

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

134776

Plasmodium vivax'ın LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİ
KODLAYAN GENİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE
İZOLASYONU VE KLONLANMASI

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

EKREM AKBULUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

134776

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ELAZIĞ, 2003

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Plasmodium vivax*'ın LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİ
KODLAYAN GENİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE
İZOLASYONU VE KLONLANMASI**

EKREM AKBULUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez, 16.10.2003 tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği ile başarılı olarak değerlendirilmiştir.

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

Üye: Prof. Dr. Ahmet ŞAHİN

Üye: Yrd. Doç. Dr. Fikret KARATAŞ

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..05.. / ..11.. / ..2003.. tarih ve ..41/1.. sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Bu yüksek lisans tez çalışması Prof. Dr. J. John Holbrook'a ithaf edilmiştir...

TEŞEKKÜR

Danışmanım Sn. Yrd. Doç. Dr. Dilek Turgut-BALIK'a, Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne, Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Sn. Yrd. Doç. Dr. Fikret KARATAŞ'a, Fırat Üniversitesi Bilgi İşlem ve Enformatik Daire Başkanı Sn. Yrd. Doç. Dr. Hasan BALIK'a, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji A.B.D. Başkanı Sn. Doç. Dr. Ahmet Gödekmerdan'a, Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Araştırma Görevlisi Sn. Venhar Çelik'e, İnönü Üniversitesi Parazitoloji A.B.D öğretim üyesi Sn. Doç. Dr. Metin ATAMBAY'a, Sıtma Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Eğitim Merkezi Sıtma Birim Amiri Sn. Mehmet AĞAR'ın şahsında Süleyman ORAL'a ve Diyarbakır Sıtma ve Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Eğitim Merkezi Sıtma Birimi çalışanlarına teşekkürü borç bilirim.

Hayatımın her aşamasında büyük desteklerini hissettiğim aileme; babam Hüsametdin, annem Zeynep, kardeşlerim Hasan, Aynur, Aysun, Evren'e ve nişanlım Gülçin'e teşekkürlerimi sunarım.

Proje olarak yürütülen bu yüksek lisans tez çalışmasını destekleyen FÜBAP, TÜBİTAK ve The Wellcome Trust'a, U.K., teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI

TEŞEKKÜR

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

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

1.1 Sıtmanın Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	3
1.2 Laktat Dehidrogenaz Enzimi	5
1.3 <i>Plasmodium falciparum</i> 'un Laktat Dehidrogenaz Enzimi	7

BÖLÜM 2 MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal	10
2.1.1 <i>E. coli</i> Soyları	10
2.1.2 Bakteriyolojik Gelişim için Besiyerleri	11
2.1.3 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar	12
2.1.4 Genomik Kütüphaneler	13
2.1.5 Genomik DNA	14
2.1.6 Kan Örnekleri	14
2.1.7 Primerler	14
2.1.7.1 Dejenere Primerler	15
2.1.7.2 Spesifik Primerler	15
2.2 Metod	17
2.2.1 Kandan Genomik DNA İzolasyonu	17
2.2.1.1 Filtre Kağıdından DNA İzolasyonu	17
2.2.1.2 Kandan Direkt DNA İzolasyonu	17

2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	17
2.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi	19
2.2.4 DNA'nın Geri Kazanılması	
2.2.4.1 DNA'nın Jelden Geri Kazanılması	19
2.2.4.2 PCR Ürününden Kit ile DNA'nın Jelden Geri Kazanılması	20
2.2.5 Etilalkol Çöktürmesi	20
2.2.6 Ligasyon	20
2.2.7 Kalsiyum Klorür Etkileşimi ile Kompetant <i>E. coli</i> Hücrelerinin	21
Hazırlanması	
2.2.8 Transformasyon	21
2.2.9 Koloni PCR	22
2.2.10 Plasmid DNA İzolasyonu	22
2.2.10.1 Küçük Ölçekli DNA Hazırlanması	22
2.2.10.2 QIAprep Spin Miniprep Kit ile DNA İzolasyonu	23
2.2.10.3 Wizard® Plus SV Minipreps Kit ile DNA İzolasyonu	23
2.2.11 DNA Dizi Analizi	23
 BÖLÜM 3 BULGULAR VE TARTIŞMA	 24
3.1 <i>Pf</i> LDH'nin Amino Asit Dizisinin, Amino Asit Dizisi Bilinen Diğer Bazı LDH'lar	24
ile Karşılaştırılması	
3.2 Standart Reaksiyon Şartlarının Belirlenmesi	26
3.3 <i>Pv</i> LDH Geninin Genomik Kütüphanelerden İzolasyonu	27
3.4 <i>Pv</i> LDH Geninin Enfekte Kan Örneklerinden İzolasyonu	28
3.4.1 Dejenere Primerler Kullanılarak <i>Pv</i> LDH'ı Kodlayan Genin	29
Amplifikasyonunun Yapılması	
3.4.2 Spesifik Primerler Kullanılarak <i>Pv</i> LDH'ı Kodlayan Genin	30
Amplifikasyonunun Yapılması	
3.5 <i>Pv</i> LDH Geninin Tam Uzunluğunun <i>P. vivax</i> Belem Soyu Genomik DNA'sından	31
İzolasyonu ve Klonlanması	

3.6 PvLDH Geninin Nükleotid ve Amino Asit Dizisinin Analizi	33
3.6.1 PvLDH Geninin Nükleotid Dizisinin Analizi	33
3.6.1.1 PvLDH Geninde Her Bir Nükleotidin Kullanım Sıklığı	36
3.6.1.2 PvLDH'ın AT ve GC Yoğunlukları	36
3.6.1.3 PvLDH Geninde Dinükleotidlerin Kullanım Sıklığı	39
3.6.2 PvLDH Geninin Amino Asit Dizisinin Analizi	40
 BÖLÜM 4 SONUÇ	 44
 KAYNAKLAR	 46
 ÖZGEÇMİŞ	 51



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 <i>Pf</i> LDH ve memeli LDH'ında substrat bağlanma bölgesi ve substrat spesifik 9	halkaya bitişik olan yarığın varlığının gösterilmesi.
Şekil 3.1 Standart reaksiyon şartlarında uygun $MgCl_2$ konsantrasyonunun belirlenmesi 27	
Şekil 3.2 Genomik kütüphaneler ile amplifikasyonda ürün oluşumunun görüntülenmesi ... 28	
Şekil 3.3 Dejenere primerler ile amplifikasyon 30	
Şekil 3.4 Oligo16–oligo 25'in kullanılmasıyla elde edilen 273 bp'lik PCR ürünü 31	
Şekil 3.5 <i>Pv</i> Belem genomik DNA kullanılarak spesifik primer çiftleri ile <i>Pv</i> LDH 32	geninin amplifikasyonu.
Şekil 3.6 <i>Pv</i> LDH'in AT yoğunluğu 37	
Şekil 3.7 <i>Pf</i> LDH'in AT yoğunluğu 37	
Şekil 3.8 <i>Pv</i> LDH'in GC yoğunluğu 38	
Şekil 3.9 <i>Pf</i> LDH'in GC yoğunluğu 38	

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1 Türkiye'deki sıtma olgularının 1925-2002 yılları arası dağılımı	3
Tablo 2.1 Ligasyon reaksiyonları ve bileşenleri	21
Tablo 3.1 <i>Pk</i> LDH'nin NH ₂ -ucu dizisinin <i>Pf</i> LDH'nin aynı bölgesiyle karşılaştırılması	24
Tablo 3.2 <i>Pf</i> LDH'nin amino asit dizisinin, amino asit dizisi bilinen diğer bazı LDH'lar ile karşılaştırılması	25
Tablo 3.3 <i>Pv</i> LDH'ı kodlayan genin nükleotid dizisi	34
Tablo 3.4 <i>Pv</i> LDH geninde her bir nükleotidin kullanım sıklığı	36
Tablo 3.5 <i>P. vivax</i> ve <i>P. falciparum</i> LDH genlerinin dinükleotidleri kullanım sıklığı ...	39
Tablo 3.6 <i>Pv</i> LDH'nin ve diğer bazı LDH'ların amino asit dizi karşılaştırması	41

KISALTMALAR VE SİMGELER

Asit sitrat dekstroza	A.C.D
Amino asit	a.a
Baz çifti	bp
Deoksiribonükleik asit	DNA
Dünya Sağlık Örgütü	WHO
Etilen diamin tetra asetik asit	EDTA
Fenol-kloroform-izoamilalkol	PCI
Histidine zengin protein 2	HRP-2
Isopropyl-B-D-thiogalaktopyranoside	IPTG
Laktat dehidrogenaz	LDH
Litre	l
Luria-Bertani	LB
Mikrolitre	µl
Mililitre	ml
Milimolar	mM
Molar	M
N,N-dimetilformamid	DMF
Plazmodiyal laktat dehidrogenaz	pLDH
<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Pf</i>
<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Pv</i>
<i>Plasmodium berghei</i>	<i>Pb</i>
<i>Plasmodium yoelii</i>	<i>Py</i>
<i>Plasmodium falciparum</i> laktat dehidrogenaz enzimi	<i>Pf</i> LDH
<i>Plasmodium vivax</i> laktat dehidrogenaz enzimi	<i>Pv</i> LDH
<i>Plasmodium berghei</i> laktat dehidrogenaz enzimi	<i>Pb</i> LDH
<i>Plasmodium yoelii</i> laktat dehidrogenaz enzimi	<i>Py</i> LDH
Pikomol	pmol
Ribonükleik asit	RNA
Ribozomal ribonükleik asit	rRNA
Tris-borik asit-EDTA	TBE
Tek zincirli deoksiribonükleik asit	ssDNA
Tek zincirli ribonükleik asit	ssRNA

Ultraviyole u.v
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactopyranoside X-GAL



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Plasmodium vivax*'ın LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİ KODLAYAN GENİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE İZOLASYONU VE KLONLANMASI**

Ekrem AKBULUT

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

2003, Sayfa : 50

Varolan antimalariallara karşı ilaç direncinin oluşması yeni ilaçların geliştirilmesinin gerekliliğini vurgulamaktadır. Bu amaçla bu tezde *Plasmodium vivax* Belem soyu (FRANSA) genomik DNA'sından laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen (PvLDH) klonlanmış ve dizi analizi yapılmıştır. PvLDH geni günümüze kadar klonlanan ikinci insan malarial laktat dehidrogenaz'dır. DNA dizisi, PvLDH'nın *Plasmodium falciparum* LDH'ı (PfLDH) gibi 316 amino asitlik bir proteini kodlayan 951 bp açık okuma çerçevesini içerdiğini gösterdi. PvLDH'nın PfLDH ve bilinen diğer bazı LDH'lar amino asit dizi kıyaslaması, PvLDH'nın sırası ile PfLDH ile %90,1, *Plasmodium berghei* LDH'ı ile %90,8, *Plasmodium yoelii* LDH'ı ile %90,5, insan-M₄ LDH'ı ile %26, insan-H₄ LDH'ı ile %25 benzer olduğunu gösterdi. Ayrıca PvLDH'nın Glutamat-48 ve Glisin-217 olmak üzere iki tek amino asit delesyonuna sahip olduğu gösterildi. En çok dikkat çeken aktif bölge halkasında 5 amino asit ilavesidir. Önceden PfLDH'dan elde edilen yüksek çözünürlüklü X ışını yapısı bu bölgenin enzim inhibitörleri için cazip bir hedef olabileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Sıtma, *Plasmodium vivax*, Laktat Dehidrogenaz, Polimeraz Zincir Reaksiyonu.

ABSTRACT

MASTER THESIS

ISOLATION AND CLONING OF *Plasmodium vivax* LACTATE DEHYDROGENASE GENE BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Ekrem AKBULUT

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

2003, Page : 50

Emergence of drug resistance to the existing antimalarials emphasizes the need for the development of new drugs. To this aim, in this thesis, a lactate dehydrogenase gene was cloned and sequenced from genomic DNA of *Plasmodium vivax* Belem strain (PvLDH). This is the second human malarial lactate dehydrogenase cloned to date. DNA sequence showed that like *Plasmodium falciparum* LDH (PfLDH), PvLDH contains a 951 bp open reading frame, coding for a 316 aminoacid protein. Aminoacid sequence alignment of PvLDH to PfLDH and to some other known LDHs indicated that PvLDH has %90,1 residue identities with PfLDH and 90,8%, 90,5%, 26%, 25% , *P. berghei*, *P. yoelii*, insan-M₄, insan-H₄ LDHs respectively. It was also shown that PvLDH has two single aminoacid deletions, which are Glutamat-48 and Glisin-217. Most remarkable is a five residue insertion in the active site loop region. The high resolution X-ray structure previously obtained from PfLDH showed that this site might be an attractive target for inhibitors.

Keywords : Malaria, *Plasmodium vivax*, Lactate Dehydrogenase, Polymerase Chain Reaction.

1 GİRİŞ

Sıtma, anofel cinsi sivrisineklerin kan emerken taşıdıkları sporozoitleri konukçu canlıya transferiyle bulaşan bir enfeksiyon hastalığıdır. Bu döngü ökaryotik parazitik protozoa olan *Plasmodium* cinsi tarafından gerçekleştirilir [1].

Çok eski çağlardan beri var olan *Plasmodium* cinsi daha çok kuşları enfekte etmekle birlikte kaplumbağa, kertenkele ve yılanlar gibi sürüngenleri de enfekte ederler. Ayrıca *Plasmodium* türleri primatlar, kemirgenler gibi memelilerde ve diğer bazı memeli familyalarında da enfeksiyona sebep olabilir.

Plasmodium'un 4 türü insanda sıtmaya sebep olur. Bunlar; *Plasmodium vivax* (tertian), *Plasmodium falciparum* (tertian), *Plasmodium ovale* (tertian) ve *Plasmodium malariae* (quartan)'dır. Bir tertian ateşi, nöbetler arasında ateşin olmadığı bir gün ile ifade edilirken, bir quartan ateşi ise nöbetler arasında ateşin olmadığı iki gün ile karakterize edilmiştir. Bunlardan *P. falciparum* dışındakiler ciddi derecede hastalığa sebep olurlar fakat nadiren öldürücüdürler. *P. falciparum* ise daha ciddi ve ilerleyen bir hastalık süreci oluşturur. Bu süreç hastanın birkaç gün içinde ölümüne bile sebep olabilir [1].

P. vivax daha çok sıcak ve tropik bölgelerde enfeksiyona sebep olur ve *Plasmodium* türleri içerisinde tüm dünyada en geniş coğrafi yayılım gösteren türdür. *P. falciparum* Afrika'da ve güneydoğu Asya'nın büyük bir bölümünde yaygındır. *P. vivax* ise daha çok güney Asya ve Amerika'nın merkezinde yaygındır. *P. ovale* yalnızca batı Afrika ve pasifik yerlilerinde hastalık oluşturur. Diğer ırklar bu türe doğal olarak bağışıklık kazanmıştır. *P. malariae* olgusuna ise pek rastlanılmamaktadır. *P. malariae*'nin anofellerdeki evriminin uzun sürede gerçekleşmesi nedeni ile sporogoninin tamamlanmadan anofellerin yaşamlarını yitirmeleri bunun temel nedeni olarak gösterilmektedir [2]. Afrikalı zenciler *P. vivax* enfeksiyonuna direnç gösterirler. Çünkü bu popülasyonda Duffy kan grubu antijeni nadirdir. Bu antijen *P. vivax* merozoitlerinin eritrositlere bağlanamamasında rol oynar. Bu antijenin Afrikalı zenci nüfus içinde nadir görülmesi doğal olarak *P. vivax*'a karşı bir doğal direnç mekanizmasının gelişmesini sağlamıştır [1].

Sıtma, günümüzde dünyanın AIDS ve tüberkülozdan sonra en önemli bulaşıcı hastalığıdır. Dünya nüfusunun %40'ı sıtmanın yaygın olduğu bölgelerde yaşamaktadır. Her yıl 160-200 milyon yeni sıtma olgusu çıkmakta, yıllık klinik olgu sayısı ise 300-500 milyonu bulmaktadır. Bu sayının 3 milyona yakını ölmektedir. Toplam sıtma olgusunun %90'ı Afrika kıtasında görülmektedir. Diğer sıtma vak'alarının 2/3'ü Hindistan, Brezilya, Vietnam, Sri-Lanka, Kolombiya, Solomon Adalarında yaygın olarak görülmektedir. Daha çok hamilelerde ve

5 yaş altı çocuklarda görülen sıtma yüzünden her yıl 1 milyonu aşkın çocuk yaşamını yitirmektedir [1, 3].

Ülkemizde sıtma hakkındaki sayısal değerlere dayanan bilgiler pek eskilere inmemektedir. Buna karşılık Anadolu'daki birçok eski uygarlığın sıtma yüzünden ortadan kalktığı bir gerçektir. Ülkemizde ilk defa İsmail Hakkı Bey, dikkatleri sıtma üzerine çekmiştir. 1914-1918 savaş yıllarında ordumuzda 412671 kişinin sıtmaya yakalandığını ve bunların 20568'inin öldüğünü bildirmiştir. Daha sonraki yıllarda sıtma inişe başlamış ve gittikçe azalmış ancak 1975 yılından sonra tekrar tırmanışa geçmiştir. Ülkemizde görülen vak'a sayılarının yıllara göre dağılımı ve bu dağılımının gerçek bir zaman dağılımının özelliklerini verip vermediği kuşkuludur [4]. Buna karşın kendi içinde tutarlı kabul edilerek bildirimi yapılan vak'aların 1925-2002 yılları arası dağılımı Tablo 1.1'de verilmiştir. Türkiye'de görülen *P. vivax* sıtmasının hafif seyretmesi ve doğrudan hastalığa bağlı ölümler yapmaması, hastalığın önemsenmemesine neden olmaktadır. Oysa; Türkiye'de görülen sıtma doğrudan ölümlere neden olmamakla birlikte, hamile kadınlarda düşüklere, düşük doğumlara bağlı anne ölümlerine yol açarak oldukça önemli olmaktadır.

