protokol 1 optimize edilmiştir. Bunun için aşağıdaki denemeler yapılmıştır:

PvLDH proteinin saflaştırılması için kullanılacak tamponların uygun imidazol konsantrasyonlarını belirlemek için yapılan ilk denemede (Deneme 1), Bölüm 2.2.15.1.'deki Protokol 1 takip edilerek Hücre Lizis Tamponu 1 (LT1: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM İmidazol; pH: 8.0), Yıkama Tamponu 1 (WT1: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 15 mM İmidazol; pH: 8.0) ve Elüsyon Tamponu 1 (ET1: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM İmidazol; pH: 8.0) aşağıdaki şekilde kullanılmıştır:

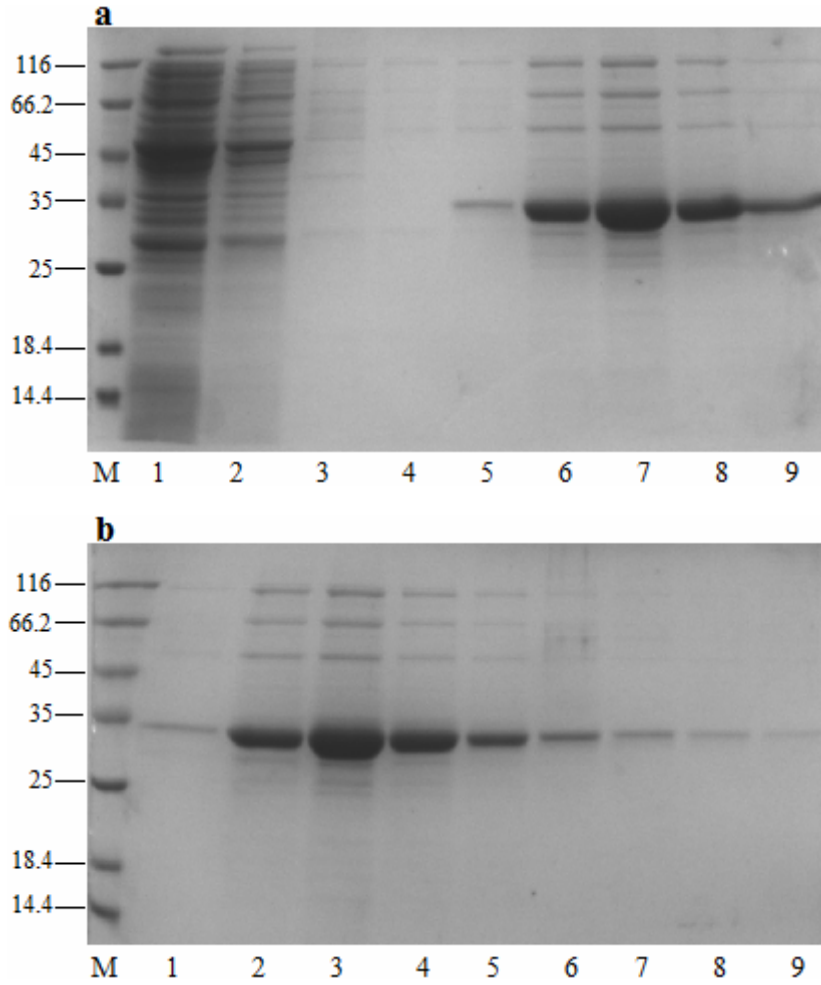
Tablo 3.5. *PvLDH*'ın Deneme 1 ile saflaştırılma protokolü

Deneme No	Kolon	Hücre Lizisi	1. Yıkama	2. Yıkama	3. Yıkama	Elüsyon
1	10 ml'lik şırınga	4 ml LT1	4 ml WT1	4 ml WT1	4 ml WT1	9x0,5 ml ET1

PvLDH proteininin saflaştırılması sırasında bütün aşamalarda alınan örnekler SDS-PAGE ile analiz edilerek saflaştırma denemesi kontrol edilmiştir. Saflaştırma protokolünün uygulanması sırasında alınan örneklerden CL (cell lysate) kolona yüklenmek üzere hazırlanan hücre ekstraktını; FT (flow through) hücre ekstraktının kolona yüklenmesi sonrasında kolondan akan ilk süzüntüyü; W1, W2, W3, ...vs. (wash 1, wash 2, wash 3, ...vs.) kolona yıkama tamponu uygulanması sonrasında alınan yıkama örneklerini; E1, E2,

E3, ...vs. (elution 1, elution 2, elution 3, ...vs.) kolona elüsyon tamponu uygulanması sonrasında alınan elüsyon örneklerini temsil etmektedir.

Şekil 3.15.'de protein örneklerini denatüre etmeden doğal şartlar altında yapılan Deneme 1 ile elde edilen saflaştırma sonuçları görülmektedir.



Şekil 3.15. Deneme 1 ile saflaştırılmış *Pv*LDH proteininin SDS-PAGE ile analizi. Hatlar: **(a)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: FT; 2: W1; 3: W2; 4: W3; 5: E1; 6: E2; 7: E3; 8: E4; 9: E5. **(b)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: E1; 2: E2; 3: E3; 4: E4; 5: E5; 6: E6; 7: E7; 8: E8; 9: E9

Şekil 3.15.'de görülen FT örneğinde, kolona bağlanma affinitesi göstermeyen protein örneklerinin kolondan uzaklaştırıldığı görülmektedir. W1'de ise kolona zayıf bağlanma affinitesi gösteren protein örneklerinin yıkama ile kolondan uzaklaştırıldığı görülmektedir. W2 ve W3'de protein bantları neredeyse görülmediği için zayıf affinite gösteren bütün yabancı proteinlerin ilk yıkamada uzaklaştırıldığı düşünülmüştür. E1'de *Pv*LDH proteini görülmesine rağmen tam olarak kolondan elüsyonu E2, E3 ve E4'de gerçekleştirilmiştir.

Ancak bu elüsyon örneklerinde *PvLDH* proteini ile birlikte bakteriyel kökenli yabancı proteinlerde elde edilmiştir. Dolayısıyla hücre ekstraktında Ni-NTA matriksine yüksek affinite gösteren *PvLDH* proteininden başka, diğer proteinlerinde bulunduğu görülmektedir. Bu yabancı proteinlerin matrikse sıkı bağlanmaları yıkama işlemi sırasında kolondan uzaklaştırılmalarını engellemiştir. Buna bağlı olarak *PvLDH* proteini tamamen saf olarak elde edilememiştir.

Denatüre ortama göre, doğal şartlar altında yapılan saflaştırma işleminde bakteriyel kökenli protein kontaminantları çok daha fazla olduğu için, lizis ve yıkama işlemlerinde düşük konsantrasyonda imidazol (sırasıyla 10 mM ve 15 mM) kullanılmıştır. İmidazol halkası histidin aminoasidinin yapısal bir kısmını oluşturmaktadır. 6xHis Tag etiketinin histidin aminoasitlerindeki imidazol halkası, Ni-NTA agaroz matriksindeki NTA ligandları ile sabitlenen nikel iyonlarına bağlanmaktadır. Aynı zamanda lizis ve yıkama tamponlarındaki imidazolde nikel iyonlarına bağlanmaktadır. Böylece 6xHis Tag ile etiketlenmemiş bakteriyel proteinlerdeki dağınık histidin aminoasitlerinin bağlanmasını engellemektedir [160]. Deneme 1'deki lizis ve yıkama tamponlarında kullanılan imidazol konsantrasyonunun (sırasıyla 10 mM ve 15 mM) bakteriyel kökenli proteinlerin kolona bağlanmasını engellemek için yeterli olmadığı düşünülmüş ve artırılmasına karar verilmiştir.

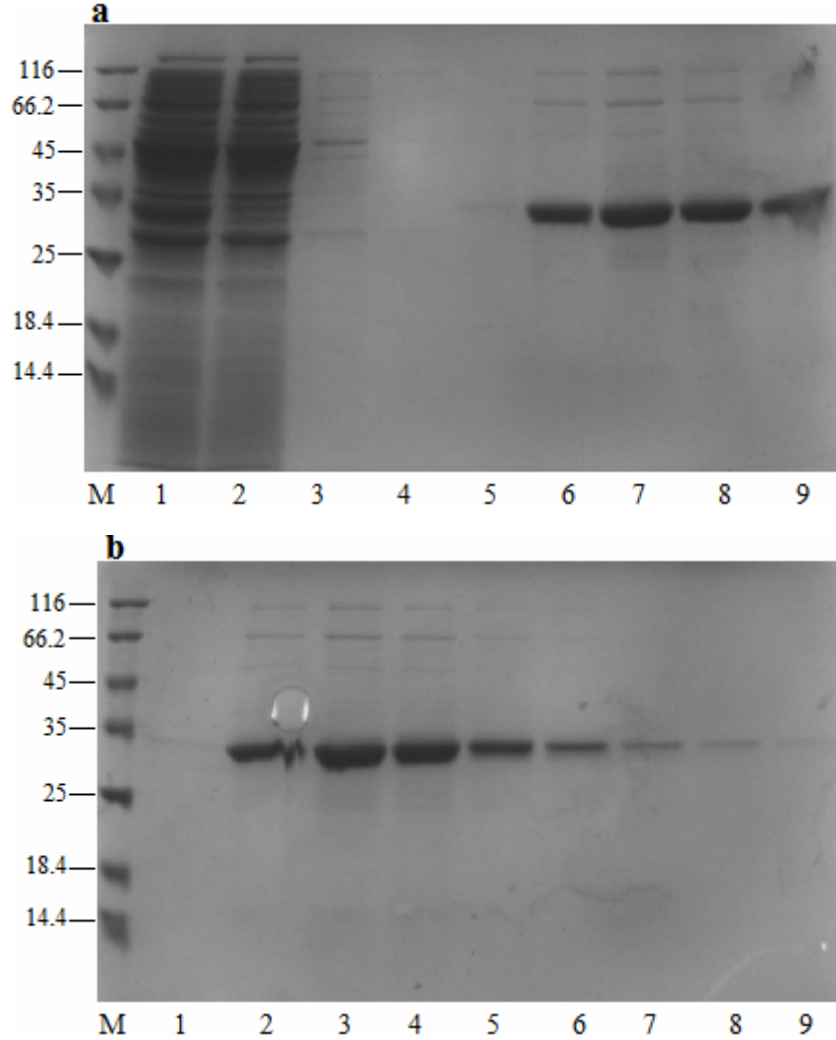
Kolona bağlanan bakteriyel kökenli proteinleri uzaklaştırmak için yapılan Deneme 2'de imidazol konsantrasyonları artırılarak Hücre Lizis Tamponu 2 (LT2: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM İmidazol; pH: 8.0) ve Yıkama Tamponu 2 (WT2: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM İmidazol; pH: 8.0) kullanılmıştır. Elüsyon için yine Elüsyon Tamponu 1 (ET1: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM İmidazol; pH: 8.0) kullanılmıştır. Deneme 2'nin saflaştırma protokolünün özeti Tablo 3.6.'da verilmiştir.

Tablo 3.6. *PvLDH*'ın Deneme 2 ile saflaştırılma protokolü

Deneme No	Kolon	Hücre Lizisi	1. Yıkama	2. Yıkama	Elüsyon
2	10 ml'lik şırınga	4 ml LT2	4 ml WT2	4 ml WT2	9x0,5 ml ET1

Şekil 3.16.'da görüldüğü gibi lizis tamponunda imidazol konsantrasyonunun yükseltilmesi ile bakteriyel proteinler neredeyse tamamen FT örneklerinde uzaklaştırıldığı için yıkama örneklerinde çok fazla bant görülmemiştir. Ayrıca elüsyon örneklerindeki

yabancı bantların azaldığı görülmüştür. Ancak yine de tamamen saf *PvLDH* proteini elde edilememiştir.



Şekil 3.16. Deneme 2 ile saflaştırılmış *PvLDH* proteininin SDS-PAGE ile analizi. Hatlar: **(a)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: CL; 2: FT; 3: W1; 4: W2; 5: E1; 6: E2; 7: E3; 8: E4; 9: E5. **(b)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: E1; 2: E2; 3: E3; 4: E4; 5: E5; 6: E6; 7: E7; 8: E8; 9: E9

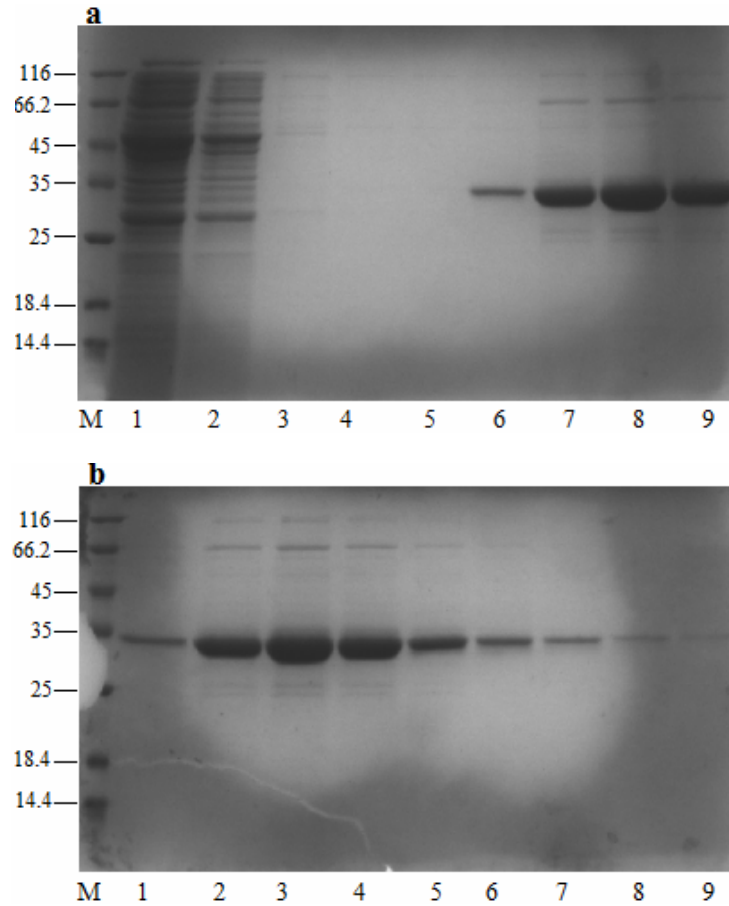
PvLDH proteininin saflık derecesinin artırılmasında kolon çapı ve yıkama sayısının artırılmasının etkisini görmek için yapılan 3. denemede yine Hücre Lizis Tamponu 2 (LT2: 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM İmidazol; pH: 8.0), Yıkama Tamponu 2 (WT2: 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM İmidazol; pH: 8.0) ve Elüsyon Tamponu 1 (ET1: 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM İmidazol; pH: 8.0) kullanılmıştır. Kolon olarak 10 ml'lik enjektör haznesi yerine daha dar çaptaki 5 ml'lik enjektör haznesi kullanılmıştır. Ayrıca yıkama sayısı 2'den 4'e çıkarılmıştır.

Deneme 3'ün saflaştırma protokolünün özeti Tablo 3.7.'de verilmiştir.

Tablo 3.7. *PvLDH*'ın Deneme 3 ile saflaştırılma protokolü

Deneme No	Kolon	Hücre Lizisi	1. Yıkama	2. Yıkama	3. Yıkama	4. Yıkama	Elüsyon
3	5 ml'lik şırınga	4 ml LT2	4 ml WT2	4 ml WT2	4 ml WT2	2 ml WT2	9x0,5 ml ET1

Şekil 3.17.'de Deneme 3 ile elde edilen saflaştırma sonuçları görülmektedir. Yıkama sayısı artırılmış olmasına rağmen bu ilave yıkamalarda bakteriyel proteinler uzaklaştırılamamıştır. Ayrıca kolon çapının daraltılarak resin yüksekliğinin artırılması saflaştırma sonucunu etkilememiştir. Resin yüksekliğinin artırılması etkili bir yıkama yapılarak saf proteinin elde edilmesini engellemiştir. Elüsyon örnekleri tamamen saf olmakla birlikte Deneme 2'deki benzer sonuçlar alınmıştır.



Şekil 3.17. Deneme 3 ile saflaştırılmış *PvLDH* proteininin SDS-PAGE ile analizi. Hatlar: **(a)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: FT; 2: W1; 3: W2; 4: W3; 5: W4; 6: E1; 7: E2; 8: E3; 9: E4. **(b)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: E1; 2: E2; 3: E3; 4: E4; 5: E5; 6: E6; 7: E7; 8: E8; 9: E9

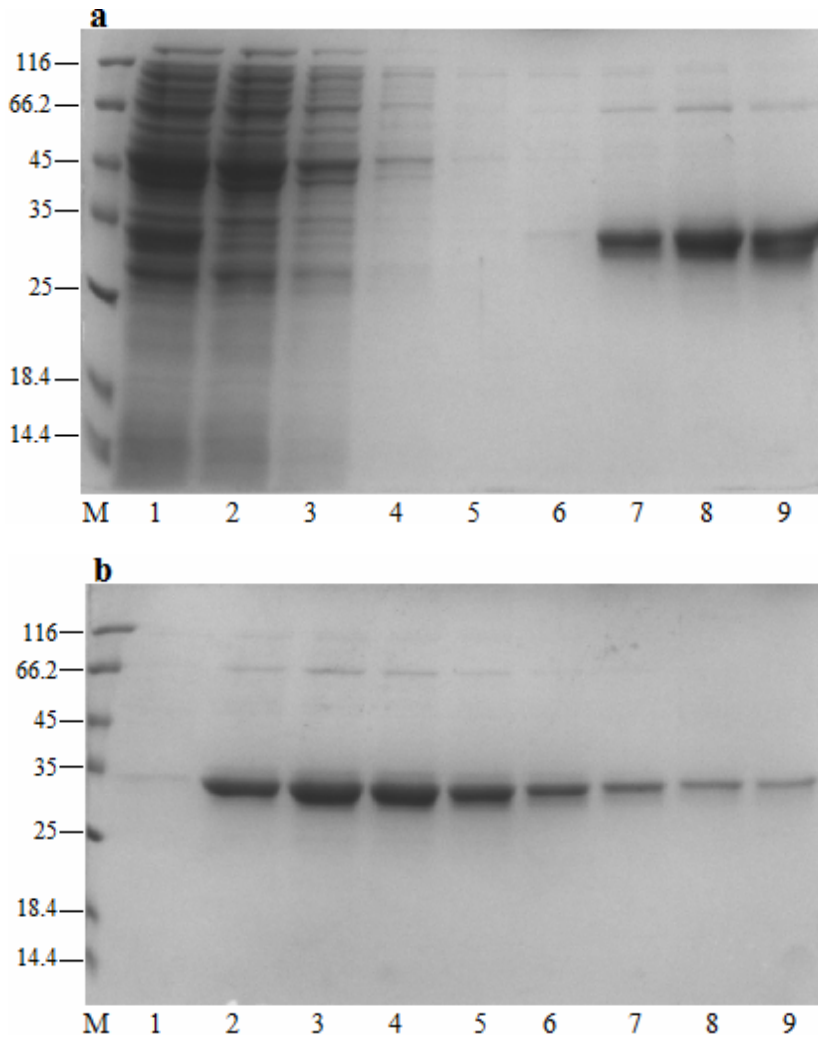
Deneme 2 ve Deneme 3'ün her ikisinde de elüsyon örneklerinde görülen bakteriyel proteinlerin matrikse bağlanma affinitesinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bu yüzden lizis ve yıkama aşamalarında imidazol konsantrasyonunun yükseltilmesi ve yıkama sayısının artırılması bu yabancı proteinlerin uzaklaştırılması için yeterli olmamıştır. Dolayısıyla Deneme 4'de saflaştırma aşamalarındaki şartların daha da kuvvetlendirilmesi gerektiği düşünülmüştür. Matriks ve yabancı proteinler arasındaki spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi için yeterli iyonik kuvvet oluşturmak amacıyla bütün tamponlardaki tuz konsantrasyonu 300 mM'dan 700 mM'a çıkarılmıştır [160]. Ayrıca lizis ve yıkama tamponlarındaki imidazol konsantrasyonu tekrar artırılarak spesifik olmayan etkileşimlerin azaltılması amaçlanmıştır.

Elüsyon örneklerinde görülen yabancı proteinlerin uzaklaştırılması için yıkama aşamasının önemli olduğu düşünülmektedir. Ancak bu proteinlerin herbirinin kolondan uzaklaştırılması için optimum imidazol konsantrasyonları değişebilmektedir. Bunun için yıkama aşamasında adım adım imidazol konsantrasyonu artırılarak bir gradient oluşturulmuştur. Yükselen imidazol konsantrasyonuna bağlı olarak bu yabancı proteinlerin kolondan uzaklaştırılacağı düşünülmüştür. Ayrıca yapılmış olan bütün denemelerde elüsyon örneklerinde görülen bu yabancı proteinlerin Ni-NTA matrikse bağlanma affinitelerinin PvLDH'dan daha yüksek olabileceği düşünülerek elüsyon tamponundaki imidazol konsantrasyonu düşürülmüştür. Böylece elüsyon aşamasında bu yabancı proteinleri kolondan almadan sadece PvLDH proteininin kolondan saflaştırılması amaçlanmıştır. Yapılan bu değişiklikler neticesinde Deneme 4'de Hücre Lizis Tamponu 3 (LT3: 50 mM NaH₂PO₄, 700 mM NaCl, 30 mM İmidazol; pH: 8.0), Yıkama Tamponu 3 (WT3: 50 mM NaH₂PO₄, 700 mM NaCl, 40 mM İmidazol; pH: 8.0), Yıkama Tamponu 4 (WT4: 50 mM NaH₂PO₄, 700 mM NaCl, 45 mM İmidazol; pH: 8.0), Yıkama Tamponu 5 (WT5: 50 mM NaH₂PO₄, 700 mM NaCl, 50 mM İmidazol; pH: 8.0) ve Elüsyon Tamponu 2 (ET2: 50 mM NaH₂PO₄, 700 mM NaCl, 200 mM İmidazol; pH: 8.0) kullanılmıştır. Tablo 3.8.'de PvLDH'ın Deneme 4 ile saflaştırılma protokolünün özeti gösterilmiştir.

Tablo 3.8. PvLDH'ın Deneme 4 ile saflaştırılma protokolü

Deneme No	Kolon	Hücre Lizisi	1. Yıkama	2. Yıkama	3. Yıkama	Elüsyon
4	10 ml'lik şırınga	4 ml LT3	2 ml WT3	2 ml WT4	2 ml WT5	9x0,5 ml ET2

Şekil 3.18.'de görüldüğü gibi elüsyon örneklerindeki bakteriyel proteinlerde bir azalma görülmüştür. Ancak hala yaklaşık olarak 66 kDa büyüklüğündeki bir bant kolondan uzaklaştırılamamıştır. Yapılan bütün saflaştırma çalışmalarında bu yabancı protein bandı elüsyon örneklerinde görülmektedir. Bu proteinin kolondan uzaklaştırılamamasının sebebi kolon matriksine oldukça yüksek bir affinite ile bağlanması olabileceği gibi hücre lizisi sırasında 6xHis Tag etiketli protein ile disülfid bağı oluşturmamasından da ileri gelebileceği düşünülmüştür [160]. Bu yüzden yapılacak yeni denemede *PvLDH* ve bakteriyel kökenli kontaminant proteinler arasında disülfid bağı oluşmasını engellemek için hücre lizis tamponuna 20 mM β -Merkaptoethanol ilave edilmesine karar verilmiştir. Ayrıca lizis ve yıkama tamponlarındaki tuz ve imidazol konsantrasyonu biraz daha yükseltilmiş ve yıkama aşamasında daha yüksek konsantrasyonda bir gradient oluşturulmuştur.

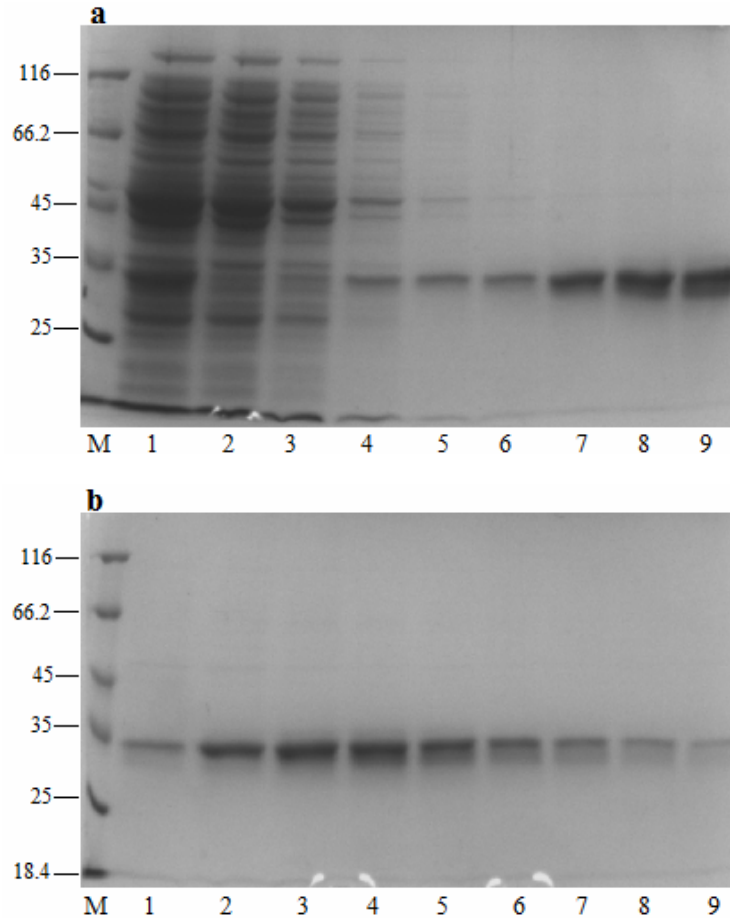


Şekil 3.18. Deneme 4 ile saflaştırılmış *PvLDH* proteininin SDS-PAGE ile analizi. Hatlar: **(a)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: CL; 2: FT; 3: W1; 4: W2; 5: W3; 6: E1; 7: E2; 8: E3; 9: E4. **(b)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: E1; 2: E2; 3: E3; 4: E4; 5: E5; 6: E6; 7: E7; 8: E8; 9: E9

Deneme 5’de Hücre Lizis Tamponu 4 (LT4: 50 mM NaH₂PO₄, 1500 mM NaCl, 50 mM İmidazol, 20 mM β-Mercaptoethanol; pH: 8.0), Yıkama Tamponu 6 (WT6: 50 mM NaH₂PO₄, 1500 mM NaCl, 70 mM İmidazol; pH: 8.0), Yıkama Tamponu 7 (WT7: 50 mM NaH₂PO₄, 1500 mM NaCl, 80 mM İmidazol; pH: 8.0), Yıkama Tamponu 8 (WT8: 50 mM NaH₂PO₄, 1500 mM NaCl, 90 mM İmidazol; pH: 8.0) ve Elüsyon Tamponu 2 (E2: 50 mM NaH₂PO₄, 700 mM NaCl, 200 mM İmidazol; pH: 8.0) kullanılmıştır. Tablo 3.9.’da *PvLDH*’ın Deneme 5 ile saflaştırılma protokolünün özeti gösterilmiştir. Şekil 3.19.’da ise SDS-PAGE analizi ile elde edilen sonuçlar gösterilmiştir.

Tablo 3.9. *PvLDH*’ın Deneme 5 ile saflaştırılma protokolü

Deneme No	Kolon	Hücre Lizisi	1. Yıkama	2. Yıkama	3. Yıkama	Elüsyon
5	10 ml’lik şırınga	4 ml LT4	2 ml WT6	2 ml WT7	2 ml WT8	9x0,5 ml ET2



Şekil 3.19. Deneme 5 ile saflaştırılmış *PvLDH* proteininin SDS-PAGE ile analizi. Hatlar: **(a)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: CL; 2: FT; 3: W1; 4: W2; 5: W3; 6: E1; 7: E2; 8: E3; 9: E4. **(b)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: E1; 2: E2; 3: E3; 4: E4; 5: E5; 6: E6; 7: E7; 8: E8; 9: E9

Şekil 3.19.'da görüldüğü gibi bakteriyel kökenli bütün yabancı proteinler yıkama aşamasında kolondan uzaklaştırılmıştır ve saf *PvLDH* proteini elde edilmiştir. Ancak 2. ve 3. yıkamalarda yabancı proteinlerle birlikte *PvLDH* proteininde kolondan uzaklaştırıldığı görülmektedir. Dolayısıyla saf *PvLDH* proteini elde edilmekle birlikte yıkama aşamasındaki kayıptan dolayı konsantrasyon oranının düştüğü görülmüştür. Ancak *PvLDH* proteini daha saf elde edildiği için bir önceki denemeden ziyade, bu denemeye ait protokolün kullanılmasına karar verilmiştir. Protein konsantrasyonunu artırmak için ise yapılan 6. Denemede, Deneme 5'deki aynı tamponlar kullanılmıştır. Kültür hacmi ve buna bağlı olarak kullanılan tamponların hacmi 6 kat artırılmıştır. Bu nedenle kolon olarak 20 ml'lik şırınga kullanılarak daha fazla yükleme yapılması sağlanmıştır (Tablo 3.10.).

Tablo 3.10. *PvLDH*'ın Deneme 6 ile saflaştırılma protokolü

Deneme No	Kolon	Hücre Lizisi	1. Yıkama	2. Yıkama	3. Yıkama	Elüsyon
6	20 ml'lik şırınga	24 ml LT4	12 ml WT6	12 ml WT7	12 ml WT8	9x3 ml ET2

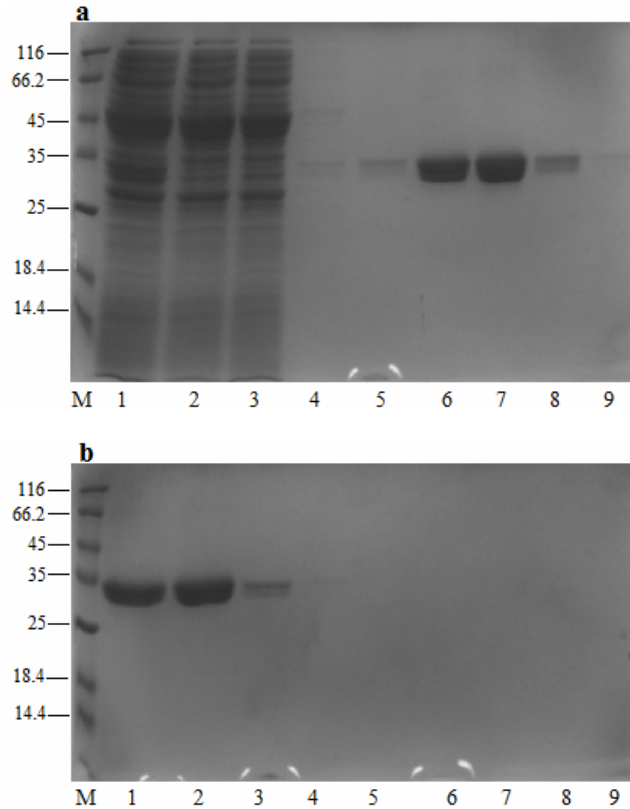
Büyük hacimde protein saflaştırması ile elde edilen *PvLDH* proteininin SDS-PAGE görüntüsü Şekil 3.20.'de görülmektedir. Buna göre *PvLDH* proteininin ilk iki elüsyonda kolondan tamamen elüsyonu yapılarak, saf ve önceki denemeye göre yüksek konsantrasyonda *PvLDH* proteini elde edilmiştir. Önceki denemede yıkama aşamalarında ortaya çıkan protein kaybı problemi bu saflaştırmada görülmemiştir. Hem büyük hacimde protein saflaştırması yapılması, hem de protein kaybının olmaması dolayısıyla elüsyon örneklerinde önceki denemelere göre daha yüksek konsantrasyonda protein elde edilmiştir. Ancak yine de protein miktarının kinetik ölçümler için yeterli olmayacağı düşünülmüştür.

Deneme 6 ile saf protein elde edilmiş olmasına rağmen, yüksek tuz konsantrasyonunun kullanılması önemli bir dezavantaj olmuştur. Bunun için hem protein miktarını konsantre etmek, hem de saflaştırma sırasında kullanılan tuzun uzaklaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi ve sonrasında diyaliz yapılmasına karar verilmiştir. Elüsyon örnekleri birleştirilerek 4 °C'de bir gece amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirilmiştir. Çöktürme sonrası santrifüjleme ile konsantre edilen *PvLDH* proteininden tuz moleküllerini uzaklaştırmak için protein örneği Bis-Tris/KCl, pH: 6.0 çözeltisinde çözülerek aynı çözeltiye karşı diyaliz yapılmıştır.

Diyalizden ardından elde edilen saf protein miktarını ölçmek için ilk olarak web tabanlı “Peptide Property Calculator” isimli program ile *PvLDH*’ın molekül ağırlığı (MW) ve ekstinksiyon katsayısı (ϵ) hesaplanmıştır. Buna göre *PvLDH*’ın molekül ağırlığı 34221 g/mol ve ekstinksiyon katsayısı $16410 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Ardından spektrofotometre ile *PvLDH* saf proteininin A_{280} değeri ölçülmüştür. Buna göre *PvLDH* saf proteininin 280 nm’deki absorpsiyon değeri 0,044 olarak okunmuştur.

Bölüm 2.2.18.’de anlatıldığı gibi yapılan hesaplamaların ardından Deneme 6 ile elde edilen saf *PvLDH* proteininin miktarı 0,09 mg/ml olarak bulunmuştur. Elde edilen protein yeteri kadar saf olmasına rağmen düşük miktarda elde edilmiştir.

