

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Plasmodium vivax*'da LAKTAT DEHİDROGENAZ
ENZİMİNİN AKTİF BÖLGE HALKASI AMİNO
ASİTLERİNİN YÖNLENDİRİLMİŞ MUTAGENEZ
ÇALIŞMALARI İLE ANALİZİ**

DİLEK SADAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ELAZIĞ, 2006

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Plasmodium vivax*'da LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN
AKTİF BÖLGE HALKASI AMİNO ASİTLERİNİN
YÖNLENDİRİLMİŞ MUTAGENEZ ÇALIŞMALARI İLE
ANALİZİ**

DİLEK SADAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 14/12 / 2006 tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği/ oyçokluğu ile başarılı/
başarısız olarak değerlendirilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

Üye: Prof. Dr. Ahmet ŞAHİN
Üye: Doç. Dr. Fikret KARATAŞ

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

TEŞEKKÜR

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

Her konuda beni destekleyen ve bana yardımcı olan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER.....	I
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	IV
TABLolar LİSTESİ.....	V
EKLER LİSTESİ.....	VI
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	VII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT.....	X
BÖLÜM. 1. GİRİŞ.....	1
1.1. Sıtma.....	1
1.2. Sıtma Tedavisindeki Yaklaşımlar.....	2
1.2.1. Sıtma Tedavisinde Kullanılan Geleneksel Antimalarial İlaçlar	2
1.2.2. Proje Aşamasındaki Antimalarial İlaçlar.....	4
1.2.3. Gelecekteki Yöntemler.....	6
1.3. <i>Plasmodium vivax</i> 'ın Laktat Dehidrogenaz Enzimi.....	7
BÖLÜM. 2. MATERYAL VE METOD.....	10
2.1. Materyal.....	10
2.1.1. Ekspresyon Vektörü.....	10
2.1.2. <i>Escherichia coli</i> Soyları.....	10
2.1.3. Bakteriyolojik Gelişim İçin Besiyerleri ve Solüsyonlar.....	11
2.1.4. Stok Solüsyonlar ve Tamponlar.....	12

2.1.5. Primerler.....	14
2.1.6. DNA Örneği.....	15
2.2. Metod	17
2.2.1. Plazmid DNA İzolasyonu.....	17
2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Yönlendirilmiş Mutagenез.....	17
2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	18
2.2.3.1. Etidyum Bromür ile Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi	18
2.2.3.2. Kristal Viyole ile Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi	19
2.2.4. DNA'nın Jelden Geri Kazanılması.....	19
2.2.5. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile DNA'nın Kesilmesi (Digest).....	19
2.2.6. Klonlanacak Olan DNA ve Vektör DNA'sının Birleştirilmesi (Ligasyon).....	20
2.2.7. Kalsiyum Klorür Etkileşimi ile Kompetant <i>E.coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması.....	20
2.2.8. Transformasyon.....	20
2.2.9. Koloni PCR.....	21
2.2.10. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	21
2.2.11. Western Blot ile Mutant PvLDH Proteinlerinin Belirlenmesi.....	22
2.2.12. Mutant Laktat Dehidrogenaz Enzimlerinin Aktivitelerinin Ölçülmesi.....	23
BÖLÜM. 3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	24
3.1. PvLDH'nin Aktif Bölge Halkasındaki Aspartik Asit _{108A} Amino Asidinin Delesyonu.....	24