Sıtmanın anofel cinsi sivrisinekler tarafından bulaştırıldığının keşfinden bu yana yüzyıldan daha fazla zaman geçmesine rağmen sıtma hala kontrol altına alınamamıştır. Bu hastalığın tüm dünyada kontrol dışına çıkmasının iki temel nedeni vardır. Bunlardan ilki; sıtma parazitlerinin tek konağı olan anofel cinsi sivrisineklerin bilinen insektisidlere karşı direnç kazanması, ikincisi ise günümüzde bazı sıtma parazitlerinin mevcut antimalarial ilaçlara karşı direnç kazanmış olmasıdır. Bu durum yeni antimalarial ilaçların geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Parazitlerin metabolik yollarında kullandıkları enzimler yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmalarının ilk hedeflerinden birisidir. *Plasmodium*'un glikolitik enzimleri hem yeni antimalarial ilaçlar için hedef moleküller hem de hastalığın teşhisinde kandaki parazit düzeyini gösteren birer indikatör olarak tanımlanmıştır [5, 6, 7, 8]. Bu bilgiler ışığında plazmodiyal laktat dehidrogenaz (pLDH) yeni antimalarial ilaçların geliştirilmesi için hedef enzim olarak seçilmiştir. İlerideki bölümlerde de açıklanacağı gibi yaklaşım başarılı bir şekilde *Plasmodium falciparum* LDH'ına (PfLDH) uygulanmaktadır. Bu yüksek lisans tez çalışmasında ise aynı çalışmanın dünyada ve Türkiye'de en yaygın *Plasmodium* türü olan *Plasmodium vivax*'a uygulanması için bu türün laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan geninin izolasyonu amaçlanmıştır.

Tablo 1.1 Türkiye'deki sıtma olgularının 1925-2002 yılları arası dağılımı.

YIL	VAKA	YIL	VAKA	YIL	VAKA	YIL	VAKA
1925	1434	1945	16739	1965	4587	1985	47311
1926	14791	1946	10373	1966	3793	1986	37899
1927	10190	1947	5979	1967	3975	1987	20134
1928	9928	1948	7298	1968	3318	1988	16245
1929	36186	1949	4973	1969	2173	1989	12112
1930	45653	1950	4211	1970	1263	1990	8680
1931	61241	1951	20132	1971	2046	1991	12218
1932	72500	1952	8400	1972	2892	1992	18676
1933	50609	1953	5227	1973	2438	1993	47210
1934	48744	1954	2489	1974	2877	1994	84345
1935	40842	1955	1494	1975	9828	1995	82096
1936	62466	1956	1573	1976	37320	1996	60884
1937	69850	1957	5536	1977	115512	1997	35456
1938	81702	1958	11213	1978	87867	1998	36842
1939	120060	1959	7305	1979	29324	1999	20963
1940	155683	1960	3092	1980	34154	2000	11432
1941	94534	1961	3498	1981	54415	2001	10812
1942	146077	1962	3594	1982	62038	2002	10224
1943	115546	1963	4365	1983	66681		
1944	80387	1964	5081	1984	55020		

1.1 Sıtmanın Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Sağlık hizmetlerinin yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde sıtma tedavisinde kullanılacak ideal bir ilaç tek dozda etkili olmalı, ayrıca parazitin tüm evrelerine etki göstermelidir. Ne yazık ki, henüz böyle bir ilaç geliştirilememiştir. Bununla beraber, başta *P. falciparum* olmak üzere, sıtma türlerinin ilaçlara karşı gösterdiği direnç sıtma tedavisinde önemli bir sorun olarak gündemdeki yerini korumaktadır. Sıtma ilaçları koruma (profilaktik), sağaltma (terapötik) ve bulaşmayı engelleme amaçları ile kullanılır.

Sıtma tedavisinde kullanılan ilaçları kimyasal içeriklerine bağlı olarak 8 grup altında inceleyebiliriz [9]. Bunlar;

A) Arilaminoalkoller: Kinin, meflokin ve halofantrin arilaminoalkoller içerisinde yer alan ilaçlardır. Bunlar yalnızca sıtma parazitinin hemoglobini sindiren kan evrelerine etkili olan kan şizontosidleridir. Kan evrelerine hızlı etki göstermeleri nedeni ile genellikle akut enfeksiyonun sağaltımında kullanılırlar. Ancak, meflokin profilaksi için de kullanılmaktadır.

B) 4-aminokinolonlar: Bu grup içerisinde yer alan klorokin ve amodiakin, arilaminoalkoller gibi kan şizontosidleridir. Kan şizontosidlerinin, hemoglobinin sindirildiği parazit lizozomlarında birikerek ve toksik hemin eriyik olmayan hemozine (sıtma pigmenti) polimerizasyonunu engelleyerek etki gösterdikleri düşünülmektedir. Hızlı etkileri nedeni ile sıtma sağaltımında çok önemlidirler. Klorokin ayrıca korunmada da kullanılır. Bu grup içerisinde yer alan ve antimalarial ilaçlar içerisinde önemli bir yere sahip olan klorokin ilk olarak ortaya çıktığı 1940'larda etki hızına, güvenliğine ve geniş etki spektrumuna hiçbir antimalarial ilaç ulaşamamıştır. Klorokine dirençli *P. falciparum* suşlarının hızla yaygınlaşmasına ve giderek artan sayıdaki klorokine dirençli *P. vivax* olgularına rağmen klorokin halen dünyada çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Asya'da *P. falciparum* sıtmasının sağaltımında artık klorokin kullanılmamaktadır. Son 10 yılı aşkın bir süredir kullanılmadığı Çin'de klorokine direncin azaldığı bildirilmiştir. Klorokin, duyarlı suşlara karşı çok etkili ve hızlı bir kan şizontosididir. Aynı zamanda *P. vivax*, *P. malariae* ve *P. ovale*'ye karşı gametosidal etkilidir.

C) Sülfonlar ve Sülfonamidler: Diamino-diafenil sülfon ve sülfonamidler (sülfadoksin, sülfalen ve ko-trimoksazol) Tip 1 antifolat ilaçlar olarak bilinirler. Bu ilaçlar yalnızca mikroorganizmalarda bulunan dihidropterat sentetaz enzimi için yarışır, sıtmada etkensel profilaksi ve sağaltım için kullanılırlar.

D) Biguanidler: Proguanil ve klorproguanil tıpkı diamino-pirimidin pirimetamin gibi triazine etkili metabolitlere (sikloguanil ve klorsikloguanil) sahiptir. Bu ilaçlar malarial dihidrofolat redüktaz enzimini özgül olarak inhibe ettiği için, Tip 2 antifolat ilaçlar olarak adlandırılırlar. Sıtma parazitinin tüm gelişim evrelerini inhibe etmeleri nedeni ile bu ilaçlar etkensel profilaksi amacı ile kullanılır ve sivrisinekteki sporogonik evrelerin gelişimini engeller (sporontositler). Tip 1 ve 2 antifolatların etkili kombinasyonları (örneğin; sülfadoksin-pirimetamin) kan şizontosidlerine dirençli infeksiyonların sağaltımında, özellikle *P. falciparum* sıtmasının kinine dirençli suşlarında kininin meydana getirdiği klinik iyileşmeyi sağlamlaştırmak için kullanılır.

E) 8-aminokinolinler: Bu gruba dahil olan Primakinin, karaciğerde kininin aktif metabolitlerine dönüştüğüne inanılmaktadır. Bunlar özellikle insanda gelişim gösteren evrelere (hipnozoitler ve gametositler) etkilidirler. Gelişim evrelerine etkili olduğu konsantrasyonlarda konağa karşı toksik etki gösterirler. Bu ilaçlar *P. falciparum* sıtmasında gametosidal, *P. vivax* ve *P. ovale* sıtmalarında hipnozoitosidal (antirelaps) ilaçlar olarak kullanılırlar.

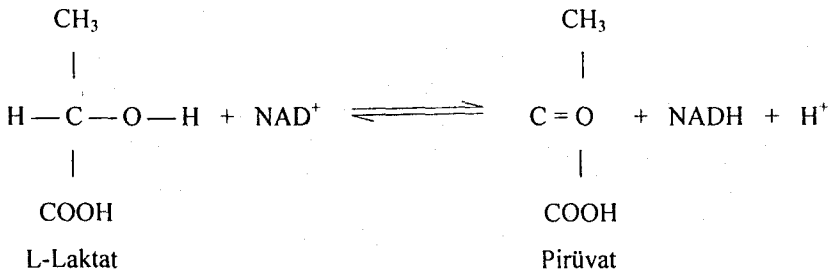
F) Antibiyotikler: Tetrasiklin, doksisisiklin, klindamisin ve florokinolonlar pre-eritrositik evrelere çok az etkili iken kan evrelerine yavaş ancak belirgin seviyede etkilidir. Bu ilaçların hepsi muhtemelen ribozomal protein sentezini inhibe ederler. Bu ilaçlar kinine dirençli sıtma suşlarına karşı klinik iyiliştirmeyi güçlendirmek amacı ile kullanılırlar. Doksisisiklin ayrıca supresif profilaktik olarak da kullanılabilirler.

G) Naftokinonlar: Atovakon bu gruba dahildir. Parazitin tüm gelişim evrelerine potansiyel profilaktik etkileri vardır. *P. falciparum* sıtmasının sağaltımında kullanıldığında dirençli klonların ortaya çıkmasına bağlı olan nüksler sık karşılaşılan bir sorundur. Ancak tetrasiklin ve proguanil gibi diğer ilaçlarla birlikte kullanıldığında etkin sonuçlar alındığı gözlenmiştir.

H) Peroksit antimalarialar: Qinghao (*Artemisia annua*) bitkisinden qinghaosu (artemisinin) adı verilen ve yapısı bilinen sıtma ilaçlarına benzemeyen bir aktif madde izole edilmiş, bu madde saflaştırılıp kristalize edilerek sıtmaya karşı etkinliği gösterilmiştir. Yapılan araştırmalar bu ilaçların diğer sıtma ilaçlarından daha hızlı etki sağladıkları, etkinliklerinin yüksek, yan etkilerininse az olduklarını göstermiştir. Artemisin türevleri klorokin ve kinine dirençli parazitlere karşı da etkili olan kan şizontosidleridir. Bu ilaçların embriyotoksik etkilerinden dolayı profilaktik kullanımının şimdilik uygun olmadığı düşünülmektedir.

1.2 Laktat Dehidrogenaz Enzimi

Laktat dehidrogenaz (LDH; EC 1.1.1.27; L-lactate: NAD⁺ oxidoreductase) hidrojen transfer eden bir enzimdir. Bu enzim, L-laktatların pirüvatlara oksidasyonunu veya pirüvatların laktata redüksiyonunu nikotinamid adenin dinükleotit (NAD⁺) aracılığı ile katalizler. NAD⁺ hidrojen alıcısıdır. LDH'nin katalizlediği reaksiyon dönüşümlü bir reaksiyondur. Bu reaksiyon aşağıda şematize edilmiştir:



Omurgalılarda LDH molekül ağırlığı 140,000 dalton olan tetramerik bir enzimdir. Farklı amino asit bileşimindeki iki form her türde bulunur. Bunlar; iskelet kası ve daha çok diğer anaerobik dokularda bol bulunan M (M_4) formu ile kalp gibi aerobik dokularda bol bulunan H (H_4) formudur. LDH iki farklı polipeptit zincirinin 5 farklı konfigürasyonda dizilimi neticesinde oluşan 5 izoenzime sahiptir. Bu izoenzimler; LDH-1(H_4), LDH-2(H_3M), LDH-3(H_2M_2), LDH-4(HM_3), LDH-5(M_4) olarak ifade edilmektedir. Bu izoenzimlerin her biri iki temel yapısal genin (M ve H zincirlerine karşılık sırasıyla A ve B genleri) denetimi altındadır. Bunlar kimyasal kompozisyon, kinetik ve immünolojik özellikleri ile birbirlerinden ayırt edilebilir. Özellikle M_4 ve H_4 formları farklı kinetik özelliklere sahiptir. Bu izoenzimler her ne kadar aynı tepkimeyi katalizlese de, bu işi farklı izoenzimler farklı fizyolojik roller oynayarak yaparlar [10, 11]. Bununla beraber memelilerin ve kuşların testis ve spermatzoalarında C geni tarafından kodlanan X formu vardır. İlave olarak gadoid balığının karaciğer dokusunda F formu bulunurken kemikli balığın fotoreseptörlerinde E formu bulunur [10]. Bakterilerde, molekül ağırlığı 70,000 dalton olan dimer ve 140,000 dalton olan tetramer formlarından biri bulunabilir ve bir çoğu fruktoz-1,6-bifosfat (FBP) tarafından aktive edilir [12]. Omurgalılar ve bitkilerin LDH'larında sadece laktatın L-izomeri üretilirken; omurgasızlar, basit yapılu funguslar ve prokaryotik organizmalarda D- veya L-laktatın (NAD^+ spesifik dehidrogenaz) ikisinden biri veya her ikisi bulunur [10]. *Lactobacillus plantarum* ve *Neisseria gonorrhoeae* gibi bazı prokaryotlar aynı hücre içerisinde D- ve L-LDH enzimlerinin her ikisine de sahiptirler [13, 14].

LDH'nin substratın bağlanmasından sorumlu olan amino asitleri (Arg-171, Arg-109, Asp-168, His-195, Thr-246) kinetik [15], kimyasal [16, 17] ve yapısal olarak [10, 18, 19] analiz edilmiştir.

Histidin-195 bir proton alıcısı/vericisi gibi davranır ve aynı zamanda aktif bölge içerisinde substrata yönelir. Histidin-195'in imidazol grubu protonlanmadıkça LDH'nin enzim-NADH-oxamat ya da enzim-NADH-pirüvat kompleksini oluşturamadığı gösterilmiştir. Kristal yapı 109. ve 171. pozisyonda yer alan arjinin amino asitlerinin aktif bölgede yer aldığını göstermiştir. Arjinin-109 keto-asidin karbonil bağını polarize etmesi için yardım eder ve böylece oksijene proton transferini ve karbona hidrat transferini sağlar. Arjinin-171 substratın etkili yönelmesini sağlayarak substrat-karboksilat ile iki noktada güçlü bir etkileşim sağlar. Threonin-246 kısmen substrat ayırımından sorumludur. Threonin-246 substrat bağlamada görevli önemli bir aktif bölge amino asididir [16]. Üç boyutlu yapıda threonin-246 amino asidi substratın karboksil grubu ile hidrojen bağı oluşturur [19].

Histidin-195, aspartat-168, arjinin-109 ve arjinin-171'in bilinen tüm LDH dizilerinde tamamen korunmuş olması bu amino asitlerin enzimin fonksiyonunda hayati rolleri olduğunu

göstermiştir. Bu aynı zamanda yönlendirilmiş mutagenез çalışmaları ile de gösterilmiştir [15, 20, 21, 22].

1.3 *Plasmodium falciparum*'un Laktat Dehidrogenaz Enzimi

Plasmodium türlerinin antimalarial ilaçlara karşı direnci tüm dünyada giderek ciddi boyutlara ulaşmaktadır. Sıtma ile mücadelede mevcut antimalarial ilaçların etkinliğini zamanla kaybetmesi yeni antimalarial ilaçların geliştirilmesini gerekli kılmıştır. *Plasmodium*'un izole edilen glikolitik enzimleri hem yeni antimalarial ilaçlar için hedef moleküller olarak hem de hastalığın teşhisinde birer indikatör olarak tanımlanmıştır [5, 6, 7]. Yapılan çalışmalar sonucu tanımlanan glikolitik enzimlerin bazı özellikleri ile konakçıdaki homologu olan enzimden farklı olduğu tespit edilmiştir [5, 23, 24, 25, 26]. Glikolitik enzimlerden çoğu izole edilmiş, klonlanmış ve tamamen nükleotid dizileri belirlenmiştir. Bunlardan bazıları; fruktoz bifosfat aldolaz, glukoz-6-fosfat izomeraz, fosfoglisarat kinaz (PGK), heksokinaz, laktat dehidrogenaz, trioz-fosfat izomeraz (TPI), gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz ve enolaz (2-fosfo-D-gliserat hidrolaz)'dır [23].

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

Laktat dehidrogenaz enzimi insan sıtma parazitlerinin karbonhidrat metabolizmasında önemli bir rol oynar. Parazit, bu enzim sayesinde glikolizin son ürünü olan pirüvik asidi dönüşümlü bir reaksiyonla laktik aside çevirmektedir. Dolayısıyla bu enzimin inhibisyonu parazitin yaşamının sonlandırılmasını sağlayacaktır [27]. Ancak aynı enzim hem insanda hem de parazitte bulunduğu için insan LDH'nın etkilenmeden kalması büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla *Pf*LDH'nın elektroforetik, kinetik ve yapısal olarak insan LDH'ından farklı olduğu gösterilmiş olup bu farklılıklar aşağıda belirtilmiştir:

- i) İnsan LDH'ından farklı olarak *Pf*LDH yüksek pirüvat konsantrasyonunda inhibe olmamaktadır [24].
- ii) İnsan M₄-LDH'ından farklı olarak, *Pf*LDH 3-asetilpiridin adenin dinükleotit (APAD') adlı koenzimi 0,5 M laktat konsantrasyonunda daha hızlı kullanabilme yeteğine sahiptir [7].
- iii) *Pf*LDH'nın gossilik nitril diasetat ve türevleri tarafından inhibisyona insan LDH'ından daha duyarlı olduğu bildirilmiştir [27].
- iv) İnsan M₄-LDH'ından farklı olarak *Pf*LDH, aktif bölge halkasında 5 ilave amino asit (AspLysGluTrpAsn) içermektedir [25].