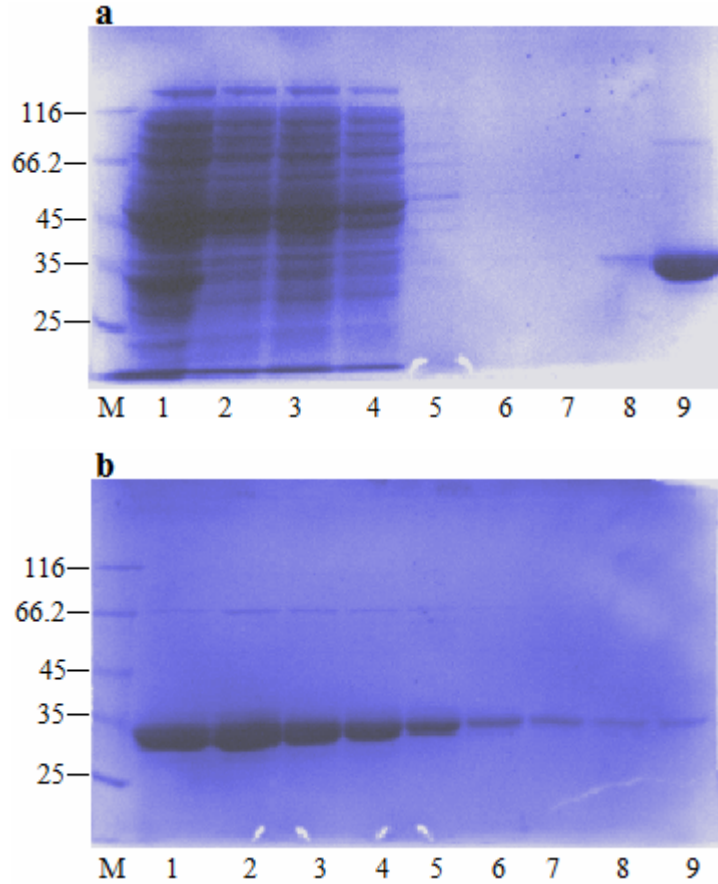
Protokol 1, Deneme 6 ile tamamen optimize edilmesine rağmen enzim miktarının düşük olması, saflaştırma sırasında yüksek tuz konsantrasyonu kullanılması, yıkama sayısının fazla olması gibi birçok işlem nedeniyle, proteinin olumsuz etkilenmesine bağlı olarak yapılan ön kinetik analizlerde enzimin düşük aktivite göstermesi ve proteini saflaştırmak için bu protokolün çok basamaklı bir işlem olması gibi sebeplerden dolayı bu protokolün yerine, yeni bir saflaştırma protokolünün uygulanmasına karar verilmiştir.



Şekil 3.20. Deneme 6 ile saflaştırılmış *PvLDH* proteininin SDS-PAGE ile analizi. Hatlar: **(a)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: CL; 2: FT; 3: W1; 4: W2; 5: W3; 6: E1; 7: E2; 8: E3; 9: E4. **(b)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: E1; 2: E2; 3: E3; 4: E4; 5: E5; 6: E6; 7: E7; 8: E8; 9: E9

3.2.1.10.2. PvLDH Proteininin Saflaştırılması İçin Protokol 2'nin Kullanılması

PvLDH proteininin Ni-NTA agaroz ile saflaştırılması için ikinci yöntem olarak Bölüm 2.2.15.2.'de anlatılan Protokol 2 [74] kullanılmıştır. Bu protokolda kullanılan tuz konsantrasyonu (300 mM) oldukça düşüktür. Bununla birlikte kullanılan bütün tamponlar, proteinler arasındaki hidrofobik etkileşimleri engellemek için % 10 gliserol içermektedir. Böylece bakteriyel kökenli kontaminantların azaltılması sağlanmıştır. İmidazol konsantrasyonu hücre lizisi ve yıkama aşamalarında 20 mM, proteinin elüsyonu aşamasında ise 250 mM kullanılmıştır. Şekil 3.21.'de Protokol 2 ile saflaştırılan *PvLDH* proteininin SDS-PAGE ile analizi gösterilmiştir.



Şekil 3.21. Protokol 2 ile saflaştırılmış *PvLDH* proteininin SDS-PAGE ile analizi. Hatlar: **(a)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: CL; 2: FT1; 3: FT2; 4: FT3; 5: W1; 6: W2; 7: W3; 8: E1; 9: E2. **(b)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: E3; 2: E4; 3: E5; 4: E6; 5: E7; 6: E8; 7: E9; 8: E10; 9: E11

Şekil 3.21.'de alınan sonuçlara göre ilk süzüntü örneklerinde matrikse tutunamayan bir miktar *PvLDH* proteini kaybedilmiş olmakla birlikte elüsyon örneklerinde bol miktarda

PvLDH proteini elde edilmiştir. Ancak sadece elüsyonların SDS-PAGE analizinin yapıldığı Şekil 3.21.b.'de görüldüğü gibi *PvLDH* proteininin yanında Ni-NTA agaroz matrikse affinitesi olan yaklaşık olarak 66 kDa büyüklüğünde yabancı bir protein daha elüsyonlarda görülmektedir. Bu yabancı protein Protokol 1'in optimize edilmesi için yapılan denemelerde de kolondan uzaklaştırılamamış ve saf proteinin elde edilmesini güçleştirmiştir. Protokol 1'in optimizasyonu için yapılan Deneme 5 ve Deneme 6'da görüldüğü gibi bu yabancı proteini kolondan uzaklaştırmak ancak yüksek tuz konsantrasyonu ile mümkün olmaktadır. Fakat bu durumda daha önce bahsedildiği gibi yüksek tuz konsantrasyonu kullanılması, proteinin olumsuz etkilenmesine bağlı olarak yapılan ön kinetik analizlerde enzimin düşük aktivite göstermesine neden olabilmektedir. Bunun için bu protokolün farklı tamponlar ile yeniden optimize edilmesine gerek duyulmamıştır. Zaten Şekil 3.21.b.'de görüldüğü gibi 7. elüsyondan sonra bu yabancı proteinin kaybolduğu ve sadece saf *PvLDH* proteininin elde edildiği görülmektedir. Kinetik çalışmalarında da tamamen saf olan elüsyon basamağına ait proteinler kullanılmıştır.

SDS-PAGE analizi ile sadece *PvLDH* proteininin görüldüğü elüsyon örneğinden yapılan spektrofotometrik ölçüm ile saflaştırılan *PvLDH* proteininin 280 nm'deki absorbans değeri 0,540 olarak okunmuştur. Buna göre Bölüm 2.2.18.'de anlatıldığı gibi yapılan hesaplamaların ardından Protokol 2 ile elde edilen saf *PvLDH* proteininin miktarı 1,13 mg/ml olarak bulunmuştur. Böylece saflaştırılan *PvLDH* proteini Protokol 1'e göre yaklaşık olarak 13 kat daha fazla miktarda elde edilmiştir.

PvLDH proteini ile alınan bu sonuçlara göre Protokol 2'nin kinetik çalışmaları sırasında kullanılacak saf proteini elde etmek için daha uygun olacağına karar verilmiş ve bütün mutant proteinler bu protokole göre saflaştırılmıştır.

3.2.1.10.3. *PvLDH* Enziminin Kinetik Analizi

PvLDH enziminin aktivitesinin ölçülmesi UNICAM UV-Visible spektrofotometre kullanılarak NADH'nin NAD⁺'a çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranı takip edilerek yapılmıştır. Kinetik ölçümlerin yapılması için 9 farklı pirüvat konsantrasyonu (20 μ M, 60 μ M, 180 μ M, 540 μ M, 1.6 mM, 4.86 mM, 14.58 mM, 20.4 mM, 29 mM) ve 200 μ M NADH kullanılmıştır. Bütün pirüvat konsantrasyonlarında enzim miktarı sabit tutulmuştur. 1 ml'lik küvete enzim ve NADH solüsyonları bırakılmış ve en

son pirüvat ilavesi ile reaksiyon başlatılmıştır. Her bir pirüvat konsantrasyonunda üç ölçüm yapıp ortalaması alınmış ve bütün çalışma üç defa tekrar edilerek yine ortalamalar verilmiştir. Aynı işlem daha sonra bahsedilecek olan bütün *PvLDH* mutant proteinleri için gerçekleştirilmiştir.

Enzim ve NADH miktarı sabit tutularak 9 farklı pirüvat konsantrasyonunda *PvLDH* enziminin aktivitesi ölçülmüş ve Tablo 3.11.'de verilen değerler elde edilmiştir [168].

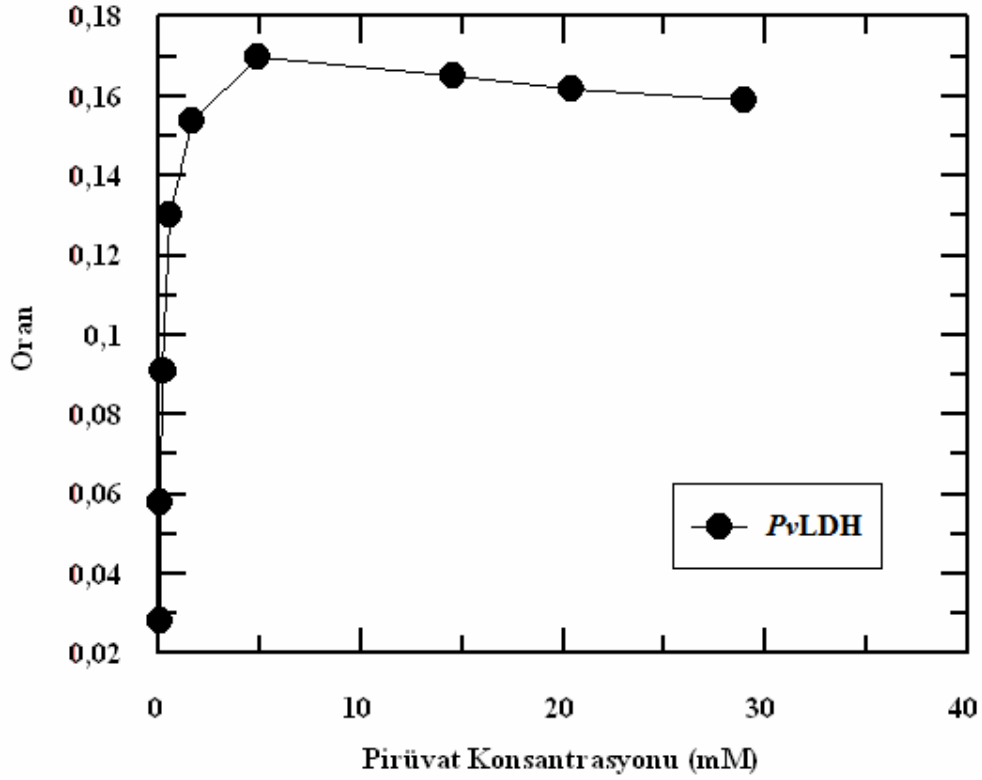
Tablo 3.11. *PvLDH* enziminin aktivitesinin NADH'ın NAD^{+} 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$) absorbans değişim oranının takip edilerek ölçülmesi [168].

Pirüvat (mM)	Oran ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$)
0,02	0,048
0,06	0,089
0,18	0,102
0,54	0,127
1,6	0,141
4,86	0,158
14,58	0,143
20,4	0,135
29	0,129

Elde edilen veriler kullanılarak Grafit 3.0 [163] isimli programa girilmiş ve kullanma klavuzuna göre enzim kinetiği hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. *PvLDH* için elde edilen sonuçlar Tablo 3.12. ve Şekil 3.22.'de sunulmuştur.

Tablo 3.12. *PvLDH*'ın Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar. *PvLDH* için Reduced Chi squared değeri 7.796e-005 olarak tespit edilmiştir [168].

Steady-State Kinetik Sabitesi	Değer	Standart Hata
$V_{\max}$	0.1413	0.0038
K_m (mM)	0.0378	0.0068



Şekil 3.22. *PvLDH*'ın Steady-State kinetik davranışı [168].

Analiz sonucunda tespit edilen V_{max} değerinden ve başlangıçta hesaplanan enzim miktarından yola çıkılarak k_{cat} değeri hesaplanmış ve yorumlamalarda kullanılmıştır. Bütün bu analizlere göre *PvLDH* için elde edilen veriler Tablo 3.13.'de sunulmuştur.

Tablo 3.13. *PvLDH*'ın Steady-State kinetik sabiteleri [168].

Enzim	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($min^{-1} M^{-1}$)
<i>PvLDH</i>	37.8	190	5.0×10^6

PvLDH kullanılarak elde edilen bu sonuçlar bütün mutant proteinler için elde edilen sonuçların karşılaştırmalı yorumunda kullanılmıştır.

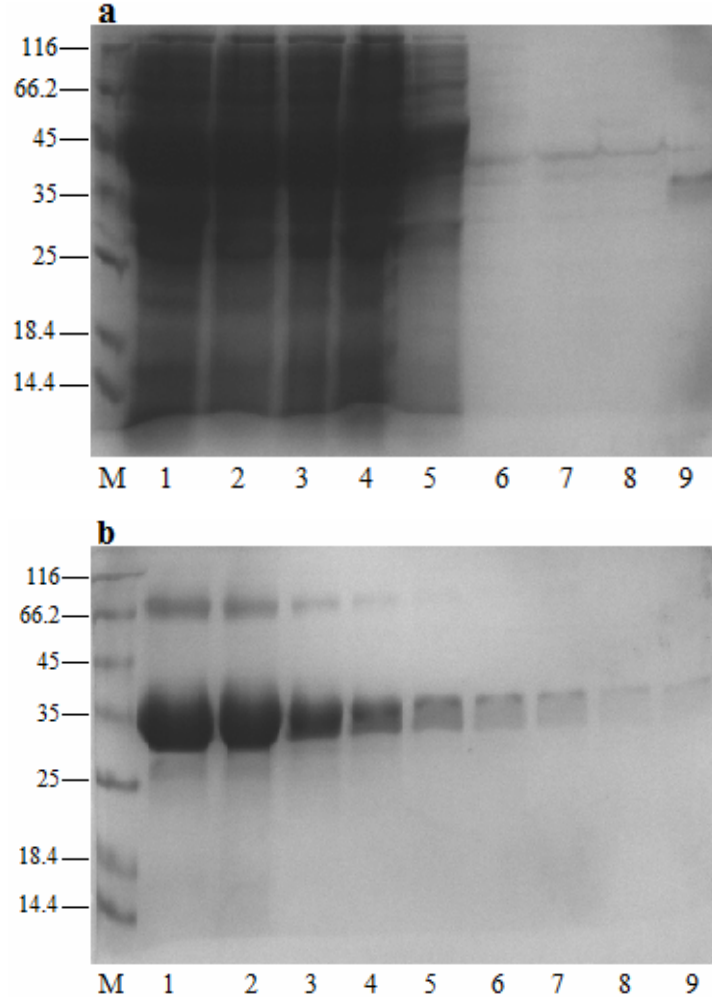
Görüldüğü gibi *PvLDH* için tespit edilen ve NADH'ın kofaktör olarak kullanıldığı K_m pirüvat değeri yaklaşık olarak $38 \mu M$ 'dır. Enzimin k_{cat} (min^{-1}) değeri ise 190'dır. Bu değer literatür bilgisi ile karşılaştırıldığı zaman, Brown, ve diğ., 2004, *PvLDH* için K_m pirüvat değerini $17 \mu M$ olarak bulmuştur [98]. Chaikuad, ve diğ., 2005 literatürüne göre *PvLDH* için K_m pirüvat değeri $52 \mu M$ olarak bulunmuştur [111]. Laboratuvar içi birliği sağlamak

için ideal olan bu değerlerin yabancı tip enzim için elde edilip daha sonra elde edilen bütün verilerin diğer mutant proteinlerin analizi ve sonuçlarının yorumunda kullanılmasıdır [169]. Bu nedenle laboratuvar içi birliği korumak için *PvLDH* tamamen farklı metotlar ile saflaştırılmış ve analiz edilmiştir. Bu kararın doğruluğu literatür araştırması ve kinetik çalışması yapılırken ortaya çıkmıştır. *PvLDH* K_m pirüvat değeri, Brown, ve diğ., 2004 tarafından [98] 17 μ M, Chaikuad, ve diğ., 2005 tarafından [111] 52 μ M ve yaptığımız çalışmalarda ise 38 μ M olarak tespit edilmiştir. Aynı farklılık *PfLDH*'ın analizinde de yaşanmıştır. Farklı grupların elde etmiş olduğu *PfLDH* K_m pirüvat değeri 30-55 μ M arasında bulunmuş olup gruplara göre değişkenlik göstermiştir [98, 111, 134, 136, 138]. k_{cat} değerinin belirlenmesinde de benzer durum söz konusudur [98, 111]. Yaptığımız çalışmada konsantrasyon bağımlı bir değer olan k_{cat} değerinin düşük bulunmuş olması, protein miktarının daha düşük olarak elde edilmiş olmasından kaynaklanabilir ve bu durum farklı protokoller ile elde ettiğimiz protein miktarındaki farklılıkları ve yapmış olduğumuz çok yoğun çalışmalarla saflaştırmanın neden optimize edildiğini de açıklamaktadır. Bu nedenle Tablo 3.13.'de sunulan veriler *PvLDH*'ın bütün mutant proteinleri için elde edilen sonuçların yorumunda kullanılmıştır. Bu kullanımın doğruluğu ileride açıklanacak olan biri diğerinin devamı niteliğinde olan tutarlı mutagenез sonuçları ile özellikle görülecektir.

3.2.1.11. *PvLM1Tg1* ve *PvLM2Tg1* Proteinlerinin Saflaştırılması

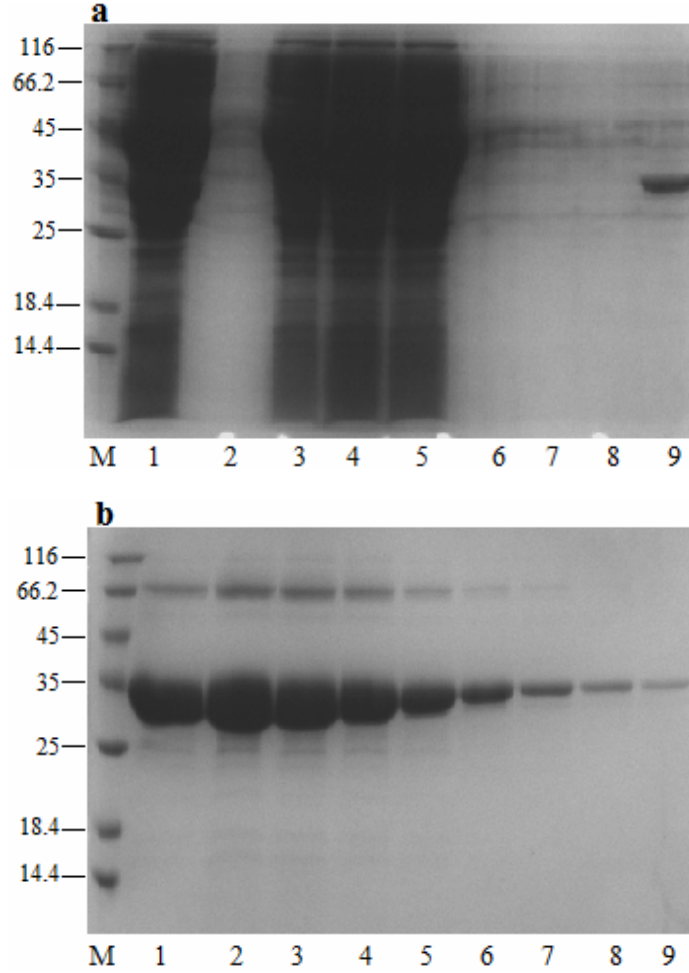
PvLM1Tg1 ve *PvLM2Tg1* mutant proteinleri Protokol 2'ye göre saflaştırılmıştır. Şekil 3.23. ve 3.24.'de bu proteinlerin saflaştırma sonrası SDS-PAGE'deki analizleri gösterilmiştir.

Her iki şekilde de görüldüğü gibi hücre ekstraktındaki yabancı proteinlerin tamamına yakını ilk yıkama ile kolondan uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.23.a. ve Şekil 3.24.a.). Elüsyon aşamasında *PvLM1Tg1* ve *PvLM2Tg1* proteinleri kolondan alınamamış, ancak 2. elüsyondan itibaren kolondan saflaştırılmıştır.



Şekil 3.23. Protokol 2 ile saflaştırılmış PvLM1Tg1 proteininin SDS-PAGE ile analizi. Hatlar: **(a)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: CL; 2: FT1; 3: FT2; 4: FT3; 5: W1; 6: W2; 7: W3; 8: E1; 9: E2. **(b)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: E3; 2: E4; 3: E5; 4: E6; 5: E7; 6: E8; 7: E9; 8: E10; 9: E11

Şekil 3.23.b. ve Şekil 3.24.b.'de görüldüğü gibi PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 protein örnekleri 3. elüsyon örneklerinden itibaren yoğun miktarda kolondan saflaştırılmıştır. Ancak yaklaşık olarak 66 kDa büyüklüğündeki yabancı bir proteinde PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 proteinlerinin herbiri ile birlikte kolondan alındığı için bu proteinler tamamen saf olarak elde edilememiştir. Ancak 7. elüsyondan itibaren bu yabancı proteinin kaybolduğu ve sadece saf PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 mutant proteinlerin elde edildiği görülmektedir.



Şekil 3.24. Protokol 2 ile saflaştırılmış PvLM2Tg1 proteininin SDS-PAGE ile analizi. Hatlar: **(a)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: CL; 2: FT1; 3: FT2; 4: FT3; 5: W1; 6: W2; 7: W3; 8: E1; 9: E2. **(b)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: E3; 2: E4; 3: E5; 4: E6; 5: E7; 6: E8; 7: E9; 8: E10; 9: E11

3.2.1.12. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Proteinlerinin Konsantrasyonlarının Hesaplanması

Web tabanlı “Peptide Property Calculator” isimli program ile PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 proteinlerinin molekül ağırlıkları (MW) sırasıyla 34180 g/mol ve 34153 g/mol, ekstinksiyon katsayıları (ϵ) $16410 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ olarak bulunmuştur. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 proteinlerinin spektrofotometre ile ölçülen A_{280} değerleri ise sırasıyla 1,945 ve 1,904’dür. Buna göre saflaştırılan PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 proteinlerinin her ikisinin de miktarı yaklaşık olarak 4 mg/ml olarak bulunmuştur.

3.2.1.13. PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 Enzimlerinin Kinetik Analizi

PvLM1Tg1 enziminin aktivitesinin ölçülmesi UNICAM UV-Visible spektrofotometre kullanılarak NADH'ın NAD^+ 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$) absorbans değişim oranı takip edilerek yapılmış ve Tablo 3.14.'de verilen değerler elde edilmiştir.

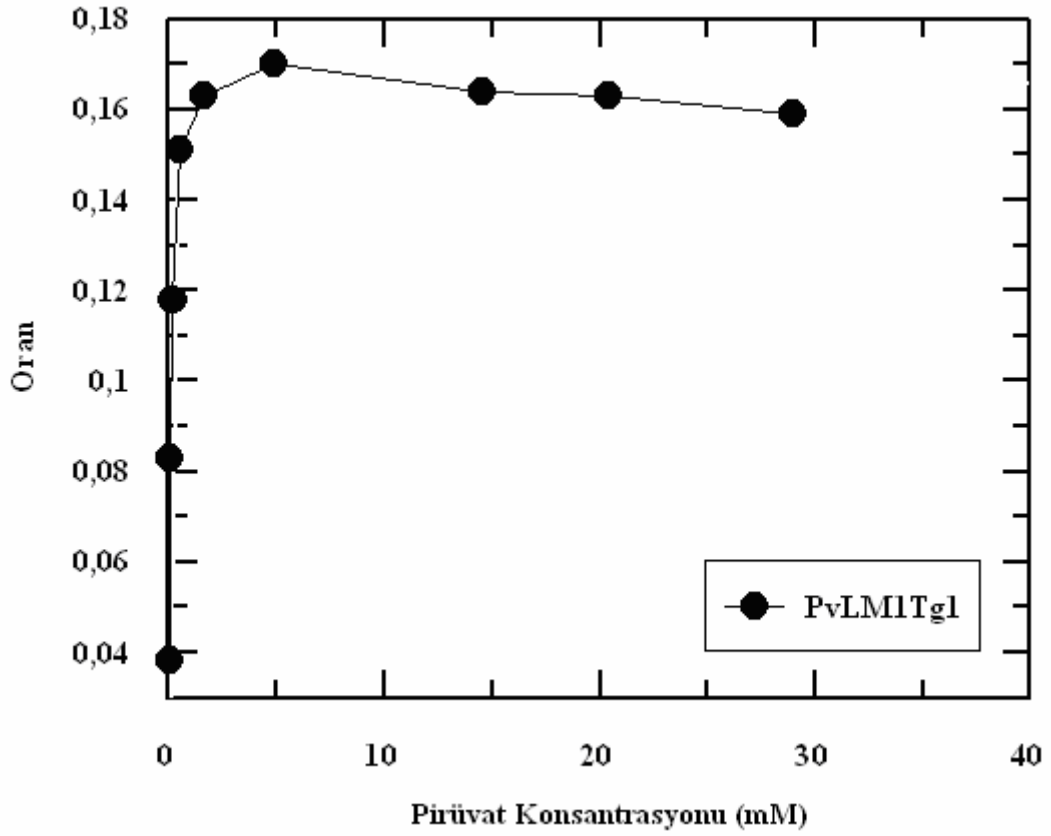
Tablo 3.14. PvLM1Tg1 enziminin aktivitesinin NADH'ın NAD^+ 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$) absorbans değişim oranının takip edilerek ölçülmesi

Pirüvat (mM)	Oran ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$)
0,02	0,038
0,06	0,083
0,18	0,118
0,54	0,151
1,6	0,163
4,86	0,170
14,58	0,164
20,4	0,163
29	0,159

Elde edilen veriler kullanılarak Grafit 3.0 [163] isimli programa girilmiş ve kullanma klavuzuna göre enzim kinetiği hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. PvLM1Tg1 için elde edilen sonuçlar Tablo 3.15. ve Şekil 3.25.'de sunulmuştur.

Tablo 3.15. PvLM1Tg1'in Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar

Steady-State Kinetik Sabitesi	Değer	Standart Hata
$V_{\max}$	0.1658	0.0020
K_m (mM)	0.0639	0.0051



Şekil 3.25. PvLM1Tg1'in Steady-State kinetik davranışı

Analiz sonucunda tespit edilen $V_{\max}$ değerinden ve başlangıçta hesaplanan enzim miktarından yola çıkılarak k_{cat} değeri hesaplanmış ve yorumlamalarda kullanılmıştır. Bütün bu analizlere göre PvLM1Tg1 için elde edilen veriler Tablo 3.16.'da sunulmuştur.

Tablo 3.16. PvLM1Tg1'in PvLDH ile karşılaştırmalı Steady-State kinetik sabiteleri

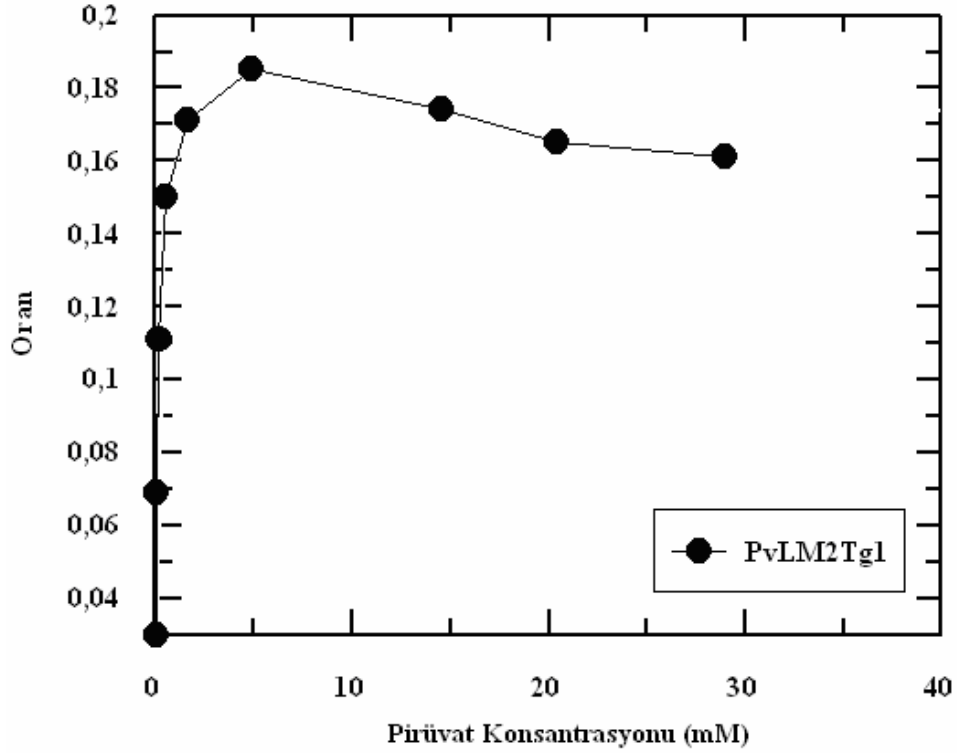
Enzim	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)
PvLDH	37.8	190	5.0×10^6
PvLM1Tg1	63.9	112	1.8×10^6

PvLM2Tg1 enziminin aktivitesinin ölçülmesi UNICAM UV-Visible spektrofotometre kullanılarak NADH'nin NAD^+ 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$) absorbans değişim oranı takip edilerek yapılmış ve Tablo 3.17.'de verilen değerler elde edilmiştir.

Tablo 3.17. PvLM2Tg1 enziminin aktivitesinin NADH'ın NAD⁺'a çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranının takip edilerek ölçülmesi

Pirüvat (mM)	Oran (ΔA_{340} /dakika)
0,02	0,030
0,06	0,069
0,18	0,111
0,54	0,150
1,6	0,171
4,86	0,185
14,58	0,174
20,4	0,165
29	0,161

Tablo 3.17.'de sunulan veriler kullanılarak Grafıt 3.0 [163] isimli programa girilmiş ve kullanma klavuzuna göre enzim kinetiği hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. PvLM2Tg1 için elde edilen sonuçlar Şekil 3.26. ve Tablo 3.18.'de sunulmuştur.



Şekil 3.26. PvLM2Tg1'in Steady-State kinetik davranışı

Tablo 3.18. PvLM2Tg1'in Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar

Steady-State Kinetik Sabitesi	Değer	Standart Hata
$V_{\max}$	0.1740	0.0038
K_m (mM)	0.0931	0.0132

Analiz sonucunda tespit edilen $V_{\max}$ değerinden ve başlangıçta hesaplanan enzim miktarından yola çıkılarak k_{cat} değeri hesaplanmış ve yorumlamalarda kullanılmıştır. Bütün bu analizlere göre PvLM2Tg1 için elde edilen veriler Tablo 3.19.'da sunulmuştur.

Tablo 3.19. PvLM2Tg1'in PvLDH ve PvLM1Tg1 ile karşılaştırmalı Steady-State kinetik sabiteleri

Enzim	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)
PvLDH	37.8	190	5.0×10^6
PvLM1Tg1	63.9	112	1.8×10^6
PvLM2Tg1	93.1	121	1.3×10^6

PvLM1Tg1 mutagenezi ile PvLDH'in aktif bölge halkasındaki ilave 5 aminoasit olan DKEWN aminoasitleri DSEWN haline getirilerek *Toxoplasma gondii* LDH1'i (Tg1LDH) taklit edilmiştir. Yapılan ikinci mutagenez olan PvLM2Tg1 ile de PvLDH'in aktif bölge halkasındaki ilave 5 aminoasit olan DKEWN aminoasitleri DSEWS haline getirilerek *Toxoplasma gondii* LDH1'in pentapeptid insersiyonu tamamen taklit edilmiştir. Tablo 3.19.'da görüldüğü gibi PvLDH enziminin K_m değeri PvLM1Tg1 mutagenezi ile % 69 oranında bir artış göstererek 37.8 μM 'dan 63.9 μM 'a yükselmiştir. Yine PvLM2Tg1 mutagenezi ile K_m değeri yaklaşık olarak 2.5 kat artarak 93.1 μM 'a yükselmiştir. K_m değerindeki bu artış, yapılan mutagenezler ile enzimin pirüvata ilgisinin azaldığını ve buna bağlı olarak bu substrata bağlanmasının zayıfladığını göstermektedir. Ayrıca PvLM1Tg1 mutagenezi, devamı niteliğinde olan PvLM2Tg1 mutagenezi ile karşılaştırıldığı zaman K_m değerinin arttığı görülmektedir. Bu durum her aşamada yapılan mutagenez ile enzimin substratına biraz daha zayıf bağlandığını göstermektedir. PvLDH enziminin pentapeptid insersiyonu Tg1LDH'dakine benzetildiği zaman protein aktivitesini devam ettirmekte, ancak Bölüm 1.4.1.'de açıklanan katalitik mekanizması olumsuz etkilenmekte ve katalitik halka olması gerektiği gibi kapanamadığı için K_m değeri yükselmekte ve pirüvata zayıf bir bağlanma gerçekleşmektedir. Katalitik halkanın iyi kapanamadığının bir diğer göstergesi

de PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 mutant proteinlerinin k_{cat} değerlerinin PvLDH'a göre düşük olmasına bağlı olarak kataliz hızlarının zayıflamasıdır. PvLDH enzimi aktif bölge halkasında sahip olduğu pentapeptid insersiyonu ile substratına daha iyi bağlanmakta ve katalizini daha iyi gerçekleştirmektedir. Ancak PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1 mutant proteinlerinin K_m değerlerindeki yükselme ve k_{cat} değerlerindeki düşüş enzimin aktif bölgesinin pirüvata ulaşma kapasitesinin azaldığını ve pirüvata bağlanmasına rağmen turn over kapasitesinin (enzim dönüşüm hızı) düştüğünü göstermektedir.