3.1.1. PvDLDH A ve B Fragmentlerinin Elde Edilmesi.....	24
3.1.2. PvDLDH Geninin Tam Uzunluğunun Elde Edilmesi.....	26
3.1.3. PvDLDH Geninin ve pKK223-3 Vektörünün Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesilmesi.....	27
3.1.4. Pv DLDH Geninin pKK223-3 Vektörüne Aktarılması	27
3.1.5. Rekombinant DNA'nın JM 105 Hücrelerine Transformasyonu.....	27
3.1.6. PvDLDH Geninin JM 105 Bakteri Soyundaki Ekspresyonu.....	29
3.1.7. PvDLDH Proteininin Aktivitesinin Ölçülmesi.....	31
3.1.8. Western Blot ile Protein Aktivitesinin Doğrulanması	31
3.2. PvLDH Aktif Bölge Halkasındaki Aspartik Asit _{108A} Lysin _{108B} Amino Asitlerinin Delesyonu.....	32
3.3. PvLDH'ın Aktif Bölge Halkasındaki Aspartik Asit _{108A} Lysin _{108B} Glutamik Asit _{108C} Amino Asitlerinin Delesyonu.....	32
3.4. PvLDH'ın Aktif Bölge Halkasındaki Aspartik Asit _{108A} Lysin _{108B} Glutamik Asit _{108C} Tryptofan _{108D} Amino Asitlerinin Delesyonu.....	33
3.5. PvLDH'ın Aktif Bölge Halkasındaki İlave 5 Amino Asidin Tamamının Delesyonu.....	34
BÖLÜM. 4. SONUÇ.....	37
KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİŞ.....	42
EKLER.....	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1: PvDLDH'ın A ve B fragmentlerinin elde edilmesi.....	25
Şekil 3.2: PvDLDH geninin tam uzunluğunun elde edilmesi.....	27
Şekil 3.3: Koloni PCR'dan sonra pozitif sonuçların jelde görüntülenmesi.....	28
Şekil 3.4: PvDLDH geni içeren JM 105 hücre ekstraktının genel protein profili.....	29
Şekil 3.5: PvDLDH geni içeren JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının ayrı ayrı protein profillerinin gösterilmesi.....	30
Şekil 3.6: PvELDH geni içeren JM 105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının ayrı ayrı protein profillerinin gösterilmesi.....	31
Şekil 3.7: PvLDH'da yapılan mutasyon sonucunda mutant proteinin Western Blot ile gösterilmesi.....	32

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1: Antimalarial ilaçlar, bulundukları yıl ve direnç kazandıkları yıllar.....	4
Tablo 2.1: <i>PvLDH</i> enzimini kodlayan genin nükleotid dizisi.....	15
Tablo 3.1: <i>PvLDH</i> 'ın aktif bölge halkasındaki ilave 5 amino asidin delesyonunun gösterilmesi.....	24
Tablo 3.2: <i>PvDLDH</i> proteininin aktivitesinin ölçülmesi.....	31
Tablo 3.3: <i>PvELDH</i> proteininin aktivitesinin ölçülmesi.....	33
Tablo 3.4: <i>PvWLDH</i> proteininin aktivitesinin ölçülmesi.....	34
Tablo 3.5: <i>PvLDH</i> 'ın ve diğer bazı <i>LDH</i> 'ların amino asit dizilerinin karşılaştırılması.....	36

EKLER LİSTESİ

Ek-1: <i>PvDLDH</i> 'ın dizi analizi.....	44
Ek-2 : <i>PvKLDH</i> 'ın dizi analizi.....	45
Ek-3: <i>PvELDH</i> 'ın dizi analizi.....	46
Ek-4 : <i>PvWLDH</i> 'ın dizi analizi.....	47
Ek-5 : <i>PvNLDH</i> 'ın dizi analizi.....	48

KISALTMALAR VE SİMGELER

Adenin.....	A
Adenozin trifosfat.....	ATP
Amino asit.....	aa
Alanin.....	A/Ala
Arjinin.....	R/Arg
Asparajin.....	N/Asn
Baz çifti.....	bp
Deoksiribonükleikasit.....	DNA
Deoksiribonükleotittrifosfat.....	dNTP
Distile su.....	dH ₂ O
Dünya Sağlık Örgütü.....	WHO
Ethilendiamintetra-asetik asit.....	EDTA
Glisin.....	G/Gly
Glutamik asit.....	E/Glu
Guanin.....	G
Histidin.....	H/His
Isopropil-B-D-thiogaltopiranosid.....	IPTG
Kristal viyole.....	CV
Lapda™ - Chloroproquanil	CPG
Laktat dehidrogenaz.....	LDH
Lisin.....	K/Lys
Litre.....	l
Low Molecular Weight.....	LMW