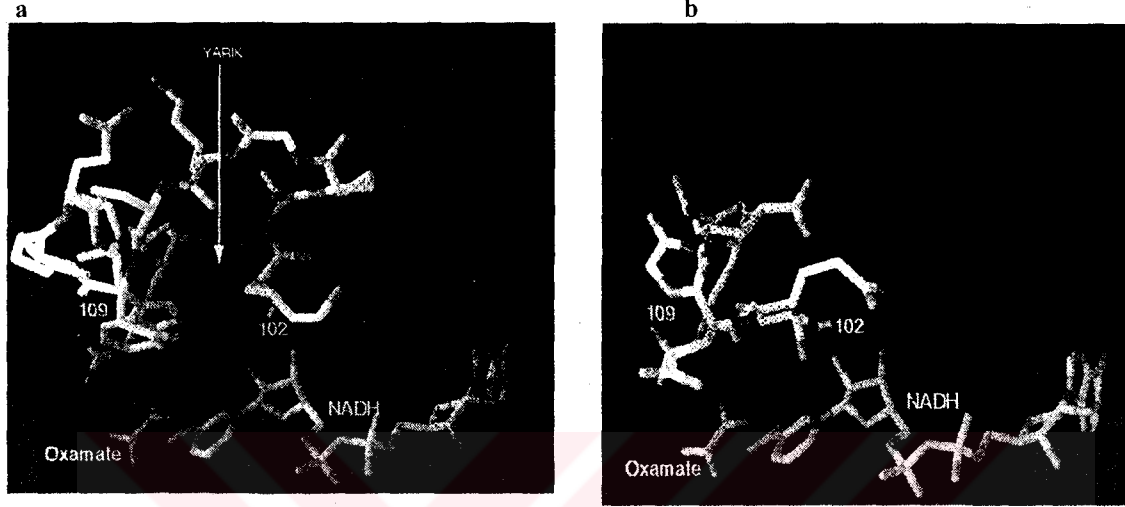
Sıtma parazitleri metabolizmaları için gerekli olan ATP ihtiyacını glikoliz ile sağlarlar. Sıtma parazitleri eşeysiz faz süresince (konukçudaki eritrositik döngüler arasındaki dönem), çok hızlı bir şekilde çoğalmaları gerektiğinden oldukça yüksek düzeyde enerjiye ihtiyaç duyarlar. Hem sıtma parazitlerinde hem de yetişkin insan eritrositlerinde ATP'nin temel metabolik kökeni glikolizdir [28]. Çünkü sıtma parazitleri ve konukçu oldukları memeli eritrositleri etkin bir sitrik asit döngüsü ve aktif bir mitokondriden yoksundurlar [5, 29]. Kullanılan glukozun hemen hemen tamamı glikolizde kullanılmak üzere oluşturulur ve neredeyse tamamı laktik asit oluşumu için metabolize edilir [5, 30]. *P. falciparum* sadece bir mitokondriye sahiptir, fakat henüz mitokondrinin metabolik rolü tam olarak açıklanamamıştır. *P. falciparum* ile infekte edilmiş eritrositler, infekte olmamış eritrositlerden yaklaşık olarak 100 kat kadar fazla glukoz kullanırlar [31]. Bu verilerin, anti-glikolitik inhibitör kökenli antimalarialların ortaya çıkarılması yönünde yapılacak çalışmalara katkı sağlayabileceği tahmin edilmektedir.

*Pf*LDH geni ilk olarak 1993 yılında Bzik ve Fox tarafından Honduras I olarak adlandırılan soydan izole edilmiştir [25]. Daha sonra aynı gen K1 (Tayland) ve *PF* FCBP (Kolombiya) soylarından izole edilmiş ve klonlanmıştır [32]. Yapılan karşılaştırmalar neticesinde izole edilen tüm bu soyların LDH geninin nükleotid dizilerinin aynı olduğu belirlenmiştir. Üç soy itibarıyla yapılan bu değerlendirmenin tüm soylar için genellenemeyeceği de bir gerçektir.

*Pf*LDH, amino asit dizisi bilinen diğer türlerin LDH'ları ile karşılaştırılmış ve *Bs*LDH ile %29, köpek balığı LDH'ı ile %29, insan M₄-LDH'ı ile %31, domuz LDH'ı ile %33, insan H₄-LDH'ı ile %29 [32] oranında amino asit düzeyinde benzerlik görüldüğü belirlenmiştir. *Pf*LDH'da iki pozisyonda amino asit eksikliği ve iki pozisyonda da amino asit fazlalığının varlığı belirlenmiştir. Glutamat-48 ve glisin-217 eksik olan iki amino asittir. Alanin-73 ve serin-74 arasında ilave bir tirozin bulunmaktadır. Diğer LDH'larla karşılaştırıldığında gözlenen en önemli farklılık *Pf*LDH'nın serin-108 ve arjinin-109 arasına ilave 5 amino asit içermesidir [25]. X ışını kristalografisi çalışmaları ile bu 5 amino asit ilavesinin enzimin katalitik halkasına yakın yüzeyinde çok belirgin bir yarık oluşturduğu (Şekil 1.1-a), fakat insandaki eşdeğeri olan LDH'da ise aynı bölgede hiçbir ilave amino asit olmadığı için söz konusu yarığın olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 1.1-b) [33].

Bu yapıya dayandırılarak yapılan moleküler modelleme çalışmaları gossipol türevi olan gossilik nitril-1,1' diasetat'ın malarial LDH'nın belirlenen bu açıklığında barındırılabilirliğini fakat memeli LDH'larında bu açıklık bulunmadığı için bu inhibitörün LDH'nın yapısına kabul edilmeyeceğini göstermiştir [34]. İnsan LDH'ından farklı olarak *Pf*LDH'a özgü olan bu bölge, çeşitli enzim inhibitörlerini barındırma ve dolayısıyla enzim aktivitesini durdurarak parazitin insan kanı içerisinde ölümüne sebep olma potansiyeline sahip olduğu için ilaç tasarımı

alışmalarında hedef bölge olarak kullanılmıştır. Yapılan alışmalar, *Pf*LDH yapısında bulunan ilave 5 amino asidin oluşturduğu yarığın klorokin ile bir kompleks meydana getirdiğini göstermiş ve klorokinin enzim üzerine olan inhibitör etkisi belirlenmiştir [35].



Şekil 1.1 *Pf*LDH ve memeli LDH'ında substrat bağlanma bölgesi ve substrat spesifik halkaya bitişik yarığın varlığının gösterilmesi. a. *Pf*LDH'in 108. ve 109. amino asitleri arasındaki ilave 5 amino asidin oluşturduğu yarık. b. Aynı pozisyonda ilave 5 amino asidin oluşturduğu yarığın memeli LDH'ında yokluğunun gösterimi [33].

Bu tezde, *P. falciparum* ile yapılan tüm bu çalışmalar göz önünde bulundurularak *P. vivax*'ın LDH (*Pv*LDH) enzimini kodlayan geninin izolasyonu ve klonlanması amaçlanarak; elde edilecek verilerin yeni antimalarial ilaçların tasarımı çalışmalarında kullanılması hedeflenmiştir.

2 MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan AmpliTaq Gold DNA Polimeraz enzimi, tampon çözelti ve $MgCl_2$ solüsyonu Applied Biosystems'den, U.S.A, plazmid DNA izolasyonunda kullanılan QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN'den, Almanya, Taq DNA Polimeraz enzimi, tampon çözelti ve $MgCl_2$ solüsyonu, Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, PCR ürünlerinin jelde koşturulmadan direkt saflaştırılmasında kullanılan Wizard® PCR Preps DNA Purification System ve PCR ürünlerinin jelde koşturulduktan sonra saflaştırılmasında kullanılan Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega'dan, U.S.A, filtre kağıdından genomik DNA izolasyonunda kullanılan Chelex 100 Resin'in sodyum formu ise Bio-Rad'dan, U.K., temin edilmiştir. PCR sonrası jel üzerinde örneklerin görüntülenmesi sırasında referans olarak kullanılan moleküler ağırlık markırı Hyper Ladder I Bioline'dan, U.S.A , temin edilmiştir.

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

Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan primerler MWG Bio-tech, U.K., tarafından sentezlenmiş olup dizi analizleri de yine aynı firmaya yaptırılmıştır [36].

2.1.1 *E. coli* Soyları

JM101 : { *supE thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacI^f lacZ ΔM15]* }

JM109 : { *recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacI^f lacZ ΔM15]* }

2.1.2 Bakteriyolojik Gelişim İçin Besiyerleri

LB (Luria-Bertani) Buyyon

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

LB Agar

Tripton	10 g/l
Maya ekstraktı	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar	15 g/l

BSA (Blue Selection Agar)

Otoklavlanmış veya eritilmiş uygun sıcaklıkta 100 ml LB Agar içerisine;

Amfisilin (100 mg/ml)	100 µl
X-Gal (20 mg/ml)	160 µl
IPTG (20 mg/ml)	160 µl , ilave edilir.

SOC Buyyon (100 ml, pH: 7,0)

Tripton	2 g
Maya ekstraktı	0,5 g
1 M NaCl	1 ml
1 M KCl	0,25 ml
2 M Mg ¹² Stok solüsyonu (Filtre ile sterilize edilir)	1 ml
2 M Glikoz (Filtre ile sterilize edilir)	1 ml

Tripton, maya ekstraktı, 1 M NaCl ve 1 M KCl distile su ile 97 ml'ye tamamlanır. Otoklavda sterilize edilir. Oda ısısına soğutulur. 2 M Mg¹² ve 2 M Glikoz solüsyonları son konsantrasyonları 20 mM olacak şekilde karışıma ilave edilir. Karışımın son pH'ı 7,0 olarak ayarlanır ve steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2.1.3 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar

10X TBE Tampon Çözeltisi (Tris-Borik asit-EDTA)

Ortho-Borik Asit	55,65 g/l
Ethilen diamin tetra asetik asit (EDTA)	4,65 g/l
Tris.HCl	108,99 g/l

Amfisilin

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

IPTG (Isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside)

20 mg/ml (Filtre ile sterilize edilir).

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

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

SAB (Sample Amplification Buffer)

Sükroz	4 g/10 ml
2 M Tris.Cl	0,5 ml/10 ml
0,5 M EDTA	2 ml/10 ml
Bromfenol mavisi	4 mg (pH: 3,0-4,6)

Nötral Fenol

Fenol	4 ml
0,5 M Tris pH:8,0	4 ml

Asit Sitrat Dekstroz (ACD)

Sitrik Asit	4,8 g/l
Sodyum Sitrat	13,2 g/l
Glukoz	14,7 g/l

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Mg⁺² Stok Solüsyonu (100 ml)

MgCl₂.6H₂O 20,33 g

MgSO₄.7H₂O 24,65 g Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Filtre ile sterilize edilir.

CaCl₂ Solüsyonu

100 mM CaCl₂.6H₂O 21,9 g/l

5 mM MgCl₂.6H₂O 1,02 g/l

5 mM Tris 5 ml (1 M pH: 7,6 olan stoktan).

Plazmid Mini-Prep Solüsyonları

Solüsyon I

25 mM Tris.HCl pH. 8,0 25 g/l

25 mM EDTA 50 ml/l

0,3 M Sükröz 102,6 g/l

Solüsyon II

10 M NaOH 0,3 ml

%10 SDS 2 ml

Distile su ile 10 ml'ye tamamlanır.

Taze hazırlanmalıdır

PCI (Phenol- Chloroform- Isoamylalcohol)

Fenol 25 g

Kloroform 24 ml

İzoamil alkol 1 ml

2.1.4 Genomik Kütüphaneler

P. vivax genomik DNA kütüphaneleri Dr. D. C. Kaslow, NIH, Bethesda, MD tarafından sağlanmıştır. *Eco* RI ve kısmi *Sau* 3AI ile kesimi yapılmış olan kütüphanelerin hazırlanması için kullanılan vektör pUC18 olup transformasyon *E. coli* içerisine yapılmıştır. *Hind* III ile kesimi yapılmış olan kütüphanenin hazırlanması için kullanılan vektör ise pUC 13 olup transformasyon yine *E. coli* içerisine yapılmıştır.

2.1.5 Genomik DNA

Genin tam uzunluğunun elde edildiği *P. vivax* Belem soyu genomik DNA, Dr. P. David (Pasteur Enstitüsü, Paris, Fransa) tarafından sağlanmıştır.

273 baz çifti PCR ürününün elde edildiği genomik DNA ise Diyarbakır Sıtma ve Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Eğitim Merkezi'ne gelen hastalardan alınan kan örneklerinden izole edilmiştir.

2.1.6 Kan Örnekleri

Kan örnekleri şiddetli baş ağrısı, yüksek ateş, iştahsızlık, mide bulantısı ve kusma şikayetleri ile Sıtma ve Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Eğitim Merkezi'ne (Diyarbakır) gelen hastalarda yapılan kalın damla ve ince yayma preparatların incelemeleri sonucunda *Plasmodium vivax*-pozitif hastalardan;

- a) Asit sitrat dekstrozu (ACD) solüsyonuna; 1 ml ACD, 6 ml kan olacak şekilde [37],
- b) Heparinli tüplere [38],
- c) Whattman 3 MM filtre kağıdına 25 µl'lik damlalar halinde [39],

yukarıda belirtilen örnek tiplerini hazırlamak için kan, damardan şırınga ile alınmıştır. Kan alma tüplerine ve filtre kağıtlarına alınan örnekler steril poşetlere konularak muhafaza edilmiştir. Filtre kağıdına alınan örnekler oda sıcaklığında, kan örnekleri ise buz içerisinde laboratuvara getirilmiştir.

2.1.7 Primerler

Plasmodium vivax LDH enzimini kodlayan geninin PCR ile izolasyonu çalışmalarında, başlangıçta hedef genin nükleotid ve amino asit dizisi hakkında hiçbir bilgi olmadığı için primerlerin tasarlanmasında Bulgular ve Tartışmada açıklanacak olan bir veri tabanı araştırması yapılmış ve PvLDH'a benzer olabilecek bazı türlerin LDH dizileri temin edilerek birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Bu bilgilerden yararlanılarak iki grup primer hazırlanmıştır. Bunlar dejenere ve spesifik primerlerdir.

2.1.7.1 Dejenere Primerler

Bu primerler hazırlanırken LDH'lar arasında korunmuş olan bölgeler amino asit seviyesinde tespit edilmiş ve dejenerasyon oranının çok yüksek olmamasına dikkat edilerek primerler tasarlanmıştır.

Oligo 1: 5' - GT(AGCT) GG(AGCT) TC(AGCT) GG(AGCT) ATG - 3'

a.a: Val Gly Ser Gly Met

GC İçeriği: % 60 T_m: 50,6 °C

Oligo 2: 5' - ATG AT(ACT) GG(AGCT) GG(AGCT) GT(AGCT) ATG GC - 3'

a.a: Met Ile Gly Gly Val Met

GC İçeriği: % 54,2 T_m: 59 °C

Oligo 13: 5' - (CT)CT (AG)TT CCA (CT)TC (CT)TT (AG)TC - 3'

a.a: Pro-Ser Ile-Val Pro Leu-Phe Leu-Phe Ile-Val

GC İçeriği: % 41,7 T_m: 50,3 °C

2.1.7.2 Spesifik Primerler

Pf1: 5' - TTT GAA TTC AAG ATA TGG CTC CAA AAG CAA AAA TCG - 3'

GC İçeriği: % 33,3 T_m: 64,9 °C

Pf2: 5' - AAA CTC TGC AGT TAA GCT AAT GCC TTC ATT CTC - 3'

GC İçeriği: % 39,4 T_m: 65,8 °C

Pv1: 5' - TTT GAA TTC ATG ACG CCG AAA CCC AAA ATT GTG CTC GTC GGG - 3'

GC İçeriği: % 47,6 T_m: 73,3 °C (Bu primer PvLDH'in 5' ucunun tamamlayıcısı olup, başında Eco RI restriksiyon enzimi kesim bölgesini taşımaktadır).

Pv2: 5' - AAA CTC TGC AGA ATG AGC GCC TTC ATC CTT TTA GTC TCC GC - 3'

GC İçeriği: % 48,8 T_m: 73,4 °C (Bu primer PvLDH'in 3' ucunun tamamlayıcısı olup, başında Pst I restriksiyon enzimi kesim bölgesini taşımaktadır).

Pv3: 5' - ATG ACG CCG AAA CCC AAA ATT GTG CTC GTC GGG - 3'

GC İçeriği: % 54,5 **T_m:** 72 °C (Bu primer PvLDH'in 5' ucunun tamamlayıcısı olup, başında hiçbir restriksiyon enzimi kesim bölgesini taşımamaktadır).

Pv4: 5' - AAT GAG CGC CTT CAT CCT TTT AGT CTC CGC AAC TGC C - 3'

GC İçeriği: % 51,4 **T_m:** 72,8 °C (Bu primer PvLDH'in 3' ucunun tamamlayıcısı olup, başında hiçbir restriksiyon enzimi kesim bölgesini taşımamaktadır).