3.2.2. PvLDH Enziminin Aktif Bölge Halkasındaki Pentapeptid İnsersiyonunun EtLDH'daki İnsersiyona Benzetilmesi ve Analiz Edilmesi

PvLDH enziminin aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonu ikinci model Apikompleksan *Eimeria tenella*'nın LDH enzimindeki (EtLDH) pentapeptid insersiyonuna benzetilmiştir (Şekil 3.27.). Bunun için her aşamada sadece bir aminoasit değiştirilmiştir. PvLDH geninin/enziminin pentapeptid insersiyonu iki aşamada tamamen EtLDH'a benzetilmiş ve her aşamadan sonra yapılan değişiklik analiz edilmiştir. Elde edilen mutant PvLDH genleri/enzimleri sırasıyla PvLM1Et ve PvLM2Et olarak adlandırılmıştır.

	98	108	109
İnsan-m	A G A R Q Q - E G E S R L		
İnsan-h	A G V R Q Q - E G E S R L		
PvLDH	A G F T K A - P G K S D K E W N R D		
EtLDH	A G I T K A - A G K S D Q E W S R K		
PvLM1Et	A G F T K A - P G K S D Q E W N R D		
PvLM2Et	A G F T K A - P G K S D Q E W S R D		

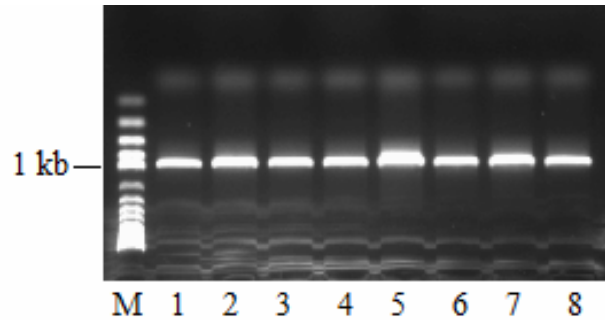
Şekil 3.27. PvLDH'ın aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun EtLDH'dakine benzetilmesi. Değiştirilen aminoasitler koyu renkli ve altı çizili olarak gösterilmiştir. (104. aminoasit tanımlanmamıştır).

Mutant PvLDH genleri olan PvLM1Et ve PvLM2Et genlerini elde etmek ve klonlamak için Bölüm 3.2.1.'de ve altbölümlerinde yapılan deneysel yöntemlerin aynısı yapılmış olup benzer sonuçlar alınmıştır.

Her iki mutant gen için sırasıyla 299 bp ve 310 bp büyüklüğünde A fragmenti ve 721 bp büyüklüğünde B fragmenti elde edilmiş olup bu fragmentler PCR ile birleştirilerek tam uzunlukta PvLM1Et ve PvLM2Et genleri elde edilmiştir.

PvLM1Et ve PvLM2Et genleri yine *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek yapışkan uçlar oluşturulmuş ve pKK223-3 vektörüne ligasyonları yapılmıştır. Elde edilen rekombinant PvLM1Et ve PvLM2Et genleri kompetant *E. coli* JM105 hücrelerine aktarılmıştır. Daha sonra koloni PCR yapılarak PvLM1Et ve PvLM2Et genleri etidyum bromür ile boyalı % 1'lik agaroz jelde yürütülerek gözlenmiştir.

Şekil 3.28.'de koloni PCR sonrası pozitif sonuçlar görülmektedir. Hat 1-4'de PvLM1Et geni için, hat 5-8'de ise PvLM2Et geni için koloni PCR sonuçları görülmektedir. Her iki gen için de beklenen bant büyüklüğü yaklaşık olarak 1 kb olup bütün sonuçların pozitif olduğu görülmektedir.



Şekil 3.28. Koloni PCR sonrası pozitif sonuçların jelde görüntülenmesi. Hatlar: M: Markır (Hyper Ladder I); 1-4: PvLM1Et geni için pozitif sonuçlar; 5-8: PvLM2Et geni için pozitif sonuçlar

Koloni PCR ile alınan muhtemel pozitif sonuçları kesin olarak doğrulamak için PvLM1Et ve PvLM2Et genlerinin Pv16 ve Pv17 primerleri ile çift yönlü dizi analizi yaptırılmıştır.

Şekil 3.29.'da mutant *PvLDH* geni PvLM1Et'nin çift yönlü dizileme sonuçları görülmektedir. PvLM1Et'in her iki zincirinde gerçekleştirilen mutagenез (Şekil 3.29. a ve b) ile AAG kodonu CAA kodonuna çevrilerek $K_{108B} \rightarrow Q_{108B}$ mutagenезi gerçekleştirilmiştir. Mutant *PvLDH* geni PvLM2Et'nin çift yönlü dizileme sonuçlarının gösterildiği Şekil 3.30.'da ise, $K_{108B} \rightarrow Q_{108B}$ mutagenезi için AAG kodonlarının CAA kodonlarına ve $N_{108E} \rightarrow S_{108E}$ mutagenезi için AAC kodonlarının TCG kodonlarına başarıyla değiştirildiği (Şekil 3.30.a.) ve komplementer zincirde de aynı mutagenезin gerçekleştirildiği (Şekil 3.30.b.) görülmektedir.

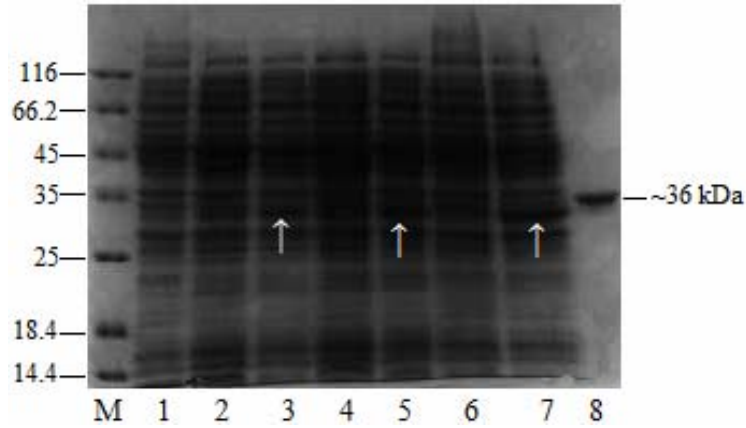


Şekil 3.29. PvLM1Et geninin (a) 5'→3' zincirinin ve (b) 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu

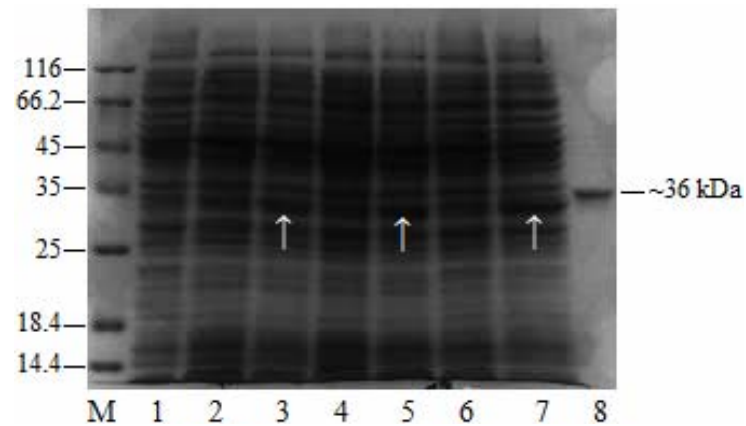


Şekil 3.30. PvLM2Et geninin (a) 5'→3' zincirinin ve (b) 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu

Mutant PvLM1Et ve PvLM2Et genleri yönlendirilmiş mutagenез ile elde edilip altklonlamaları yapıldıktan sonra bu mutant genlerin herbirinin aktarıldıkları *E. coli* JM105 hücrelerindeki ekspresyonlarını kontrol etmek için SDS-PAGE ile genel protein analizi yapılmıştır. Buna göre T_0 , T_{log} , T_1 ve T_2 dönemlerindeki örneklerde protein ekspresyonunun zayıf olmasından dolayı bu protein bantları görülmemiştir. PvLM1Et ve PvLM2Et proteinlerinin ekspresyonu T_3 döneminden itibaren görülmekte olup en iyi protein ekspresyonu bir gecelik örneklerde gözlenmiştir (Şekil 3.31. ve Şekil 3.32.).



Şekil 3.31. PvLM1Et genini içeren 3 saatlik-bir gecelik *E. coli* JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili. Hatlar: M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: Herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili; 2 ve 3: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Et genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T_3 protein profili; 4 ve 5: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Et genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T_5 protein profili; 6 ve 7: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Et genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin $T_{O/N}$ protein profili; 8: İnsan LDH-M saf proteinini

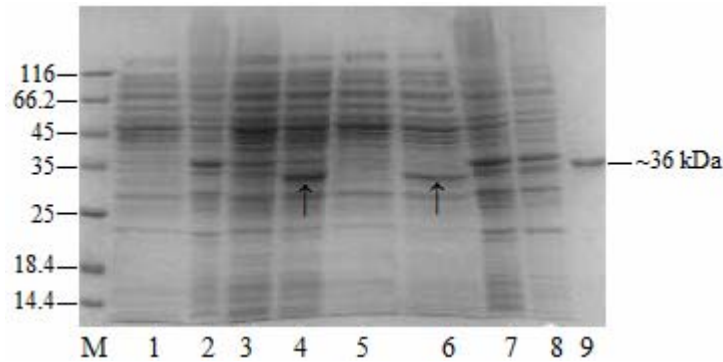


Şekil 3.32. PvLM2Et genini içeren 3 saatlik-bir gecelik *E. coli* JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili. Hatlar: M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: Herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili; 2 ve 3: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Et genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T_3 protein profili; 4 ve 5: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Et genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T_5 protein profili; 6 ve 7: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Et genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin $T_{O/N}$ protein profili; 8: İnsan LDH-M saf proteinini

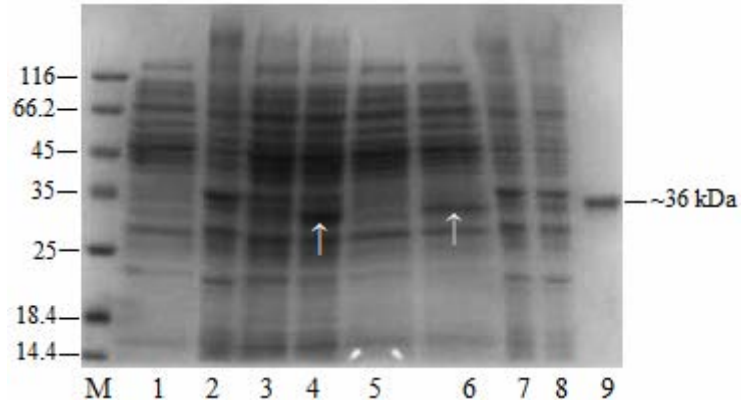
Mutant proteinlerin eksprese edildiği *E. coli* JM105 hücrelerinin indüklenme sonrası 3. saatinden itibaren (T₃ dönemi) proteinin ekspresyonu jel üzerinde görülebildiği için bu sürecin öncesindeki örneklerin SDS-PAGE görüntüsü gösterilmemiştir.

Şekil 3.31. ve Şekil 3.32.'de görüldüğü gibi “↑” ile gösterilen mutant proteinlerin *E. coli* JM105 bakteri soyundaki zayıf ekspresyonlarından dolayı en iyi protein ekspresyonu bakteri hücre sayısının artışına paralel olarak bir gecelik örneklerde gözlenmiştir. Bunun için bir gecelik örneklerin süpernatantının ve peletinin SDS-PAGE ile analizi yapılarak PvLM1Et ve PvLM2Et proteinlerinin çözünebilir formda olup olmadıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Şekil 3.33. ve Şekil 3.34.'de indüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Et ve PvLM2Et genlerini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili ve aynı zamanda süpernatant ve pelet fazlarının protein profilleri görülmektedir. Her iki jel görüntüsünde de görüldüğü gibi PvLM1Et ve PvLM2Et genlerinin herbirinin aktarıldığı *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profilinde görülen mutant proteinlerin bantları, süpernatant ve pelet fazları ayrı ayrı incelendiği zaman sadece süpernatant fazında görülmektedir. Pelet fazında ise bu protein bandı görülmemektedir. Dolayısıyla hem PvLM1Et proteininin hem de PvLM2Et proteininin çözünebilir formda ekspresyonu yapılmıştır. Ancak zayıf ekspresyondan dolayı genel protein profilinde görüldüğü gibi her iki protein de sadece indüklenmiş süpernatant fazında görülmüştür.

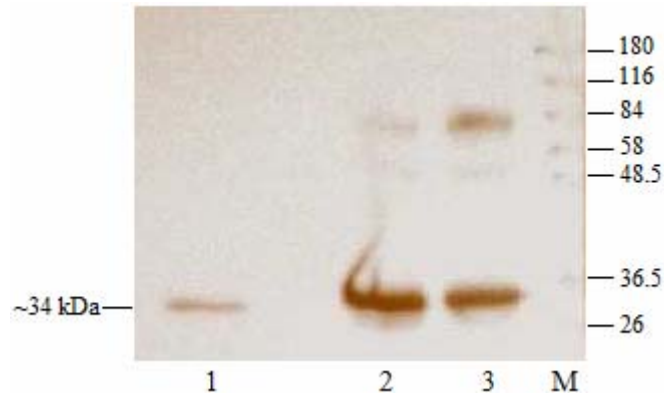


Şekil 3.33. PvLM1Et genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının protein profillerinin ayrı ayrı gösterilmesi. Hatlar: M: Markır (Protein MW-SM0431); 1 ve 2: Herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazları; 3 ve 4: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Et genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili; 5 ve 6: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Et genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı; 7 ve 8: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Et genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin pelet fazı; 9: İnsan LDH-M saf protein



Şekil 3.34. PvLM2Et genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının protein profillerinin ayrı ayrı gösterilmesi. Hatlar: M: Markır (Protein MW-SM0431); 1 ve 2: Herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazları; 3 ve 4: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Et genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili; 5 ve 6: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Et genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı; 7 ve 8: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Et genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin pelet fazı; 9: İnsan LDH-M saf proteini

PvLM1Et ve PvLM2Et proteinlerini kesin olarak belirlemek için protein ekspresyonunun SDS-PAGE ile analizinden sonra Western blot yapılmıştır. Western blot için primer antikor olarak yine *Pf*LDH poliklonal antikor kullanılmıştır (Şekil 3.35.).



Şekil 3.35. PvLM1Et ve PvLM2Et proteinlerinin Western blot ile gösterilmesi. Hatlar: 1: İndüklenmiş *Pv*LDH genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı; 2: İndüklenmiş PvLM1Et genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı; 3: İndüklenmiş PvLM2Et genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı; M: Markır (SDS 7B)

Şekil 3.35.'de PvLM1Et ve PvLM2Et proteinlerinin Western blot sonuçları görülmektedir. Hem hat 1'de pozitif kontrol olarak gösterilen *Pv*LDH bandından hem de hat 4'de gösterilen markırın 36.5 kDa büyüklüğündeki bandından anlaşılacağı gibi her iki protein de tespit edilmiştir. Böylece jel üzerinde net bir şekilde görülemeyen proteinlerin

Western blot membranı üzerindeki bantları, PvLM1Et ve PvLM2Et proteinlerinin *E. coli* JM105 bakteri hücrelerinde ekspresyonlarının yapıldığını ve hücrede çözünebilir formda bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca önceki iki mutant protein PvLM1Tg1 ve PvLM2Tg1’de olduğu gibi *Pf*LDH’nin poliklonal antikoru PvLM1Et ve PvLM2Et mutant proteinleri ile de çapraz reaksiyon göstermektedir. Bu durum poliklonal antikorun tanıdığı protein epitopunun mutant proteinlerde değiştirilmemiş olduğunu göstermektedir. Şekil 3.35.’de PvLM1Et ve PvLM2Et proteinlerinin bantlarına ilave olarak yaklaşık olarak 84 kDa büyüklüğünde yabancı bantlarda elde edilmiştir. Kullanılan primer antikor poliklonal olduğu için bu bantların görülmesi son derece normaldir. Bu bantların, kullanılan poliklonal antikorun bakteriyel kökenli farklı proteinleri tanımasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

PvLM1Et ve PvLM2Et proteinlerinin çözünebilir formda eksprese edildikleri tespit edildikten sonra ön aktivite kontrolü yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.20. ve Tablo 3.21.’de gösterilmiştir.

Tablo 3.20. PvLM1Et proteininin aktivitesinin ölçülmesi. (LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiş olup bu değerlerin ortalaması verilmiştir).

$\Delta A_{340}/\text{dakika}$			OD ₆₀₀ (Seyreltme Faktörü: 1/10)	10 mM Pirüvat	1 mM Pirüvat
PvLM1Et genini içeren <i>E. coli</i> JM105	İndüklenmemiş	3 saat	0,237	0,051	0,072
	İndüklenmiş		0,184	0,145	0,216
	İndüklenmemiş	Bir gece	0,379	0,067	0,053
	İndüklenmiş		0,321	0,497	0,645
<i>E. coli</i> JM105	3 saat		0,217	0,020	0,021
	Bir gece		0,388	0,080	0,039

Tablo 3.20.’de alınan sonuçlara göre PvLM1Et proteini aktif olup K_{108B}→Q_{108B} aminoasit değişikliği, PvLM1Tg1 mutagenesinde yapılan K_{108B}→S_{108B} aminoasit değişikliğinde olduğu gibi *Pv*LDH proteininin aktivitesinde hiçbir değişiklik yapmamıştır. Tablo 3.21.’de alınan sonuçlar ise K_{108B}→Q_{108B} mutagenesi ile birlikte N_{108E}→S_{108E} mutagenesinin de protein aktivitesini etkilemediğini göstermektedir. Dolayısıyla *Pv*LDH’nin polar ve hidrofilik K_{108B} ve N_{108E} aminoasitlerinin *Et*LDH’nin yine aynı gruptan

Q_{108B} ve S_{108E} aminoasitleri ile değiştirilmesi PvLDH proteininin aktivitesini ortadan kaldıracak herhangi bir konformasyonel değişim meydana getirmemiştir.

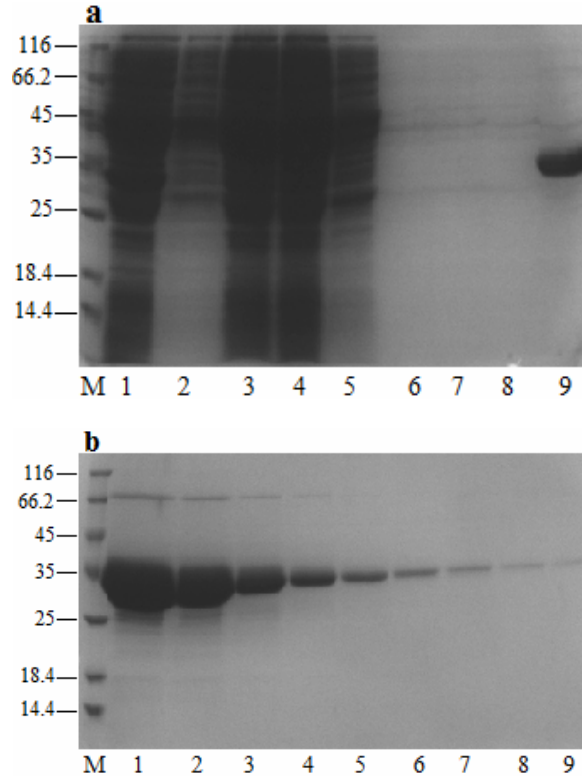
Tablo 3.21. PvLM2Et proteininin aktivitesinin ölçülmesi. (LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiş olup bu değerlerin ortalaması verilmiştir).

$\Delta A_{340}/\text{dakika}$			OD ₆₀₀ (Seyreltme Faktörü: 1/10)	10 mM Pirüvat	1 mM Pirüvat
PvLM2Et genini içeren <i>E. coli</i> JM105	İndüklenmemiş	3 saat	0,213	0,033	0,053
	İndüklenmiş		0,217	0,169	0,215
	İndüklenmemiş	Bir gece	0,383	0,077	0,068
	İndüklenmiş		0,342	0,321	0,428
<i>E. coli</i> JM105	3 saat		0,217	0,020	0,021
	Bir gece		0,388	0,080	0,039

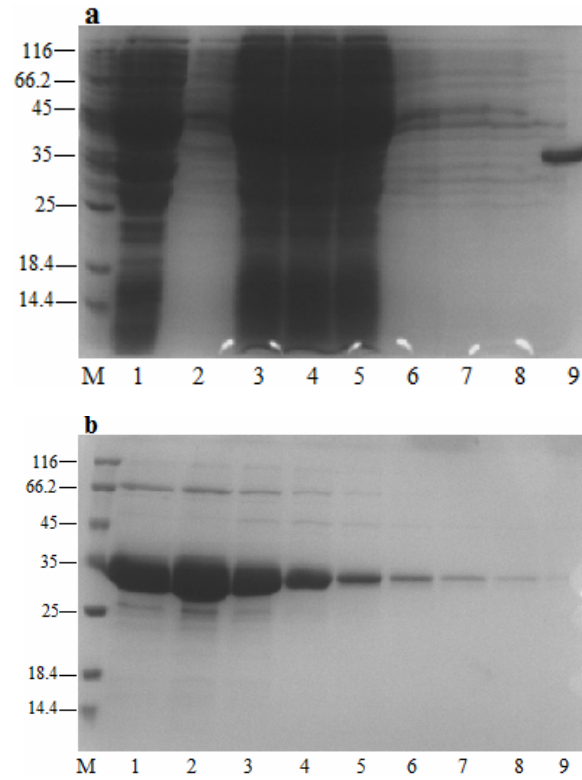
Tablo 3.20. ve Tablo 3.21.'de alınan sonuçlara göre 3 saatlik örneklerle birlikte bir gecelik örneklerde bile indüklemeye yapılmadığı zaman aktivite görülmezken ancak indüklenmiş örneklerde aktivite ölçülmüştür. Bu durumun PvLM1Et ve PvLM2Et genlerinin klonlandığı ekspresyon vektöründeki P_{tac}'ın güçlü bir promotor olmasına rağmen ekspresyon için IPTG ile indüklemeye ihtiyaç duymasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

PvLM1Et ve PvLM2Et proteinlerinin ekspresyonlarının yapıldığı doğrulanıp aktiviteleri ölçüldükten sonra bu proteinler Bölüm 2.2.15.2.'de anlatıldığı gibi Protokol 2 ile saflaştırılmıştır.

Şekil 3.36. ve Şekil 3.37.'de görülen saflaştırılmış PvLM1Et ve PvLM2Et proteinlerinin SDS-PAGE analizine göre her iki proteinin Protokol 2 ile saflaştırılması sonrasında benzer sonuçlar alınmıştır. Buna göre ilk süzüntü ve yıkama ile hücre ekstraktındaki neredeyse bütün yabancı proteinler kolondan uzaklaştırılmıştır. Elüsyon örneklerinde görülen bazı yabancı proteinler ise azalan konsantrasyonlarına bağlı olarak son elüsyon örneklerinde kaybolmuş ve böylece PvLM1Et ve PvLM2Et proteinleri saf olarak elde edilmiştir.



Şekil 3.36. Protokol 2 ile saflaştırılmış PvLM1Et proteininin SDS-PAGE ile analizi. Hatlar: **(a)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: CL; 2: FT1; 3: FT2; 4: FT3; 5: W1; 6: W2; 7: W3; 8: E1; 9: E2. **(b)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: E3; 2: E4; 3: E5; 4: E6; 5: E7; 6: E8; 7: E9; 8: E10; 9: E11



Şekil 3.37. Protokol 2 ile saflaştırılmış PvLM2Et proteininin SDS-PAGE ile analizi. Hatlar: **(a)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: CL; 2: FT1; 3: FT2; 4: FT3; 5: W1; 6: W2; 7: W3; 8: E1; 9: E2. **(b)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: E3; 2: E4; 3: E5; 4: E6; 5: E7; 6: E8; 7: E9; 8: E10; 9: E11

Sırasıyla 34221 g/mol ve 34194 g/mol molekül ağırlığındaki saf PvLM1Et ve PvLM2Et proteinlerinin ekstinksiyon katsayıları $16410 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ olarak bulunmuştur. A_{280} değerleri sırasıyla 0,782 ve 0,744 olarak ölçülen saf PvLM1Et ve PvLM2Et proteinlerinin her ikisi de 1,6 mg/ml miktarında elde edilmiştir.

PvLM1Et enziminin aktivitesinin ölçülmesi UNICAM UV-Visible spektrofotometre kullanılarak NADH'nin NAD^{+} 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$) absorbans değişim oranı takip edilerek yapılmış ve Tablo 3.22.'de verilen değerler elde edilmiştir.

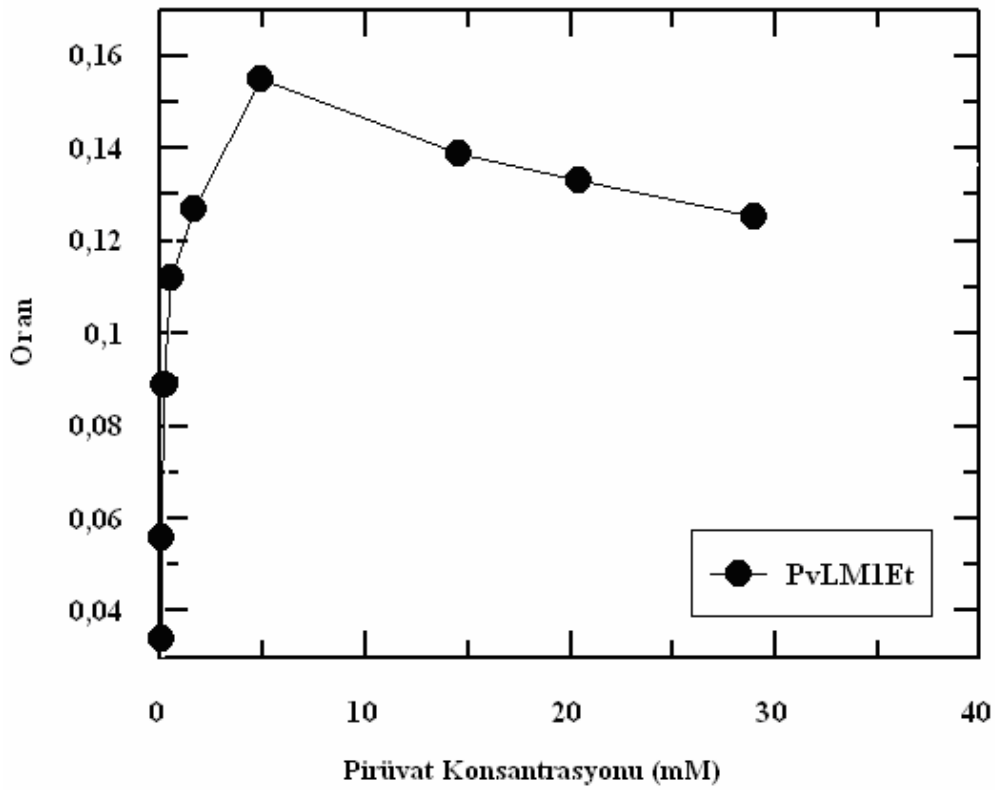
Tablo 3.22. PvLM1Et enziminin aktivitesinin NADH'nin NAD^{+} 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$) absorbans değişim oranının takip edilerek ölçülmesi

Pirüvat (mM)	Oran ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$)
0,02	0,034
0,06	0,056
0,18	0,089
0,54	0,112
1,6	0,127
4,86	0,155
14,58	0,139
20,4	0,133
29	0,125

Elde edilen veriler kullanılarak Grafit 3.0 [163] isimli programa girilmiş ve kullanma klavuzuna göre enzim kinetiği hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. PvLM1Et için elde edilen sonuçlar Tablo 3.23. ve Şekil 3.38.'de sunulmuştur.

Tablo 3.23. PvLM1Et'nin Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar

Steady-State Kinetik Sabitesi	Değer	Standart Hata
$V_{\max}$	0.1368	0.0045
K_m (mM)	0.0863	0.0183



Şekil 3.38. PvLM1Et'nin Steady-State kinetik davranışı

Analiz sonucunda tespit edilen V_{max} değerinden ve başlangıçta hesaplanan enzim miktarından yola çıkılarak k_{cat} değeri hesaplanmış ve yorumlamalarda kullanılmıştır. Bütün bu analizlere göre PvLM1Et için elde edilen veriler Tablo 3.24.'de sunulmuştur.

Tablo 3.24. PvLM1Et'nin PvLDH ile karşılaştırmalı Steady-State kinetik sabiteleri

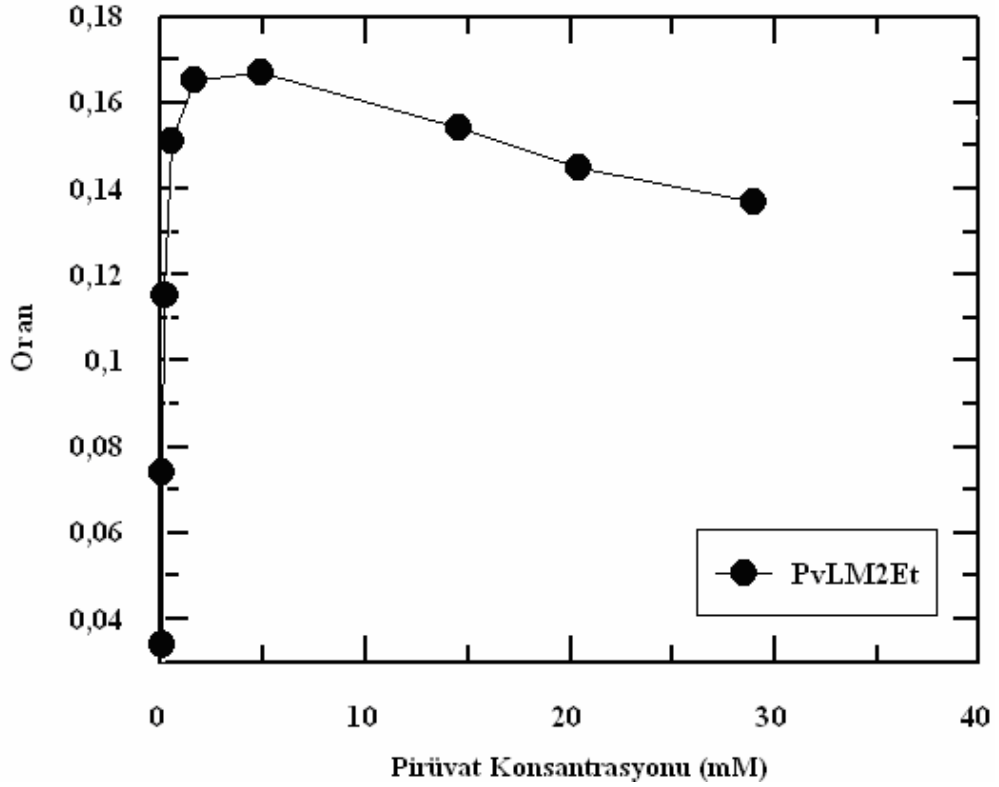
Enzim	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($min^{-1} M^{-1}$)
PvLDH	37.8	190	5.0×10^6
PvLM1Et	86.3	122	1.4×10^6

PvLM2Et enziminin aktivitesinin ölçülmesi UNICAM UV-Visible spektrofotometre kullanılarak NADH'nin NAD^+ 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki ($\Delta A_{340}/dakika$) absorbans değişim oranı takip edilerek yapılmış ve Tablo 3.25.'de verilen değerler elde edilmiştir.

Tablo 3.25. PvLM2Et enziminin aktivitesinin NADH'ın NAD⁺a çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranının takip edilerek ölçülmesi

Pirüvat (mM)	Oran (ΔA_{340} /dakika)
0,02	0,034
0,06	0,074
0,18	0,115
0,54	0,151
1,6	0,165
4,86	0,167
14,58	0,154
20,4	0,145
29	0,137

Tablo 3.25.'de sunulan veriler kullanılarak Grafıt 3.0 [163] isimli programa girilmiş ve kullanma klavuzuna göre enzim kinetiği hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. PvLM2Et için elde edilen sonuçlar Şekil 3.39. ve Tablo 3.26.'da sunulmuştur.



Şekil 3.39. PvLM2Et'nin Steady-State kinetik davranışı

Tablo 3.26. PvLM2Et'nin Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar

Steady-State Kinetik Sabitesi	Değer	Standart Hata
$V_{\max}$	0.1567	0.0052
K_m (mM)	0.0629	0.0138

Analiz sonucunda tespit edilen $V_{\max}$ değerinden ve başlangıçta hesaplanan enzim miktarından yola çıkılarak k_{cat} değeri hesaplanmış ve yorumlamalarda kullanılmıştır. Bütün bu analizlere göre PvLM2Et için elde edilen veriler Tablo 3.27.'de sunulmuştur.