Mikrolitre.....	µl
Miliamper.....	mA
Mililitre.....	ml
Milimolar.....	mM
Molar.....	M
Medicines for Malaria Venture.....	MMV
Nikotiamid adenin dinükleotid.....	NAD ⁺
Nikotiamid adenin dinükleotid (indirgenmiş).....	NADH
NNN'N'-tetramethilenethilendiamin.....	TEMED
Optik dansite.....	OD
Phosphate buffered saline.....	PBS
<i>Plasmodium falciparum</i> laktat dehidrogenaz enzimi.....	PfLDH
<i>Plasmodium vivax</i> laktat dehidrogenaz enzimi.....	PvLDH
Pikomol.....	pmol
Polimeraz zincir reaksiyonu.....	PCR
Sample amplification buffer.....	SAB
Sitozin.....	C
Sodyum dodesil sülfat.....	SDS
Timin.....	T
Triptofan.....	W/Trp
Tris-Asetat-EDTA.....	TAE
Ultraviyole.....	UV
Ünite.....	u
3,3' - Diaminobenzidin.....	DAB
3-asetilpiridin adenin dinükleotit.....	APAD ⁺

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Plasmodium vivax*'da LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN AKTİF
BÖLGE HALKASI AMİNO ASİTLERİNİN YÖNLENDİRİLMİŞ
MUTAGENEZ ÇALIŞMALARI İLE ANALİZİ**

Dilek SADAK

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
2006, Sayfa: 48

Mevcut antimalariallara karşı direncin ortaya çıkması yeni ilaçların geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Bu tezde; *Plasmodium vivax*'ın glikolitik enzimi olan laktat dehidrogenaz hedef olarak seçilmiştir. Enzimin aktif bölge halkasında ilave 5 amino asit uzantısı vardır. Bu ilave uzantının insan laktat dehidrogenaz enzimlerinde kopyası mevcut değildir. Kinetik çalışmaları ile beraber bu ilave, yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmaları için bölgeyi ideal bir hale getirmektedir. Laktat dehidrogenaz enzimi bu tezde yönlendirilmiş mutagenез çalışmalarıyla *Plasmodium vivax*'da çalışılmıştır. Aktif bölge halkasından ilk iki amino asit çıkarıldığında enzim aktivitesi devam etmiştir ama 5 amino asit çıkarıldığında enzim aktivitesi durmuştur. Bu sonuçlar yeni antimalarialların tasarımında bu bölgenin ideal bir hedef olması fikrini desteklemiştir.

Anahtar Kelimeler: *Plasmodium vivax*, laktat dehidrogenaz, aktif bölge halkası, yönlendirilmiş mutagenез, antimalarial.

ABSTRACT

MASTER THESIS

ANALYSIS OF ACTIVE SITE LOOP AMINO ACIDS OF ENZYME

***Plasmodium vivax* LACTATE DEHYDROGENASE IN BY SITE-**

DIRECTED MUTAGENESIS STUDIES

Dilek SADAK

Firat University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
2006, Page: 48

Increasing resistance of malaria parasites to the currently available drugs necessitates the development of new antimalarials. In this thesis, glycolytic enzyme lactate dehydrogenase of *Plasmodium vivax* has been targetted for this aim. Active site loop of this enzyme is extended by five extra amino acids. The extended loop is not present in their human counterpart. In combination to the kinetic studies, this makes the site an ideal target for the structure based drug design studies. Lactate dehydrogenase was evaluated from *Plasmodium vivax* by the site directed mutagenesis studies in this thesis. The enzyme remained active after the removal of the first two amino acids from the loop, but this activity abolished when all of the inserted amino acids were removed. These results supports the idea of being this site ideal target for the design of new antimalarials.