Oligo 25: 5' - ATT TAC ATC TCT TGG GCA TAC ATT - 3'

GC İçeriği: % 33,3 **T_m:** 55,9 °C



2.2 Metod

2.2.1 Kandan Genomik DNA İzolasyonu

2.2.1.1 Filtre Kağıdından DNA İzolasyonu

3 mm'lik Whatman filtre kağıdına 25 µl'lik damlalar halinde alınan infekte kan örneklerinden bir damlalık bölge kesilip alınarak mikrosantrifüj tüpüne konulur. Üzerine kaynamakta olan %5'lik Chelex çözeltisi başlangıçtaki kan örneğine göre 1:10 oranı sağlanacak şekilde ilave edilir. Chelex ilavesinden sonra örnek 30 saniye süreyle vortekslenir ve 10 dakika kaynatılır. Daha sonra örnek 12,000 g'de ($\approx 10,700$ rpm'de) 1,5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası süpernatant temiz bir tüpe alınır ve tekrar 12,000 g'de 1,5 dakika santrifüj edilir. Süpernatant tekrar temiz bir tüpe alınır. İzole edilen DNA +4°C'de muhafaza edilir [39].

2.2.1.2 Kandan Direkt DNA İzolasyonu

Plasmodium vivax infeksiyonu görülen hastalardan alınan ve belirli oranlarda antikoagülant (Heparin, Asit Sitrat Dekstroz[ACD]) içeren kan örneğinden 100 µl alınır ve bir mikrosantrifüj tüpüne konulur. Üzerine 400 µl taze hazırlanmış 0,17 M NH₄Cl ilave edilir. Mikrosantrifüj tüpü ters-düz edilmek suretiyle karıştırılır ve 20 dakika oda sıcaklığında bekletilir. 30 saniye 16,000 rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant atılır ve pelet 3 kez (pelet renksizleşinceye kadar) %0,9'luk NaCl çözeltisi ile yıkanır (yıkama işlemi; NaCl ilave edilmesi, vorteksleme ve 15 saniye santrifüjleme olacak şekilde sırasıyla gerçekleştirilmelidir). Yıkama işleminden sonra oluşan pelete 200 µl 0,05 M NaOH ilave edilir, örnek vortekslenir ve 10 dakika su banyosunda kaynatılır. Kaynatma işleminin ardından NaOH'i etkisiz hale getirmek için örneğe 25 µl 1 M tris pH:8,0 ilave edilir. İzolasyon sonrası DNA -20°C'de muhafaza edilir [40].

2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Çalışmalarımızda *Taq* DNA polimeraz veya *AmpliTaq Gold* DNA polimeraz enzimleri kullanılmıştır. Her bir reaksiyonda 2,5 ünite enzim kullanılmıştır.

P. vivax LDH'nin izolasyonu çalışmalarında kalıp DNA olarak kullanılan iki farklı materyal (kandan direkt olarak elde edilen genomik DNA ve *Pv*Belem soyundan elde edilen saf genomik DNA) göz önünde bulundurularak, her biri için farklı PCR şartları ile çalışılmıştır.

Direkt kandan veya filtre kağıdından izole edilen genomik DNA [39] ile amplifikasyonu gerçekleştirilen 273 bp'lik *Pv*LDH gen bölgesinin ampifikasyonunda; $MgCl_2$ konsantrasyonu 1,5-5 mM, kalıp DNA miktarı 5-20 μ l, dNTP konsantrasyonu 10-100 mM, enzim miktarı 2,5-7,5 ünite, primer miktarı ise 20-500 pmol aralıklarında çalışılmış olup, reaksiyon şartları aşağıda verilmiştir:

10x <i>Taq</i> tamponu	5 μ l (enzim ile beraber verilmiştir)
$MgCl_2$	10 μ l (stok; 25 mM)
dNTP'ler	5 μ l (stok; herbiri 10 mM olan dNTP'lerden 10'ar μ l ve 10 μ l H_2O)
5' primeri	2.5 μ l (stok; 50 pmol/ μ l)
3' primeri	2.5 μ l (stok; 50 pmol/ μ l)
Kalıp DNA	5 μ l
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0.5 μ l (2.5 ünite)
dH_2O	19,5 μ l (son hacim 50 μ l olacak şekilde)

Amplifikasyon 95°C'de 5 dakika öndenatürasyon basamağı, 94°C'de 30 saniye, 42°C'de 30 saniye, 72°C'de 3 dakika ve 45 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

*Pv*LDH enzimini kodlayan genin tamamının izole edildiği *P. vivax* Belem soyu genomik DNA ile gerçekleştirilen amplifikasyon çalışmalarında *Pv*1-*Pv*2, *Pv*3-*Pv*4 primer çiftleri kullanılarak; $MgCl_2$ konsantrasyonu 1,5-5 mM, kalıp DNA miktarı 0,5-3 μ l, enzim miktarı 2,5-5 ünite aralığında test edilmiş ve en fazla ürün oluşumu gözlenen reaksiyon koşulları aşağıda verilmiştir:

10xAmpli <i>Taq</i> tamponu	5 μ l (enzim ile beraber verilmiştir)
$MgCl_2$	3 μ l (stok; 25 mM)
dNTP'ler	5 μ l (stok; 10 mM'lık dNTP'lerden 10'ar μ l ve 10 μ l H_2O)
5' primeri	1 μ l (stok; 50 pmol/ μ l)
3' primeri	1 μ l (stok; 50 pmol/ μ l)
Kalıp DNA	1 μ l (stok; 20 ng/ μ l)
Ampli <i>Taq</i> DNA polimeraz	0.5 μ l (2.5 ünite) (stok; 5 ünite/ μ l)
dH_2O	33,5 μ l (son hacim 50 μ l olacak şekilde)

Amplifikasyon 94°C'de 1,5 dakika, 55°C'de 2 dakika, 72°C'de 2 dakika ve 45 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi

PvLDH enzimini kodlayan geninin izolasyonu çalışmalarında %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyon kaynatılır. Jel oda sıcaklığında 55-65°C'ye kadar soğutulur. Bu esnada jelin döküleceği jel tepsi hazırlanır, taraklar yerine yerleştirilir. Jeli tepsiye dökmeden önce 10 mg/ml konsantrasyondaki etidyum bromid'den 5 µl ilave edilir. Jel tepsiye dökülür ve katılaşması beklenir. Katılaştıktan sonra tarak çıkarılır. Jel üzerindeki kuyucuklara yerleştirilecek olan DNA örneklerine 2 µl SAB ilave edilir. Elektroforez rutin agaroz jel elektroforezi için 40-60 mA, düşük erime noktalı agaroz jel elektroforezi 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 u.v (ultraviyole) transilluminatöründe görüntülenir. Etidyum bromid DNA'ya bağlanarak u.v ışık altında flouresan etki göstermektedir. Bu sayede çok düşük miktarlardaki DNA'nın bile varlığını belirlemek mümkün olmaktadır [37].

2.2.4 DNA'nın Geri Kazanılması

2.2.4.1 DNA'nın Jelden Geri Kazanılması

A) Fenol Ekstraksiyonu

Spesifik DNA bantları jelden dilimler halinde kesilir. Jel dilimi üzerine 200 µl TE tampon çözeltisi ilave edilir ve 68°C'de su banyosunda 10 dakika süreyle inkübe edilir. İnkübasyon sonrası örneğe 200 µl nötral fenol ilave edilir ve derhal vortekslenir. 5 dakika 16,000 rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant pelet rahatsız edilmeden temiz bir tüpe alınır ve santrifüj işlemi tekrarlanır. Santrifüj sonrası süpernatant tekrar temiz bir tüpe alınır. Örneğin, ortamda bulunması muhtemel diğer bütün maddelerden tamamen temizlenmesi amacı ile etanol çöktürmesi uygulanır [37].

B) Kit ile DNA'nın Jelden Geri Kazanılması

Jelden dilimler halinde kesilen spesifik DNA bantları 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine bırakılır ve DNA, Promega Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System kiti kullanılarak saflaştırılır [41].

2.2.4.2 PCR Üründen Kit ile DNA'nın Geri Kazanılması

PCR sonrası 30-300 µl amplifikasyon ürünü içerisinde 100 µl PCR Purification Buffer bulunan 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine bırakılır ve DNA, Promega Wizard®PCR Preps DNA Purification System kiti ile saflaştırılır [42].

2.2.5 Etilalkol Çöktürmesi

DNA örneğine toplam hacminin 1/10'u kadar 4 M NaCl ilave edilir. Üzerine, oluşan toplam hacmin (örnek + örnek hacminin 1/10'u oranında 4 M NaCl) 2,5 katı kadar %100'lük soğuk etanol ilave edilir ve en az 30 dakika -20°C de bekletilir. Daha sonra 16,000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Pelete 500 µl %70'lik soğuk etanol ilave edilir ve 10 dakika 16,000 rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Elde edilen DNA'ya 100 µl steril distile su ilave edilir ve ikinci kez etanol çöktürmesi uygulanır. Daha sonra elde edilen DNA steril distile suda çözülür [37].

2.2.6 Ligasyon

Ligasyon vektörü üreten firmanın kullanma talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir [43]. PvLDH geni pGEM®-T klonlama vektörü içerisine T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak aktarılır. Reaksiyon 4°C'de 16 saat olarak gerçekleştirilmiş olup, bileşenleri aşağıda verilmiştir (Tablo 2.1):

Tablo 2.1 Ligasyon reaksiyonları ve bileşenleri.

Bileşen	PvLDH'in Ligasyonu	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
2 X Rapid Ligasyon Tamponu	5 µl	5 µl	5 µl
PGEM-T easy vektör	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
PCR Ürünü	2,5 µl	-	-
Kontrol İnsert DNA	-	2 µl	-
T4 DNA Ligaz (3 ünite/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Steril dH ₂ O	1 µl	1,5 µl	3,5 µl
Toplam	10 µl	10 µl	10 µl

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

E. coli JM101 hücreleri LB agar da 37°C'de bir gece inkübe edilir. İnkübasyon sonrası tek bir koloni steril bir kürdan yardımı ile alınır, 60 ml LB buyyon içerisine atılır ve 37°C'de 100 rpm'de çalkalamalı etüvde bir gece inkübe edilir. Bir gecelik kültürden 1/10 sulandırım oranını sağlayacak şekilde 300 µl alınır ve üzerine 2700 µl distile su ilave edilir. O.D₆₀₀'de ki hücre yoğunluğu ölçülür. LB buyyon ile son hacim 60 ml olacak şekilde hücre yoğunluğu O.D₆₀₀= 0,1'e ayarlanır. Kültür 37°C'de 100 rpm'de O.D₆₀₀= 0,45-0,55 arasında bir değere ulaşıncaya kadar inkübe edilir. Kültür belirtilen yoğunluğa ulaşıncaya iki Oakridge tüpüne bölünür. 30ml'lik kültürün her biri 4,400 rpm'de 5 dakika boyunca 4°C'de santrifüjlenerek hücreler çöktürülür. Süpernatant dökülür. Pelet üzerine 10 ml 100 mM CaCl₂ solüsyonu ilave edilir. 30 dakika buz içerisinde bekletilir. 4,400 rpm'de 5 dakika 4°C'de santrifüj edilir. Bu aşamada tüpleri sarsmamaya dikkat edilir. Süpernatant dökülür. Pelete 2 ml 100 mM CaCl₂ solüsyonu ilave edilir. En az 2 saat buz içerisinde bekletilen hücreler ya hemen transformasyonda kullanılır ya da daha sonra kullanılmak üzere sıvı nitrojen içerisinde gliserol stoğu hazırlanarak -70°C'de saklanır [37].

2.2.8 Transformasyon

Ligasyonu yapılmış örneğin üzerine hazırlanan kompetant hücreden 50 µl ilave edilir ve karıştırılır, 20 dakika buzda bekletilir. Daha sonra 42°C'deki su banyosunda 50 saniye süreyle sıcak şoku uygulanır (Bu aşamada tüpler kesinlikle sarsılmamalıdır). Derhal buz içerisine alınır

ve 2 dakika bekletilir. Örneğin üzerine oda sıcaklığındaki SOC buyyon'dan 950 µl ilave edilir ve 37°C'de 150 rpm'de 1,5 saat inkübasyonu gerçekleştirilir. Inkübasyon sonrası mavi/beyaz renk ayırımı için örnekten 100 µl ve 500 µl alınarak BSA içeren petrilere ekim yapılır [43].

2.2.9 Koloni PCR

Klonlama sonrası besiyeri üzerinde gelişen beyaz kolonilere 2 ayrı steril kürdan yardımı ile dokunulur, kürdanlardan birisi koloni PCR'ı gerçekleştirmek üzere içerisinde 50 µl steril distile su bulunan bir mikrosantrifüj tüpü içerisine aktarılır. Koloni kalıntısı kürdandan tamamen ayrılincaya kadar kürdan su içerisinde karıştırılır. Daha sonra örnek 10 dakika kaynatılır, 15 dakika 13,000 rpm'de santrifüj edilir. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatantın 10 µl'si kalıp olarak kullanılarak aşağıda şartları verilen reaksiyon gerçekleştirilir.

Taq tamponu	5 µl (enzim ile beraber verilmiştir)
MgCl ₂	3 µl (stok; 25 mM)
dNTP'ler	5 µl (stok; herbiri 10 mM olan dNTP'lerden 10'ar µl ve 10 µl H ₂ O)
Pv3 primeri	1 µl (stok; 50 pmol/µl)
Pv4 primeri	1 µl (stok; 50 pmol/µl)
Kalıp DNA	10 µl
Taq DNA polimeraz	0.5 µl (2.5 ünite) (stok; 5 ünite/µl)
H ₂ O	24,5 µl (son hacim 50 µl olacak şekilde)

Amplifikasyon 94°C'de 1.5 dakika, 55°C'de 2 dakika, 72°C'de 2 dakika ve 45 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

Diğer kürdan ise koloni PCR'dan pozitif sonuç alınması durumunda bu pozitif koloninin stok kültürünün yapılması ve bir sonraki basamak olan altklonlamada kullanılması için amfisilin içeren 5 ml LB buyyon içerisine aktarılır ve 37°C'de 100 rpm'de bir gece inkübe edilir.

2.2.10 Plazmid DNA İzolasyonu

2.2.10.1 Küçük Ölçekli DNA Hazırlanması

LB agar besiyerinde geliştirilmiş bakteri kültüründen tek bir koloni steril bir kürdan yardımıyla içerisinde 100 µg/ml amfisilin içeren 5 ml LB buyyona aktarılır. Hazırlanan kültür

bir gece 37°C’de inkübe edilir. İnkübasyon sonrası bu kültürden 1,4 ml alınır ve 5 dakika süreyle santrifüjlenerek hücreler çöktürülür. Üstteki tabaka (süpernatant) dökülür, altta kalan hücreler 500 µl Miniprep I. Solüsyonda çözülür. Üzerine 250 µl taze hazırlanmış Miniprep II. Solüsyonu ilave edilir. Örnek derhal vortekslenir veya 5-6 kez ters-düz edilmek suretiyle karıştırılır. 68°C’deki su banyosunda 5 dakika süreyle inkübe edilir. İnkübasyon sonrası örnek oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletilir. Uygun sıcaklığa gelince üzerine 200 µl PCI (fenol-kloroform-izoamilalkol) ilave edilir. Çok iyi bir şekilde vortekslenir ve 13,000 rpm’de 15 dakika süreyle santrifüjlenir. Santrifüj sonrası süpernatant temiz bir tüpe alınır. Üzerine 70 µl 4 M NaCl ve 700 µl isopropanol ilave edilir ve vortekslenir. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir. 15 dakika süreyle santrifüjlenir ve süpernatant atılır. Altta kalan çökelti 100 µl steril distile suda çözülür. Daha sonra etil alkol çöktürmesi uygulanır [37].

2.2.10.2 QIAprep Spin Miniprep Kit ile DNA İzolasyonu

Transformasyonu *E. coli* içerisine yapılmış olan *Pv* genomik DNA kütüphaneleri LB agar besiyerinde geliştirilir ve seçilen kolonilerden bir tanesi steril bir kürdan yardımıyla içerisinde 100 mg/ml amfisilin içeren 5 ml LB buyyona aktarılır. Hazırlanan kültür bir gece 37°C’de inkübe edilir. 1,4 ml bir gecelik kültür 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne alınır ve DNA QIAprep® Miniprep kiti kullanılarak izole edilir [44].

2.2.10.3 Wizard®Plus SV Minipreps Kit ile DNA İzolasyonu

Transformasyonu *E. coli* içerisine yapılmış olan *PvLDH* geni LB agar besiyerinde geliştirilir ve seçilen kolonilerden bir tanesi steril bir kürdan yardımıyla içerisinde 100 mg/ml amfisilin içeren 5 ml LB buyyona aktarılır. Hazırlanan kültür bir gece 37°C, 100 rpm’de çalkalamalı etüvde inkübe edilir. 1,5 ml bir gecelik kültür 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne alınır. DNA, Promega Wizard®Plus SV Minipreps kiti kullanılarak izole edilir [45].

2.2.11 DNA Dizi Analizi

PCR sonrası jelden saflaştırılan DNA örneklerinin ve klonlama sonrası elde edilen plazmid DNA’nın dizi analizleri MWG-Biotech Genomic Company, U.K., tarafından gerçekleştirilmiştir [36].

3 BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 *Pf*LDH'in Amino Asit Dizisinin, Amino Asit Dizisi Bilinen Diğer Bazı LDH'lar ile Karşılaştırılması

Bu projenin amacı, *P. vivax* laktat dehidrogenaz (*Pv*LDH) enzimini kodlayan genin izolasyonudur. Çalışmaya başlarken *Pv*LDH enzimini kodlayan genin nükleotid veya amino asit dizileri hakkında herhangi bir bilgi bulunmadığı için bu durumda ilk olarak yararlanılması gereken dizi *Pf*LDH dizisi olmuştur. Proje başlangıcında *P. falciparum* LDH nükleotid ve amino asit dizisi tam olarak bilinen tek *Plasmodium* türü [25] olmakla beraber yapılan bir diğer çalışmada *P. knowlesi* LDH'sinin (*Pk*LDH) NH₂-ucunun ilk 21 amino asidi belirlenmiş ve bunlardan 18 amino asidin *Pf*LDH ve *Pk*LDH arasında aynı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.1) [46].