Tablo 3.27. PvLM2Et'nin PvLDH ve PvLM1Et ile karşılaştırmalı Steady-State kinetik sabiteleri

Enzim	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)
PvLDH	37.8	190	5.0×10^6
PvLM1Et	86.3	122	1.4×10^6
PvLM2Et	62.9	187	3.0×10^6

PvLM1Et mutagenesi ile PvLDH'nin aktif bölge halkasındaki ilave 5 aminoasit olan DKEWN aminoasitleri DQEWN haline getirilerek *Eimeria tenella* LDH'ına kısmen benzetilmiştir. İkinci aşamada ise PvLM2Et mutagenesi yapılarak PvLDH'nin aktif bölge halkasındaki ilave 5 aminoasit olan DKEWN aminoasitleri DQEWS haline getirilerek *Eimeria tenella* LDH'nin pentapeptid insersiyonu tamamen taklit edilmiştir. PvLM1Et mutant proteininin K_m pirüvat değeri iki katına çıkarken k_{cat} değeri düşmüştür. Dolayısıyla bu mutagenes ile enzimin substratına ilgisi azalmakla birlikte kataliz hızı azda olsa düşmüştür. PvLM2Et mutant proteininin ise K_m değeri yükselmiş olup, k_{cat} değeri değişmemiştir. Bu durum enzimin kataliz görevini yaptığı halde substratına olan ilgisini önemli bir oranda kaybettiğini göstermektedir. Ayrıca yapılan değişiklikler sonucunda PvLM2Et mutant proteini, PvLM1Et mutant proteinine göre yabanıl tip proteine (PvLDH) daha yakın değerler ile sonuçlanmıştır. Bununla birlikte bu mutagenesler Tg1LDH'nin taklit edildiği mutageneslerde olduğu gibi protein üzerinde çok çarpıcı bir değişiklik yapmamıştır.

3.2.3. PvLDH Enziminin Aktif Bölge Halkasındaki Pentapeptid İnsersiyonunun TpLDH'daki İnsersiyona Benzetilmesi ve Analiz Edilmesi

PvLDH enziminin aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonu son olarak model Apikompleksan *Theileria parva*'nın LDH enzimindeki (TpLDH) pentapeptid insersiyonuna benzetilmiştir (Şekil 3.40.). İlk aşamada D_{108A}→N_{108A} mutagenezi yapılmış, ikinci aşama da ise D_{108A}K_{108B}→N_{108A}E_{108B} mutagenezi ile PvLDH geninin/enziminin pentapeptid insersiyonu tamamen TpLDH'a benzetilmiştir. Her aşamadan sonra yapılan değişiklik analiz edilmiştir. Elde edilen mutant PvLDH genleri/enzimleri sırasıyla PvLM1Tp ve PvLM2Tp olarak adlandırılmıştır.

	98	108	109
İnsan-m	A G A R Q Q - E G E S R L		
İnsan-h	A G V R Q Q - E G E S R L		
PvLDH	A G F T K A - P G K S D K E W N R D		
TpLDH	A G L A K A - P A K S N E E W N R D		
PvLM1Tp	A G F T K A - P G K S N K E W N R D		
PvLM2Tp	A G F T K A - P G K S N E E W N R D		

Şekil 3.40. PvLDH'nin aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun TpLDH'dakine benzetilmesi. Değiştirilen aminoasitler koyu renkli ve altı çizili olarak gösterilmiştir. (104. aminoasit tanımlanmamıştır).

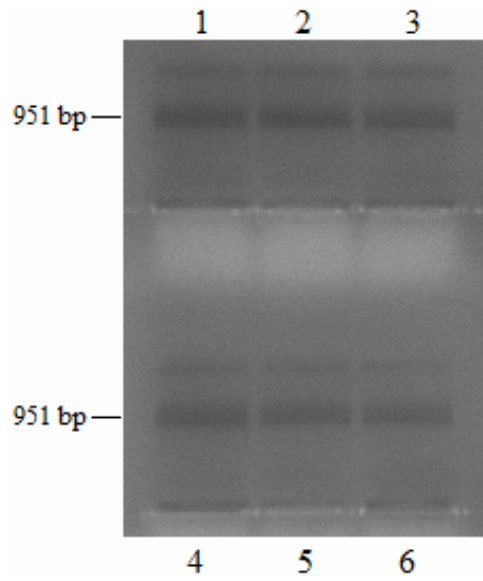
Mutant PvLDH genleri olan PvLM1Tp ve PvLM2Tp genlerini elde etmek ve klonlamak için Bölüm 3.2.1.'de ve altbölümlerinde yapılan deneysel yöntemlerin aynısı yapılmış olup benzer sonuçlar alınmıştır.

Her iki mutant gen için sırasıyla 297 bp ve 301 bp büyüklüğünde A fragmenti ve 724 bp büyüklüğünde B fragmenti elde edilmiş olup bu fragmentler PCR ile birleştirilerek tam uzunlukta PvLM1Tp ve PvLM2Tp genleri elde edilmiştir.

Tez çalışmasının yapılması sırasında bütün A ve B fragmentlerinin elde edilmesi aşamasından restriksiyon endonükleazlarla kesim aşamasına kadar DNA örnekleri birkaç kez agaroz jelde yürütülmüş ve daha sonra jelden saflaştırılmıştır. Jelden saflaştırma sırasında DNA örneklerinin kısmi olarak kaybindan dolayı konsantrasyon düştüğünden bazı durumlarda ligasyon öncesi aşamada yeterli miktarda DNA örneği elde edilememiştir. Bunun için jelden DNA izolasyonu sırasında meydana gelen kayıp dikkate alınarak bütün

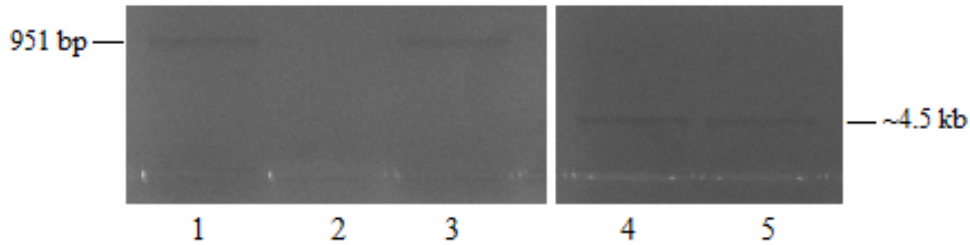
A ve B fragmentlerinin birleştirilmesi ve endonükleazlarla kesimi aşamalarında birden fazla örnek hazırlanmış ve bu örnekler jelden saflaştırılma işlemi sırasında birleştirilerek konsantrasyonlarının artırılması sağlanmıştır.

Şekil 3.41.'de, PvLM1Tp ve PvLM2Tp genleri kristal viyole ile boyalı % 1'lik agaroz jel üzerinde kalın bantlar şeklinde görülmektedir. DNA örnekleri jelden kesilerek saflaştırılmış ve aynı zamanda bu aşamada birleştirilmiştir.



Şekil 3.41. PvLM1Tp ve PvLM2Tp genlerinin tam uzunluğunun elde edilmesi. Hatlar: 1-3: PvLM1Tp geni; 4-6: PvLM2Tp geni

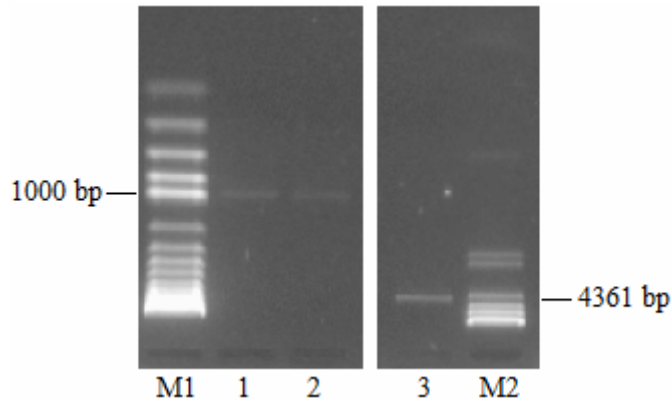
PvLM1Tp ve PvLM2Tp genleri ve aynı zamanda genlerin aktarılacağı pKK223-3 ekspresyon vektörü *Eco*RI ve *Pst*I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş ve yapışkan uçlar oluşturularak ligasyona hazır duruma getirilmiştir (Şekil 3.42.).



Şekil 3.42. PvLM1Tp ve PvLM2Tp genlerinin ve pKK223-3 vektörünün restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi sonrası jelde görüntülenmesi. Hatlar: 1: PvLM1Tp geni; 2: Boş; 3: PvLM2Tp geni; 4 ve 5: pKK223-3

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim sonrası PvLM1Tp ve PvLM2Tp genleri ve pKK223-3 ekspresyon vektörü kristal viyole ile boyalı % 1'lik agaroz jel üzerinde yürütülmüştür. Şekil 3.42.'de endonükleazlarla kesim sonrası PvLM1Tp ve PvLM2Tp genleri jel üzerinde zayıf bantlar olarak görülmektedir. Bu örneklerle ait DNA bantları Şekil 3.41.'de oldukça rahat izlenebilen kalın bantlar olarak görülmesine rağmen jelden saflaştırma ve endonükleazlarla kesim aşamasından sonra jel üzerinde bantların oldukça zayıf olduğu Şekil 3.42.'de görülmektedir. Bu DNA bantları tekrar jelden kesilerek saflaştırılmıştır. Şekil 3.42.'de hat 4 ve 5'de yürütülen pKK223-3 ekspresyon vektörünün bantlarını jelden saflaştırma aşamasında yine birleştirerek transformasyon için yeterli konsantrasyonun elde edilmesi amaçlanmıştır. Saflaştırma sonrası konsantrasyonun ölçülmesi için DNA örnekleri etidyum bromür ile boyalı % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

Şekil 3.43.'de görüntülenen jelde transformasyon için hazırlanan PvLM1Tp ve PvLM2Tp genleri ve pKK223-3 ekspresyon vektörünün yaklaşık konsantrasyonları ölçülmüştür. Buna göre PvLM1Tp ve PvLM2Tp genleri 20 ng/μl konsantrasyonda, pKK223-3 ekspresyon vektörü ise 40 ng/μl konsantrasyonda elde edilmiştir. Bu konsantrasyonun transformasyon için yeterli olduğu yapılan daha önceki transformasyon çalışmalarında da görülmüştür.

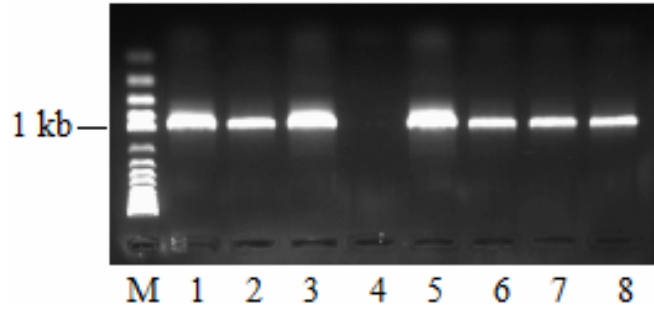


Şekil 3.43. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş PvLM1Tp ve PvLM2Tp genlerinin ve pKK223-3 vektörünün yaklaşık konsantrasyonlarının ölçülmesi için jelde görüntülenmesi. Hatlar: M1: Markır (Hyper Ladder I); M2: Markır (Lambda DNA Hind III Digest); 1: PvLM1Tp geni; 2: PvLM2Tp geni; 3: pKK223-3

Transformasyon öncesi her bir mutagenез için insert (PvLM1Tp/PvLM2Tp geni) ve vektörden 100 ng kullanılmış ve ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen rekombinant PvLM1Tp ve PvLM2Tp genleri kompetant *E. coli* JM105 hücrelerine

aktarılmıştır. Daha sonra koloni PCR yapılarak PvLM1Tp ve PvLM2Tp genleri etidyum bromür ile boyalı % 1'lik agaroz jelde yürütülerek gözlenmiştir.

Şekil 3.44.'de koloni PCR sonrası pozitif ve negatif sonuçlar görülmektedir. Hat 1-4'de PvLM1Tp geni için, hat 5-8'de ise PvLM2Tp geni için koloni PCR sonuçları görülmektedir.

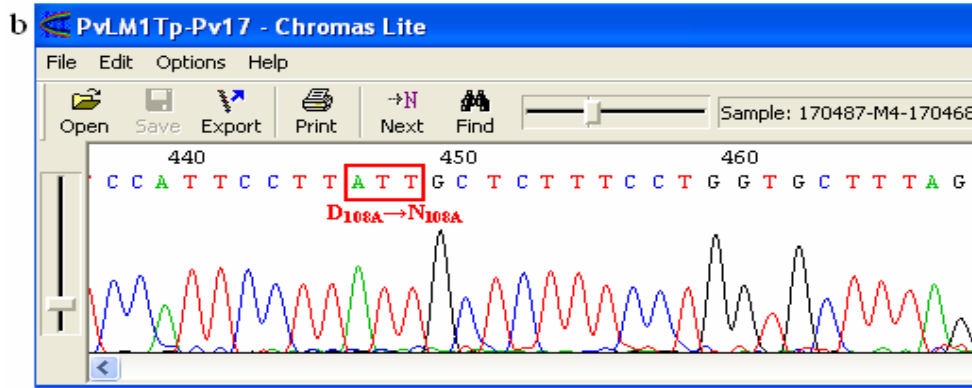
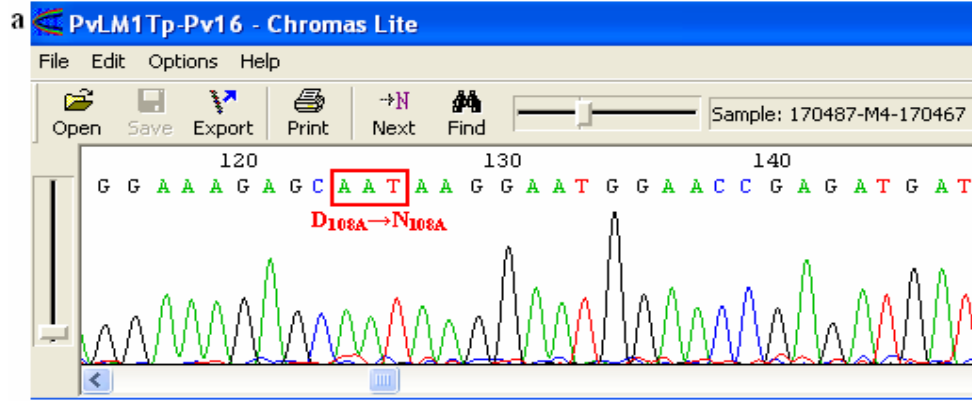


Şekil 3.44. Koloni PCR sonrası pozitif ve negatif sonuçların jelde görüntülenmesi. Hatlar: M: Markır (Hyper Ladder I); 1-3: PvLM1Tp geni için pozitif sonuçlar; 4: PvLM1Tp geni için negatif sonuç; 5-8: PvLM2Tp geni için pozitif sonuçlar

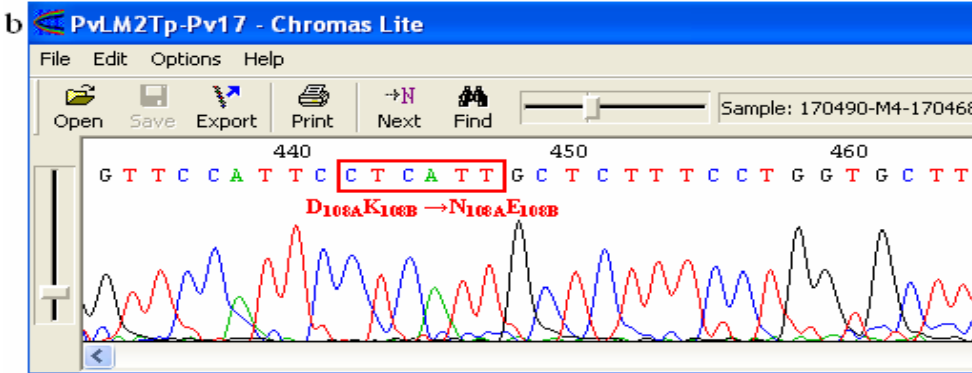
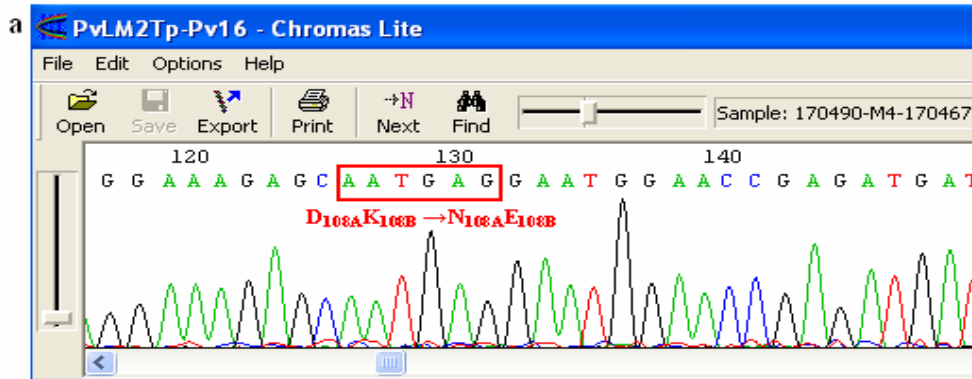
Her iki gen için de beklenen bant büyüklüğü yaklaşık olarak 1 kb olup *E. coli* JM105 hücrelerine insert transformasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Sadece hat 4'de görülen negatif sonuca göre seçilen bu kolonideki *E. coli* JM105 hücreleri PvLM1Tp genini taşımamaktadır.

Şekil 3.45.'de koloni PCR ile pozitif sonucu alınan PvLM1Tp geninin çift yönlü dizileme sonuçları (Şekil 3.45. a ve b) görülmektedir. Buna göre pentapeptid insersiyonunun ilk aminoasidi D_{108A}'nın GAC kodonu N aminoasidinin AAT kodonu ile değiştirilmiştir. Böylece D_{108A}→N_{108A} mutagenezi gerçekleştirilerek mutant PvLDH geni PvLM1Tp elde edilmiştir.

Şekil 3.46.'da ise D_{108A}K_{108B}→N_{108A}E_{108B} mutagenezi için AAT GAG kodonlarının PvLDH dizisine yerleştirilmiş olduğu (Şekil 3.46.a.) ve aynı zamanda komplementer zincirinde bu değişikliği taşıdığı (Şekil 3.46.b.) görülmektedir. Buna göre genin tamamı doğru bir şekilde klonlanmış ve istenilen mutagenez yapılmıştır. Böylece bu değişiklik neticesinde PvLM2Tp mutagenezi elde edilmiştir.

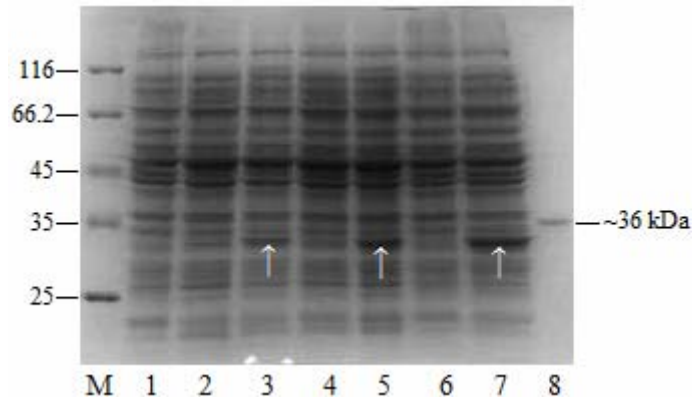


Şekil 3.45. PvLM1Tp geninin (a) 5'→3' zincirinin ve (b) 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu

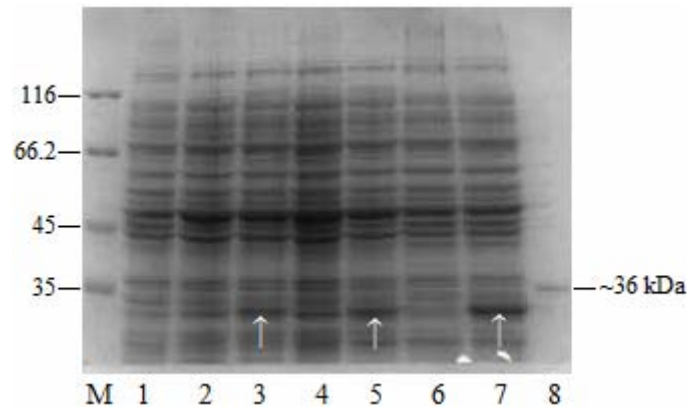


Şekil 3.46. PvLM2Tp geninin (a) 5'→3' zincirinin ve (b) 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu

Dizi analizi yapılarak yönlendirilmiş mutagenезin gerçekleştirildiği doğrulandıktan sonra PvLM1Tp ve PvLM2Tp genlerinin herbirinin aktarıldıkları *E. coli* JM105 hücrelerindeki ekspresyonlarını kontrol etmek için SDS-PAGE ile genel protein analizi yapılmıştır. PvLM1Tp ve PvLM2Tp proteinlerinin ekspresyonu T_0 , T_{log} , T_1 ve T_2 dönemlerindeki örneklerde zayıf olmakla birlikte (şekilde gösterilmemiştir) T_3 döneminden itibaren SDS-PAGE jel üzerinde görülmüştür ve en iyi protein ekspresyonu diğer mutant proteinlerde olduğu gibi yine indüklenmiş ve bir gecelik örneklerde gözlenmiştir (Şekil 3.47. ve Şekil 3.48.).

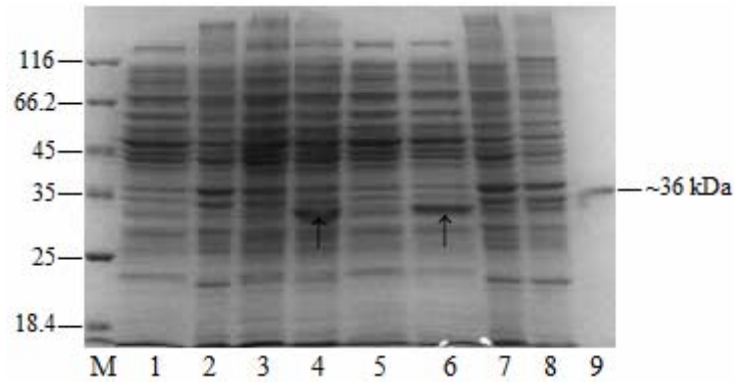


Şekil 3.47. PvLM1Tp genini içeren 3 saatlik-bir gecelik *E. coli* JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili. Hatlar: M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: Herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili; 2 ve 3: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Tp genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T_3 protein profili; 4 ve 5: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Tp genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T_5 protein profili; 6 ve 7: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Tp genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin $T_{O/N}$ protein profili; 8: İnsan LDH-M saf proteini

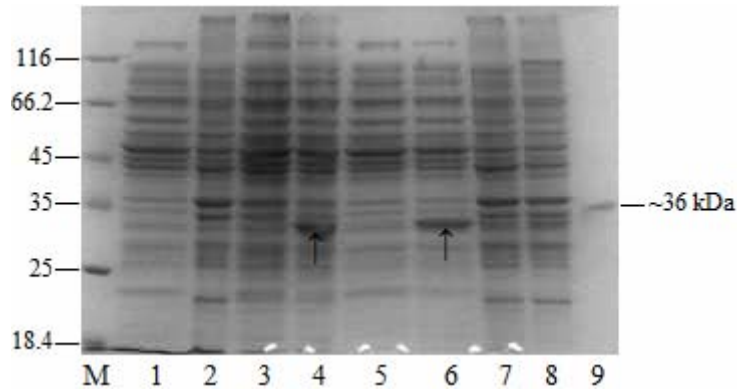


Şekil 3.48. PvLM2Tp genini içeren 3 saatlik-bir gecelik *E. coli* JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili. Hatlar: M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: Herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili; 2 ve 3: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Tp genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T_3 protein profili; 4 ve 5: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Tp genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T_5 protein profili; 6 ve 7: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Tp genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin $T_{O/N}$ protein profili; 8: İnsan LDH-M saf proteini

PvLM1Tp ve PvLM2Tp proteinlerinin ekspresyonları kontrol edildikten sonra bu proteinlerin çözünebilir formda olup olmadıklarını belirlemek için her iki proteinin de eksprese edildikleri hücre ekstraktlarının süpernatant ve pelet fazları ayrı ayrı incelenmiştir. Bunun için en iyi protein ekspresyonunun gözlemlendiği bir gecelik örneklerin süpernatant ve pelet fazları hazırlanmıştır. Bu fazlar karşılaştırma yapmak için aynı zamanda genel hücre ekstraktı ile birlikte SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 3.49. ve Şekil 3.50.).



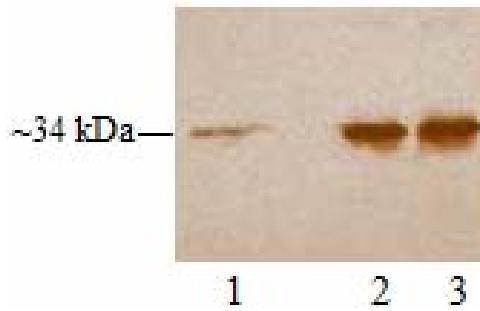
Şekil 3.49. PvLM1Tp genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının protein profillerinin ayrı ayrı gösterilmesi. Hatlar: M: Markır (Protein MW-SM0431); 1 ve 2: Herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazları; 3 ve 4: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Tp genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili; 5 ve 6: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Tp genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı; 7 ve 8: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Tp genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin pelet fazı; 9: İnsan LDH-M saf proteini



Şekil 3.50. PvLM2Tp genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının protein profillerinin ayrı ayrı gösterilmesi. Hatlar: M: Markır (Protein MW-SM0431); 1 ve 2: Herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazları; 3 ve 4: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Tp genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili; 5 ve 6: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Tp genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı; 7 ve 8: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM2Tp genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin pelet fazı; 9: İnsan LDH-M saf proteini

Şekil 3.49. ve Şekil 3.50.'de indüklenmemiş ve indüklenmiş PvLM1Tp ve PvLM2Tp genlerini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili ve aynı zamanda süpernatant ve pelet fazlarının protein profilleri görülmektedir. Her iki jel görüntüsünde de görüldüğü gibi PvLM1Tp ve PvLM2Tp genlerinin herbirinin aktarıldığı *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profilinde görülen mutant proteinlerin bantları, süpernatant ve pelet fazları ayrı ayrı incelendiği zaman sadece süpernatant fazında görülmektedir. Pelet fazında ise bu protein bandı görülmemektedir. Dolayısıyla hem PvLM1Tp proteininin hem de PvLM2Tp proteininin çözünebilir formda ekspresyonu yapılmıştır. Ancak zayıf ekspresyondan dolayı genel protein profilinde görüldüğü gibi her iki protein de sadece indüklenmiş süpernatant fazında görülmüştür.

PvLM1Tp ve PvLM2Tp proteinlerinin eksprese edildiklerini kesin olarak doğrulamak için Western blot yapılmıştır. Şekil 3.51.'de PvLM1Tp ve PvLM2Tp proteinlerinin Western blot sonuçları görülmektedir. Hat 1'de pozitif kontrol PvLDH proteini görülmekte olup mutant proteinlerde aynı büyüklükte beklenmektedir. Hat 2 ve hat 3'de sırasıyla PvLM1Tp ve PvLM2Tp genlerinin herbirini içeren *E. coli* JM105 bakteri hücre ekstraktlarından hazırlanan süpernatant fazındaki mutant PvLM1Tp ve PvLM2Tp proteinlerinin bantları görülmektedir. Buna göre her iki proteinin ekspresyonları yapılmış olup proteinler çözünebilir formda bulunmaktadır.



Şekil 3.51. PvLM1Tp ve PvLM2Tp proteinlerinin Western blot ile gösterilmesi. Hatlar: 1: İndüklenmiş PvLDH genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı; 2: İndüklenmiş PvLM1Tp genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı; 3: İndüklenmiş PvLM2Tp genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı

Çözünebilir formda ekspresyonları yapılan mutant proteinlerinin ön aktivite kontrolü için PvLM1Tp ve PvLM2Tp genlerinin herbirini içeren *E. coli* JM105 bakteri hücre ekstraktlarından hazırlanan süpernatant fazının spektrofotometrik aktivite ölçümü yapılmıştır. Tablo 3.28.'deki aktivite ölçüm sonuçlarına göre PvLDH'nin hidrofilik D_{108A}

aminoasidi yine hidrofilik bir aminoasit olan N_{108A} ile değiştirildiği zaman protein aktivitesi etkilenmemektedir. PvLDH proteini yapısal değişikliğindeki aynı toleransı, aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunu tamamen TpLDH'dakine benzetmek için yapılan D_{108A}K_{108B}→N_{108A}E_{108B} mutagenezinde de devam ettirmiştir (Tablo 3.29.). Değiştirilen aminoasitlerin fiziko-kimyasal özellikleri açısından birbirine yakın olması proteinin enzim aktivitesini kaybetmeyip bu değişiklikleri tolere etmesinin nedeni olarak gösterilebilir. Her iki proteinin de ileri kinetik analizlerinin yapılması daha açıklayıcı bilgiler verecektir.

Tablo 3.28. ve Tablo 3.29.'da görüldüğü gibi hem 3 saatlik hem de bir gecelik örnekler indüklenmediği zaman aktivite görülmemiştir. Bununla birlikte indükleme, hücre sayısında herhangi bir değişiklik yapmamasına rağmen protein aktivitesini artırmaktadır. Ayrıca pirüvat konsantrasyonunun azalması ile her iki proteinin aktivitesi 2 kat artmıştır.

Tablo 3.28. PvLM1Tp proteininin aktivitesinin ölçülmesi. (LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiş olup bu değerlerin ortalaması verilmiştir).

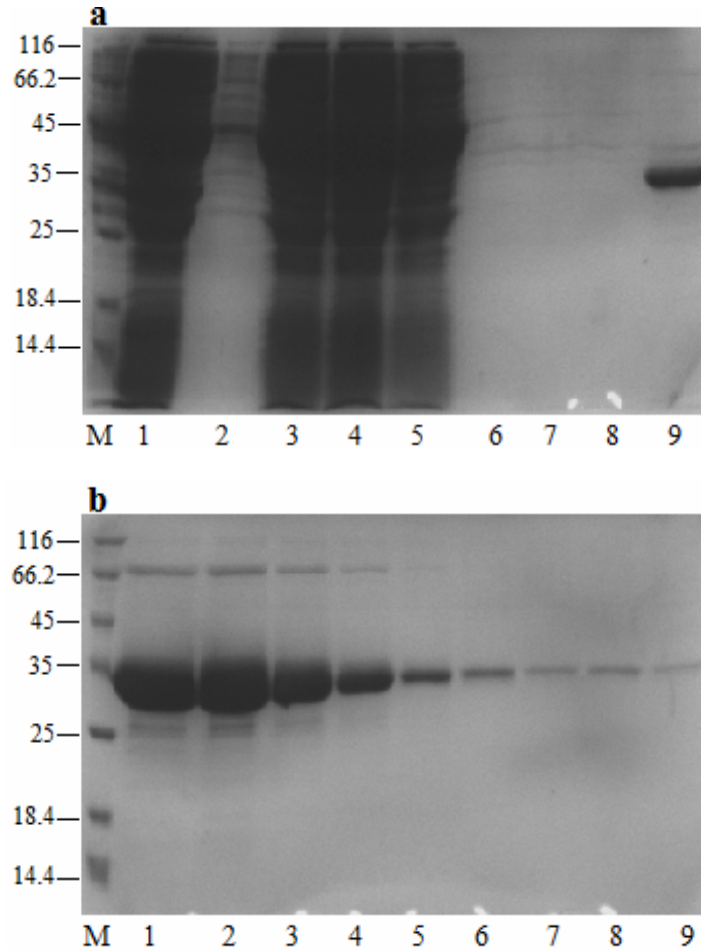
$\Delta A_{340}/\text{dakika}$			OD ₆₀₀ (Seyreltme Faktörü: 1/10)	10 mM Pirüvat	1 mM Pirüvat
PvLM1Tp genini içeren <i>E. coli</i> JM105	İndüklenmemiş	3 saat	0,193	0,040	0,052
	İndüklenmiş		0,177	0,106	0,179
	İndüklenmemiş	Bir gece	0,363	0,089	0,085
	İndüklenmiş		0,345	0,377	0,759
<i>E. coli</i> JM105	3 saat		0,217	0,020	0,021
	Bir gece		0,388	0,080	0,039

Tablo 3.29. PvLM2Tp proteininin aktivitesinin ölçülmesi. (LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiş olup bu değerlerin ortalaması verilmiştir).