Keywords: *Plasmodium vivax*, lactate dehydrogenase, active site loop, site directed mutagenesis, antimalarial.

1. GİRİŞ

1.1. Sıtma:

Sıtma infekte dişi anofel sivrisineklerin kan emerken taşıdıkları sporozoitleri konukçu canlıya taşımalarıyla bulaşan bir enfeksiyon hastalığıdır. Sıtmanın en belirgin etkeni ateştir ve bunu nöbetler halinde gelen titremeler takip eder [1].

Sıtmayla mücadele yüz yıllardan beri devam etmesine rağmen sıtma dünyanın tropikal ve subtropikal ülkelerinde halk sağlığını ve buna bağlı olarak ekonominin gelişmesini tehdit eden önemli ve gittikçe büyüyen faktör olmaya devam etmektedir [2].

Dünya Sağlık Örgütünün (WHO) verilerine göre dünya nüfusunun yaklaşık %40'ı sıtmaya yakalanma riski yüksek olan yerlerde yaşamaktadır. Bu durumdan en çok çocuklar etkilenmektedir. Her yıl görülen yaklaşık 300-500 milyon arası sıtma enfeksiyonlarının 1 milyonundan fazlası insan ölümüne sebep olmaktadır. 3.2 milyar insanın çoğu da tehlike altındadır. Bununla birlikte Afrika'da yaşayan çocuklar arasındaki ölüm oranı % 75'den fazladır [3,4].

Plasmodium falciparum (*P. falciparum*), *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), *Plasmodium ovale* (*P. ovale*) ve *Plasmodium malariae* (*P. malariae*) insanda sıtmaya sebep olan plasmodium türleridir [1]. *P. vivax*, *P. falciparum* kadar tehlikeli ve öldürücü değildir. Ancak insan üzerinde olumsuz etkileri çok fazladır ve infekte ülkelerde ekonomik olarak büyük zarara yol açmaktadır [5].

P. vivax daha çok sıcak ve tropik bölgelerde hastalığa sebep olmakta ve plasmodium türleri içerisinde tüm dünyada geniş bir coğrafi yayılım göstermektedir. Tropikal Afrika, Asya ve Güney Amerika'da oldukça yaygındır [6,7]. *P. ovale* yalnızca Batı ve Pasifik yerlilerinde hastalık oluştururken *P. malariae* olgusuna ise pek rastlanmamıştır [6]. *P. falciparum* ise diğer üç türe göre daha ciddi ve ilerleyen bir hastalığa neden olup, çoğunlukla birkaç gün içinde hastanın ölümüne yol açar [8,9]. Afrika ve Güneydoğu Asya'nın büyük bir bölümünde yaygındır [6].

Bununla beraber sıtma parazitlerinin klasik antimalarial ilaçlara karşı direnç kazanmaları sıtmanın tehlikeli boyutunu daha ileri aşamalara götürmektedir. *P. falciparum* ve *P. vivax*'ın da varolan antimalarial ilaçlara karşı direnç kazanmış olmaları, bu türler için yeni ilaç tasarımlarını zorunlu hale getirmiştir [5,10]. Bunun için ilk adım olarak parazitin metabolik yollarında

kullandıkları enzimler, ilaç tasarımları için hedef olarak seçilmiştir. Çünkü parazitin yaşam devresinde bu enzimler önemli rol oynamaktadır [10]. Plasmodiumların glikolitik enzimleri hem yeni antimalarial ilaç tasarımlarında alternatif bir yolu temsil edeceği düşünüldüğü için hedef moleküller olarak hem de hastalığın tespiti sırasında kandaki parazit düzeyini gösteren birer indikatör olarak tanımlanmıştır [10,11,12,13]. Bu amaçla *P. falciparum*'un LDH enzimi (*Pf* LDH) hedef enzim olarak seçilmiştir. Bu enzim, plasmodiumların yaşam döngüsü için gereklidir [14]. Yapılan çalışmalar bu enzimin aktivitesinin engellenmesinin parazitin yaşamının sonlandırılmasını sağladığını göstermektedir [15].