Tablo 3.1 *Pk*LDH'in NH₂-ucu dizisinin *Pf*LDH'in aynı bölgesiyle karşılaştırılması. Her iki LDH'da da korunmuş olan amino asitler koyu karakterde gösterilmiştir

<i>P. knowlesi</i>	A G/S P K P K I V L V G S G M I G G V M A T
<i>P. falciparum</i>	M A P K A K I V L V G S G M I G G V M A T

P. falciparum ve *P. vivax* aynı cinse ait türler oldukları için LDH dizilerinin benzer olması beklenmekle beraber, benzer olmayabilecekleri ihtimali de olduğu için *Pf* ve *Pk* LDH dizilerine dayanarak sınırlı bir bilgi elde edileceği düşünülmüş ve LDH dizisi bilinen diğer bazı türlerin de dizilerine bakılarak bunlar arasındaki korunmuş bölgeler tespit edilmiştir. *Pv*LDH genini PCR ile amplifiye etmede gerekli olan oligonükleotidlerin tasarımında kullanılacak dizilerin tespiti için bir veritabanı araştırması yapılmıştır [47]. Bu veritabanından; insan LDH'sinin kalp formu (insan-h₄) ve kas (insan-m₄) formları, domuz (domuz-m) ve köpek balığı (köpekb-m) LDH'larının kas formu ile *Bacillus stearothermophilu*'a ait LDH amino asit dizileri temin edilmiş ve bu diziler ClustalW adlı web tabanlı yazılım programı kullanılarak *Pf*LDH ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan dejenere primerler bu karşılaştırma sonucuna göre tasarlanmıştır (Tablo 3.2). 2.1.7.2 alt bölümünde dizileri verilen spesifik primerler ise çalışmaya başlandığı zaman henüz yayınlanmamış olan *P. berghei*'in LDH dizisi V. Winter'dan (2002, yazılı görüşme) temin edilerek *Pf*LDH'in nükleotid dizisi ile karşılaştırılarak tasarlanmıştır.

3.2 Standart Reaksiyon Şartlarının Belirlenmesi

Standart reaksiyon bileşenleri ifadesi PCR'in aşağıda verilen bileşenlerinin tamamının kullanıldığı reaksiyon için verilmiş olup şartlarda yapılan bütün değişimler anlatılan deney için ilgili bölümde verilmiştir. Primer çiftleri metin içerisinde yazılırken ilk yazılan primer daima 5'-ucu primeri ikinci yazılan ise 3'-ucu primeridir.

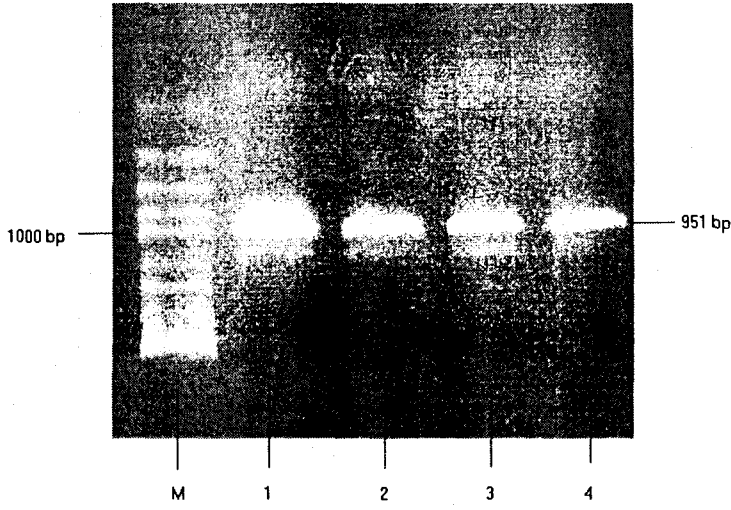
P. vivax LDH'ını kodlayan genin izolasyonu çalışmalarına başlanmadan önce standart PCR şartlarını belirlemek amacı ile kalıp DNA olarak *Pf*LDH kullanılarak kontrol deneyleri yapılmıştır. Kullanılan primer çifti *Pf1-Pf2* olup bu primerler *Pf*LDH'nın 5' ve 3' uçlarına komplementerdir. Reaksiyonlar sırasında sadece $MgCl_2$ konsantrasyonu 1,5–3,0 mM arasında değiştirilmiş olup aşağıda, denemelerde en fazla DNA oluşumu ile sonuçlanan reaksiyonun (Şekil 3.1) bileşenleri verilmiştir:

<i>Taq</i> tamponu	5 µl (enzim ile beraber verilmiştir)
$MgCl_2$	3 µl (stok; 25 mM)
dNTP'ler	5 µl (stok; herbiri 10 mM olan dNTP'lerden 10'ar µl ve 10 µl H_2O)
5' primeri	2.5 µl (stok; 20 pmol/µl)
3' primeri	2.5 µl (stok; 20 pmol/µl)
Kalıp DNA	0.5 µl (stok; 20 ng/µl)
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0.5 µl (2.5 ünite)
dH_2O	31 µl (son hacim 50 µl olacak şekilde)

Amplifikasyon 94°C'de 1.5 dakika, 55°C'de 2 dakika, 72°C'de 2 dakika ve 20 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.1'de görüldüğü gibi en parlak DNA bandı 1,5 mM $MgCl_2$ 'ün kullanıldığı 1 numaralı reaksiyonda oluşmuştur.

*Pv*LDH geninin izolasyonu çalışmalarında, yukarıda verilen standart reaksiyon bileşenlerine bağlı kalınmış olup, elde edilen sonuçlara göre bileşenlerin miktarları ve amplifikasyonun uygulandığı sıcaklık ve süre ile döngü sayısı değiştirilmiştir. Her bir reaksiyonda bu parametreler en iyi DNA bandı elde edilinceye kadar defalarca değiştirilmiş ancak, Bulgular ve Tartışma'da ortaya çıkabilecek muhtemel bir karışıklığı engellemek için sadece net sonuca ulaşılan reaksiyonlar verilmiştir.



Şekil 3.1 Standart reaksiyon şartlarında uygun $MgCl_2$ konsantrasyonunun belirlenmesi. M: Markır (Hyper Ladder I). Hatlar: (1)*PjLDH*, 1,5 mM $MgCl_2$; (2)*PjLDH*, 2,0 mM $MgCl_2$; (3) *PjLDH*, 2,5 mM $MgCl_2$; (4)*PjLDH*, 3,0 mM $MgCl_2$

3.3 *PvLDH* Geninin Genomik Kütüphanelerden İzolasyonu

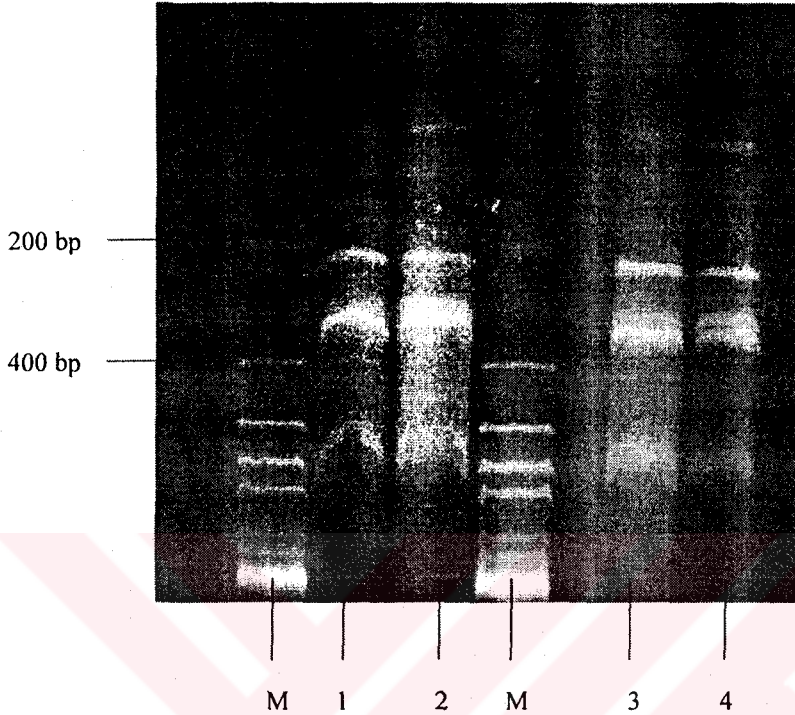
PvSau 3A1 ve *PvEco* RI genomik DNA kütüphanelerinden mini prep metoduyla plazmid DNA elde edilmiş ve dejenere primer çiftlerinin farklı kombinasyonları kullanılarak amplifikasyonlar gerçekleştirilmiştir. Standart reaksiyon bileşenlerine bağlı kalınarak hem, 94°C’de 1.5 dakika, 55°C’de 2 dakika, 72°C’de 2 dakika ve 35 döngü olarak gerçekleştirilen hem de bu sıcaklık ve süre parametrelerinin değiştirildiği diğer amplifikasyonlar sonucunda beklenen büyüklükte bir bant elde edilememiştir.

Şekil 3.2’de oligo2–oligo13 primer çiftlerinin kullanıldığı, $MgCl_2$ konsantrasyonunun 2-2,5 mM olduğu bir amplifikasyon örneği verilmiştir. Bu reaksiyonlar sonucunda 246 baz çifti (bp) büyüklüğünde ürün oluşması beklenmektedir.

Amplifikasyonu takiben örnekler %1’lik agaroz jel üzerinde yürütülmüştür. Reaksiyonların dördünde de beklenen büyüklükte (246 bp) DNA bandı oluşumu gerçekleşmemiş ama çeşitli bantlar görülmüştür. Bant oluşumunun çok fazla olmasının nedeni, primerlerin dejenerasyon katsayısının fazla olmasından ve bunun sonucunda hedef dizi üzerinde birden fazla bölgeyi tanıyarak spesifik olmayan bağlanmalar gerçekleştirmesinden kaynaklanmış olabilir.

Bütün dejenere primerlerin değişik kombinasyonlarda kullanılması ile gerçekleştirilen denemeler sonucunda herhangi bir pozitif sonucun elde edilememiş olması çalışılan genomik

DNA kütüphanelerinin istenen geni temsil etmediği fikrini kuvvetlendirmiş ve bu kütüphaneler ile yapılan çalışmalara son verilmiştir.



Şekil 3.2 Genomik kütüphaneler ile amplifikasyonda ürün oluşumunun görüntülenmesi. M: Markır (Hyper Ladder I). hatlar; (1) *PvSau* 3AI-2,0 mM MgCl₂, (2) *PvSau* 3AI-2,5 mM MgCl₂ (3) *PvEco* RI-2,0 mM MgCl₂ (4) *PvEco* RI-2,5 mM MgCl₂

3.4 *PvLDH* Geninin İnfekte Kan Örneklerinden İzolasyonu

Genomik DNA kütüphanelerinin amplifikasyonu denemelerinden pozitif bir sonuç alınamaması sebebiyle, Diyarbakır Sıtma ve Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Eğitim Merkezine baş ağrısı, yüksek ateş, iştahsızlık, mide bulantısı ve kusma şikayetleri ile gelen hastalardan Materyal ve Metod'da belirtilen şekilde kan örnekleri alınmıştır. Yine aynı Merkez'in laboratuvarı'nda hazırlanan kalın damla ve ince yayma preparatların incelenmesi alınan kan örneklerinin *P. vivax* ile infekte edildiğini ispatlamıştır. Laboratuvara getirilen kan örneklerinden DNA saflaştırıldıktan sonra hem dejenere hem de spesifik primerler kullanılarak amplifikasyonlar gerçekleştirilmiş ve pozitif sonuçlar elde edilmiştir.

3.4.1 Dejenere Primerler Kullanılarak *Pv*LDH'ı Kodlayan Genin Amplifikasyonunun Yapılması

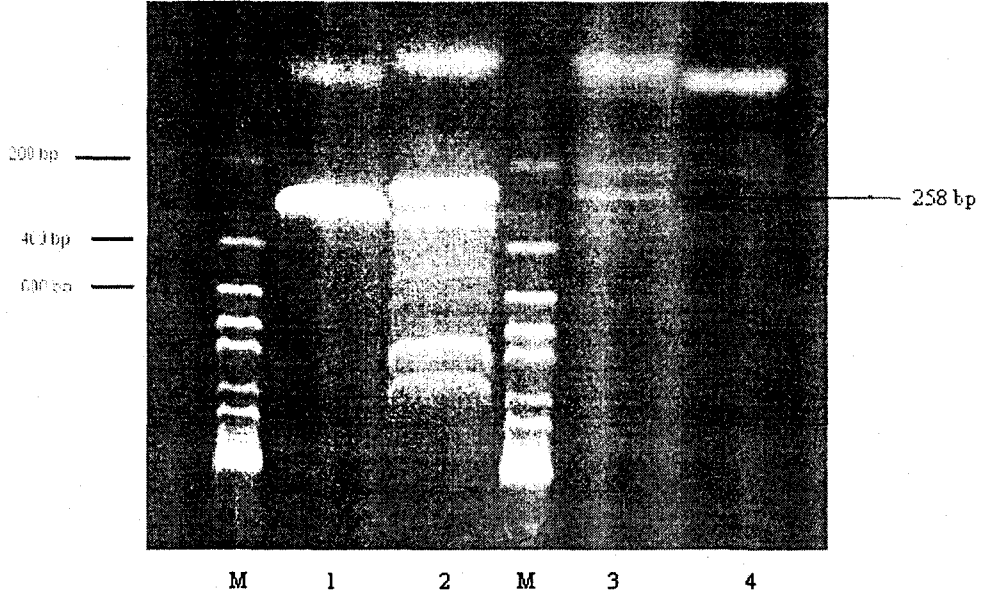
P. vivax ile infekte olan kan örneklerinden Kain ve ark. [39] göre genomik DNA izole edilmiş ve amplifikasyon için bu DNA'nın 5µl'si kalıp olarak kullanılmıştır. Amplifikasyon, standart reaksiyon bileşenleri kullanılarak 95°C'de gerçekleştirilen 5 dakikalık bir öndenatürasyon sonrası, 94°C'de 30 saniye, 42°C'de 30 saniye, 72°C'de 3 dakika, 45 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonların tamamı 3,5 mM MgCl₂ konsantrasyonunda yapılmış olup, primer çiftleri olarak *Pf*1-oligo13, oligo1-oligo13 kullanılmıştır.

*Pf*1 – oligo 13 primer çifti ile yapılan amplifikasyon sonucunda 285 bp, oligo1 – oligo13 primer çifti ile yapılan amplifikasyon sonucunda da 258 bp büyüklüğünde DNA bandı oluşumu beklenmektedir. Elde edilecek bantların büyüklüğünü net olarak tespit edebilmek amacı ile markıra ilave olarak kontrol grubu olacak amplifikasyonlar da gerçekleştirilmiştir. *Pf*LDH plazmid DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı reaksiyonlarda *Pf*1-oligo13 ve oligo1 – oligo13 primer çiftlerinin her ikisiyle de amplifikasyon yapılmış ve bu örnekler de aynı jel üzerinde yürütülmüştür (Şekil 3.3).

Şekil 3.3 incelendiği zaman her iki kontrol grubunun da çok iyi bir şekilde çalıştığı ve istenen büyüklükte DNA bantlarının oluştuğu görülmektedir. Kalıp olarak *Pv* genomik DNA, primer olarak da oligo1-oligo13 çiftinin kullanıldığı (3) nolu hatta da istenen büyüklükteki bir DNA bandının (258 bp) varlığı görülmektedir. Bandın büyüklüğünün doğruluğu markır ile karşılaştırılarak kontrol edilebileceği gibi tam olarak 258 baz çifti büyüklüğünde olan (2) nolu hattaki DNA bandı ile karşılaştırılarak da tespit edilebilmektedir.

Muhtemel bant, dizi analizi için MWG-Biotech'e gönderilmiş olup herhangi bir olumlu sonuç elde edilememiştir. Bunun sebeplerinden birisi, amplifikasyon ürününün dizi analizi için yeterli konsantrasyonda olmamasıdır. Diğer ise kullanılan primerlerin kalıp DNA ile çok düşük oranlarda etkileşmiş olması olabilir. Verimli bir PCR'ın temel unsurları hedef diziye komplementer primerlerin varlığını gerekli kılar. Hedef DNA dizisi hakkında hiçbir bilgi olmadığı için primerlerin yüksek dejenerasyon oranında tasarlanması ve bunun sonucunda amplifikasyon sırasında primerlerin düşük özgüllük düzeylerinde olması bu zayıf etkileşime sebep olabilir.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

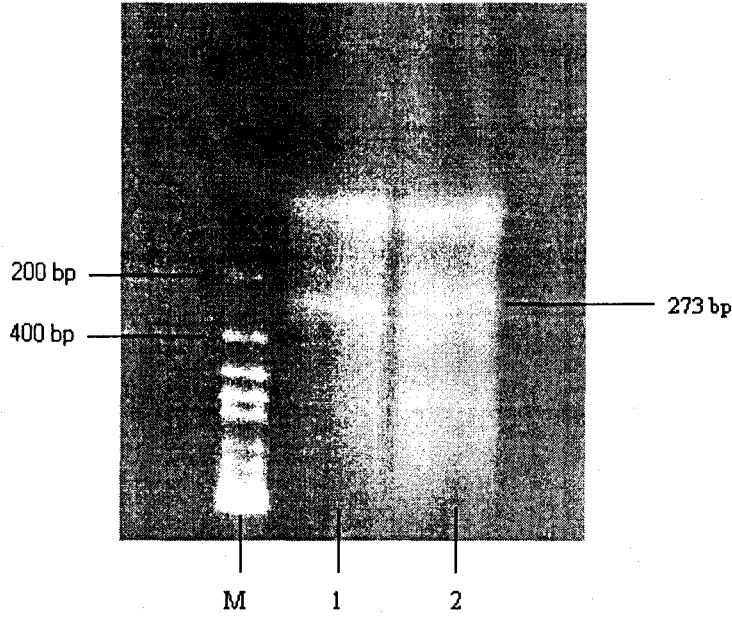


Şekil 3.3 Dejenere primerler ile amplifikasyon. M: Markır (Hyper Ladder I).
Hatlar: (1) *Pj*LDH, *Pj*I - Oligo 13; (2) *Pj*LDH, Oligo 1 - Oligo 13;
(3) *Pv* genomik DNA, Oligo 1- Oligo 13; (4) *Pv* genomik DNA, *Pj*I -Oligo 13.