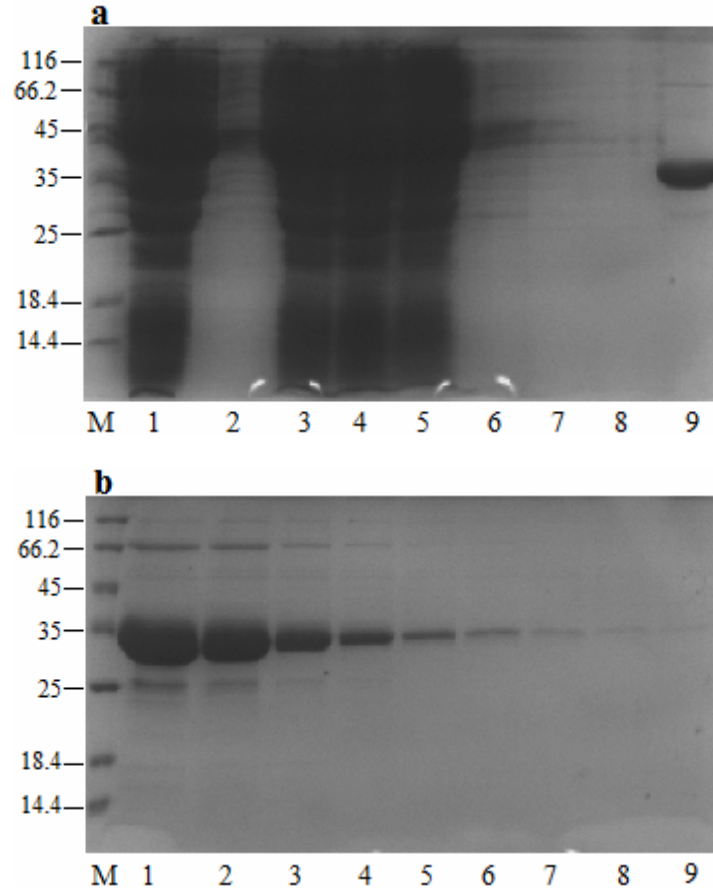
$\Delta A_{340}/\text{dakika}$			OD ₆₀₀ (Seyreltme Faktörü: 1/10)	10 mM Pirüvat	1 mM Pirüvat
PvLM2Tp genini içeren <i>E. coli</i> JM105	İndüklenmemiş	3 saat	0,211	0,032	0,059
	İndüklenmiş		0,190	0,124	0,233
	İndüklenmemiş	Bir gece	0,371	0,062	0,078
	İndüklenmiş		0,339	0,331	0,774
<i>E. coli</i> JM105	3 saat		0,217	0,020	0,021
	Bir gece		0,388	0,080	0,039

Aktivite gözlenen PvLM1Tp ve PvLM2Tp mutant proteinlerin her ikisinin de saflaştırılması Bölüm 2.2.15.2.'de anlatıldığı gibi Protokol 2 ile yapılmıştır. Şekil 3.52. ve Şekil 3.53.'de bu mutant proteinlerin saflaştırma sonrası SDS-PAGE'deki analizleri gösterilmiştir. PvLM1Tp ve PvLM2Tp mutant proteinlerin her ikisinin de saflaştırılması sonrasında diğer mutant proteinlerde olduğu gibi benzer sonuçlar alınmıştır. İlk elüsyon örneklerinde yabancı protein bantları görülen PvLM1Tp ve PvLM2Tp proteinleri son elüsyon örnekleri ile saf olarak elde edilmiştir.

Sırasıyla 34220 g/mol ve 34221 g/mol molekül ağırlığında olan PvLM1Tp ve PvLM2Tp proteinlerinin her ikisi de 1,2 mg/ml miktarında saf olarak elde edilmiştir.



Şekil 3.52. Protokol 2 ile saflaştırılmış PvLM1Tp proteininin SDS-PAGE ile analizi. Hatlar: **(a)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: CL; 2: FT1; 3: FT2; 4: FT3; 5: W1; 6: W2; 7: W3; 8: E1; 9: E2. **(b)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: E3; 2: E4; 3: E5; 4: E6; 5: E7; 6: E8; 7: E9; 8: E10; 9: E11



Şekil 3.53. Protokol 2 ile saflaştırılmış PvLM2Tp proteininin SDS-PAGE ile analizi. Hatlar: **(a)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: CL; 2: FT1; 3: FT2; 4: FT3; 5: W1; 6: W2; 7: W3; 8: E1; 9: E2. **(b)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: E3; 2: E4; 3: E5; 4: E6; 5: E7; 6: E8; 7: E9; 8: E10; 9: E11

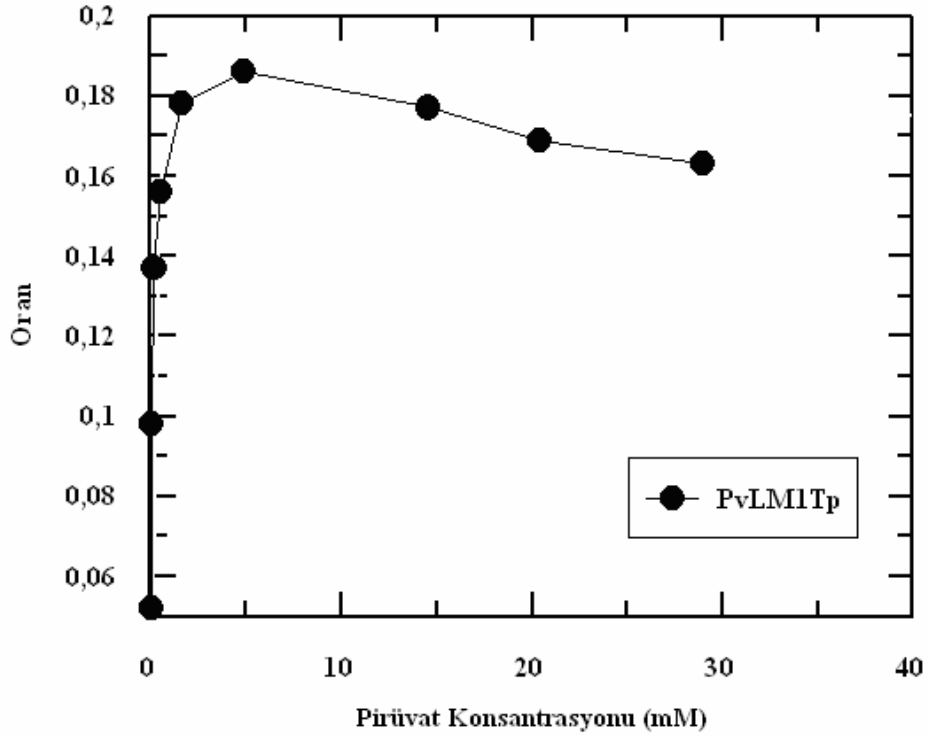
Mutant *PvLDH* proteinleri saflaştırıldıktan sonra kinetik değerlerinin hesaplanması için farklı pirüvat konsantrasyonlarında aktiviteleri ölçülmüştür.

PvLM1Tp enziminin aktivitesinin ölçülmesi UNICAM UV-Visible spektrofotometre kullanılarak NADH'nin NAD^+ 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$) absorbans değişim oranı takip edilerek yapılmış ve Tablo 3.30.'da verilen değerler elde edilmiştir.

Tablo 3.30. PvLM1Tp enziminin aktivitesinin NADH'ın NAD⁺'a çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbens değişim oranının takip edilerek ölçülmesi

Pirüvat (mM)	Oran (ΔA_{340} /dakika)
0,02	0,052
0,06	0,098
0,18	0,137
0,54	0,156
1,6	0,178
4,86	0,186
14,58	0,177
20,4	0,169
29	0,163

Elde edilen veriler kullanılarak Grafüt 3.0 [163] isimli programa girilmiş ve kullanma klavuzuna göre enzim kinetiği hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. PvLM1Tp için elde edilen sonuçlar Şekil 3.54. ve Tablo 3.31.'de sunulmuştur.



Şekil 3.54. PvLM1Tp'nin Steady-State kinetik davranışı

Tablo 3.31. PvLM1Tp'nin Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar

Steady-State Kinetik Sabitesi	Değer	Standart Hata
$V_{\max}$	0.1752	0.0034
K_m (mM)	0.0480	0.0065

Analiz sonucunda tespit edilen $V_{\max}$ değerinden ve başlangıçta hesaplanan enzim miktarından yola çıkılarak k_{cat} değeri hesaplanmış ve yorumlamalarda kullanılmıştır. Bütün bu analizlere göre PvLM1Tp için elde edilen veriler Tablo 3.32.'de sunulmuştur.

Tablo 3.32. PvLM1Tp'nin PvLDH ile karşılaştırmalı Steady-State kinetik sabiteleri

Enzim	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)
PvLDH	37.8	190	5.0×10^6
PvLM1Tp	48.0	316	6.6×10^6

PvLM2Tp enziminin aktivitesinin ölçülmesi UNICAM UV-Visible spektrofotometre kullanılarak NADH'nin NAD^{+} 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$) absorbans değişim oranı takip edilerek yapılmış ve Tablo 3.33.'de verilen değerler elde edilmiştir.

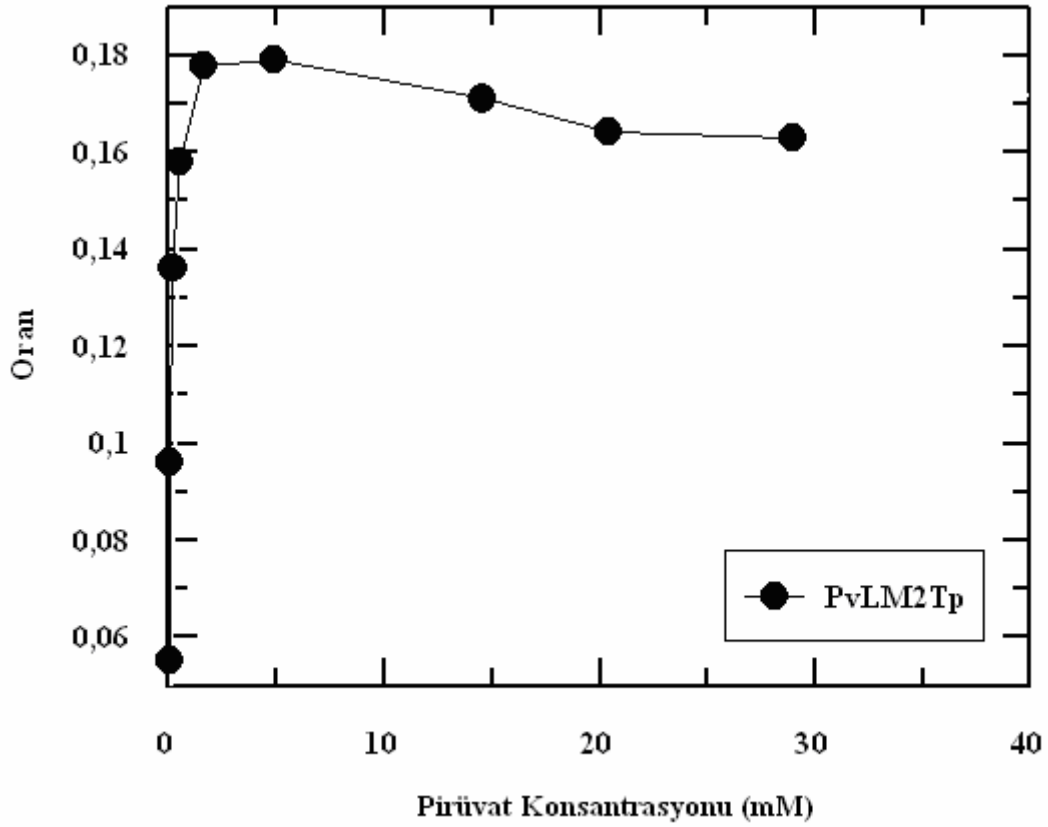
Tablo 3.33. PvLM2Tp enziminin aktivitesinin NADH'nin NAD^{+} 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$) absorbans değişim oranının takip edilerek ölçülmesi

Pirüvat (mM)	Oran ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$)
0,02	0,055
0,06	0,096
0,18	0,136
0,54	0,158
1,6	0,178
4,86	0,179
14,58	0,171
20,4	0,164
29	0,163

Elde edilen veriler kullanılarak Grafit 3.0 [163] isimli programa girilmiş ve kullanma klavuzuna göre enzim kinetiği hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. PvLM2Tp için elde edilen sonuçlar Tablo 3.34. ve Şekil 3.55.'de sunulmuştur.

Tablo 3.34. PvLM2Tp'nin Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar

Steady-State Kinetik Sabitesi	Değer	Standart Hata
$V_{\max}$	0.1720	0.0030
K_m (mM)	0.0482	0.0055



Şekil 3.55. PvLM2Tp'nin Steady-State kinetik davranışı

Analiz sonucunda tespit edilen $V_{\max}$ değerinden ve başlangıçta hesaplanan enzim miktarından yola çıkılarak k_{cat} değeri hesaplanmış ve yorumlamalarda kullanılmıştır. Bütün bu analizlere göre PvLM2Tp için elde edilen veriler Tablo 3.35.'de sunulmuştur.

Tablo 3.35. PvLM2Tp'nin PvLDH ve PvLM1Tp ile karşılaştırmalı Steady-State kinetik sabiteleri

Enzim	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)
PvLDH	37.8	190	5.0×10^6
PvLM1Tp	48.0	316	6.6×10^6
PvLM2Tp	48.2	254	5.3×10^6

PvLDH enziminin aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun son model Apikompleksan olan *Theileria parva*'nın LDH enzimindeki (TpLDH) pentapeptid insersiyonuna benzetildiği mutagenез çalışmalarında PvLM1Tp mutagenезi ile PvLDH'ın aktif bölge halkasındaki ilave 5 aminoasit olan DKEWN aminoasitleri NKEWN haline getirilerek *Theileria parva* LDH'ı kısmen taklit edilmiş, PvLM2Tp mutagenезi ile de PvLDH'ın aktif bölge halkasındaki ilave 5 aminoasit olan DKEWN aminoasitleri NEEWN haline getirilerek *Theileria parva* LDH'ının ilave 5 aminoasit bölgesi tamamen taklit edilmiştir. Bu grubun mutagenезlerinde diğer mutagenез çalışmalarından farklı olarak yapılan değişiklikler ile enzimin substratına ilgisi hemen hemen değişmeden kalmış ancak her iki enzimin de k_{cat} pirüvat değerleri arttığından bu değişikliğin yapılması ile beraber PvLM1Tp enziminin katalitik aktivitesinde % 66, PvLM2Tp enziminin katalitik aktivitesinde ise % 34 oranında iyileşme gerçekleşmiştir. Apikompleksan LDH'larının aktif bölge elemanlarının değiştirilmesi durumunda benzer özellikler göstermesi, plazmodiyal LDH'lar için önerilen yaklaşımın diğer Apikompleksanlar için de uygulanmasının benzer başarılı sonuçları verebileceğinin bir kanıtıdır.

3.3. *Plasmodium vivax*'ın Laktat Dehidrogenaz Enzimindeki Kofaktör Bağlanma Bölgesinin Yönlendirilmiş Mutagenез Çalışmaları ile Analizi

Yapıya dayalı antimalarial tasarım çalışmalarında *Plasmodium* LDH'ının aktif bölgesi kadar kofaktör bağlanma bölgesi de dikkat çekmektedir. İnsan LDH'ında kofaktör bağlanma bölgesindeki Ser₁₆₃, bir H₂O molekülü ve NADH'ın nikotinamid grubu arasında bir hidrojen bağı etkileşimi vardır [128]. Fakat plazmodiyal LDH'larda Leu₁₆₃'ün belkemiği karbonil grubu, NADH'ın nikotinamid grubu ile hidrojen bağı yapmaktadır. Bu hidrojen bağının oluşması Leu₁₆₃'ün belkemiği peptidinin 180 °C'lik bir açı ile dönmesiyle sağlanmaktadır [98, 109, 111, 113]. Plazmodiyal LDH'ın, insan LDH'ına göre kofaktör

bağlanma bölgesindeki S₁₆₃ aminoasidinin yerine L₁₆₃ aminoasidini taşıması, NADH kofaktörünün insan LDH'ına göre substrata ve enzim aktif bölgesine ~1 Å daha yakın olmasına neden olmaktadır [18, 19, 98, 110, 113, 114, 116, 117]. Bu farklılık, enzimin katalizleme kinetiğini ve substrat inhibisyonu özelliğini değiştirmektedir [98, 109, 111, 113]. NADH kofaktörünün pozisyonunu değiştiren bu fenomen, aynı zamanda 163. pozisyonda korunmuş methionin içeren *Toxoplasma gondii* [76] ve *Eimeria tenella* [122] LDH enzimlerinde de görülmektedir. *Theileria parva* LDH enziminde ise Met₁₆₃ korunmuş olmakla birlikte [47] üç boyutlu yapısı bilinmediği için enzimin aynı yapısal farklılığı gösterip göstermediği bilinmemektedir.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında, sıtmaya karşı etkin olacak yeni ilaç tasarım çalışmalarına sağlayacağı katkının test edilmesi için *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenaz enziminin kofaktör bağlanma bölgesindeki Leu₁₆₃ aminoasidi hedef alınmıştır. Proteine kazandırdığı yapısal ve kinetik özellikleri araştırmak için Leu₁₆₃ aminoasidi model Apikompleksanlardaki Met₁₆₃ aminoasidi ve insan LDH'ındaki Ser₁₆₃ aminoasidi ile değiştirilmiş ve bu değişikliklerin enzim üzerindeki etkileri test edilmiştir.

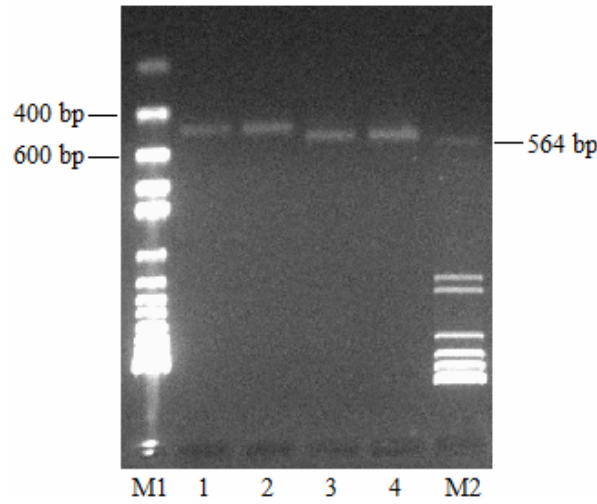
3.3.1. PvLDH Enziminin Kofaktör Bağlanma Bölgesindeki Leu₁₆₃ Aminoasidinin Model Apikompleksanların LDH'ındaki Met₁₆₃ ile Değiştirilmesi ve Analiz Edilmesi

PvLDH enziminin aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun analizinden sonra kofaktör bağlanma bölgesindeki Leu₁₆₃ aminoasidinin analizi yapılmıştır. Bunun için Leu₁₆₃ aminoasidi ilk olarak model Apikompleksanlardaki Met₁₆₃ aminoasidi ile değiştirilmiştir. Elde edilen mutant PvLDH geni/enzimi PvL163M olarak adlandırılmıştır (Şekil 3.56.).

	163
<i>Pv</i> LDH	I I G L G G V L D
<i>Tg</i> ₁ LDH	I C G M A C M L D
<i>Et</i> LDH	V C G M A G V L D
<i>Tp</i> LDH	V V G M G G L L D
PvL163M	I I G M G G V L D

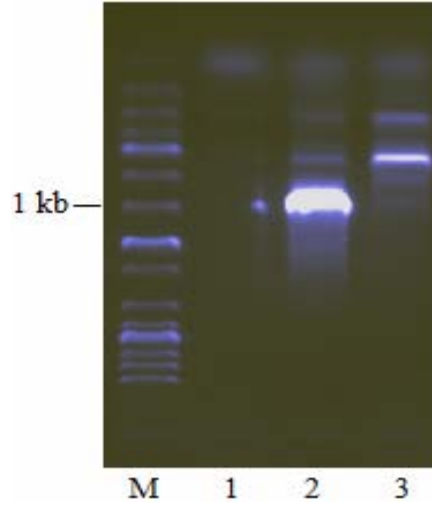
Şekil 3.56. *Pv*LDH'nin kofaktör bağlanma bölgesindeki Leu₁₆₃ aminoasidinin model Apikompleksanlardaki Met₁₆₃ aminoasidi ile değiştirilmesi. Değiştirilen aminoasit koyu renkli ve altı çizili olarak gösterilmiştir.

PvL163M için yönlendirilmiş mutagenез çalışmalarıyla 478 bp büyüklüğünde A fragmenti ve 545 bp büyüklüğünde B fragmenti elde edilmiş olup kristal viyole ile boyalı % 1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra jelden saflaştırılmıştır. Bu fragmentler PCR ile birleştirilmeden önce etidyum bromür ile boyalı % 1'lik agaroz jelde yürütülerek yaklaşık konsantrasyonları ölçülmüştür (Şekil 3.57.). Elde edilen A ve B fragmentlerinin konsantrasyonları dikkate alınarak birleştirilmiş ve tam uzunlukta PvL163M geni elde edilmiştir.



Şekil 3.57. PvL163M geninin A ve B fragmentlerinin yaklaşık konsantrasyonlarının ölçülmesi için jelde görüntülenmesi. Hatlar: M1: Markır (Hyper Ladder I); M2: Markır (Lambda DNA Hind III Digest); 1 ve 2: PvL163M geninin A fragmentleri; 3 ve 4: PvL163M geninin B fragmentleri

Diğer mutagenезlerde yapıldığı gibi PvL163M geni *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek yapışkan uçlar oluşturulmuş ve pKK223-3 vektörüne ligasyonu yapılmıştır. Elde edilen rekombinant PvL163M geni kompetant *E. coli* JM105 hücresine aktarılmıştır. Koloni PCR yapılarak transformasyon sonucu kontrol edilmiştir. Şekil 3.58.'de PvL163M geninin transformasyonu için hat 2'de 1 kb büyüklüğünde bant elde edilerek pozitif sonuç, hat 1 ve 3'de ise negatif sonuç alınmıştır.



Şekil 3.58. Koloni PCR sonrası pozitif ve negatif sonuçların jelde görüntülenmesi. Hatlar: M: Markır (GeneRuler SM1338); 1-3: PvL163M geni için pozitif ve negatif sonuçlar

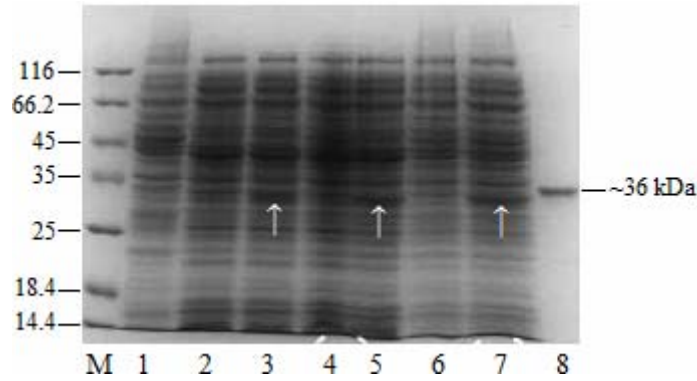
Şekil 3.59.'da (a ve b) mutant *PvLDH* geni PvL163M'in çift yönlü dizileme sonuçları görülmektedir. Buna göre TTA kodonu ATG kodonuna çevrilerek L₁₆₃→M₁₆₃ mutagenezi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.59. PvL163M geninin (a) 5'→3' zincirinin ve (b) 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu

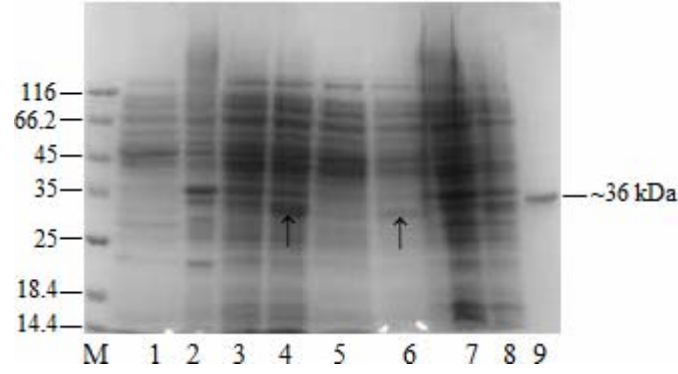
PvL163M geni yönlendirilmiş mutagenез ile elde edilip altklonlaması yapıldıktan sonra aktarıldığı *E. coli* JM105 hücresindeki ekspresyonunu kontrol etmek için SDS-PAGE ile genel protein analizi yapılmıştır. PvLDH proteininin aktif bölge halkasındaki aminoasitlerin değiştirilmesi ile elde edilen bütün mutant proteinlerde olduğu gibi, kofaktör bağlanma bölgesindeki L₁₆₃ aminoasidinin değiştirildiği PvL163M mutant proteininde de *E. coli* JM105 hücresindeki zayıf ekspresyonundan dolayı ancak T₃ döneminden itibaren protein bantları SDS-PAGE ile jel üzerinde gözlenmiştir (Şekil 3.60.).

PvL163M proteininin *E. coli* JM105 hücresindeki en iyi ekspresyonu diğer mutant proteinlerin ekspresyonlarında olduğu gibi indüklenmiş ve bir gecelik örneklerde gözlenmiştir. İndüklenmemiş örneklerde ise bu proteinin bandı görülmemiştir. İndüklenmemiş örneklerde de PvL163M proteininin eksprese edildiği düşünölmekle birlikte oldukça zayıf olduğu için görölmemektedir.



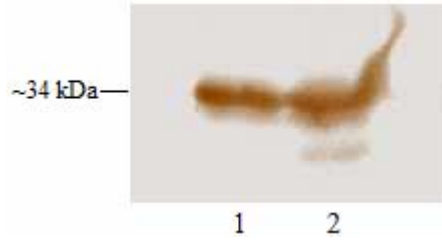
Şekil 3.60. PvL163M genini içeren 3 saatlik-bir gecelik *E. coli* JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili. Hatlar: M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: Herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili; 2 ve 3: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvL163M genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T₃ protein profili; 4 ve 5: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvL163M genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T₅ protein profili; 6 ve 7: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvL163M genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T_{O/N} protein profili; 8: İnsan LDH-M saf proteini

PvL163M proteininin ekspresyonu kontrol edildikten sonra bu proteinin çözünabilir formda olup olmadığını belirlemek için hücre ekstraktının süpernatant ve pelet fazı ayrı ayrı incelenmiştir. Bunun için en iyi protein ekspresyonunun gözleendiği bir gecelik örneğin süpernatant ve pelet fazı hazırlanmıştır. Bu fazlar karşılaştırma yapmak için aynı zamanda genel hücre ekstraktı ile birlikte SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 3.61.).



Şekil 3.61. PvL163M genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının protein profillerinin ayrı ayrı gösterilmesi. Hatlar: M: Markır (Protein MW-SM0431); 1 ve 2: Herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazları; 3 ve 4: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvL163M genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili; 5 ve 6: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvL163M genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı; 7 ve 8: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvL163M genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin pelet fazı; 9: İnsan LDH-M saf proteini

Şekil 3.61.'de görüldüğü gibi genel protein profilinde görülen PvL163M proteini, süpernatant ve pelet fazlarının her ikisinde de belirgin bir şekilde tespit edilememiştir. Bunun için PvL163M proteininin ekspresyonunu kesin olarak doğrulamak ve çözünebilir formda olup olmadığını belirlemek için hem süpernatant hem de pelet fazları ile Western blot çalışması yapılmıştır (Şekil 3.62.).



Şekil 3.62. PvL163M proteininin Western blot ile gösterilmesi. Hatlar: 1: İndüklenmiş PvL163M genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı; 2: İndüklenmiş PvL163M genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin pelet fazı

Şekil 3.62.'de verilen Western blot sonuçlarına göre PvL163M proteini hem çözünebilir formda süpernatant fazında hem de çözünemeyen formda pelet fazında bulunmaktadır. Dolayısıyla PvL163M proteini *E. coli* JM105 hücresinde her iki formda da eksprese edilmektedir. Bilindiği gibi *E. coli*'deki heterolog gen ürünlerinin yüksek düzeydeki ekspresyonları sırasında bazı durumlarda eksprese edilen proteinler doğal konformasyonlarını oluşturamamakta ve bu yüzden inklüzyon cisimcikleri olarak bilinen

çözünemeyen formdaki çökeltileri oluşturmaktadır [170]. Dolayısıyla PvL163M proteininin ekspresyonu sırasında da proteinin aktif olarak eksprese edildiği ancak ekspresyon ürününün bir kısmının çözünemeyen formda pelette yer aldığı düşünülmektedir. Bu durum proteinin hem süpernatant hem de pelet fazında belirlenmiş olmasının nedeni olarak gösterilebilir.

PvL163M proteininin aktif olup olmadığını belirlemek için spektrofotometrik olarak aktivite ölçümü yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.36.'da gösterilmiştir.

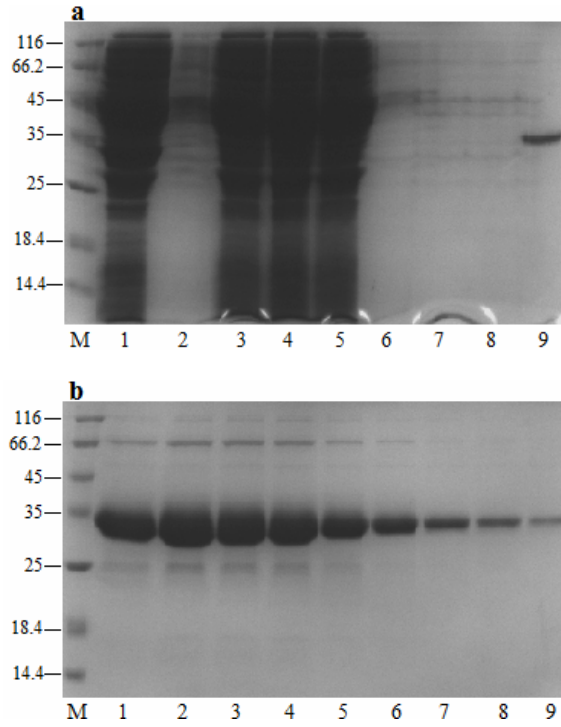
Tablo 3.36. PvL163M proteininin aktivitesinin ölçülmesi. (LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiş olup bu değerlerin ortalaması verilmiştir).

$\Delta A_{340}/\text{dakika}$			OD ₆₀₀ (Seyreltme Faktörü: 1/10)	10 mM Pirüvat	1 mM Pirüvat
PvL163M genini içeren <i>E. coli</i> JM105	İndüklenmemiş	3 saat	0,257	0,029	0,066
	İndüklenmiş		0,240	0,209	0,281
	İndüklenmemiş	Bir gece	0,521	0,149	0,121
	İndüklenmiş		0,504	0,499	0,636
<i>E. coli</i> JM105	3 saat		0,217	0,020	0,021
	Bir gece		0,388	0,080	0,039

Tablo 3.36.'da alınan sonuçlara göre PvL163M mutant proteini aktif olarak eksprese edilmektedir. PvLDH'nin 163. pozisyonundaki büyük ve hidrofobik bir aminoasit olan Leu, yine hidrofobik ve aynı zamanda büyük bir yapıda olan Met aminoasidi ile değiştirildiği zaman protein aktif olarak üretilmektedir.

Aktif olarak ekspresyonu yapılan PvL163M proteininin saflaştırılması Bölüm 2.2.15.2.'de anlatılan Protokol 2 ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar diğer mutant proteinlerin saflaştırılması sırasında alınan sonuçlarla benzer olup PvL163M proteini saf olarak elde edilmiştir (Şekil 3.63.).

Son elüsyon örneklerinde saf olarak elde edilen PvL163M proteininin 280 nm'de yapılan spektrofotometrik ölçümünde A_{280} değeri 0,541 olarak ölçülmüştür. Buna göre 34239 g/mol molekül ağırlığındaki PvL163M proteini 1,1 mg/ml konsantrasyonunda elde edilmiştir.



Şekil 3.63. Protokol 2 ile saflaştırılmış PvL163M proteininin SDS-PAGE ile analizi. Hatlar: **(a)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: CL; 2: FT1; 3: FT2; 4: FT3; 5: W1; 6: W2; 7: W3; 8: E1; 9: E2. **(b)** M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: E3; 2: E4; 3: E5; 4: E6; 5: E7; 6: E8; 7: E9; 8: E10; 9: E11

PvL163M enziminin aktivitesinin ölçülmesi UNICAM UV-Visible spektrofotometre kullanılarak NADH'nin NAD^{+} 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$) absorbans değişim oranı takip edilerek yapılmış ve Tablo 3.37.'de verilen değerler elde edilmiştir.

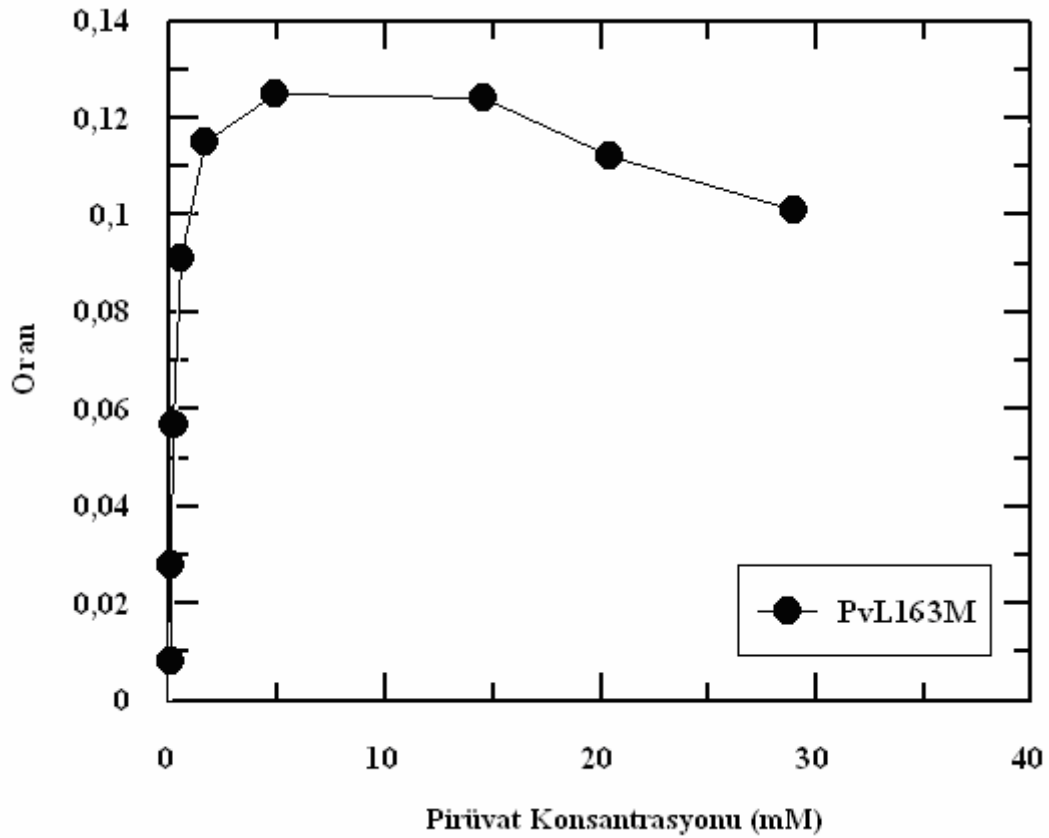
Tablo 3.37. PvL163M enziminin aktivitesinin NADH'nin NAD^{+} 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$) absorbans değişim oranının takip edilerek ölçülmesi

Pirüvat (mM)	Oran ($\Delta A_{340}/\text{dakika}$)
0,02	0,008
0,06	0,028
0,18	0,057
0,54	0,091
1,6	0,115
4,86	0,125
14,58	0,124
20,4	0,112
29	0,101

Elde edilen veriler kullanılarak Grafit 3.0 [163] isimli programa girilmiş ve kullanma klavuzuna göre enzim kinetiği hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. PvL163M için elde edilen sonuçlar Tablo 3.38. ve Şekil 3.64.'de sunulmuştur.