İlaç tasarım çalışmalarının uygulanabilmesi amacıyla LDH geni *P. falciparum* soyları olan K1 ve PF FCPR'den klonlanmış, gen ifadesi yapılmış [17] ve enzimin üç boyutlu yapısı belirlenmiştir [18]. *P. falciparum* LDH enzimini kodlayan genin klonlanmasından sonra *P. vivax* Belem soyu (Fransa) genomik DNA'sından LDH enzimini kodlayan gen izole edilmiş, klonlanmış ve nükleotit dizisi belirlenmiştir [10,19]. *Pv* LDH geni *Pf* LDH geninden sonra günümüze kadar klonlanan ikinci insan malarial LDH'dır. DNA dizisi, *Pv* LDH'nın *Pf* LDH'ı gibi 316 amino asitlik (aa) bir proteini kodlayan 951 bp açık okuma çerçevesini içerdiğini göstermiştir. *Pv* LDH'nın *Pf* LDH ve bilinen diğer bazı LDH'ların aa dizi kıyaslaması *Pv* LDH'nın sırasıyla *Pf* LDH ile %90,1, *P. berghei* LDH'ı ile %90,8, *P. yoelii* LDH'ı ile %90,5, insan-M₄ LDH'ı ile %26, insan-H₄ LDH'ı ile %25 benzer olduğunu göstermiştir [19]. Bu benzerlikten ötürü tasarlanan yeni ilaçlar insan LDH'ını etkilememelidir. Yapılan çalışmalar *Pv* LDH'nın insandaki eşdeğeri olan LDH'dan elektroforetik kinetik ve yapısal olarak farklı olduğunu göstermektedir [10]. En çok dikkat çeken özellik, *Pv* LDH'nın aktif bölge halkasında *Pf* LDH'da da olduğu gibi 5 aa ilavesi (aspartik asit, lizin, glutamik asit, triptofan ve asparajin) olmasıdır [19]. *Pf* ve *Pv* LDH'dan elde edilen yüksek çözünürlüklü X ışını yapısı, her iki türün LDH'nın da bulunan bu bölgenin enzim inhibitörleri için cazip bir hedef olabileceğini gösterirken, yeni ortak ilaç tasarım çalışmalarına sağlayacağı katkıyı test edebilmek için, bu dizinin proteine kazandırdığı özelliklerin araştırılması bu yüksek lisans tez çalışmasının amacını oluşturmaktadır.

1.2. Sıtma Tedavisindeki Yaklaşımlar:

1.2.1. Sıtma Tedavisinde Kullanılan Geleneksel Antimalarial İlaçlar:

Sıtma tedavisinde kullanılacak ideal bir ilaç parazitin tüm yaşam evrelerine etki edebilmeli ve özellikle sağlık hizmetlerinin yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde kullanılabilmesi için tek dozda etkili olmalıdır [20]. Günümüzde kullanılan ilaçların büyük bir

kısmı sıtma parazitlerinin farklı yaşam evrelerini hedeflemektedir [21]. Ancak var olan antimalarial ilaçlara karşı direnç gelişmesi göz önünde tutulduğu zaman yeni antimalariallara duyulan ihtiyaç hızla artmaktadır [22]. Günümüze kadar geliştirilen temel antimalarial ilaçların bazıları aşağıda sıralanmıştır.

Kininler

Kinin, Avrupa’da 17. yy’da şiddetli malarianın tedavisi için, modern tedavi teknikleri gelişmeden önce ortaya çıkmıştır [23,24]. 20. yy başlarında ayrıntılı olarak incelenmeye başlanmıştır (24). Bu ilaçlara örnek olarak 4- aminokinin, klorokin verilebilir. Bu ilaçların hemoglobinin yıkımı esnasında oluşan serbest hem bileşiğinin sıtma pigmenti olan hemozoin dönüşümünü engellediği belirtilmiştir [25,26]. Hemoglobinin yıkımı esnasında hem bileşiği serbest kalmakta ve oksidatif bir mekanizma ile hemozoin olarak adlandırılan hücre içi sıvıda çözünmeyen toksik kristallere dönüşmektedir [27]. Dolayısıyla bu ilaçlar “hem” polimerizasyonu, oksitlenme, glutatyon bağımlı “hem” yıkımı gibi reaksiyonları inhibe etmektedir [28].