3.4.2 Spesifik Primerler Kullanılarak *Pv*LDH'ı Kodlayan Genin Amplifikasyonunun Yapılması

Genomik kütüphaneler ve dejenere primerlerle gerçekleştirilen amplifikasyon denemeleri neticesinde elde edilen sonuçların somut verilere dönüştürülememeleri *P. berghei*'in LDH nükleotid dizisinin V. Winter (yazılı görüşme, 2002) tarafından tanımlanmasıyla eş zamanlı olmuştur. Bu dizi Winter'dan temin edilmiş 2.1.7.2'de değinildiği üzere, LDH nükleotid dizisi bilinen iki *Plasmodium* türü (*P. falciparum* ve *P. berghei*) arasında yüksek oranda korunmuş olan bölgeler dikkate alınarak 10 spesifik primer tasarlanmış ve bunlar değişik kombinasyonlarda kullanarak amplifikasyonlar gerçekleştirilmiştir.

Standart reaksiyon bileşenleri kullanılarak oligo16-oligo25 primer çifti (273 bp) ile 95°C'de gerçekleştirilen 5 dakikalık bir öndenatürasyon sonrası, 94°C'de 30 saniye, 42°C'de 30 saniye, 72°C'de 3 dakika, 45 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. MgCl₂ konsantrasyonu 3,0-4,5 mM aralığında, kalıp DNA miktarı ise 2,5-15 µl aralığında değişik oranlarda kullanılmış ve optimum MgCl₂ konsantrasyonu 4,0 mM, kalıp DNA miktarı ise 5 µl olarak belirlenmiştir (Şekil 3.4). (Parantez içinde verilen değer, bu primer çiftinin kullanılması sonucunda oluşması beklenen ürünün büyüklüğünü ifade etmektedir.)



Şekil 3.4 Oligo16–oligo25’in kullanılmasıyla elde edilen 273 bp’lik PCR ürünü.
M: Markır (Hyper Ladder I). Hatlar: (1) ve (2) Oligo 16 – oligo 25 (273 bp).

Amplifikasyon sonrası %1’lik agaroz jelde yürütülmüş muhtemel 273 bp’lik DNA örneği jelden geri alınmış ve dizi analizi için MWG-Biotech’e, U.K., gönderilmiştir.

273 bp’lik DNA örneğinin dizi analizi sonucunda dizinin tamamı okunabilmiştir. Okunan bu dizi *P. falciparum* LDH’ı ve dizisi bilinen diğer LDH’lar ile karşılaştırılmış ve amplifikasyonu yapılan DNA parçasının *Plasmodium vivax* LDH’ına ait olduğu tespit edilmiştir.

İnfekte kan örneklerinden sadece 273 bp’lik DNA’nın izolasyonu değil *P. vivax* LDH geninin tamamının izolasyonu da gerçekleştirilmiş, fakat daha sonraki reaksiyonlarda PCR ile amplifikasyon için gerekli olan DNA konsantrasyonuna ulaşamadığı için reaksiyon tekrarlanamamıştır. Bu sebeple bu reaksiyon şartları ve jel görüntüleri verilmemiştir.

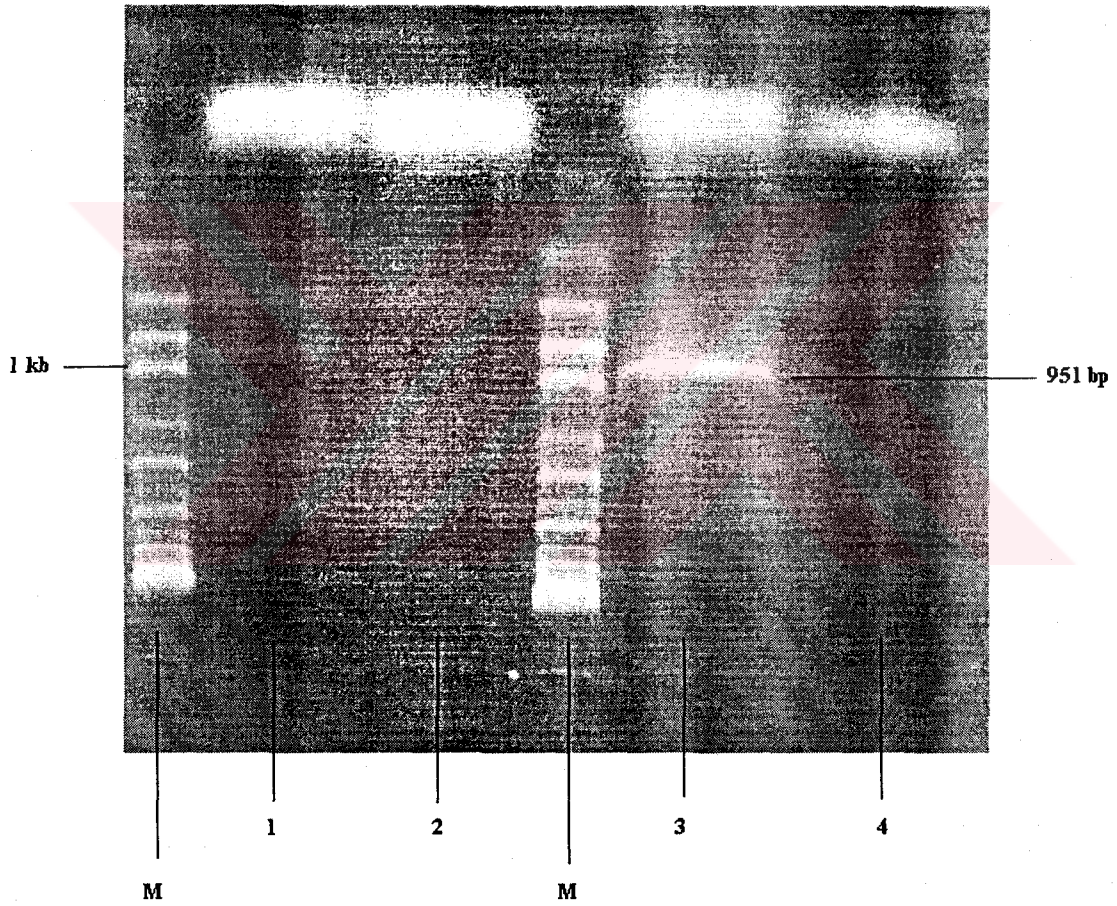
3.5 PvLDH Geninin Tam Uzunluğunun *P. vivax* Belem Soyu Genomik DNA’sından İzolasyonu ve Klonlanması

P. vivax’ın laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan geninin amplifikasyonu çalışmaları sürerken TIGR (The Institute for Genome Research) veritabanından [48] *P. vivax* LDH’ına ait veriler temin edilmiş ve eldeki veriler ışığında 4 adet yeni primer sentezlenmiştir (*Pv1*, *Pv2*, *Pv3*, *Pv4*). Bu primerlerden *Pv1*, *PvLDH* geninin 5’ ucunun tamamlayıcısı olup *Eco* RI, *Pv2* ise 3’ ucunun tamamlayıcısı olup *Pst* I restriksiyon enzimi kesim bölgelerini taşımaktadırlar. *Pv3*

primeri yine *PvLDH* geninin 5' ucunun, *Pv4* ise 3' ucunun tamamlayıcısı olup herhangi bir restriksiyon enzimi kesim bölgesini taşımamaktadırlar.

PvBelem genomik DNA'sının *Pv1-Pv2* ve *Pv3-Pv4* primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilen amplifikasyonu çalışmalarında enzim olarak *Taq* ve *AmpliTaq* DNA polimeraz enzimleri kullanılmış olup sadece *AmpliTaq* ile gerçekleştirilen reaksiyondan pozitif sonuç alınabilmektedir.

PCR sonrası örnekler %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 3.5). *Pv1-Pv2* primer çifti ile gerçekleştirilen reaksiyon (1. hat) çalışmamış, *Pv3-Pv4* primer çifti ile gerçekleştirilen reaksiyonda muhtemel pozitif bant (3. hat) görülmüştür.



Şekil 3.5 *PvBelem* genomik DNA kullanılarak spesifik primer çiftleri ile *PvLDH* geninin amplifikasyonu. M: Markır (Hyper Ladder I). Hatlar: (1) *Pv1-Pv2* (948 bp); (2) *Pv1-Pv2* Negatif kontrol; (3) *Pv3-Pv4* (951 bp); (4) *Pv3-Pv4* Negatif kontrol.

Pv1-Pv2 primer çifti ile gerçekleştirilen reaksiyonunun çalışmamasının nedeni bu primerlerin 5' uçlarına ilave edilen *Eco* RI ve 3' ucuna ilave edilen *Pst* I restriksiyon enzimi kesim bölgesi ve bu bölgelerin tanınmasını sağlayacak ilave nükleotidlerin primerin hedef diziye olan özgüllüğünü kısıtlaması olabilir.

3. hattaki muhtemel pozitif bant jelden kesilerek alınmış, saflaştırılmış ve pGEM®-T Easy vektör içerisine klonlanmıştır. Koloni PCR ile istenen genin klonlandığına dair ön bir doğrulama yapılmıştır.

Koloni PCR sonucunda pozitif olarak tespit edilen koloninin bir gece geliştirilmiş olan stok kültüründen Wizard Plus SV Minipreps kit ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve dizi analizinin yapılması için MWG-Biotech'e gönderilmiştir. pGEM®-T Easy vektör içerisine aktarılan *PvLDH* DNA'sının tam uzunluğunun çift yönde dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi neticesinde okunan bu dizi *PfLDH* ve dizisi bilinen diğer LDH'lar ile karşılaştırılmıştır. Bütün LDH'ların karakteristiği olan katalitik amino asitlerin *PvLDH* da da bulunduğu tespit edilmiş ve böylece klonlanan DNA parçasının *P. vivax* LDH'ı olduğu ispatlanmıştır.

3.6 *PvLDH* Geninin Nükleotid ve Amino Asit Dizisinin Analizi

Sonuçlarda karışıklığa sebep olmamak için bu altbölümde analiz sonuçları *PvLDH* geninin nükleotid dizisinin analizi ve *PvLDH* geninin amino asit dizisinin analizi olarak iki ayrı başlık altında ele alınacaktır.

3.6.1 *PvLDH* Geninin Nükleotid Dizisinin Analizi

İzolasyonu ve klonlanması gerçekleştirilen *PvLDH*'ı kodlayan genin nükleotid dizisi Tablo 3.3'te verilmiştir.

P. vivax laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen 951 nükleotid (316 amino asit) içermektedir. *PfLDH*'da olduğu gibi [25] *PvLDH*'ı kodlayan gende intron içermemektedir. *PvLDH*, ATG kodonu ile başlayıp TTA kodonu ile sonlanmaktadır.

PvLDH geninin nükleotid dizisi elde edildikten sonra veriler Gene Tool Lite 1.0 isimli yazılım programı ile değerlendirilmiştir.

Tablo 3.3 *PvLDH*'ı kodlayan genin nükleotid dizisi.

```

ATGACGCCGAAACCCAAAATTGTGCTCGTCGGGTCGGGCATGATCGGAGGCGTGATGGCC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACTGCGGCTTTGGGTTTAAACACGAGCAGCCAGCCCGTACTAGCCTCCGCACTACCGG

ACGCTGATTGTGCAGAAGAACCTGGGGGACGTAGTGATGTTTGACGTAGTGAAAAACATG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
TGCCTACTAACACGTCTTCTTGGACCCCTGCATCACTACAACTGCATCACTTTTTGTAC

CCCCAAGGAAAGGCACTAGATACGTCTCACTCGAATGTGATGGCTTATTCCAATTGCAAG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GGGGTTCCTTTCCGTGATCTATGCAGAGTGAGCTTACACTACCGAATAAGGTTAACGTTC

GTGACTGGCTCGAACTCGTATGATGACTTGAAGGGAGCCGACGTGGTGATCGTCACTGCG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CACTGACCGAGCTTGAGCATACTACTGAACTCCCTCGGCTGCACCACTAGCAGTGACGC

GGATTTACTAAAGCACCAGGAAAGAGCGACAAGGAATGGAACCGAGATGATTTACTCCCC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCTAAATGATTTTCGTGGTCCTTTCTCGCTGTTCTTACCTTGGCTCTACTAAATGAGGGG

TTGAATAACAAAATTATGATTGAGATTGGGGGACATATTAAGAACCTTTGCCCCAATGCC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
AACTTATTGTTTTAATACTAACTCTAACCCCTGTATAATTCTTGAAACGGGGTTACGG

TTTATCATTGTGGTGACGAACCCAGTGGACGTGATGGTGCAGTTACTCTTCGAGCATTC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
AAATAGTAACACCACTGCTTGGGTACCTGCACTACCACGTCAATGAGAAGCTCGTAAGG

GGAGTCCCAAAAAATAAAATCATCGGATTAGGTGGTGTGCTAGATACATCTAGACTGAAA
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
CCTCAGGGTTTTTTTATTTTAGTAGCCTAATCCACCACACGATCTATGTAGATCTGACTTT

```

TATTACATATCGCAGAAGTTGAACGTCTGCCCCGAGAGATGTTAATGCACTCATTGTGCGT
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
ATAATGTATAGCGTCTTCAACTGCAGACGGGCTCTCTACAATTACGTGAGTAACAGCCA

GCACATGGGAACAAGATGGTTCTCCTGAAAAGGTACATCACAGTTGGAGGTATCCCATTG
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
CGTGTACCCTTGTTCTACCAAGAGGACTTTTCCATGTAGTGTCAACCTCCATAGGGTAAC

CAAGAATTTATTAATAACAAAAAGATTACAGATGAAGAAGTGAAGGCATATTTGATCGC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
GTTCTTAAATAATTATTGTTTTTCTAATGTCTACTTCTTCACCTCCGTATAAACTAGCG

ACTGTCAACACTGCTTTGGAGATTGTGAACCTCCTTGCCTCTCCTTATGTTGCCCCAGCT
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
TGACAGTTGTGACGAAACCTCTAACACTTGGAGGAACGGAGAGGAATACAACGGGGTCTGA

GCTGCCATCATCGAAATGGCCGAATCTTATTTGAAGGATATAAAGAAAGTGCTTGTTTGT
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
CGACGGTAGTAGCTTTACCGGCTTAGAATAAACTTCCTATATTTCTTTCACGAACAAACA

TCCACTCTACTAGAGGGACAATACGGCCACAGCAACATCTTTGGTGGTACTCCTCTCGTT
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
AGGTGAGATGATCTCCCTGTTATGCCGGTGTCTGTTGTAGAAACCACCATGAGGAGAGCAA

ATCGGGGGCACCAGGAGTTGAGCAAGTCATCGAGTTGCAGCTGAATGCCGAGGAGAAGACC
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
TAGCCCCCGTGGCCTCAACTCGTTCAGTAGCTCAACGTGCGACTTACGGCTCCTCTTCTGG

AAGTTCGACGAGGCAGTTGCGGAGACTAAAAGGATGAAGGCGCTCATTTAA
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 951
TTCAAGCTGCTCCGTCAACGCCTCTGATTTTCCTACTTCCGCGAGTAAATT

3.6.1.1 PvLDH Geninde Her Bir Nükleotidin Kullanım Sıklığı

Tablo 3.4'te PvLDH geninde her bir nükleotidin kullanım sıklığı verilmiştir

Tablo 3.4 PvLDH geninde her bir nükleotidin kullanım sıklığı.