Tablo 3.38. PvL163M'in Grafit 3.0 isimli program ile analizi sonucunda elde edilen sonuçlar

Steady-State Kinetik Sabitesi	Değer	Standart Hata
$V_{\max}$	0.1189	0.0044
K_m (mM)	0.1792	0.0409



Şekil 3.64. PvL163M'in Steady-State kinetik davranışı

Analiz sonucunda tespit edilen $V_{\max}$ değerinden ve başlangıçta hesaplanan enzim miktarından yola çıkılarak k_{cat} değeri hesaplanmış ve yorumlamalarda kullanılmıştır. Bütün bu analizlere göre PvL163M için elde edilen veriler Tablo 3.39.'da sunulmuştur.

Tablo 3.39. PvL163M'in *PvLDH* ile karşılaştırmalı Steady-State kinetik sabiteleri

Enzim	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)
<i>PvLDH</i>	37.8	190	5.0×10^6
PvL163M	179.2	97	5.4×10^5

PvLDH enziminin kofaktör bağlanma bölgesindeki Leu₁₆₃ aminoasidinin model Apikompleksanlardaki Met₁₆₃ aminoasidi ile değiştirildiği PvL163M proteini tez çalışmasının kofaktör bağlanma bölgesi mutagenезlerinden elde edilen tek aktif proteindir. PvL163M enzimi aktivitesini korumasına rağmen substratına olan ilgisi yaklaşık olarak 5 kat azalmış ve katalitik hızı yarı yarıya düşmüştür. Buna göre *PvLDH* diğer model Apikompleksanlardaki Met₁₆₃ aminoasidi yerine Leu₁₆₃ aminoasidi ile substratına daha etkin bir bağlanma sağlamak ve daha iyi bir katalitik aktivite göstermektedir. Ayrıca Brown, ve diğ., 2004'de [98] belirtildiği gibi ve bu tez çalışmasında da yapılan diğer bazı mutagenезlerde olduğu gibi bu mutagenез sonucunda da 20 mM pirüvat konsantrasyonunda çok az da olsa substrat inhibisyonunun olduğu mutant proteinlerin Steady-State kinetik davranışları şekillerinde görülmektedir.

3.3.2. *PvLDH* Enziminin Kofaktör Bağlanma Bölgesindeki Leu₁₆₃ Aminoasidinin İnsan LDH'ındaki Ser₁₆₃ ile Değiştirilmesi ve Analiz Edilmesi

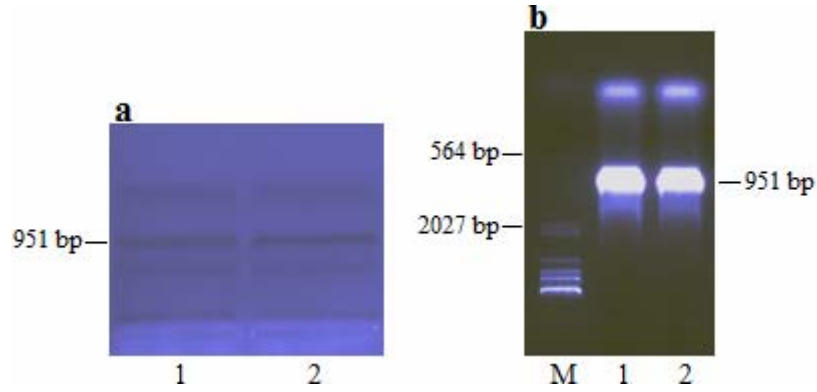
PvLDH enziminin kofaktör bağlanma bölgesindeki Leu₁₆₃ aminoasidinin son olarak insan LDH'ındaki Ser₁₆₃ aminoasidi ile değiştirilerek analiz edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen mutant *PvLDH* geni/enzimi PvL163S olarak adlandırılmıştır (Şekil 3.65.).

	163
<i>PvLDH</i>	I I G L G G V L D
İnsan-m	V I G S G C N L D
İnsan-h	V I G S G C N L D
PvL163S	I I G S G G V L D

Şekil 3.65. *PvLDH*'ın kofaktör bağlanma bölgesindeki Leu₁₆₃ aminoasidinin insan LDH'ındaki Ser₁₆₃ aminoasidi ile değiştirilmesi. Değiştirilen aminoasit koyu renkli ve altı çizili olarak gösterilmiştir.

Mutant *PvLDH* geni olan *PvL163S*'i elde etmek ve klonlamak için Bölüm 3.2.1.'de ve altbölümlerinde yapılan deneysel yöntemlerin aynısı yapılmış olup benzer sonuçlar alınmıştır.

PvL163S için yönlendirilmiş mutagenез çalışmalarıyla 478 bp büyüklüğünde A fragmenti ve 545 bp büyüklüğünde B fragmenti beklenmiş ve doğru büyüklükte elde edilen fragmentler jelden saflaştırılarak PCR ile birleştirilmiştir. Tam uzunlukta elde edilen *PvL163S* geni kristal viyole ile boyalı % 1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra (Şekil 3.66.a.) saflaştırılmıştır. Genin tam uzunlukta olduğu aynı zamanda etidyum bromür ile boyalı % 1'lik agaroz jelde yürütülerek de doğrulanmıştır (Şekil 3.66.b.).



Şekil 3.66. *PvL163S* geninin tam uzunluğunun (a) kristal viyole ile boyalı % 1'lik agaroz jelde görüntülenmesi ve (b) etidyum bromür ile boyalı % 1'lik agaroz jelde görüntülenmesi. Hatlar: (a) 1 ve 2: *PvL163S* geni. (b) M: Markır (Lambda DNA Hind III Digest); 1 ve 2: *PvL163S* geni

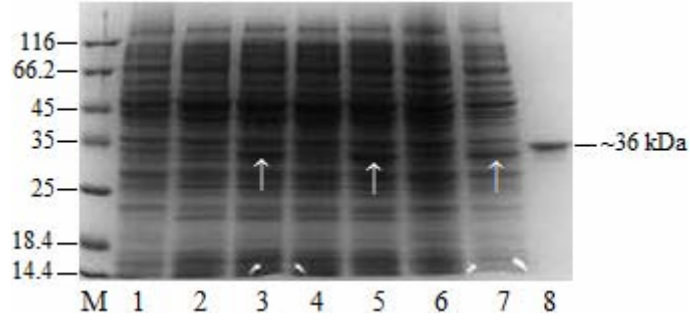
Tam uzunlukta elde edilen *PvL163S* geni daha sonra *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek pKK223-3 vektörüne ligasyonu yapılmıştır. Elde edilen rekombinant *PvL163S* geni kompetant *E. coli* JM105 hücrelerine aktarılarak koloni PCR ile transformasyon sonucu kontrol edilmiştir.

Koloni PCR ile alınan muhtemel pozitif sonucu kesin olarak doğrulamak için yaptırılan dizilemenin sonuçlarına göre (Şekil 3.67.a. ve Şekil 3.67.b.) *PvLDH* geninin 163. pozisyonundaki Leu aminoasidinin TTA kodonu Ser aminoasidinin TCG kodonu ile değiştirilmiştir.



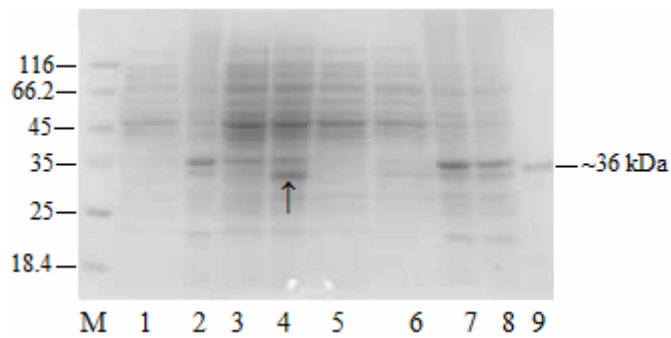
Şekil 3.67. PvL163S geninin (a) 5'→3' zincirinin ve (b) 3'←5' zincirinin dizi analizi sonucu

Dizi analizi yapılarak yönlendirilmiş mutagenезin gerçekleştirildiği doğrulandıktan sonra PvL163S geninin *E. coli* JM105 hücreesindeki ekspresyonunu kontrol etmek için SDS-PAGE ile genel protein analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda Şekil 3.68.'de “↑” ile gösterildiği gibi PvL163S proteininin *E. coli* JM105 hücreesinde ekspresyonu yapılmakta olup, T₃ döneminden itibaren protein bantları SDS-PAGE ile jel üzerinde gözlenmiştir.



Şekil 3.68. PvL163S genini içeren 3 saatlik-bir gecelik *E. coli* JM105 hücre ekstraktlarının genel protein profili. Hatlar: M: Markır (Protein MW-SM0431); 1: Herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili; 2 ve 3: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvL163S genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T₃ protein profili; 4 ve 5: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvL163S genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T₅ protein profili; 6 ve 7: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvL163S genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin T_{ON} protein profili; 8: İnsan LDH-M saf proteini

PvL163S proteininin ekspresyonu kontrol edildikten sonra bu proteinin çözünebilir formda olup olmadığını belirlemek için eksprese edildiği *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazları ayrı ayrı incelemiştir. Ancak Şekil 3.69.'da görüldüğü gibi genel protein profilinde zayıf olarak görülen PvL163S proteini süpernatant ve pelet fazları ayrı ayrı incelendiği zaman her iki fazda da belirgin bir şekilde görülemedi. Benzer sonuçlar PvL163M mutant proteininde de alınmış olup zayıf ekspresyonun yanı sıra fazların ayrılması işlemi sırasında protein miktarı daha da azaldığı için jel üzerinde görülemediği düşünülmektedir.



Şekil 3.69. PvL163S genini içeren *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının protein profillerinin ayrı ayrı gösterilmesi. Hatlar: M: Markır (Protein MW-SM0431); 1 ve 2: Herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazları; 3 ve 4: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvL163S genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin genel protein profili; 5 ve 6: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvL163S genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin süpernatant fazı; 7 ve 8: İndüklenmemiş ve indüklenmiş PvL163S genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin pelet fazı; 9: İnsan LDH-M saf proteini

PvL163S proteininin ekspresyonunu kesin olarak doğrulamak ve çözünebilir formda olup olmadığını belirlemek için hem süpernatant hem de pelet fazları ile Western blot çalışması yapılmıştır (Şekil 3.70.). Buna göre PvL163S proteini sadece pelet fazında tespit edilmiş olup süpernatant fazında görülmemiştir. Dolayısıyla PvL163S proteininin eksprese edildiği ancak inaktif olduğu anlaşılmıştır. Yine Western blot ile alınan sonuçlara göre negatif kontrol olarak kullanılan insan LDH-M saf proteini ve herhangi bir genin aktarılmadığı *E. coli* JM105 hücresinin ekstraktı membran üzerinde herhangi bir bant oluşturmamıştır.



Şekil 3.70. İndüklenmiş PvL163S genini içeren bir gecelik *E. coli* JM105 hücrelerinin pelet fazındaki PvL163S proteininin Western blot ile gösterilmesi

Tablo 3.40.'da ise PvL163S mutant proteininin aktivite ölçüm sonuçları görülmektedir. Buna göre bütün örneklerde protein aktivite göstermediği için inaktiftir. Bu inaktivite aynı zamanda indüklenmiş örneklerde de görülmektedir. Bu durum, PvLDH'daki Leu aminoasidinin kendisinden daha küçük yapıda ve aynı zamanda hidrofilik olan Ser aminoasidi ile değiştirilmesinin proteinin aktivitesini etkilediğini göstermektedir. Yapılan bu değişiklik protein için önemli olup muhtemelen 163. pozisyonuna Ser aminoasidinin yerleşmesi proteinin aktivitesini gösterecek üç boyutlu yapıyı oluşturmasını engellemektedir. Dolayısıyla protein aktivitesini kaybetmiştir.

163. pozisyonun önemi Ser163Leu mutagenezi ile substrat inhibisyon özelliğini kaybeden insan LDH enziminin LDH-M ve LDH-H izoformlarında ve *Bacillus stearothermophilus* LDH enzimlerinde de gösterilmiştir [132, 133, 135]. Yine PvLDH ile yapılan Leu163Ser mutagenez çalışmaları ile proteinin inaktif olduğu tespit edilmiştir [149]. İnsan LDH'nda aynı pozisyonda bulunan Ser aminoasidi PvLDH'ın 163. pozisyonu için uygun bir aminoasit olmadığından protein PvL163S mutagenezi ile aktivitesini kaybetmiştir. İnsan LDH'nda, kofaktör NADH'ın nikotinamid halkasının karboksiamid

yan zinciri, Ser₁₆₃'ün hidroksil grubu ile bir H₂O molekülü aracılığıyla hidrojen bağı yapmaktadır [128]. *Pf*LDH'da, büyük ve hidrofobik bir aminoasit olan Leu aminosidinin yapıya dahil olması, H₂O molekülünün bağlanma bölgesinin kaybına ve buna bağlı olarak konformasyonel değişime neden olduğundan Leu₁₆₃ aminoasidinin Ser₁₆₃ ile yer değiştirmesi hidrojen bağı oluşumunu imkânsız kılmaktadır. Bu durum kofaktör ve enzim arasındaki ilişkiyi azaltarak indirgenmiş substrat inhibisyonuna neden olmaktadır [144]. *Pv*LDH proteini ile yapılan aynı mutagenез çalışması ile elde edilen PvL163S mutant proteini de inaktif olarak eksprese edilmiş olup 163. pozisyondaki Leu aminoasidinin protein için önemli olduğu gösterilmiştir. İnsan LDH'ında aynı pozisyonda bulunan Ser aminoasidi *Pv*LDH'ın 163. pozisyonu için uygun bir aminoasit olmadığından protein PvL163S mutagenезi ile aktivitesini kaybetmiştir. Bu sonuçlara göre *Pv*LDH enziminin kofaktör bağlanma bölgesindeki Leu₁₆₃ aminoasidi, enzimin aktivitesi ve indirgenmiş substrat inhibisyonu için önemlidir.

Tablo 3.40. PvL163S proteininin aktivitesinin ölçülmesi. (LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiş olup bu değerlerin ortalaması verilmiştir).

$\Delta A_{340}/\text{dakika}$			OD ₆₀₀ (Seyreltme Faktörü: 1/10)	10 mM Pirüvat	1 mM Pirüvat
PvL163S genini içeren <i>E. coli</i> JM105	İndüklenmemiş	3 saat	0,211	0,013	0,017
	İndüklenmiş		0,208	0,031	0,031
	İndüklenmemiş	Bir gece	0,404	0,070	0,046
	İndüklenmiş		0,384	0,044	0,027
<i>E. coli</i> JM105	3 saat		0,217	0,020	0,021
	Bir gece		0,388	0,080	0,039

4. SONUÇ

Sıtmayı ortadan kaldırmak için yüzyıldan daha fazla bir süre çaba harcanmış olmasına rağmen, hastalık her yıl yaklaşık 250 milyon vak'a ve 1 milyon civarında ölüm oranı ile dünyanın en önemli ilk üç enfeksiyon hastalığı arasında yer almaktadır. Dünya popülasyonunun yarısının risk altında olduğu bu hastalığa karşı etkin bir tedavinin olmaması uzun ömürlü, ucuz ve güvenle kullanılabilecek yeni ilaçların geliştirilmesini gerekli kılmıştır [1, 2, 3].

İnsan-*Plasmodium*-anofel üçlüsü arasındaki herhangi bir zincir halkasının kırılmasının sıtmanın engellenmesini sağlayacağı düşünülmektedir. Ancak insan üzerinde yapılacak çalışmaların etik kaygılardan dolayı mümkün olmaması, anofel üzerinde yapılacak çalışmaların ise insektisitlerin yayılması ile oluşacak çevresel risklerinden dolayı uygulanmasının sınırlı olması, çalışmaları *Plasmodium* üzerine yoğunlaştırmıştır [171].

İnsanı infekte eden *Plasmodium* türleri arasında sıtma vak'alarının % 25-40'ından sorumlu olan [3] ve aynı zamanda dünyadaki ve Türkiye'deki en yaygın tür olan *P. vivax*, tez çalışmasının hedef türü seçilmiştir.

Plasmodium'lar eritrositik basamakta fonksiyonel bir Krebs döngüsüne sahip olmadıkları için ihtiyaç duydukları bütün enerjiyi glikoliz ile sağlamak zorundadırlar [92]. Bunun için glikoliz reaksiyonunun son enzimi laktat dehidrogenaz, parazitin yaşam döngüsü için gerekli bir enzimdir [12]. Bu amaçla Türkiye'deki en yaygın tür olan *P. vivax*'ın laktat dehidrogenaz enzimi tez çalışması için hedef enzim olarak seçilmiştir. Yapılan çalışmalar bu enzimin aktivitesinin engellenmesinin parazitin yaşamının sonlandırılmasını sağladığını göstermektedir [13, 14]. Ancak aynı enzim hem insanda hem de parazitte bulunduğu için insan LDH'nin etkilenmeden kalması gerekmektedir. Yapılan çalışmalar, plazmodiyal LDH'nin insandaki eşdeğeri olan LDH'dan elektroforetik, kinetik ve yapısal olarak farklı olduğunu göstermektedir [12, 13, 15-19]. Bu tez çalışmasında, *Plasmodium*'ların insan LDH'ından farklı olan yapısal ve kinetik özellikleri dikkate alınarak, bu özelliklerde kritik rol oynadığı bilinen *Plasmodium vivax* LDH'nin aktif bölge ve kofaktör bağlanma bölgesindeki önemli bazı aminoasitlerin analizi yapılmıştır.

Plazmodiyal LDH enzimi, insan LDH'ı ve diğer bilinen LDH'lar ile karşılaştırıldığında gözlenen en önemli farklılık plazmodiyal LDH enziminin, aktif bölge halkasında Ser₁₀₈ ve Arg₁₀₉ arasında bir pentapeptid insersiyonu (D_{108A}, K_{108B}, E_{108C},

W_{108D}, N_{108E}) içermesidir [18, 19, 89, 98, 110, 113, 114, 116, 117]. X ışını kristalografisi ve homoloji modelleme çalışmaları ile bu pentapeptid insersiyonunun enzimin aktif bölge halkasına yakın yüzeyinde çok belirgin bir yarık oluşturduğu, fakat insandaki eşdeğeri olan LDH'da ise aynı bölgede hiçbir ilave aminoasit olmadığı için sözkonusu yarığın olmadığı tespit edilmiştir [98, 109, 111, 113, 128]. Plazmodiyal LDH'nin aktif bölgesindeki bu değişikliğe bağlı olarak, insan LDH'ına göre yüksek derecede seçici bir inhibitör geliştirilmesi için aktif bölge halkası cazip bir hedef olarak görülmektedir [98].

Yapıya dayalı antimalarial tasarım çalışmalarında *Plasmodium* LDH'nin aktif bölgesi kadar kofaktör bağlanma bölgesi de dikkat çekmektedir. Plazmodiyal LDH'nin, insan LDH'ına göre kofaktör bağlanma bölgesindeki S₁₆₃ aminoasidinin yerine L₁₆₃ aminoasidini taşıması NADH kofaktörünün pozisyonunda değişikliğe neden olmaktadır [18, 19, 89, 98, 110, 113, 114, 116, 117]. Bu farklılık, enzimin katalizleme kinetiğini ve substrat inhibisyonu özelliğini değiştirmektedir [98, 109, 111, 113].

X ışını kristalografisi [109, 111, 113] ve homoloji modelleme çalışmalarına göre [98] plazmodiyal LDH'nin aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun oluşturduğu yarık ve kofaktör bağlanma bölgesindeki aminoasit değişikliğine bağlı olarak NADH kofaktörünün pozisyonundaki değişiklik aktif bölgede genişlemiş bir hacim ile sonuçlanmaktadır [14, 112, 113]. İnsan LDH'ına göre PvLDH'nin yapısal ve kinetik farklılığını sağlayan bu iki bölge seçici inhibitörler için bir tutunma bölgesi oluşturması ve enzimin substrat fazlalığını tolere etmesinde önemli bir rol oynamaktadır [111]. Dolayısıyla *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenaz enzimindeki aktif bölge halkasının sahip olduğu pentapeptid insersiyonunun ve kofaktör bağlanma bölgesindeki L₁₆₃ aminoasidinin yapısal değişiklikleri tolere edip etmediğinin test edilmesi bütün *Plasmodium*'lar için etkili ve seçici bir inhibitör tasarımı için önemlidir. *Plasmodium*'lar dışında aynı zamanda diğer Apikompleksanlara özgü olan bu bölge, çeşitli enzim inhibitörlerini barındırma ve enzim aktivitesini durdurarak parazitin ölümüne sebep olma potansiyeline sahip olduğu için *Plasmodium*'larla birlikte Apikompleksanlar için de genel ilaç tasarım çalışmalarında hedef bölge olarak kullanılabilip kullanılamayacağı konusunda bu tez çalışmasında açıklamalar getirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için insanda ve ekonomik olarak önemli olan hayvanlarda ciddi infeksiyonlara yol açan üç Apikompleksan türü olan *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella* ve *Theileria parva*'nın LDH enzimleri model olarak seçilmiştir. Bu tez çalışmasında, PvLDH enziminin kofaktör bağlanma bölgesindeki L₁₆₃ aminoasidinin ve aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun bu üç

Apikompleksanın aminoasitleri ile değiştirilmesi sonucu enzimin bu değişiklikleri tolere edip etmediği ve yapılan değişikliğin enzim kinetiğini nasıl etkilediği araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında yapılan altklonlama çalışmalarında, daha önceki çalışmalarda [156, 164] etidyum bromür ile boyalı jellerde yürütülen DNA örnekleri için ortaya çıkan klonlama problemleri devam etmiş olup bütün preparatif amaçlı jel elektroforezi için kristal viyole ile boyanan agaroz jeller kullanılmıştır. *Plasmodium falciparum* LDH'ı için yaşanan problemin [164] *Plasmodium vivax* LDH'ında da devam etmesi, etidyum bromürün DNA stabilizasyonu üzerindeki olumsuz etkisinin gen klonlamasını etkilediğini doğrulamış ve aynı zamanda preparatif amaçlı jel elektroforezi için kristal viyole ile boyanan agaroz jellerin önemli bir alternatif olduğunu göstermiştir.

Protein üretim basamağı, yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmalarının kilit basamağıdır. PvLDH proteininde yönlendirilmiş mutagenез ile yapılan değişikliğin analiz edilebilmesi için tez çalışmasının bu aşaması önem arz etmiştir. *E. coli*'de over-ekspresyon genellikle proteinin büyük miktarda üretimi için kabul edilen en iyi yoldur [138]. Bununla beraber yapılan tez çalışmasında bütün mutant proteinlerin *E. coli* JM105 hücrelerindeki ekspresyonlarının gerçekleştiği ancak zayıf olduğu görülmüştür. Mutant proteinler sadece IPTG ile indüklenmiş örneklerde gözlenmiş olup protein ekspresyonu aynı zamanda Western blot ile doğrulanmıştır. Yapılan çalışmada PjLDH primer antikorunun PvLDH mutant proteinlerini tanıyarak çapraz reaksiyon gerçekleştirdiği gözlenmiştir. PjLDH poliklonal antikorunun, PvLDH proteinini tanıması iki LDH arasındaki benzerlik oranının yüksek olmasından kaynaklanırken, mutant PvLDH proteinlerini tanımasının ise antikorun bağlandığı epitopun mutant PvLDH proteinlerinde değiştirilmemiş olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Benzer bir şekildeki çapraz reaksiyon Apikompleksan *Eimeria*'nın farklı türleri arasında da gerçekleşmiştir [172]. Çapraz reaksiyonun sadece aynı cinsin türleri arasında değil, aynı zamanda *Eimeria* türleri ile Apikompleksa şubesinin diğer üyeleri *Neospora*, *Toxoplasma* ve *Cryptosporidium*'un türleri arasında da görülmesi [173, 174], Apikompleksan türleri arasında ortak epitop bölgelerinin bulunduğunu işaret etmektedir. Buna bağlı olarak bu çalışmada kullanılan PjLDH poliklonal antikorunun PvLDH proteinini tanımasının yanında diğer plazmodiyal LDH proteinlerini ve hatta diğer Apikompleksan LDH'larını da tanıması muhtemeldir. Kesin olarak doğrulanması için PjLDH primer antikorunun kullanılarak bu türlerin LDH enzimleri ile Western blot çalışmaları yapılması gerektiği düşünülmektedir.

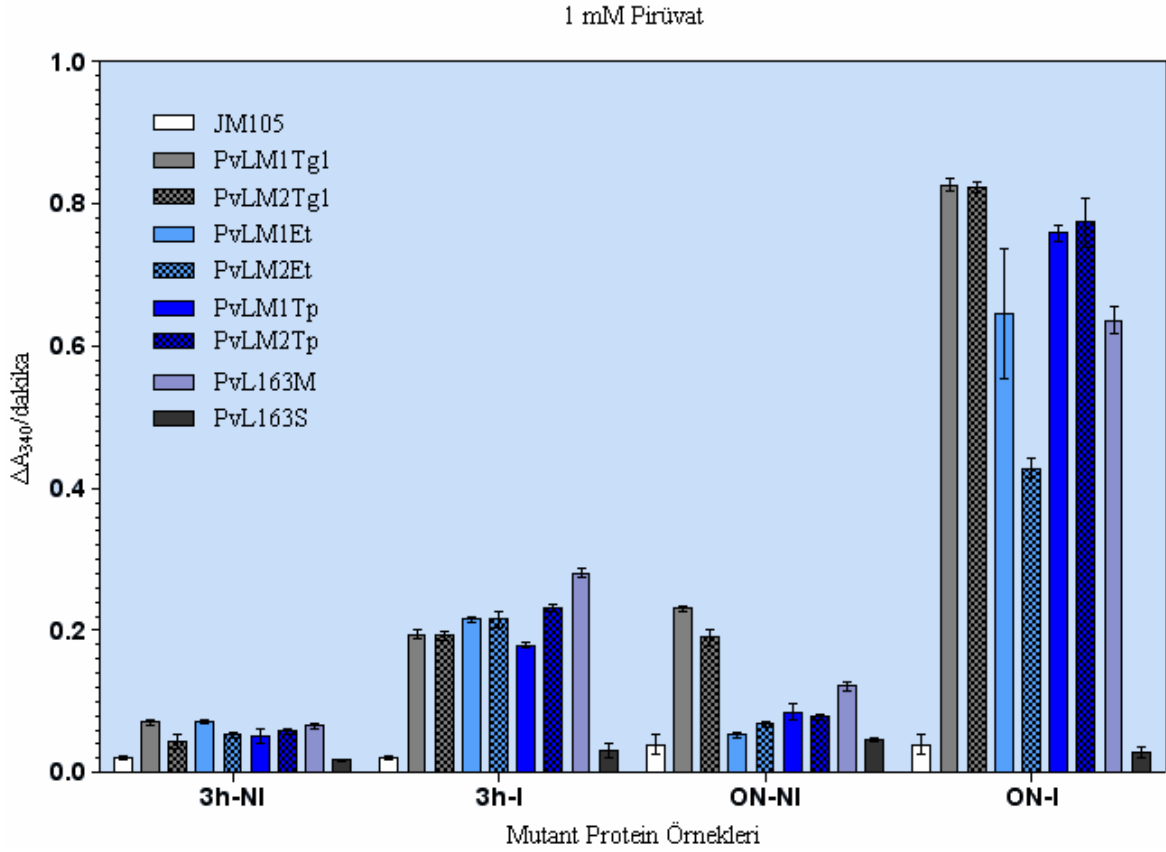
Tez çalışmasının hedef bölgesi olan aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunu ortak bir epitop bölgesi olarak hedefleyen antikör tarafından üç *Plasmodium* türündeki LDH enzimi belirlenmiştir [175]. Dolayısıyla plazmodiyal LDH'nin bu bölgesi antimalarial hedeften başka insan LDH'ından farklı olarak sadece plazmodiyal LDH'a özgü bir epitop olduğundan, iyi bir tanı hedef bölgesi olarak da kullanılabilir [176, 177]. Aynı zamanda aynı epitopa sahip diğer Apikompleksanların tanısı için de kullanılmasının mümkün olabileceği düşünülmektedir.

PvLDH enziminin aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun ve kofaktör bağlanma bölgesindeki L₁₆₃ aminoasidinin yönlendirilmiş mutagenез ile değiştirilerek diğer model Apikompleksanlara benzetilmesi ile proteinin yapısal değişikliğe olan tolerans durumunu görmek için yapılan aktivite ölçümünde Tablo 4.1.'de verilen sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre aktif bölge halkasında yapılan aminoasit değişikliğine karşı protein dayanıklıdır. Diğer Apikompleksanlar model alınarak yapılan bu değişiklik proteinin aktivitesi için önem arzetmemektedir. Ancak kofaktör bağlanma bölgesindeki L₁₆₃ aminoasidinin değiştirilmesi bu pozisyona yerleştirilen aminoaside göre farklılık göstermektedir. Proteinin 163. pozisyonundaki Leu aminoasidi Met gibi yine büyük bir aminoasitle değiştirildiği zaman proteinin aktif olma durumunu etkilememiştir. Ancak aynı pozisyona daha küçük bir aminoasit olan Ser aminoasidinin yerleştirilmesi proteinin aktivitesini kaybetmesine neden olmuştur. Böylece PvL163S proteininin ekspresyonunun yapılmasına rağmen inaktif olduğu görülmüştür.

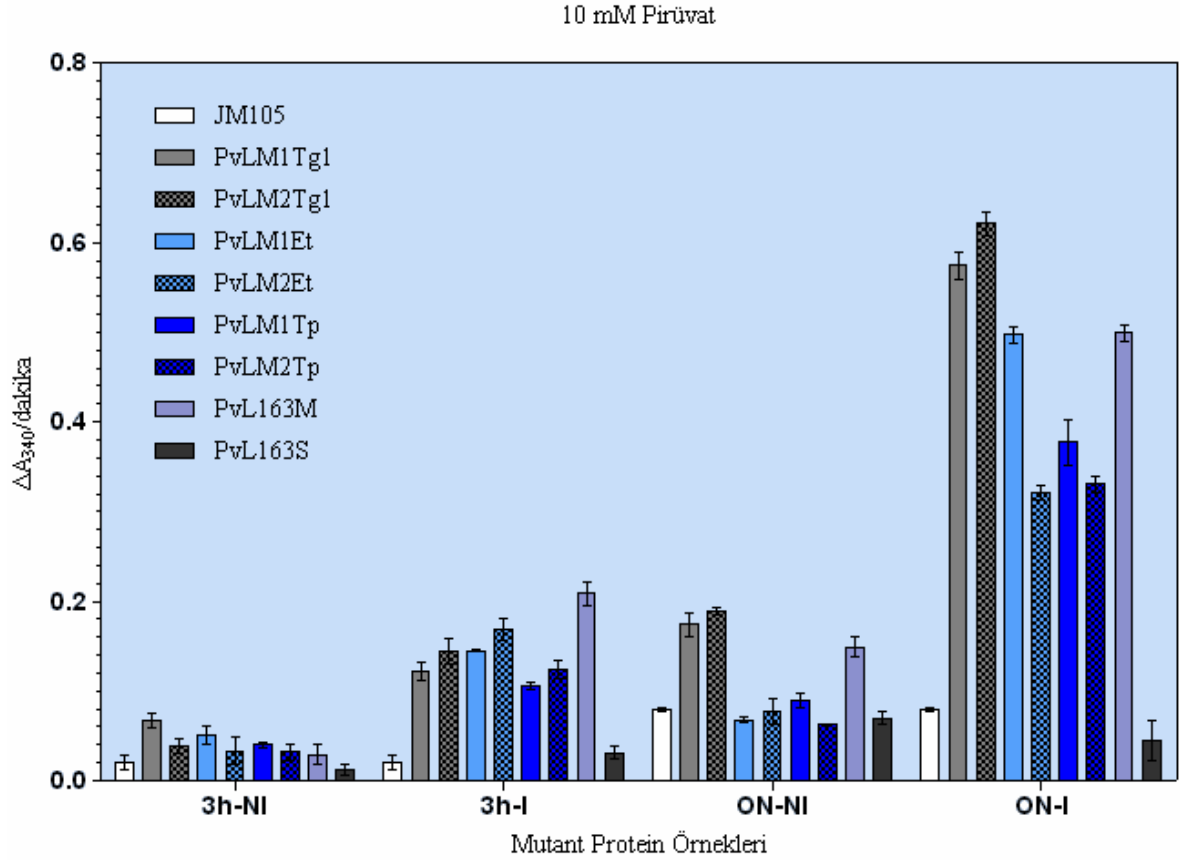
Tablo 4.1. PvLDH'nin aktif bölge halkasının ve kofaktör bağlanma bölgesinin yapısal değişikliğe olan tolerans durumu. Protein ekspresyonu (+: ekspresyon yapılmış); protein aktivitesi (+: aktif, -: inaktif)

Protein	Yönlendirilmiş Mutagenез	Protein Ekspresyonu	Protein Aktivitesi
PvLM1Tg1	D _{108A} S _{108B} E _{108C} W _{108D} N _{108E}	+	+
PvLM2Tg1	D _{108A} S _{108B} E _{108C} W _{108D} S _{108E}	+	+
PvLM1Et	D _{108A} Q _{108B} E _{108C} W _{108D} N _{108E}	+	+
PvLM2Et	D _{108A} Q _{108B} E _{108C} W _{108D} S _{108E}	+	+
PvLM1Tp	N _{108A} K _{108B} E _{108C} W _{108D} N _{108E}	+	+
PvLM2Tp	N _{108A} E _{108B} E _{108C} W _{108D} N _{108E}	+	+
PvL163M	I ₁₆₀ I ₁₆₁ G ₁₆₂ M ₁₆₃ G ₁₆₄ G ₁₆₅	+	+
PvL163S	I ₁₆₀ I ₁₆₁ G ₁₆₂ S ₁₆₃ G ₁₆₄ G ₁₆₅	+	-

Mutant enzimlerin aktiviteleri, farklı inkübasyon süresi, indükleme ve farklı substrat konsantrasyonları gibi parametreler dikkate alınarak karşılaştırılmıştır. Buna göre enzim aktivitesi, inkübasyon süresi ve indükleme ile doğru orantılı bir ilişki göstermiştir. Mutant enzimlerin aktivite değerlerinin logaritmik fazın 3 saatlik örneklerine göre bir gecelik örneklerde daha yüksek olduğu görülmüştür. Yine IPTG ile indüklenmiş örneklerde indüklenmemiş örneklere göre daha yüksek aktivite elde edilmiştir. En iyi enzim aktivitesi indüklenmiş bir gecelik örneklerde görülmüştür. Bu sonuçlara bağlı olarak inkübasyon süresi ve indükleme gibi ekspresyon parametrelerinin artan hücre yoğunluğuna ve dolayısıyla artan enzim miktarına paralel olarak aktivite artışını sağladığı düşünülmektedir (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.).