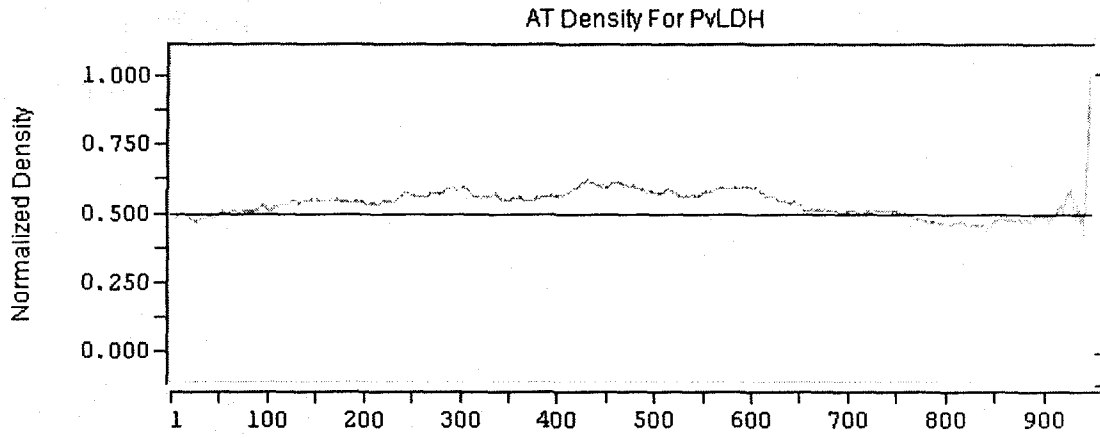
	A (Adenin)	T (Timin)	G (Guanin)	C (Sitozin)
Sayı	273	233	250	192
%	28,8	24,6	26,4	20,3

PvLDH geninde ise adenin 341 (%35,9), timin 296 (%31,1), sitozin 127 (%13,4) ve guanin 187 (%19,7) pozisyonunda kullanılmıştır. *P. vivax* ve *P. falciparum* arasında nükleotid kullanım oranları açısından yapılan kıyaslamada; *P. vivax*'ın *P. falciparum*'a oranla adenin ve timin nükleotidlerini kullanım sayısının daha az olduğu, buna karşın guanin ve sitozin nükleotidlerini kullanım sayısının daha fazla olduğu görülmüştür. *P. vivax*'ın guanin ve sitozin nükleotidleri açısından zengin oluşu yapılacak olan amplifikasyon çalışmalarında yüksek denatürasyon ve bağlanma sıcaklıklarının seçilerek spesifik amplifikasyonların gerçekleştirilmesini mümkün kılacaktır. Gene Tool Lite 1.0 isimli yazılım programı ile yapılan hesaplamalar bu düşüncüyü kanıtlar yönde sonuç vermiş, *P. vivax* çift sarmalının erime sıcaklığı (Tm) 78°C, *P. falciparum* çift sarmalının erime sıcaklığı 72°C olarak hesaplanmıştır

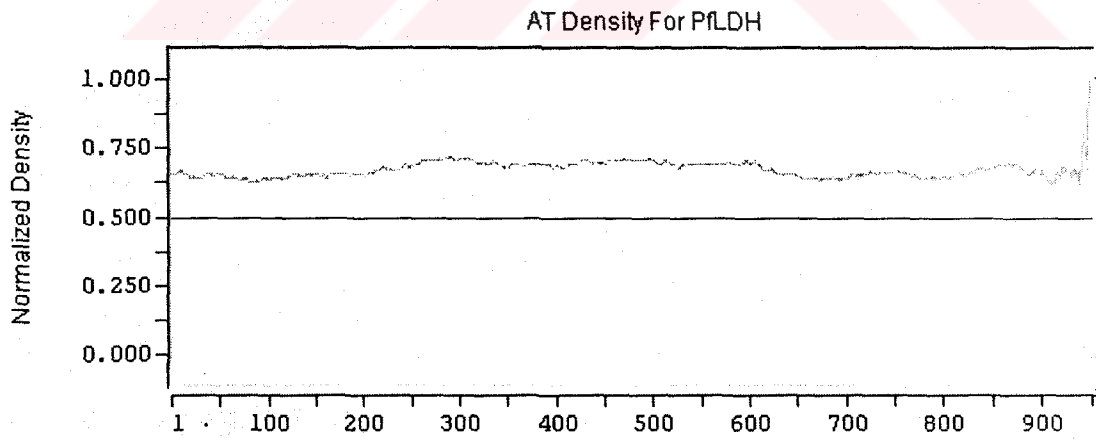
3.6.1.2 PvLDH'in AT ve GC Yoğunlukları

P. vivax ve *P. falciparum* LDH genlerinin AT ve GC yoğunlukları yine Gene Tool Lite 1.0 isimli yazılım programı ile değerlendirilmiş ve elde edilen grafikler PvLDH'in AT yoğunluğu Şekil 3.6'da, PvLDH'in AT yoğunluğu Şekil 3.7'de, PvLDH'in GC yoğunluğu Şekil 3.8'de ve PvLDH'in GC yoğunluğu Şekil 3.9'da verilmiştir.

Şekil 3.6 PvLDH'in AT yoğunluğu.

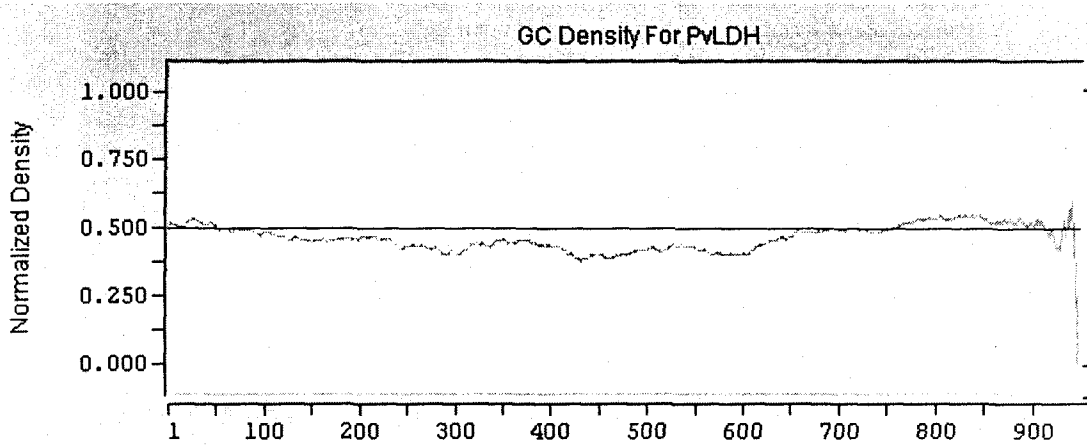


Şekil 3.7 P/LDH'in AT yoğunluğu.

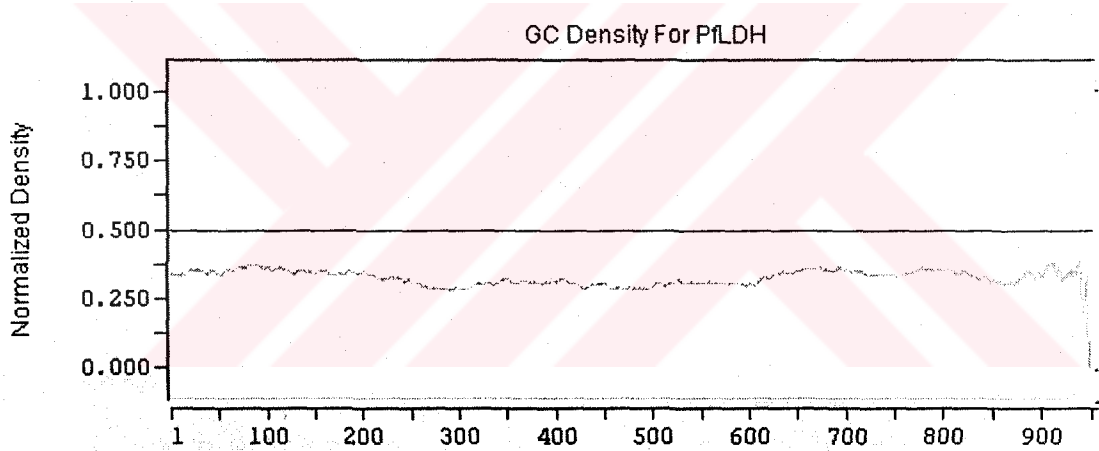


T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Şekil 3.8 *PvLDH*'ın GC yoğunluğu.



Şekil 3.9 *PfLDH*'ın GC yoğunluğu.



Genel olarak *PvLDH* ve *PfLDH* AT bakımından zengindirler. Ama grafiklerde de görüldüğü gibi *P. vivax*'ın *P. falciparum*'a oranla AT yoğunluğunun daha az, GC yoğunluğu ise daha fazladır. *P. vivax*'ın %GC yoğunluğu %46,6 iken *P. falciparum*'da bu oran %33'tür. *PvLDH* geni için yapılan değerlendirmede *PvLDH* geninin ortalarına doğru %GC yoğunluğunun azaldığı belirlenmiştir. Bununla beraber *PfLDH*'a oranla genin başında ve sonunda %GC yoğunluğunun oldukça arttığı görülmektedir. %AT yoğunluğu açısından yapılan değerlendirmede ise %GC yoğunluğu ile ters orantılı olarak %AT yoğunluğunun genin ortalarına doğru artış gösterdiği yine de eşdeğeri olan bölge ile kıyaslandığı zaman *PvLDH*'ın daha düşük %AT yoğunluğuna sahip olduğu görülmektedir. *P. vivax* LDH geninin baş ve son kısmında %GC yoğunluğunun yüksek olması hem bu gen ile gerçekleştirilecek amplifikasyon

çalışmalarında spesifik ve yüksek erime ısısına sahip primerlerin tasarlanabilmesini mümkün kılması açısından hem de guanin ve sitozin nükleotidleri arasında üç hidrojen bağı bulunması sebebiyle daha kararlı yapı oluşturması bakımından önemlidir. Ayrıca yüksek %GC yoğunluğu termostabilitenin de göstergesidir.

Genel olarak *P. vivax*'tan izole edilen genlerin %GC yoğunluğunun diğer bazı *Plasmodium* türlerindeki eşdeğerlerinden daha yüksek olduğu bilinmektedir. Örneğin; Valin sentetaz enzimini kodlayan gen hem *P. vivax*'tan hem de *P. knowlesi*'den izole edilmiş ve *P. vivax*'taki %GC oranı %54,7, *P. knowlesi*'deki oran ise %46,7 olarak tespit edilmiştir [49].

3.6.1.3 PvLDH Geninde Dinükleotidlerin Kullanım Sıklığı

P. vivax ve *P. falciparum* LDH genlerinin dinükleotidleri kullanım sıklığı Tablo 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3.5 *P. vivax* ve *P. falciparum* LDH genlerinin dinükleotidleri kullanım sıklığı.

		AA	CA	GA	TA	AC	CC	GC	TC	AG	CG	GG
Pv	Sayı	84	57	90	41	53	45	47	47	62	42	62
	%	8,9	6,0	9,5	4,3	5,6	4,8	5,0	5,0	6,5	4,4	6,5
Pf	Sayı	124	60	63	93	45	23	32	27	65	7	37
	%	13,1	6,3	6,6	9,8	4,7	2,4	3,4	2,8	6,8	0,7	3,9
		TG	AT	CT	GT	TT						
Pv	Sayı	84	74	48	51	60						
	%	8,9	7,8	5,1	5,4	6,3						
Pf	Sayı	78	106	37	55	98						
	%	8,2	11,2	3,9	5,8	10,3						

P. vivax ve *P. falciparum* LDH genleri dinükleotidleri kullanma oranları açısından karşılaştırıldığı zaman iki tür arasında özellikle bazı dinükleotid çiftlerinin kullanım sıklığının büyük oranlarda farklılaştığı görülmüştür. CG dinükleotidinin *PvLDH*'da %3,7 oranında daha fazla kullanıldığı tespit edilmiştir. Buna karşılık TA dinükleotidinin %4,5, AA'nın %4,2, TT'nin %4 ve AT dinükleotidinin %3,4 oranında *PfLDH* geninde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Diğer dinükleotidlerin kullanım sıklığının iki tür arasında yakınlık gösterdiği görülmüştür. Bu, sonuçta yine *PvLDH* geninin GC yoğunluğunun *PfLDH* genine göre daha fazla olduğunun göstergesidir.

3.6.2 PvLDH Geninin Amino Asit Dizisinin Analizi

PvLDH bilinen diğer plazmodiyal LDH'lar (*Pf*LDH, *Pb*LDH, *Py*LDH) ve insan LDH'nin her iki formu (H_4 ve M_4) ile karşılaştırılmıştır. LDH dizilerinin karşılaştırılması DNASTar ve ClustalW isimli yazılım programları ile gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırma neticesinde PvLDH'nin amino asit düzeyinde *Pf*LDH ile %90,1, *Pb*LDH ile %90,8, *Py*LDH ile %90,5, insan- M_4 LDH'ı ile %26 ve insan- H_4 LDH'ı ile %25 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir. Dizi karşılaştırması Tablo 3.6'da verilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi diğer tüm LDH'lar gibi PvLDH'da katalizlemede görevli olan arjinin-171 (pirüvatı bağlar), aspartat-168 ve histidin-195 (proton verici amino asitler), arjinin-109 (pirüvatın karbonil bağını polarize eder) anahtar amino asitlerini içerir. Bu da bize klonlanan genin PvLDH geni olduğunu ispatlar.

Tablo 3.6 P_vLDH ve diğer bazı LDH'ların amino asit dizi karşılaştırması. Katalitik amino asitler altı çizili, P_vLDH ve P_lLDH'da korunmuş amino asitler koyu karakterde yazılmıştır. İnsan LDH'ında "m" LDH'ın kas formunu, "h" ise LDH'ın kalp formunu temsil etmektedir.

	1	2729	32	48	53	61	65	72	76	85
<i>P. vivax</i>		MT PKPKIVLVGSGMIGGVNATLIVQKNLGD.	VVMEFVYKNNPQGGKALDTSHTNVNMAYSNCKV	TG	SN	SYDD	LK	GAD	VVI	
<i>P. falciparum</i>		MA PKAKIVLVGSGMIGGVNATLIVQKNLGD.	VVLFDIVKNNPHGKALDTSHTNVNMAYSNCKV	SG	SN	TYDD	LAGAD	VVI		
<i>P. berghei</i>		M	APKAKIVLVGSGMIGGVNATLIVQKNLGD.	VVMEFVYKNNPHGKALDTSHTNVNMAYSNCKV	SG	SN	TYDD	LKDAD	VVI	
<i>P. yoleii</i>		M	APKAKIVLVGSGMIGGVNATLIVQKNLGD.	VVLFDIVKNNPHGKALDTSHTNVNMAYSNCKV	SG	SN	TYDD	LKDAD	VVI	
man-m		ATLKDQLIYNL.	LKEEQTPQNKITVVGVGAVGMACAISILMKDLADELALVDVIEDKLGEMMDLQHGSLFL.	RTPKIVSGKDVNVTANSK	LVI					
man-h		ATLKEKLIAPVAEEETVPNNKITVVGVGQVGMACAISILGKSLADELALVDVLEDDKLGEMMDLQHGSLFL.	QTPKIVADKDYSVTANSK	IVV						
	96	109								
<i>P. vivax</i>		VTAGFTKAPGKSDKEWNRDDLLPLNNKIMIEIGGHIK	KNLCPNAFIIVVTNPVDMVQQL	FEH	HSGV	PKNKII	IGLGGV	LDT	SR	LKYYISQKLN
<i>P. falciparum</i>		VTAGFTKAPGKSDKEWNRDDLLPLNNKIMIEIGGHIK	KNCPNAFIIVVTNPVDMVQQL	HQ	HSGV	PKNKII	IGLGGV	LDT	SR	LKYYISQKLN
<i>P. berghei</i>		VTAGFTKAPGKSDKEWNRDDLLPLNNKIMIEIGGHIK	KNCPNAFIIVVTNPVDMVQQL	HQ	HSGV	PKNKII	IGLGGV	LDT	SR	LKYYISQKLN
<i>P. yoleii</i>		VTAGFTKAPGKSDKEWNRDDLLPLNNKIMIEIGGHIK	KNCPNAFIIVVTNPVDMVQQL	HQ	HSGV	PKNKII	IGLGGV	LDT	SR	LKYYISQKLN
man-m		ITAGARQQEGES.		R	NL	VQRNVN	IFKFI	P	NV	VKYS
man-h		VTAGVRQQEGES.		R	NL	VQRNVN	VF	KFI	P	QIVK
	185	195								
<i>P. vivax</i>		RDVNA	LIVGAHGNKMVLLKRYITVGGIPLQ	EFFINNK.	K	I	TD	E	E.	V
<i>P. falciparum</i>		RDVNA	LIVGAHGNKMVLLKRYITVGGIPLQ	EFFINNK.	L	I	S	D	A	E.
<i>P. berghei</i>		RDVNA	LIVGAHGNKMVLLKRYITVGGIPLQ	EFFINNK.	K	I	TD	Q	E.	L
<i>P. yoleii</i>		RDVNA	LIVGAHGNKMVLLKRYITVGGIPLQ	EFFINNK.	K	I	TD	Q	E.	L
man-m		LSCHGW	VLGEHGDSSVPVWSGMNVAGVSLKTLHPDLGLGDKDEQWKEVHKQV	VESAYE	V	I	K	L	G	Y
man-h		SSCHGW	ILGEHGDSSVAVWWSGMNVAGVSLQELNPEMGTNDSENWKEVHKMV	VESAYE	V	I	K	L	G	Y
	275									
<i>P. vivax</i>		LEGQY	GHS.	N	I	F	G	G	TP	L
<i>P. falciparum</i>		LEGQY	GHS.	D	I	F	G	G	TP	L
<i>P. berghei</i>		LEGQY	GHS.	D	I	F	G	G	TP	L
<i>P. yoleii</i>		LEGQY	GHS.	D	I	F	G	G	TP	L
man-m		IKGLY	GIKDDVFLSVPCILQNGISDLVKVTLTSEEEARLKK	SADTLW	G	I	Q	K	E	L
man-h		VKGM	YIENEVFLSLPCILNARGLT	SVINQ	LKDD	E	V	A	Q	L

PvLDH insan *LDH*'ı ile karşılaştırıldığı zaman bazı tek amino asit delesyonları ve insersiyonların varlığı görülmektedir. Glutamat-48 ve glisin-217 bahsedilen iki delesyondur. *PvLDH* da 73. ve 74. amino asitler arasında bir tirozin insersiyonu içermektedir. Aynı zamanda insan *LDH*'ından farklı olarak *PvLDH* enziminin aktif bölge halkasında serin-108 ve arjinin-109 amino asitleri arasında 5 amino asit insersiyonu mevcuttur. Bunlar sırasıyla DKEWN (Aspartik asit- lizin- glutamik asit- triptofan- asparjin) amino asitleridir. *PvLDH*, *PfLDH*'dan 31, *PbLDH*'dan 29 ve *PyLDH*'dan ise 30 amino asit pozisyonunda farklıdır. *PvLDH* insan *LDH*'ından farklı olarak plazmodiyal *LDH*'lar arasında korunmuş olan önemli bazı amino asitlere sahiptir. *PvLDH* 163. pozisyonunda serin yerine lösin, 246. pozisyonunda threonin yerine prolin, 250. pozisyonunda izolösin yerine yine bir prolin amino asidini içermektedir. 163. amino asit aktif bölgenin nikotinamid bağlanma cebinde bulunur ve serin yan zincirinin, kofaktörün amid grubu ile etkileşimi kristallografi çalışmaları ile gösterilmiştir [19, 50, 51]. Bu amino asit değişikliği *PfLDH*'ın APAD ile etkileşimini sağlar [33, 52]. *PfLDH*'ın kinetik özellikleri arasında yer alan APAD adlı koenzimi daha hızlı kullanabilme yeteneğinin ve ortamda biriken substrat fazlalığından etkilenmemesinin 163. amino asitte sahip olduğu özellikten kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı zamanda diğer *LDH*'lardan farklı olarak NADH kofaktörünün bağlanma cebinin farklı bir konumda bulunmasının nedeni olarak da bu amino asit değişikliği gösterilmektedir. *PfLDH*'da NADH yaklaşık olarak 1 Angstrom 163. elemana doğru ilerlemiştir. Bu özellik plazmodiyal *LDH*'a özgüdür ve lösin 163 proteinin kinetik özelliklerini etkilemektedir. *PvLDH*'da da 163. pozisyonunda lösin amino asidi bulunması sebebiyle benzer yaklaşımların *PvLDH* içinde geçerli olabileceği düşünülmektedir.

PvLDH da *PfLDH* gibi 5 amino asit insersiyonuna sahiptir. *PfLDH* ile yapılan yapısal kristallografi çalışmaları [33] memeli *LDH*'ından farklı olarak bu ilave 5 amino asidin enzimin aktif bölgesinde bir yarık oluşturduğunu göstermiştir. Bu yarık yeni antimalariaların tasarlanmasında hedef bölge olarak tanımlanmıştır [33, 34]. Bu 5 amino asit ilavesinin varlığı *LDH* dizisi bilinen bütün plazmodiyal *LDH*'larda gösterilmiştir. Bu *PfLDH*'a uygulanan çalışmaların *PvLDH*'a da uygulanabileceği fikrini desteklemektedir.

Yapılan çalışmalarda *PfLDH* klorokin için potansiyel hedef olarak belirlenmiştir [53, 54]. *PfLDH* ve klorokin arasında oluşan kompleksin yapısı analiz çalışmaları ile tanımlanmış [35] ve klorokinin enzim üzerine olan inhibitör etkisi gösterilmiştir. *PfLDH*'ın aktif bölge halkasında yer alan 5 amino asit ilavesinin *PvLDH*'da da görülmesi klorokin ve diğer inhibitörlerin *PvLDH* içinde inhibitör olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Yapılan bir diğer çalışmada da *PfLDH* ve *PbLDH* amino asit dizisi arasındaki farklılığın üç boyutlu yapı üzerine çok az etkili olacağı gösterilmiştir [55]. *PfLDH* ve *PbLDH* arasındaki benzerlik %90,8 iken *PvLDH* ve *PfLDH* arasındaki benzerlik %90,1'dir. Dolayısıyla *PvLDH*'ın üç boyutlu

yapısının da *Pf*LDH'dan çok farklı olmayacağı tahmin edilmektedir. *Pv*LDH için yapılacak olan yapı analizi çalışmaları sonucunda *Pv*LDH'nın yapısal ve kinetik olarak *Pf*LDH ile büyük oranda benzerlik göstermesi durumunda, *Pf*LDH için yapılan yeni antimalarial ilaçların tasarlanmasına yönelik çalışmaların *Pv*LDH içinde yapılması mümkün olacaktır.



4 SONUÇ

Sıtma tedavisinde kullanılan antimalarial ilaçlara karşı gelişen direnç yeni antimalarialların geliştirilmesini gerekli kılmıştır.

Sıtma parazitlerinde ATP'nin temel metabolik kökeni glikolizdir [28]. Çünkü sıtma parazitleri etkin bir sitrik asit döngüsü ve aktif bir mitokondriden yoksundurlar [5, 29]. Laktat dehidrogenaz enzimi insan sıtma parazitlerinin karbonhidrat metabolizmasında önemli bir rol oynar. Parazit, bu enzim sayesinde glikolizin son ürünü olan pirüvik asidi dönüşümlü bir reaksiyonla laktik aside çevirmektedir. Dolayısıyla bu enzimin inhibisyonu parazitin yaşamının sonlandırılması anlamına gelmektedir [27].

Bu yüksek lisans tez çalışmasında *PvLDH* geni, yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmaları için hedef olarak seçilmiştir.

PfLDH, ilk kez Honduras I isimli soydan [25] daha sonra K1 ve *PFFCBR* isimli soylardan izole edilmiş ve klonlanmıştır [32]. Elde edilen verilerden yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmalarında yararlanılmıştır. *PfLDH*, proteini üretilen [56] ve yapısı tanımlanan [33] ilk plazmodiyal enzimdir. Plazmodiyal LDH başlıca iki özelliği ile diğer LDH'lerden ayrılmaktadır. Bunlardan ilki, NADH bağlama cebinin diğer LDH'lerden farklı konumda bulunması, ikincisi ise enzimin katalitik halkasında 5 amino asit ilavesinin bulunmasıdır. Bu ilave 5 amino asit enzimin katalitik halkasında bir yarı oluşturmaktadır ve bu yarığın gossipol ve türevleri [27] gibi çeşitli enzim inhibitörlerini yapısına alarak enzimin inhibisyonunu sağlama potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir [34].

Son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucunda *PbLDH*'da da bu ilave 5 amino asidin varlığı tespit edilmiştir [55]. *PbLDH* ile yapılan yapı analizi çalışmaları *PbLDH*'ın da *PfLDH*'a benzer yapısal ve kinetik özellikler gösterdiği ispatlanmıştır.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında *P. vivax* laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen izole edilmiş, klonlanmış ve nükleotid dizisi belirlenmiştir. *PvLDH* dizisi, dizisi bilinen diğer LDH'lar ile karşılaştırıldığı zaman tüm anahtar amino asitlere sahip olduğu görülmüştür. *PvLDH*'ın *PfLDH* ile amino asit düzeyinde %90,1 oranında benzerlik göstermesi *PfLDH*'a özgü yapısal ve biyokimyasal özelliklerin *PvLDH*'da da görülebileceğini düşündürmektedir. Daha önce *PfLDH*'da gösterilen, yeni antimalarial ilaçların tasarlanması için hedef bölge olarak nitelendirilen aktif bölge halkasında ilave 5 amino asidin, *PvLDH*'da da tespit edilmiş olup *PfLDH*'a uygulanan yaklaşımların *PvLDH*'a da uygulanabileceği düşünülmektedir.

P. vivax dünya üzerinde en geniş yayılım gösteren *Plasmodium* türü olması sebebiyle, bu parazite karşı geliştirilecek yeni antimalarial ilaçlar sıtma ile mücadelede büyük öneme

sahiptir. Yapılan bu çalışma ile *PvLDH* enzimini kodlayan gen izole edilmiş olup, yeni bir antimalarial ilacın geliştirilmesi çalışmalarında hedef bölge olan enzim aktif bölgesi tanımlanmıştır.

Bir sonraki çalışmalarda genin ekspresyonu yapılarak protein saflaştırılacaktır. Bu protein enzimin yapısal ve kinetik analizlerinin yapılmasında kullanılarak elde edilecek veriler yeni antimalarialların tasarlanması çalışmalarında kullanılacaktır.



KAYNAKLAR

1. Knell, A.J., 1991, *Malaria*, Oxford University Press, Oxford, 91s.
2. 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.
3. WHO, WHO Scientific Group, 1999, *Rolling Back Malaria*, World Health Report 1999, Geneva.
4. Akdur, R., 1998, *İl Eğitimcileri için Sıtma Eğitim Rehberi*, Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü, Ankara, 64s.
5. Roth, E.F. JR, Calvin, M.C., Max-Audit, I., Rosa, J. and Rosa, R., 1988, The Enzymes of the Glycolytic Pathway in Erythrocytes Infected With *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites, *Blood*, 72, No. 6, 1922-1925.
6. Klenerman, P., Dickson, H., 1992, Plasma Lactate Dehydrogenase Estimation in the Diagnosis of Malaria, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 86, 563-565.
7. Makler, M.T., Hinrichs, D.J., 1993, Measurement of the Lactate Dehydrogenase Activity of *Plasmodium falciparum* as an Assessment of Parasitemia, *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48, No. 2, 205-210.
8. Makler, M.T., Piper, R.C. and Milhous, W.K., 1998, Lactate Dehydrogenase and the Diagnosis of Malaria, *Parasitology Today*, 14, No. 9, 376-377.
9. Ok, Ü.Z., Girginkardeşler, N., Kilimcioğlu, A.A., 1999, Sıtmada Sağaltım ve Kemoprofilaksi, In: Özcel, M.A.(ed.), *Sıtma-Malaria*, Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın No. 16, İzmir, 295s.
10. Holbrook, J.J., Liljas, A., Steindel, S.J., Rossman, M.G., 1975, Lactate Dehydrogenase, In: Boyer, D. P. (Ed.), *The Enzymes*, Vol. XI, Academic Press, New York, 292s.
11. Fersht, A., 1985, *Structures and Mechanisms of Selected Enzymes*, W.H. Freeman and Company, New York, 400s.
12. Garvie, E.I., 1980, Bacterial Lactate Dehydrogenases, *Microbiological Reviews*, 44, No. 1, 106-139.
13. Taguchi, H., Ohta, T., 1991, D-Lactate Dehydrogenase is a Member of the D-Isomer-Specific 2-Hydroxyacid Dehydrogenase Family, *The Journal of Biological Chemistry*, 266, No. 19, 12588-12594.
14. Fischer, R.S., Martin, G.C., Rao, P. and Jensen, R.A., 1994, *Neisseria gonorrhoeae* Possesses two Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Independent Lactate Dehydrogenases, *FEMS Microbiology Letters*, 115, No. 1, 39-44.
15. 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, No. 18/25, 699-702.
16. 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, No. 1, 59-63.
17. Deng, H., Zheng, J., Clarke, A., Holbrook, J.J., Callender, R. And 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.
18. 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.

19. Wigley, D.B., Gamblin, S.J., Turkenburg, J.P., Dodson, E.J., Piontek, K., Muirhead, H. and 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.
20. Clarke, A.R., Wilks, H.M., Barstow, D.A., Atkinson, T., Chia, W.N. and 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.
21. 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.
22. Holbrook, J.J. and Stinson, R.A., 1973, The Use of Ternary Complexes to Study Ionizations and Isomerizations During Catalysis by Lactate Dehydrogenase, *Biochemical Journal*, 131, 739-748.
23. Read, M., Hicks, K.E., Sims, P.F.G. and Hyde, E., 1994, Molecular Characterisation of the Enolase Gene from the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*, *European Journal of Biochemistry*, 220, 513-520.
24. Vander-Jagt, D.L., Hunsaker, L.A. and Heidrich, J.E., 1981, Partial Purification and Characterization of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 4, 255-264.
25. Bzik D.J., Fox, B.A. and Gonyer, K., 1993, Expression of *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase in *Escherichia coli*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 59, 155-166.
26. 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, No. 32, 15678-15682.
27. Royer, R.E., Deck, L.M., Campos, N.M., Hunsaker, L.A. and Vander Jagt, D.L., 1986, Biologically Active Derivatives of Gossypol: Synthesis and Antimalarial Activities of Peri-Acylated Gossylic Nitriles, *Journal of Medicinal Chemistry*, 29, 1799-1801.
28. Basco, L.K., Marquet, F., Makler, M.M., Le Bras, J., 1995, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*: Lactate Dehydrogenase Activity and Its Application for in Vitro Drug Susceptibility Assay, *Experimental Parasitology*, 80, 260-271.
29. Trager, W., 1986, Metabolism: Energy Sources: Respiration, in *Living Together-The Biology of Animal Parasitism*, Plenum, New York, 169s.
30. Sherman, I.W., 1979, Biochemistry of *Plasmodium* (Malarial Parasites), *Microbiological Reviews*, 43, No. 4, 453-495.
31. Roth, E.F. JR, Raventos-Suarez, C., Perkins, M. and Nagel, R.L., 1982, Glutathione Stability and Oxidative Stress in *P. falciparum* Infection In-vitro: Responses of Normal and G6PD Deficient Cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 109, No. 2, 355-362.
32. Turgut-Balık, 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.
33. Dunn, C.R., Banfield, M.J., Barker, J.J., Higham, C.W., Moreton, K.M., Turgut-Balik, D., Brady, R.L. and Holbrook, J.J., 1996, The Structure of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* Reveals a New Target for Anti-malarial Design, *Nature Structural Biology*, 3, No. 11, 912-915.
34. 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, No. 4, 301-306.

35. Read, J.A., Wilkinson, K.W., Tranter, R., Sessions, R.B. and Brady, R.L., 1999, Chloroquine Binds in the Cofactor Binding Site of *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase, *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 10213-10218.
36. www.mwg-biotech.com
37. Sambrook, J. and Russell, D.W., 2001, *Molecular Cloning A Laboratory Manual* II-III, Third Edit., CSHL Press, New York.
38. Aktümsek, A., Nurullahoğlu, Ü., 1996, *Pratik Biyokimya*, Mimoza Yayınları, Sağlık Dizisi 7, Konya, 175s.
39. Kain, K.C., Brown, A.E., Lanar, D.E., Ballou, W.R. and Webster, H.K., 1993, Response of *Plasmodium vivax* Variants to Chloroquine As Determined By Microscopy And Quantitative Polymerase Chain Reaction, *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 49, No. 4, 478-484.
40. Talmud, P., Tybjaerg-Hansen, A., Bhatnagar, D., Mbewu, A., Miller, J.P., Durrington, P. and Humphries, S., 1991, Rapid Screening for Specific Mutations in Patients with a Clinical Diagnosis of Familial Hypercholesterolaemia, *Atherosclerosis*, 89, 137-141.
41. Promega, Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System Technical Bulletin, 2002, Cat. No: A9281, U.S.A.
42. Promega, Wizard®PCR Preps DNA Purification System Technical Bulletin, 2002, Cat.No: A7170, U.S.A.
43. Promega, pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector System Technical Manual No. 042, 2003.
44. QIAGEN, QIAprep®Miniprep Handbook, 2002, Cat. No: 27104, Germany.
45. Promega, Wizard®Plus SV Minipreps Technical Bulletin, 2002, Cat. No: A1330, U.S.A.
46. Kaushal, D.C., Kaushal, N.A. and Kaslow, D.C., 1993, Amino Acid Sequence of the NH₂-Terminus of *Plasmodium knowlesi* Lactate Dehydrogenase, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 59, 167-170.
47. www.plasmodb.org
48. www.tigr.org
49. Snewin, V.A., Khouri, E., Mattei, D., Tekaia, F., Delarue, M., Mendis, K.N. and David, P.H., 1996, Cloning and Characterisation of a Gene from *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi*: Homology with Valine-tRNA Synthetase, *Gene*, 173, 137-145.
50. Read, J.A., Winter, V.J., Eszes, C.M., Sessions, R.B. and 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.
51. Dunn, C.R., Wilks, H.M., Halsall, D.J., Atkinson, T., Clarke, A.R., Muirhead, H. and Holbrook, J.J., 1991, Design and Synthesis of New Enzymes Based on the Lactate Dehydrogenase Framework, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B*, 332, 177-184.
52. Turgut-Balık, 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.
53. Foley, M., Deady, L.W., Ng, K., Cowman, A.F. and Tilley, L., 1994, Photoaffinity Labeling of Chloroquine-Binding Proteins in *Plasmodium falciparum*, *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 6955-6961.
54. 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.
55. Winter, V.J., Cameron, V.T., 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*, Baskıda.

56. 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.



ÖZGEÇMİŞ

Soyadı : AKBULUT

Adı : Ekrem

Doğum Yeri : MALATYA

Doğum Tarihi : 10.02.1978

Adres : Cengiz Topel Caddesi Yudum Apt. No: 31 Kat: 6/11 44200 MALATYA.

Tel : 0 422 324 71 60

0 533 523 95 29

e-posta : ekbulut@firat.edu.tr

2001-2003 : Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji A.B.D'da Yüksek Lisans Eğitimi.

Yüksek Lisans Tez Konusu : *Plasmodium vivax*'ın Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Geninin PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) İle İzolasyonu ve Klonlanması.

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

1996-2000 : İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde Lisans Eğitimi

1999-2000 : Biyoloji Bölüm Stajı; İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi PCR Laboratuvarı, Mikrobiyoloji Laboratuvarı.

1992-1995 : Ortaöğrenim, Malatya Lisesi.

1984-1992 : İlköğrenim, Fırat İlköğretim - Atatürk İlköğretim.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