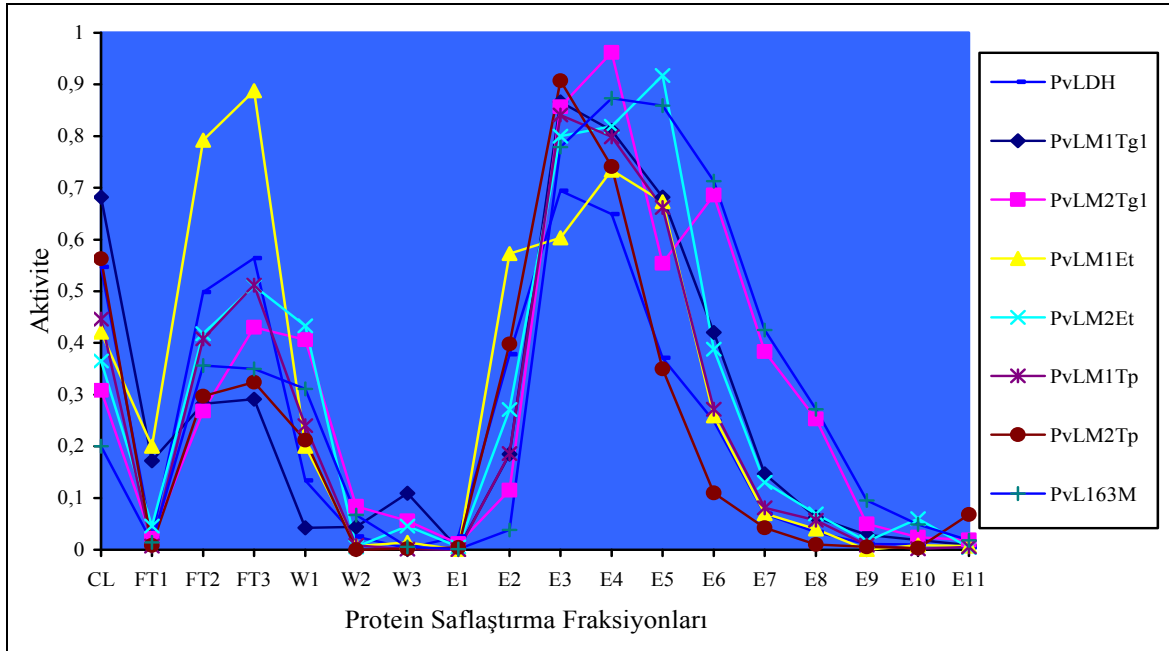
Şekil 4.1. PVL163S mutant proteinlerinin 1 mM pirüvat konsantrasyonundaki aktivitelerinin gösterilmesi. 3h-NI: Logaritmik fazın 3 saatlik ve indüklenmemiş (non-induced) örnekleri; 3h-I: Logaritmik fazın 3 saatlik ve indüklenmiş (induced) örnekleri; ON-NI: Bir gecelik ve indüklenmemiş (non-induced) örnekler; ON-I: Bir gecelik ve indüklenmiş (induced) örnekler



Şekil 4.2. *PvLDH* mutant proteinlerinin 10 mM pirüvat konsantrasyonundaki aktivitelerinin gösterilmesi. 3h-NI: Logaritmik fazın 3 saatlik ve indüklenmemiş (non-induced) örnekleri; 3h-I: Logaritmik fazın 3 saatlik ve indüklenmiş (induced) örnekleri; ON-NI: Bir gecelik ve indüklenmemiş (non-induced) örnekler; ON-I: Bir gecelik ve indüklenmiş (induced) örnekler

Artan inkübasyon süresi ve indükleme ile yüksek düzeydeki ekspresyona bağlı olarak inklüzyon cisimciklerinin oluşumu teşvik edildiğinden bazı durumlarda çözünabilir LDH enziminin ekspresyonu için bu parametreler düşürülmüştür [138]. Dolayısıyla enzim aktivitesinin inkübasyon süresi ve indükleme ile doğru orantılı ilişkisinin lineer olduğu düşünülmemektedir. Bununla beraber mutant enzimlerin aktiviteleri substrat konsantrasyonu ile ters orantılı bir ilişki göstermiş olup substrat (pirüvat) konsantrasyonu 1 mM'dan 10 mM'a çıkarıldığı zaman enzim aktivitesi azalmıştır (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.). Substrat konsantrasyonuna bağlı olarak aktivitenin azalmasının ileri kinetik analizlerde elde edilecek sonuçlara göre kesin olarak yorumlanması mümkün olmaktadır. Bununla beraber bu aktivite sonuçları, mutant enzimlerin substrat doygunluğuna dayanan zayıf bir substrat inhibisyonu gösterebileceğinin muhtemel sonuçları olarak düşünülmüştür.

Bir proteinin aktif ve saf olarak elde edilmesi kinetik çalışmalarının merkezini oluşturmakta olup, saf ve aktif protein olmaksızın bu ileri çalışmaların yapılması mümkün değildir. Bu tez çalışmasında *PvLDH* ve mutant *PvLDH* proteinleri, yapılmış olan yoğun çalışmalar ile aktif ve saf olarak elde edilmiştir. *PvLDH* ve mutant *PvLDH* proteinlerini saflaştırmak için iki farklı saflaştırma protokolü (Protokol 1 ve Protokol 2) kullanılmıştır. Bu iki protokol saflaştırma sonrası proteinin saflık derecesi, miktarı ve aktivitesi parametrelerine göre karşılaştırıldığı zaman Protokol 1 [159, 160] ile daha yüksek saflık derecesine sahip protein elde edilirken, Protokol 2 [74] ile daha yüksek miktarda ve aktif protein elde edilmiştir. Saflaştırmada protein aktivitesinin korunması en hassas kriterdir. Dolayısıyla kinetik çalışmalar için kullanılacak saf proteinleri elde etmek için Protokol 2 tercih edilmiştir. Mutant *PvLDH* proteinleri saflaştırıldıktan sonra kinetik analizleri *PvLDH*'a göre yorumlanacağı için bu proteinlerle birlikte, 104T215 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında bir yüksek lisans tez çalışması ile ortak olarak *PvLDH*'da saflaştırılmıştır. Şekil 4.3.'de Protokol 2 ile saflaştırılan *PvLDH* ve mutant *PvLDH* proteinlerinin bütün fraksiyonlarının aktivite değerleri gösterilmiştir. Protokol 2 ile proteinler elüsyon aşamasında aktif olarak saflaştırılmıştır.



Şekil 4.3. Saflaştırılmış *PvLDH* ve mutant proteinlerin saflaştırma fraksiyonlarının aktivite değerlerinin gösterilmesi. CL: Hücre lizati; FT1, FT2, FT3: Süzuntu 1, 2, 3; W1, W2, W3: Yıkama 1, 2, 3; E1-E11: Elüsyon 1-11

PvLDH proteinini saf ve aktif olarak elde edildikten sonra kinetik analizi yapılmıştır. *PvLDH* kullanılarak elde edilen kinetik sonuçlar bütün mutant proteinler için elde edilen sonuçların karşılaştırmalı yorumunda kullanılmıştır. *PvLDH*'ın Tablo 1.2.'de verilen farklı gruplar tarafından elde edilen kinetik değerleri [98, 111] yapmış olduğumuz çalışmada elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığı zaman bu değerlerin gruplar arasında değişkenlik gösterdiği görülmüştür. Dolayısıyla bu tez çalışmasında elde edilen mutant *PvLDH* proteinlerinin kinetik sonuçlarının yine yapmış olduğumuz çalışmada elde edilen yabancı tip enzimin (*PvLDH*) kinetik değerlerine göre yorumlanarak laboratuvar içi birliğin sağlanmasının doğru bir karar olduğu görülmüştür. *PvLDH* enziminin K_m değeri 37,8 μM , k_{cat} değeri ise 190 min^{-1} olarak bulunmuştur. Yapmış olduğumuz çalışmada *PvLDH*'ın konsantrasyon bağımlı bir değer olan k_{cat} değerinin düşük bulunmuş olmasının, protein miktarının daha düşük olarak elde edilmiş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu durum farklı protokoller ile elde ettiğimiz protein miktarındaki farklılıkları ve yapmış olduğumuz çok yoğun çalışmalarla saflaştırmanın neden optimize edildiğini de açıklamaktadır.

PvLDH'ın kinetik analizi yapıldıktan sonra mutant *PvLDH* proteinlerinin de analizi yapılarak *PvLDH*'a göre kinetik farklılıkları gösterilmiştir. Buna göre *PvLDH*'ın aktif bölge halkasının *Toxoplasma gondii* LDH1'dekine benzetilmesi için DKEWN pentapeptidinin sırasıyla DSEWN ve DSEWS olarak değiştirildiği *PvLM1Tg1* ve *PvLM2Tg1* mutant proteinlerinin K_m değerleri yükselirken k_{cat} değerleri düşmüştür (Tablo 4.2.). Bu değişiklik enzimin aktif bölgesinin pirüvata ulaşma kapasitesinin azaldığını ve pirüvata bağlanmasına rağmen enzim kataliz hızının düştüğünü göstermektedir. Aynı pentapeptid, *Eimeria tenella* LDH'ı model alınarak sırasıyla DQEWN ve DQEWS olarak değiştirildiği zaman *PvLM1Et* ve *PvLM2Et* mutant proteinlerinin K_m değerleri yükselmiştir. Ayrıca yapılan değişiklikler sonucunda *PvLM2Et* mutant proteininin k_{cat} değeri, *PvLM1Et* mutant proteininkine göre yabancı tip proteine (*PvLDH*) daha yakın bir değer ile sonuçlanmıştır (Tablo 4.2.). Bununla birlikte bu mutagenезler *Tg1LDH*'ın taklit edildiği mutagenезlerde olduğu gibi protein üzerinde çok çarpıcı bir değişiklik yapmamıştır. *PvLDH* enziminin aktif bölge halkasındaki DKEWN insersiyonunun *Theileria parva*'nın LDH enzimindeki pentapeptid model alınarak sırasıyla NKEWN ve NEEWN olarak değiştirildiği *PvLM1Tp* ve *PvLM2Tp* mutagenезlerinde ise diğer mutagenез çalışmalarından farklı olarak yapılan değişiklikler ile enzimin substratına ilgisi hemen hemen değişmeden kalmış ancak her iki enzimin de k_{cat} pirüvat değerleri arttığından

bu değişikliğin yapılması ile beraber enzimin katalitik aktivitesinde iyileşme gerçekleşmiştir (Tablo 4.2.). Dolayısıyla *Pv*LDH enzimi aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun kısılmasını tolere edemezken [178, 179] aynı bölgedeki aminoasit değişikliğini daha iyi tolere edebildiği görölmüşür. Yine aynı şekilde *Pf*LDH enzimi de aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun kısılmasını tolere edemezken [164] aynı bölgedeki aminoasit değişikliğini tolere ederek *Pv*LDH ile benzer sonuçlar vereceği düşünölmektedir. Çeşitli enzim inhibitörlerinin tutunması için önemli bir bölge olan *Pv*LDH'ın pentapeptid insersiyonunun diğer Apikompleksanlardan *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella* ve *Theileria parva* LDH'larındakine benzetilmesi *Pv*LDH'ın substratına ilgisini ve katalizleme hızını değiştirirken katalitik aktivitesini tamamen ortadan kaldırmamıştır. Bu yüzden bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre, *Pv*LDH'ın aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun oluşturduğu yarığa uyumlu bir inhibitör bulunması durumunda, aynı inhibitör diğer model Apikompleksanların LDH enzimleri için de kullanılabilecek ve böylece hem *Plasmodium*'lar hem de diğer Apikompleksanlar için ortak bir inhibitör geliştirmek mümkün olabilecektir. İnhibitör geliştirme ve ilaç tasarım çalışmaları için ortak hedef seçilen peptapeptid insersiyonu, *Plasmodium* ve diğer Apikompleksanların LDH'ını insan LDH'ından farklılaştırdığı için aynı zamanda etkili ve seçici bir inhibitör bulunmasını kolaylaştıracaktır.

Tablo 4.2. *Pv*LDH'ın aktif bölge halkası mutagenizlerinin Steady-State kinetik sabiteleri

Enzim	K_m (μ M)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)
<i>Pv</i> LDH	37.8	190	5.0×10^6
<i>Pv</i> LM1Tg1	63.9	112	1.8×10^6
<i>Pv</i> LM2Tg1	93.1	121	1.3×10^6
<i>Pv</i> LM1Et	86.3	122	1.4×10^6
<i>Pv</i> LM2Et	62.9	187	3.0×10^6
<i>Pv</i> LM1Tp	48.0	316	6.6×10^6
<i>Pv</i> LM2Tp	48.2	254	5.3×10^6

Plazmodiyal LDH'ın aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonuna benzer insersiyonlar, farklı plazmodiyal enzimlerde de bulunabilmektedir [180-182]. Proteinleri insandaki eşdeğerinden farklılaştıran böyle insersiyonlar plazmodiyal proteinlerin geniş bir kısmında ($\geq$ % 90) bulunmaktadır [183]. Plazmodiyal proteinlerin yanısıra diğer

Apikompleksan proteinlerinde de böyle insersiyonlar bulunmaktadır [184-186]. Bu insersiyonlara sahip proteinlerin belirlenmesi ve insersiyonlarının protein fonksiyonu için öneminin anlaşılması hedef moleküllerin sayısını genişletmek için önemlidir. Bununla beraber insersiyon dizisinin enzim için öneminin araştırıldığı bazı çalışmalar vardır. *Plasmodium falciparum*'daki glutatyon redüktaz enziminin insersiyon dizisinin mutasyonal delesyonu, insersiyonun enzimin stabilitesi ve katlanması için önemli olduğunu göstermiştir [187]. *Plasmodium berghei*'deki bifonksiyonel enzim glukoz-6-fosfat dehidrogenaz-6-fosfoglukonolaktonaz (G6PD-6PGL)'ın insersiyonundaki delesyon, enzimin 6PGL aktivitesini etkilemezken, G6PD domaininin inaktivasyonuna neden olmuştur. *P. berghei*'deki aynı insersiyonun *P. falciparum*'daki insersiyonla yer değiştirmesi ise 6PGL aktivitesini artırırken G6PD aktivitesini biraz düşürmüştür [188]. Yine *P. falciparum*'daki enolaz enziminin insersiyonunun delesyonu, bu insersiyonun enzimin katalitik aktivitesi için gerekli olduğunu gösterirken [189], *Toxoplasma gondii* enolaz enzimindeki benzer çalışma substrat affinitesinin azalması ile sonuçlanmıştır [190]. Dolayısıyla bu tez çalışmasında yapılan, *PvLDH* enziminin aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonunun analiz çalışmalarının önemi, benzer bütün çalışmalar tarafından desteklenmiştir.

PvLDH enziminin kofaktör bağlanma bölgesindeki Leu₁₆₃ aminoasidinin model Apikompleksanlardaki Met₁₆₃ aminoasidi ile değiştirildiği *PvL163M* proteini tez çalışmasının kofaktör bağlanma bölgesi mutagenезlerinden elde edilen tek aktif protein olmuştur. *PvL163M* enzimi aktivitesini korumasına rağmen substratına olan ilgisi yaklaşık olarak 5 kat azalmış ve katalitik hızı yarı yarıya düşmüştür. Ayrıca 20 mM pirüvat konsantrasyonunda çok az da olsa substrat inhibisyonu görülmüştür (Tablo 4.3.). Buna göre *PvLDH* diğer model Apikompleksanlardaki Met₁₆₃ aminoasidi yerine Leu₁₆₃ aminoasidi ile substratına daha etkin bir bağlanma sağlamak ve daha iyi bir katalitik aktivite göstermektedir. Bununla beraber *PvLDH* enziminin kofaktör bağlanma bölgesindeki Leu₁₆₃ aminoasidinin Ser₁₆₃ aminoasidi ile değiştirildiği *PvL163S* proteini aktivitesini kaybetmiştir (Tablo 4.3.). Yapılan bu değişiklik protein için önemli olup muhtemelen 163. pozisyonuna Leu aminoasidinden daha küçük yapıda ve aynı zamanda hidrofilik olan Ser aminoasidinin yerleşmesi proteinin aktivitesini gösterecek üç boyutlu yapıyı oluşturmasını engellemiştir. LDH enzimi için 163. pozisyonun önemi Ser₁₆₃Leu mutagenезi ile substrat inhibisyon özelliğini kaybeden insan LDH enziminin LDH-M ve LDH-H izomerlerinde ve *Bacillus stearothermophilus* LDH enzimlerinde de gösterilmiştir

[132, 133, 135]. Yine *Pf*LDH ile yapılan Leu163Ser mutagenез çalışmaları ile proteinin inaktif olduğu tespit edilmiştir [149]. İnsan LDH’ında, kofaktör NADH’ın nikotinamid halkasının karboksiamid yan zinciri, Ser₁₆₃’ün hidroksil grubu ile bir H₂O molekülü aracılığıyla hidrojen bağı yapmaktadır [128]. *Pf*LDH’da, büyük ve hidrofobik bir aminoasit olan Leu aminosidinin yapıya dahil olması, H₂O molekülünün bağlanma bölgesinin kaybına ve buna bağlı olarak konformasyonel değişime neden olduğundan Leu₁₆₃ aminoasidinin Ser₁₆₃ ile yer değiştirmesi hidrojen bağı oluşumunu imkânsız kılmaktadır. Bu durum kofaktör ve enzim arasındaki ilişkiyi azaltarak indirgenmiş substrat inhibisyonuna neden olmaktadır [144]. *Pv*LDH proteini ile yapılan aynı mutagenез çalışması ile elde edilen PvL163S mutant proteini de inaktif olarak eksprese edilmiş olup 163. pozisyondaki Leu aminoasidinin protein için önemli olduğu gösterilmiştir. İnsan LDH’ında aynı pozisyonda bulunan Ser aminoasidi *Pv*LDH’ın 163. pozisyonu için uygun bir aminoasit olmadığından protein PvL163S mutagenезi ile aktivitesini kaybetmiştir. Bu sonuçlara göre *Pv*LDH enziminin kofaktör bağlanma bölgesindeki Leu₁₆₃ aminoasidi enzimin aktivitesi ve indirgenmiş substrat inhibisyonu için önemlidir.

Tablo 4.3. *Pv*LDH’nin kofaktör bağlanma bölgesi mutagenезlerinin Steady-State kinetik sabiteleri

Enzim	K _m (μM)	k _{cat} (min ⁻¹)	k _{cat} /K _m (min ⁻¹ M ⁻¹)
<i>Pv</i> LDH	37.8	190	5.0x10 ⁶
PvL163M	179.2	97	5.4x10 ⁵
PvL163S	-	-	-

Sonuç olarak bu tez çalışmasında yapılan çalışmalar ile elde edilen sonuçlara göre *Pv*LDH enziminin aktif bölge halkası ve kofaktör bağlanma bölgesi yapıya dayalı ilaç tasarım çalışmaları için önemli bir hedeftir. Aktif bölge halkasındaki pentapeptid insersiyonu *Plasmodium*’lar arasında korunmuş olup bu bölge hedef alınarak *P. vivax* için geliştirilen bir inhibitörün diğer türler içinde kullanılması mümkün olabilir. Ayrıca aktif bölgedeki pentapeptid insersiyonu model Apikompleksanlardakine benzetildiği zaman *Pv*LDH enzimi yapılan değişikliği tolere edebilmektedir. Dolayısıyla bu sonuç, aktif bölge halkasının *Plasmodium*’larla birlikte Apikompleksanlar için de genel ilaç tasarım çalışmalarında hedef bölge olarak kullanılabileceğinin bir göstergesidir. Yine dehidrogenazlarda benzer yapıya sahip olan kofaktör bölgesinin iyi bir hedef olabileceği

genellikle düşünülmemesine rağmen [67, 98, 121] *PvLDH* enziminin 163. pozisyonunda yapılan mutagenез çalışmaları ile kofaktör bağlanma bölgesinin de yapıya dayalı ilaç tasarım çalışmaları için değerlendirilmesi gerektiği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] **Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M.A., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M., Barrell, B.,** 2002, Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Nature*, 419, 498-511.
- [2] <http://www.rbm.who.int>, 10 Aralık 2009.
- [3] **Aregawi, M., Cibulskis, R., Otten, M., Williams, R., Dye, C.,** 2008, *World Malaria Report 2008*. World Health Organization, 215p.
- [4] **Knell, A.J.,** 1991, *Malaria*. Oxford University Press, Oxford, 91p.
- [5] **Cox-Singh, J., Davis, T.M.E., Lee, K.S., Shamsul, S.S.G., Matusop, A., Ratnam, S., Rahman, H.A., Conway, D.J., Singh, B.,** 2008, *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening, *Clinical Infectious Diseases*, 46, 165-171.
- [6] **Cox-Singh, J., Singh, B.,** 2008, Knowlesi malaria: Newly emergent and of public health importance?, *Trends in Parasitology*, 24:9, 406-410.
- [7] **Darwin, K.,** 2002, *Malaria...at a glance*. Research Directions in Malaria, Wellcome News Supplement 6, The Wellcome Trust, 36p.
- [8] **Gilles, H.M., Warrel, D.A.,** 1993, *Bruce-Chwatt's Essential Malariology*. 3rd Edition, Edward Arnold, London, 340p.
- [9] **Unat, E.K., Yücel, A., Altaş, K., Samastı, M.,** 1995, *Unat'ın Tıp Parazitolojisi - İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları*. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları:15, İstanbul, 664s.
- [10] **Greenwood, B., Mutabingwa, T.,** 2002, Malaria in 2002, *Nature*, 415, 670-672.

- [11] **Winzeler, E.A.**, 2008, Malaria research in the post-genomic era, *Nature*, 455, 751-756.
- [12] **Vander-Jagt, D.L., Hunsaker, L.A., Heidrich, J.E.**, 1981, Partial purification and characterization of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 4, 255-264.
- [13] **Royer, R.E., Deck, L.M., Campos, N.M., Hunsaker, L.A., Vander Jagt, D.L.**, 1986, Biologically active derivatives of gossypol: Synthesis and antimalarial activities of peri-acylated gossylic nitriles, *Journal of Medicinal Chemistry*, 29, 1799-1801.
- [14] **Cameron, A., Read, J., Tranter, R., Winter, W.J., Sessions, R.B., Brady, R.L., Vivas, L., Easton, A., Kendrick, H., Croft, S.L., Barros, D., Lavandera, J.L., Martin, J.J., Risco, F., García-Ochoa, S., Gamó, F.J., Sanz, L., Leon, L., Ruiz, J.R., Gabarró, R., Mallo, A., Gómez de Las Heras, F.**, 2004, Identification and activity of a series of azole-based compounds with lactate dehydrogenase-directed anti-malarial activity, *The Journal of Biological Chemistry*, 279:30, 31429- 31439.
- [15] **Sherman, I.W.**, 1961, Molecular heterogeneity of lactic dehydrogenase in avian malaria (*Plasmodium lophurae*), *Journal of Experimental Medicine*, 114:6, 1049-1062.
- [16] **Makler, M.T., Hinrichs, D.J.**, 1993, Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48:2, 205-210.
- [17] **Deck, L.M., Vander-Jagt, D.L., Royer, R.E.**, 1991, Gossypol and derivatives: A new class of aldolase reductase inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*, 34, 3301-3305.
- [18] **Bzik, D.J., Fox, B.A., Gonyer, K.**, 1993, Expression of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase in *Escherichia coli*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 59, 155-166.
- [19] **Turgut-Balik, D., Holbrook, J.J.**, 2001, Determination of the DNA and amino acid sequences of the lactate dehydrogenase gene from *Plasmodium falciparum* strains K1 and PF FCBP: A route to the design of new antimalarials, *Turkish Journal of Biology*, 25, 241-250.

- [20] **Özçelik, S., Çeliksöz, A.,** 1999, *Sıtma, Malaria*. M. Ali Özcel (Editör), Türkiye Parazitoloji Derneği, İzmir, s. 13-34.
- [21] <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/malaria.htm>, 10 Aralık 2009.
- [22] **Kremsner, P.G., Krishna, S.,** 2004, Antimalarial combinations, *Lancet*, 364, 285-294.
- [23] **Ekland, E.H., Fidock, D.A.,** 2008, In vitro evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes, *International Journal for Parasitology*, 38, 743-747.
- [24] **Tracey, J., Webster, L.,** 1996, *Drugs Used in The Chemotherapy of Protozoal Infections*. Hardman, J., Molinoff, P., Rudon, R. and Gilman, A., (Editors). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Pergamon Press, New York, pp. 978–1017.
- [25] **Olliaro, P.,** 2001, Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs, *Pharmacology&Therapeutics*, 89, 207-219.
- [26] **Carlton, J.M-R., Hayton, K., Cravo, P.V.L., Walliker, D.,** 2001, Of mice and malaria mutants: Unravelling the genetics of drug resistance using rodent malaria models, *Trends in Parasitology*, 17:5, 236-242.
- [27] **Wongsrichanalai, C., Pickard, A.L., Wernsdorfer, W.H., Meshnick, S.R.,** 2002, Epidemiology of drug-resistant malaria, *The Lancet Infectious Diseases*, 2, 209-218.
- [28] **Hyde, J.E.,** 2005, Drug-resistant malaria, *Trends in Parasitology*, 21:11, 494-498.
- [29] **Meshnick, S.R.,** 2002, Artemisinin: Mechanisms of action, resistance and toxicity, *International Journal for Parasitology*, 32, 1655-1660.
- [30] **Ogbonna, A., Uneke, C.J.,** 2008, Artemisinin-based combination therapy for uncomplicated malaria in sub-saharan Africa: The efficiency, safety, resistance and policy implementation since Abuja 2000, *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102, 621-627.
- [31] **Inselburg, J.,** 1985, Induction and isolation of artemisinin-resistant mutants of *Plasmodium falciparum*, *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 34, 417-418.
- [32] **Peters, W., Robinson, B.L.,** 1999, The chemotherapy of rodent malaria, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 93, 325-339.

- [33] **Chretien, J.P., Fukuda, M., Noedl, H.,** 2007, Improving surveillance for antimalarial drug resistance, *JAMA*, 297, 2278-2281.
- [34] **Levine, N.D.,** 1988, Progress in taxonomy of the Apicomplexan Protozoa, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 35:4, 518-520.
- [35] **Kıyıldı, S.N.,** 2006, Afyon Bölgesi'ndeki anne ve yenidoğanlarda Toksoplazma antikör profilinin farklı yöntemlerle araştırılması, *Uzmanlık Tezi*, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 89s.
- [36] **Montoya, J.G., Liesenfeld, O.,** 2004, Toxoplasmosis, *Lancet*, 363, 1965-1976.
- [37] **Kijlstra, A., Jongert E.,** 2008, Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat, *International Journal for Parasitology*, 38, 1359-1370.
- [38] **Bayrak, N.,** 2004, Kars Yöresi'ndeki koyunlarda *Toxoplasma gondii*'nin seroprevalansı, *Yüksek Lisans Tezi*, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 58s.
- [39] **Vedadi, M., Lew, J., Artz, J., Amani, M., Zhao, Y., Dong, A., Wasney, G.A., Gao, M., Hills, T., Brokx, S., Qiu, W., Sharma, S., Diassiti, A., Alam, Z., Melone, M., Mulichak, A., Wernimont, A., Bray, J., Loppnau, P., Plotnikova, O., Newberry, K., Sundararajan, E., Houston, S., Walker, J., Tempel, W., Bochkarev, A., Kozieradzki, I., Edwards, A., Arrowsmith, C., Roos, D., Kain, K., Hui, R.,** 2007, Genome-scale protein expression and structural biology of *Plasmodium falciparum* and related Apicomplexan organisms, *Molecular&Biochemical Parasitology*, 151, 100-110.
- [40] **Dubey, J.P.,** 2008, The history of *Toxoplasma gondii*-The first 100 years, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55:6, 467-475.
- [41] **Al-Anouti, F., Tomavo, S., Parmley, S., Ananvoranich, S.,** 2004, The expression of lactate dehydrogenase is important for the cell cycle of *Toxoplasma gondii*, *The Journal of Biological Chemistry*, 279:50, 52300-52311.
- [42] **Luft, B.J., Remington, J.S.,** 1992, Toxoplasmic encephalitis in AIDS, *Clinical Infectious Diseases*, 15, 211-222.
- [43] **Israelski, D.M., Remington, J.S.,** 1993, Toxoplasmosis in patients with cancer, *Clinical Infectious Diseases*, 17, 423-435.

- [44] **Serin, İ.S.**, 2006, Etlik civcivlerde koksidiyoz kontrolünde bitkisel ekstraktların kullanım olanakları, *Doktora Tezi*, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 92s.
- [45] **Shirley, M.W.**, 2000, The genome of *Eimeria* spp., with special reference to *Eimeria tenella*-a coccidium from the chicken, *International Journal for Parasitology*, 30, 485-493.
- [46] **Dalloul, R.A., Bliss, T.W., Hong, Y.H., Ben-Chouikha, I., Park, D.W., Keeler, C.L., Lillehoj, H.S.**, 2007, Unique responses of the avian macrophage to different species of *Eimeria*, *Molecular Immunology*, 44, 558-566.
- [47] **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.
- [48] **Altay, K., Aktaş, M.**, 2004, Sığır Theileriosis, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 18:2, 79-86.
- [49] **Saruhan, B.**, 2007, Theileriosisli sığırlarda buparvaquone (Buparvon)'un terapötik etkinliği, *Yüksek Lisans Tezi*, Adnan Menders Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 68s.
- [50] **Kiama, T.N., Kiara, J.K., Konji, V.N., Musoke, A.J.**, 1999, Enzymes of glucose and glycerol catabolism in *in vitro*-propagated *Theileria parva* schizonts, *The Veterinary Journal*, 158, 221-227.
- [51] **Nene, V., Morzaria, S., Bishop, R.**, 1998, Organisation and informational content of the *Theileria parva* genome, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 95, 1-8.
- [52] **Nene, V., Bishop, R., Morzaria, S., Gardner, M.J., Sugimoto, C., Ole-MoiYoi, O.K., Fraser, C.M., Irvin, A.**, 2000, *Theileria parva* genomics reveals

- an atypical Apicomplexan genome, *International Journal for Parasitology*, 30, 465-474.
- [53] **Holbrook, J.J., Liljas, A., Steindel, S.J., Rossman, M.G.**, 1975, *The Enzymes*. Paul D. Boyer (Editor), Vol. XI, Part A, Third Edition, Academic Press, New York, pp. 191-292.
 - [54] **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 dehydrogenases A₄, B₄, and C₄, *Biochemical Pharmacology*, 62:1, 81-89.
 - [55] **Price, N.C., Stevens, L.**, 1989, *Fundamentals of Enzymology*. Second Edition, Oxford University Press, New York, 470p.
 - [56] **Markert, C.L., Möller, F.**, 1959, Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic, and species specific patterns, *PNAS*, 45:5, 753-763.
 - [57] **Fersht, A.**, 1985, *Structures and Mechanisms of Selected Enzymes*. W.H. Freeman and Company, New York, 400p.
 - [58] **Musick, W.D.I., Rossmann, M.G.**, 1979, The tentative amino acid sequencing of lactate dehydrogenase C₄ by X-ray diffraction analysis, *The Journal of Biological Chemistry*, 254:16, 7621-7623.
 - [59] **Birktoft, J.J., Banaszak, L.J.**, 1983, The presence of a histidine-aspartic acid pair in the active site of 2-hydroxyacid dehydrogenases, *The Journal of Biological Chemistry*, 258:1, 472-482.
 - [60] **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.
 - [61] **Bellamacina, C.R.**, 1996, The nicotinamide dinucleotide binding motif: A comparison of nucleotide binding proteins, *FASEB Journal*, 10:11, 1257-1269.
 - [62] **Kutzenko, A.S., Lamzin, V.S., Popov, V.O.**, 1998, Conserved super secondary structural motif in NAD-dependent dehydrogenases, *FEBS Letters*, 423:1, 105-109.
 - [63] **Exequiel, J.R., Pineda, T., Callender, R., Schwartz, S.D.**, 2007, Ligand binding and protein dynamics in lactate dehydrogenase, *Biophysical Journal*, 93:5, 1474-1483.

- [64] **Clarke, A.R., Atkinson, T., Holbrook, J.J.,** 1989, From analysis to synthesis: New ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part I, *TIBS*, 14:3, 101-105.
- [65] **Qiu, L, Gulotta, M., Callender, R.,** 2007, Lactate dehydrogenase undergoes a substantial structural change to bind its substrate, *Biophysical Journal*, 93:5, 1677-1686.
- [66] **McClendon, S., Zhadin, N., Callender, R.,** 2005, The approach to the Michaelis complex in lactate dehydrogenase: The substrate binding pathway, *Biophysical Journal*, 89:3, 2024-2032.
- [67] **Deck, L.M., Royer, R.E., Chamblee, B.B., Hernandez, V.M., Malone, R.R., Torres, J.E., Hunsaker, L.A., Piper, R.C., Makler, M.T., Vander Jagt, D.L.,** 1998, Selective inhibitors of human lactate dehydrogenases and lactate dehydrogenase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 41, 3879-3887.
- [68] **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.
- [69] **Wigley, D.B., Gamblin, S.J., Turkenburg, J.P., Dodson, E.J., Piontek, K., Muirhead, H., Holbrook, J.J.,** 1992, Structure of a ternary complex of an allosteric lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 2,5 Å resolution, *Journal of Molecular Biology*, 223, 317-335.
- [70] **Bur, D., Clarke, T., Friesen J.D., Gold, M., Hart, K.W., Holbrook, J.J., Jones, J.B., Luyten, M.A., Wilks, H.M.,** 1989, On the effect on specificity of Thr246→Gly mutation in L-lactate dehydrogenase of *Bacillus stearothermophilus*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 161:1, 59-63.
- [71] **Deng, H., Zheng, J., Clarke, A., Holbrook, J.J., Callender, R., Burgner II, J.W.,** 1994, Source of catalysis in the lactate dehydrogenase system. Ground-state interactions in the enzyme-substrate complex, *Biochemistry*, 33, 2297-2305.
- [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 residue in lactate dehydrogenase catalysis, *Nature*, 324:18/25, 699-702.

- [73] **Clarke, A.R., Wilks, H.M., Barstow, D.A., Atkinson, T., Chia, W.N., Holbrook, J.J.**, 1988, An investigation of the contribution made by the carboxylate group of an active site histidine-aspartate couple to binding and catalysis in lactate dehydrogenase, *Biochemistry*, 27, 1617-1622.
- [74] **Shoemark, D.K.**, 2000, The kinetic characterization of the lactate dehydrogenase enzyme from *Plasmodium falciparum*, *Doctor of Philosophy Thesis*, Department of Biochemistry University of Bristol, UK, 196p.
- [75] **Hart, K.W., Clarke, A.R., Wigley, D.B., Waldman, A.D.B., Chia, W.N., Barstow, D.A., Atkinson, T., Jones, J.B., Holbrook, J.J.**, 1987, A strong carboxylate-arginine interaction is important in substrate orientation and recognition in lactate dehydrogenase, *Biochimica et Biophysica Acta*, 914, 294-298.
- [76] **Kavanagh, K.L., Elling, R.A., Wilson D.K.**, 2004, Structure of *Toxoplasma gondii* LDH1: Active-site differences from human lactate dehydrogenases and the structural basis for efficient APAD⁺ use, *Biochemistry*, 43, 879-889.
- [77] **Cortes, A., Emery, D.C., Halsall, D.J., Jackson, R.M., Clarke, A.R. and Holbrook, J.J.**, 1992, Charge balance in the α -Hydroxyacid dehydrogenase vacuole: An acid test, *Protein Science*, 1, 892-901.
- [78] **Holbrook, J.J., Stinson, R.A.**, 1973, The use of ternary complexes to study ionizations and isomerizations during catalysis by lactate dehydrogenase, *Biochemical Journal*, 131, 739-748.
- [79] **Adams, M.J, Ford, G.C., Koekkoek, R., Lentz, P.J., Jr, McPherson, A., Jr, Rossmann, M.G., Smiley, I.E., Schevitz, R.W., Wonacott, A.J.**, 1970, Structure of lactate dehydrogenase at 2.8 Å resolution, *Nature*, 227, 1098-1103.
- [80] **Hill, E., Tsernoglou, D., Webb, L., Banaszak, L.J.**, 1972, Polypeptide conformation of cytoplasmic malate dehydrogenase from an electron density map at 3.0 Å resolution, *Journal of Molecular Biology*, 72:3, 577-580.
- [81] **Brändén, C.-I., Eklund, H., Nordström, B., Boiwe, T., Söderlund, G., Zeppazauer, E., Ohlsson, I., Åkeson, Å.**, 1973, Structure of liver

- alcohol dehydrogenase at 2.9-Å resolution, *PNAS, USA*, 70:8, 2439-2442.
- [82] **Buehner, M., Ford, G.C., Moras, D., Olsen, K.W., Rossmann, M.G.**, 1973, D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Three-dimensional structure and evolutionary significance, *PNAS, USA*, 70:11, 3052-3054.
 - [83] **Rossmann, M.G., Moras, D., Olsen, K.W.**, 1974, Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein, *Nature*, 250, 194-199.
 - [84] **Rao, S.T., Rossmann, M.G.**, 1973, Comparison of super-secondary structures in proteins, *Journal of Molecular Biology*, 76, 241-250.
 - [85] **Wierenga, R.K., De Maeyer, M.R.C., Hol, W.G.J.**, 1985, Interaction of pyrophosphate moieties with α -helices in dinucleotide binding proteins, *Biochemistry*, 24, 1346- 1357.
 - [86] **Lesk, A.M.**, 1995, NAD-binding domains of dehydrogenases, *Current Opinon in Structural Biology*, 5, 775-783.
 - [87] **Brown, W.M., Metzger IV, L.E., Barlow, J.P., Hunsaker, L.A., Deck, L.M., Royer, R.E., Vander Jagt D.L.**, 2003, 17- β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: Computational design of active site inhibitors targeted to the Rossmann fold, *Chemico-Biological Interactions*, 143-144, 481-491.
 - [88] <http://images.wellcome.ac.uk>, 10 Aralık 2009.
 - [89] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 10 Aralık 2009.
 - [90] **Turgut, D.**, 1998, Overproduction of the active lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* opens a route to obtain new antimalarials, *Doctor of Philosophy Thesis*, Department of Biochemistry University of Bristol, UK, 217p.
 - [91] **Patel, A.P., Staines, H.M., Krishna, S.**, 2008, New antimalarial targets: The example of glucose transport, *Travel Medicine and Infectious Disease*, 6, 58-66.
 - [92] **Sherman, I.W.**, 1979, Biochemistry of *Plasmodium* (Malarial Parasites), *Microbiological Reviews*, 43:4, 453-495.
 - [93] **Trager, W.**, 1986, *Metabolism: Energy Sources: Respiration, in Living Together-The Biology of Animal Parasitism*. Plenum Press, New York, 169p.

- [94] **Florens, L., Washburn, M.P., Raine, J.D., Anthony, R.M., Grainger, M., Haynes, J.D., Moch, J.K., Muster, N., Saccl, J.B., Tabb, D.L., Witney, A.A., Wolters, D., Wu, Y., Gardner, M.J., Holder, A.A., Sinden, R.E., Yates, J.R., Caruccl, D.J., 2002,** A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle, *Nature*, 419, 520-526.
- [95] **Roth, E.F., JR, Calvin, M.C., Max-Audit, I., Rosa, J., Rosa, R., 1988,** The enzymes of the glycolytic pathway in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites, *Blood*, 72:6, 1922-1925.
- [96] **Roth, E.F., Jr, 1987,** Malarial parasite hexokinase and hexokinase-dependent glutathione reduction in the *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocyte, *The Journal of Biological Chemistry*, 262:32, 15678-15682.
- [97] **Roth, E.F., Jr, Raventos-Suarez, C., Perkins, M., Nagel, R.L., 1982,** Glutathione stability and oxidative stres in *P. falciparum* infection in vitro: Responses of normal and G6PD deficient cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 109:2, 355-362.
- [98] **Brown, W.M., Yowell, C.A., Hoard, A., Vander Jagt, T.A., Hunsaker, L.A., Deck, L.M., Royer, R.E., Piper, R.C., Dame, J.B., Makler, M.T., Vander Jagt, D.L., 2004,** Comparative structural analysis and kinetic properties of lactate dehydrogenases from the four species of human malarial parasites, *Biochemistry*, 43, 6219- 6229.
- [99] **Klenerman, P., Dickson, H., 1992,** Plasma lactate dehydrogenase estimation in the diagnosis of malaria, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 86, 563-565.
- [100] **Certa, U., Ghera, P., Dobeli, H., Matile, H., Kocher, H.P., Shrivastava, I.K., Shaw, A.R., Perrin, L.H., 1988,** Aldolase activity of a *Plasmodium falciparum* protein with protective properties, *Science*, 240:4855, 1036-1038.
- [101] **Cloonan, N., Fischer, K., Cheng, Q., Saul, A., 2001,** Aldolase genes of *Plasmodium* species, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 113, 327-330.

- [102] **Kim, H., Certa, U., Döbeli, H., Jakob, P., Hol W.G.,** 1998, Crystal structure of fructose-1,6-biphosphate aldolase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Biochemistry*, 37:13, 4388-4396.
- [103] **Ranie, J., Kumar, V.P., Balaram, H.,** 1993, Cloning of the triosephosphate isomerase gene of *Plasmodium falciparum* and expression in *Escherichia coli*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 61:2, 159-169.
- [104] **Velanker, S.S., Ray, S.S., Gokhale, R.S., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P., Murthy, M.R.,** 1997, Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design, *Structure*, 5:6, 751-761.
- [105] **Hicks, K.E., Read, M., Holloway, S.P., Sims, P.F., Hyde, J.E.,** 1991, Glycolytic pathway of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: primary sequence analysis of the gene encoding 3-phosphoglycerate kinase and chromosomal mapping studies, *Gene*, 100, 123-129.
- [106] **Chattoadhyay, D., Pal, B., Smith, C.D.,** 2002, Crystal structure of phosphoglycerate kinase from *Plasmodium falciparum*, In the open conformation deposited in PDB (PDB ID: 1LTK).
- [107] **Wernimont, A.K., Tempel, W., Lam, A., Zhao, Y., Lew, J., Lin, Y.H., Wasney, G., Vedadi, M., Kozieradzki, I., Cossar, D., Schapira, M., Weigelt, J., Arrowsmith, C.H., Bochkarev, A., Edwards, A.M., Hui, R., Pizarro, J., Hills, T.,** 2008, Crystal structure of phosphoglycerate mutase from *Plasmodium falciparum* deposited in PDB (PDB ID: 3EOZ).
- [108] **Turgut-Balik, D., Shoemark, D.K., Moreton, K.M., Sessions, R.B., Holbrook, J.J.,** 2001, Over-production of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* opens route to new antimalarials, *Biotechnology Letters*, 23, 917-921.
- [109] **Dunn, C.R., Banfield, M.J., Barker, J.J., Higham, C.W., Moreton, K.M., Turgut-Balik, D., Brady, R.L., Holbrook, J.J.,** 1996, The structure of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* reveals a new target for anti-malarial design, *Nature Structural Biology*, 3:11, 912-915.

- [110] **Turgut-Balik, D., Akbulut, E., Shoemark, D.K., Celik, V., Moreton, K.M., Sessions, R.B., Holbrook, J.J., Brady, R.L.,** 2004, Cloning, sequence and expression of the lactate dehydrogenase gene from the human malaria parasite, *Plasmodium vivax*, *Biotechnology Letters*, 26, 1051-1055.
- [111] **Chaikuad, A., Fairweather, V., Conners, R., Joseph-Horne, T., Turgut-Balik, D., Brady, R.L.,** 2005, Structure of lactate dehydrogenase from *Plasmodium vivax*: Complexes with NADH and APADH, *Biochemistry*, 44:49, 16221-16228.
- [112] **Brady, R.L., Cameron, A.,** 2004, Structure-based approaches to the development of novel anti-malarials, *Current Drug Targets*, 5, 137-149.
- [113] **Winter, V.J., Cameron, A., Tranter, R., Sessions, R.B., Brady, R.L.,** 2003, Crystal structure of *Plasmodium berghei* lactate dehydrogenase indicates the unique structural differences of these enzymes are shared across the *Plasmodium* genus, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 131, 1, 1-10.
- [114] **Tanabe, K., Sakihama, N., Hattori, T., Ranford-Cartwright, L., Goldman, I., Escelante, A.A., Lal, A.A.,** 2004, Genetic distance in housekeeping genes between *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium reichenowi* and within *P. falciparum*, *Journal of Molecular Evolution*, 59:5, 687-694.
- [115] **Couto, A., Silveira, H.,** 2004, *Plasmodium yoelii nigeriensis* lactate dehydrogenase mRNA, partial cds. deposited in EMBL/DDBJ/GenBank Accession Number: AY533032.
- [116] **Pain, A., Bohme, U., Berry, A.E., Mungall, K., Finn, R.D., Jackson, A.P., Mourier, T., Mistry, J., Pasini, E.M., Aslett, M.A., Balasubramaniam, S., Borgwardt, K., Brooks, K., Carret, C., Carver, T.J., Cherevach, I., Chillingworth, T., Clark, T.G., Galinski, M.R., Hall, N., Harper, D., Harris, D., Hauser, H., Ivens, A., Janssen, C.S., Keane, T., Larke, N., Lapp, S., Marti, M., Moule, S., Meyer, I.M., Ormond, D., Peters, N., Sanders, M., Sanders, S., Sargeant, T.J., Simmonds, M., Smith, F., Squares, R., Thurston, S., Tivey, A.R., Walker, D., White, B., Zuiderwijk, E., Churcher, C.,**

- Quail, M.A., Cowman, A.F., Turner, C.M., Rajandream, M.A., Kocken, C.H., Thomas, A.W., Newbold, C.I., Barrell, B.G., Berriman, M., 2008, The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*, *Nature*, 455, 799-804.
- [117] Carlton, J.M., Angiuoli, S.V., Suh, B.B., Kooij, T.W., Pertea, M., Silva, J.C., Ermolaeva, M.D., Allen, J.E., Selengut, J.D., Koo, H.L., Peterson, J.D., Pop, M., Kosack, D.S., Shumway, M.F., Bidwell, S.L., Shalom, S.J., van Aken, S.E., Riedmuller, S.B., Feldblyum, T.V., Cho, J.K., Quackenbush, J., Sedegah, M., Shoaibi, A., Cummings, L.M., Florens, L., Yates, J.R., Raine, J.D., Sinden, R.E., Harris, M.A., Cunningham, D.A., Preiser, P.R., Bergman, L.W., Vaidya, A.B., van Lin, L.H., Janse, C.J., Waters, A.P., Smith, H.O., White, O.R., Salzberg, S.L., Venter, J.C., Fraser, C.M., Hoffman, S.L., Gardner, M.J., Carucci, D.J., 2002, Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*, *Nature*, 419, 512-519.
- [118] Tsujibo, H., Tiano, H.F., S.-L.Li, S., 1985, Nucleotide sequences of the cDNA and an intronless pseudogene for human lactate dehydrogenase-A isozyme, *European Journal of Biochemistry*, 147, 9-15.
- [119] Sakai, I., Sharief, F.S., Pan, Y.-C.E., S.-L.Li, S., 1987, The cDNA and protein sequences of human lactate dehydrogenase B, *Biochemical Journal*, 248, 933-936.
- [120] Yang, S., Parmley, S.F., 1997, *Toxoplasma gondii* expresses two distinct lactate dehydrogenase homologous genes during its life cycle in intermediate hosts, *Gene*, 184, 1-12.
- [121] Dando, C., Schroeder, E.R., Hunsaker, L.A., Deck, L.M., Royer, R.E., Zhou, X., Parmley, S.F., Vander Jagt, D.L., 2001, The kinetic properties and sensitivities to inhibitors of lactate dehydrogenases (LDH1 and LDH2) from *Toxoplasma gondii*: Comparisons with pLDH from *Plasmodium falciparum*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 118, 23-32.
- [122] Schaap, D., Arts, G., Kroze, J., Niessen, R., Roosmalen-Vos, S.V., Spreeuwenberg, K., Kuiper, C.M., Beek-Verhoeven, N.V.D., Kok, J.J., Knegt, R.M.A., Vermeulen, A.N., 2004, An *Eimeria* vaccine

- candidate appears to be lactate dehydrogenase; Characterization and comparative analysis, *Parasitology*, 128, 603-616.
- [123] **Shirley, M.W.**, 1975, Enzyme variation in *Eimeria* species of the chicken, *Parasitology*, 71:3, 369-376.
- [124] **Shirley, M.W., Chapman, H.D., Kucera, J., Jeffers, T.K., Bedrnir, P.**, 1989, Enzyme variation and pathogenicity of recent field isolates of *Eimeria tenella*, *Research in Veterinary Science*, 46:1, 79-83.
- [125] **Allsopp, B.A., Gibson, W.C., Stag, D.A.**, 1985, Characterisation of some East African *Theileria* species isolates by isoenzyme analysis with particular reference to *T. parva*, *International Journal for Parasitology*, 15, 271-276.
- [126] **Goddeeris, B.M., Dunlap, S., Innes, E.A., McKeever, D.J.**, 1991, A simple and efficient method for purifying and quantifying schizonts from *Theileria parva*-infected cells, *Parasitology Research*, 77, 482-484.
- [127] **Dunn, C.R., Wilks, H.M., Halsal, D.J., Atkinson, T., Clarke, A.R., Muirhead, H., Holbrook, J.J.**, 1991, Design and synthesis of new enzymes based on the lactate dehydrogenase framework, *Philosophical Transactions of The Royal Society London B*, 332, 177-184.
- [128] **Read, J.A., Winter, V.J., Eszes, C.M., Sesiions, R.B., Brady, R.L.**, 2001, Structural basis for altered activity of M- and H-Isozyme forms of human lactate dehydrogenase, *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 43, 175-185.
- [129] **Fromm, H.J.**, 1961, Evidence for ternary-complex formation with rabbit-muscle lactic acid dehydrogenase, diphosphopyridine nucleotide and pyruvic acid, *Biochimica et Biophysica Acta*, 52, 199-200.
- [130] **Gutfreund, H., Cantwell, R., McMurray, C.H., Criddle, R.S., Hathaway, G.**, 1968, The kinetics of the reversible inhibition of heart lactate dehydrogenase through the formation of the enzyme-oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide-pyruvate compound, *Biochemical Journal*, 1968:106, 683-687.
- [131] **Coulson, C.J., Rabin, B.R.**, 1969, Inhibition of lactate dehydrogenase by high concentrations of pyruvate: The nature and removal of the inhibitor, *FEBS Letters*, 3:5, 333-337.

- [132] **Eszes, C.M., Sessions, R.B., Clarke, A.R., Moreton, K.M., Holbrook, J.J.,** 1996, Removal of substrate inhibition in a lactate dehydrogenase from human muscle by a single residue change, *FEBS Letters*, 399, 193-197.
- [133] **Hewitt, C.O., Eszes, C.M., Sessions, R.B., Moreton, K.M., Dafforn, T.R., Takei, J., Dempsey, C.E., Clarke, A.R., Holbrook, J.J.,** 1999, A general method for relieving substrate inhibition in lactate dehydrogenases, *Protein Engineering*, 12:6, 491-496.
- [134] **Shoemark, D.K., Cliff, M.J., Sessions, R.B., Clarke, A.R.,** 2007, Enzymatic properties of the lactate dehydrogenase enzyme from *Plasmodium falciparum*, *FEBS Journal*, 274, 2738-2748.
- [135] **Hewitt, C.O., Sessions, R.B., Dafforn, T.R., Holbrook, J.J.,** 1997, Protein engineering tests of a homology model of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase, *Protein Engineering*, 10:1, 39-44.
- [136] **Gomez, M.S., Piper, R.C., Hunsaker, L.A., Royer, R.E., Deck, L.M., Makler, M.T., Vander Jagt, D.L.,** 1997, Substrate and cofactor specificity and selective inhibition of lactate dehydrogenase from the malarial parasite *P. falciparum*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 90, 235-246.
- [137] **Wilks, H.M., Moreton, K.M., Halsall, D.J., Hart, K.W., Sessions, R.B., Clarke, A.R., Hobbrook, J.J.,** 1992, Design of a specific phenyllactate dehydrogenase by peptide loop exchange on the *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase framework, *Biochemistry*, 31, 7802-7806.
- [138] **Berwal, R., Gopalan, N., Kshitij, C., Prasad, G.B.K.S., Prakash, S.,** 2008, *Plasmodium falciparum*: Enhanced soluble expression, purification and biochemical characterization of lactate dehydrogenase, *Experimental Parasitology*, 120, 135-141.
- [139] **Makler, M.T., Ries, J.M., Williams, J.A., Bancroft, J.E., Piper, R.C., Gibbins, B.L., Hinrichs, D.J.,** 1993, Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48:6, 739-741.
- [140] **Fairweather, V., Schwarzenbacher, R., Brady, L.,** 2008, *Eimeria tenella* lactate dehydrogenase as a target for anti-parasitics, *Acta Crystallographica Section A Foundations of Crystallography*, Volume 64, Supplement

- (August), P04.15.356, p. C342, *Abstracts of the XXI IUCr Congress*, Osaka, Japan, 23-31 August 2008.
- [141] **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 and Biochemical Parasitology*, 136, 165-172.
 - [142] **Connors, R., Schambach, F., Read, J., Cameron, A., Sessions, R.B., Vivas, L., Easton, A., Croft, S.L., Brady, R.L.,** 2005, Mapping the binding site for gossypol-like inhibitors of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 142, 137-148.
 - [143] **Razakantoanina, V., Phung, N.K.P., Jaureguiberry, G.,** 2000, Antimalarial activity of new gossypol derivatives, *Parasitology Research*, 86, 665-668.
 - [144] **Sessions, R.B., Dewar, V., Clarke, A.R., Holbrook, J.J.,** 1997, A model of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase and its implications for the design of improved antimalarials and the enhanced detection of parasitaemia, *Protein Engineering*, 10:4, 301-306.
 - [145] **Menting, J.G.T., Tilley, L., Deady, L.W., Ng, K., Simpson, R.J., Cowman, A.F., Foley, M.,** 1997, The antimalarial drug, chloroquine, interacts with lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 88, 215-224.
 - [146] **Read, J.A., Wilkinson, K.W., Tranter, R., Sessions, R.B., Brady, R.L.,** 1999, Chloroquine binds in the cofactor binding site of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase, *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 10213-10218.
 - [147] **Choi, S.R., Beler, A.B., Pradhan, A., Watkins, E.B., Rimoldi, J.M., Tekwani, B., Avery, M.A.,** 2007, Generation of oxamic acid libraries: Antimalarials and inhibitors of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase, *Journal of Combinatorial Chemistry*, 9:2, 292-300.
 - [148] **Senkovich, O., Speed, H., Grigorian, A., Bradley, K., Ramarao, C.S., Lane, B., Zhu, G., Chattopadhyay, D.,** 2005, Crystalization of three key

glycolytic enzymes of the opportunistic pathogen *Cryptosporidium parvum*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1750, 166-172.

- [149] **Turgut-Balik, D., Shoemark, D.K., Sessions, R.B., Moreton, K.M., Holbrook, J.J.**, 2001, Mutagenic exploration of the active site of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*, *Biotechnology Letters*, 23, 923-927.
- [150] <http://www.mwg-biotech.com>, 10 Aralık 2009.
- [151] <http://www.iontek.com.tr>, 10 Aralık 2009.
- [152] QIAGEN, QIAprep[®] Miniprep Handbook, 2006, Cat. No: 27104-27106, Germany, 54p.
- [153] QIAGEN, QIAquick[®] Spin Handbook, 2006, Cat. No: 28704-28706, Germany, 44p.
- [154] **Sambrook, J., Russell, D.W.**, 2001, *Molecular Cloning A Laboratory Manual I-II-III*, Third Edition, CSHL Press, New York.
- [155] **Rand, K.N.**, 1996, Crystal violet can be used to visualize DNA bands during gel electrophoresis and to improve cloning efficiency, *Elsevier Trends Tecnicl Tips Online*, T40022.
- [156] **Turgut-Balik, D., Celik, V., Moreton, K., Brady, L.**, 2005, Overcoming cloning problems by staining agarose gels with crystal violet instead of ethidium bromide in lactate dehydrogenase gene from *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*, *Acta Biologica Hungarica*, 56:3-4, 389-397.
- [157] **Laemmli, U.K.**, 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227:5259, 680-685.
- [158] <http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm>, 10 Aralık 2009.
- [159] QIAGEN, Ni-NTA Spin Kit Handbook, 2008, Cat. No: 31314, Germany, 36p.
- [160] QIAGEN, The QIAexpressionist[™] A Handbook for High-Level Expression and Purification of 6xHis-Tagged Proteins, 2003, Cat. No: 31314, Germany, 128p.
- [161] <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html>, 10 Aralık 2009.
- [162] **Nelson, D.L., Cox, M.M.**, 2005, *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. Üçüncü Baskıdan Çeviri, Prof. Dr. Nedret Kılıç (Editör), Palme Yayıncılık, Ankara, 1152s.

- [163] **Leatherbarrow, R.J.**, 1992, Grafit, Version 3.0. Eritcrasus Software Ltd., Staines, UK.
- [164] **Celik, V.**, 2004, *Plasmodium falciparum*'da laktat dehidrogenaz enziminin aktif bölge halkası aminoasitlerinin site-directed mutagenез çalışmaları ile analizi, *Yüksek Lisans Tezi*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 53s.
- [165] **Aslan, A., Çelik, V., Turgut-Balık, D.**, 2005, IPTG indüklemesinin yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmalarında kullanılmak üzere *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan geninin ifadesi üzerine etkisi, *Türk Biyokimya Dergisi*, 30:1, 30-31. (19. Ulusal Biyokimya Kongresi, 22- 25 Nisan 2005, Antalya).
- [166] **Aslan, A.**, 2006, *Plasmodium vivax*'ın laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan genin ifade edilerek ilgili proteinin saflaştırılması ve analizlerinin yapılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 50s.
- [167] **Celik, V., Sadak, D., Turgut-Balik, D.**, 2006, Immunological analysis of active site loop of lactate dehydrogenase from two *Plasmodium* species, *FEBS Journal*, 273, Suppl. 1, PP749, p. 279. (FEBS Young Scientists Forum 22-24 June, 2006, 31st FEBS Congress Molecules in Health& Disease, 24-29 June 2006, Istanbul, Turkey).
- [168] **Mutlu, Ö.**, 2009, *Plasmodium vivax* yabanıl tip laktat dehidrogenaz enziminin saflaştırmasının optimizasyonu ve yabanıl tip ile mutant enzimlerinin kinetik analizlerinin yapılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 103s.
- [169] **Shoemark, D.K.**, 2009. Kişisel görüşme.
- [170] **Baneyx, F., Mujacic, M.**, 2004, Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*, *Nature Biotechnology*, 22:11, 1399-1408.
- [171] **Saïdani, N., Grando, D., Valadié, H., Bastien O., Maréchal, E.**, 2009, Potential and limits of *in silico* target discovery-case study of the search for new antimalarial chemotherapeutic targets, *Infection, Genetics and Evolution*, 9, 359-367.
- [172] **Constantinoiu, C.C., Lillehoj, H.S., Matsubayashi, M., Hosoda, Y., Tani, H., Matsuda, H., Sasai, K., Baba, E.**, 2003, Analysis of cross-reactivity of five new chicken monoclonal antibodies which recognize the apical

- complex of *Eimeria* using confocal laser immunofluorescence assay, *Veterinary Parasitology*, 118, 29-35.
- [173] **Sasai, K., Lillehoj, H.S., Hemphill, A., Matsuda, H., Hanioka, Y., Fukata, T., Baba, E., Arakawa, A.**, 1998, A chicken anti-conoid monoclonal antibody identifies a common epitope which is present on motile stages of *Eimeria*, *Neospora*, and *Toxoplasma*, *The Journal of Parasitology*, 84:3, 654-656.
- [174] **Matsubayashi, M., Kimata, I., Iseki, M., Lillehoj, H.S., Matsuda, H., Nakanishi, T., Tani, H., Sasai, K., Baba, E.**, 2005, Cross-reactivity with *Cryptosporidium* spp. by chicken monoclonal antibodies that recognize avian *Eimeria* spp., *Veterinary Parasitology*, 128, 47-57.
- [175] **Hurdayal, R., Achilonu, I., Choveaux, D., Coetzer, T.H.T., Goldring, J.P.D.**, 2010, Anti-peptide antibodies differentiate between plasmodial lactate dehydrogenases, *Peptides*, 31, 525-532.
- [176] **Fogg, C., Twesigye, R., Batwala, V., Piola, P., Nabasumba, C., Kiguli, J., Mutebi, F., Hook, C., Guillerm, M., Moody, A., Guthmann, J.P.**, 2008, Assessment of three new parasite lactate dehydrogenase (pan-pLDH) tests for diagnosis of uncomplicated malaria, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102, 25-31.
- [177] **Piper, R., Ebras, J., Wentworth, L., Cooke, A.H., Houze, S., Chiodini, P., Makler, M.**, 1999, Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydroenase (pLDH), *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60, 109-118.
- [178] **Sadak, D., Celik, V., Turgut-Balik, D.**, 2006, Insertion of five aminoacids in the active site loop is essential for the stability of PvLDH protein, *FEBS Journal*, 273, Suppl. 1, PP753, p. 280. (*FEBS Young Scientists Forum* 22-24 June, 2006, *31st FEBS Congress Molecules in Health& Disease*, 24-29 June 2006, Istanbul, Turkey).
- [179] **Sadak, D.**, 2006, *Plasmodium vivax*'da laktat dehidrogenaz enziminin aktif bölge halkası aminoasitlerinin yönlendirilmiş mutagenез çalışmalarıyla analizi, *Yüksek Lisans Tezi*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 48s.

- [180] **Read, M., Hicks, K.E., Sims, P.F., Hyde, J.E.,** 1994, Molecular characterisation of the enolase gene from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Evidence for ancestry within a photosynthetic lineage, *European Journal of Biochemistry*, 220, 513-520.
- [181] **Li, J.L., Baker, D.A.,** 1998, A putative protein serine/threonine phosphate from *Plasmodium falciparum* contains a large N-terminal extension and five unique inserts in the catalytic domain, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 95, 287-295.
- [182] **Baumgartner F., Wiek, S., Paprotka, K., Zauner, S., Lingelbach, K.,** 2001, A point mutation in an unusual Sec7 domain is linked to brefeldin. A resistance in a *Plasmodium falciparum* line generated by drug selection, *Molecular Microbiology*, 41, 1151-1158.
- [183] **Brocchieri, L.,** 2001, Low-complexity regions in *Plasmodium* proteins: In search of a function, *Genome Research*, 11, 195-197.
- [184] **Labbé, M., Péroval, M., Bourdieu, C., Girard-Misguich, F., Péry, P.,** 2006, *Eimeria tenella* enolase and pyruvate kinase: A likely role in glycolysis and in others functions, *International Journal for Parasitology*, 36, 1443-1452.
- [185] **Dzierszinski, F., Popescu, O., Toursel, C., Slomianny, C., Yahiaoui, B., Tomavo, S.,** 1999, The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* expresses two functional plant-like glycolytic enzymes, *The Journal of Biological Chemistry*, 274:35, 24888-24895.
- [186] **Harper, J.T., Keeling, P.J.,** 2004, Lateral gene transfer and the complex distribution of insertions in eukaryotic enolase, *Gene*, 340, 227-235.
- [187] **Gilberger, T.W., Schirmer, R.H., Walter, R.D., Muller, S.,** 2000, Deletion of the parasite-specific insertions and mutation of the catalytic traid in glutathione reductase from chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* 3D7, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 107, 169-179.
- [188] **Clarke, J.L., Sodeinde, O., Mason, P.J.,** 2003, A unique insertion in *Plasmodium berghei* glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase: evolutionary and functional studies, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 127, 1-8.

- [189] **Vora, H.K., Shaik, F.R., Pal-Bhowmick, I., Mout, R., Jarori, G.K.,** 2009, Effect of deletion of a plant like pentapeptide insert on kinetic, structural and immunological properties of enolase from *Plasmodium falciparum*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 485, 128-138.
- [190] **Dzierszinski, F., Mortuaire, M., Dendouga, N., Popescu, O., Tomavo, S.,** 2001, Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, *Journal of Molecular Biology*, 309, 1017-1027.

ÖZGEÇMİŞ

Venhar ÇELİK

Doğum Yeri: Elazığ

Doğum Tarihi: 10.01.1980

Görevi: Araştırma Görevlisi

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

Tel: 0 424 237 00 00/ 38 38

Faks: 0 424 233 00 62

E-posta: venharcelik@firat.edu.tr, venharcelik@gmail.com

2004-2010: Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora Eğitimi

Doktora Tez Konusu: *Plasmodium vivax* Laktat Dehidrogenaz Enzimindeki Aktif Bölge Halkasının ve Kofaktör Bağlanma Bölgesinin Diğer Apikompleksan Laktat Dehidrogenaz Enzimleri ile Karşılaştırmalı Analizi

Danışman: Doç. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

2001-2004: Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eğitimi

Yüksek Lisans Tez Konusu: *Plasmodium falciparum*'da Laktat Dehidrogenaz Enziminin Aktif Bölge Halkası Aminoasitlerinin Site-Directed Mutagenesis Çalışmaları ile Analizi

Danışman: Doç. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

1997-2001: Fırat Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde Lisans Eğitimi