Artemisininler

Birkaç yarı sentetik artemisinin türevlerinin aktif bileşimi, Çin’de “qinghao” adı verilen ve geleneksel ateş tedavisi için kullanılan *Artemisia annua* bitkisinden elde edilmiştir [19]. Değişik artemisin türevleri (artemeter, artemisinin, artemotil ve artesunat içeren) şiddetli malarianın tedavisinde kullanılmıştır. Suda çözünebilir olması bakımından artesunatın farmakokinetik özellikleri diğerlerine göre daha yüksektir [23].

Antifolatlar

Orjinalleri hakkında pek fazla bilgi bulunmamaktadır. Bu ilaçlar (pirimetamin, sülfadoksin) gebelikte özellikle malaryal tedavide folat metabolizmasında rol almaktadır. Folat metabolizmasında; pirimetamin, dihidrofolat redüktaz (DHFR) enziminin inhibitörü, sülfadoksin ise dihidropterat sentetaz (DHPS) enziminin inhibitörü olarak görev yapmaktadır [22].

Tablo 1.1’de geleneksel olarak kullanılan antimalarial ilaçlar, bulundukları yıl ve bu ilaçlara direnç kazanılan yıllar verilmiştir [30].

Tablo 1. 1: Antimalarial ilaçlar, bulundukları yıl ve direnç kazandıkları yıllar

Antimalarial ilaçlar	Bulunduğu yıl	Direnç kazandığı yıl
Kinin	19. yy	1910
Klorokin	1945	1957
Proguanil	1948	1949
Primakin	1950	–
Sulfadoxin-primetamin	1967	1967
Amodiakın	1975	–
Meflokin	1977	1982
Artemisin	1970'ler	–
Halofantrin	1988	1992
Atovakon	1996	1996
Lapdap	2003	–

1.2.2. Proje Aşamasındaki Antimalarial İlaçlar:

İlaç gelişiminde başarı oranını yükseltmek için değişik metotlar araştırılmaktadır. Bunların içinde varolan ilaçların yeniden düzenlenmesi, eski ilaçların yeni kombinasyonlarla kullanımı (örneğin lapdap ve artemisin kombinasyonları) ve parazite özgü yeni ilaç tasarımlarını hedeflemek vardır. Aşağıda kısaca MMV (Medicines for Malaria Venture)'nin ilaç geliştirme portföyündeki sürekli araştırılan 8 proje hakkında bilgi verilecektir [29].

Chloroproguanil-Dapsone (Lapdap™- Artesunate)

Lapdap™, chloroproguanil (CPG) ve dapson (DDS)'un bir kombinasyonudur. 2003 yılında etkili ve ucuz bir antimalarial olarak yansıtılmıştır [29]. *P. falciparum*'un neden olduğu sıtma tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmektedir. Ağır olmayan malarialı yetişkin ve çocuklardaki faz II doz çalışması tamamlanmıştır [30].

Sentetik-Peroksit- OZ 277

Faz I klinik çalışmaları 2004’de tamamlanmıştır. Tayland’ da yetişkin hastalarda faz I-II farmakodinamik çalışması 2005’de tamamlanmıştır ve çalışmanın verileri sürekli olarak analiz edilmektedir. İlave faz I çalışması ve faz II doz aralığı çalışması 2006’da başlatılmıştır. Ancak çok pahalı bir ilaç olduğu için ancak gelişmiş ülkelerde kullanılmaktadır [29,30].

Geliştirilmiş Diamidin- DB289

DB289 aromatik bir diamidindir. Antiprotozoal ajan olan pentamidinin benzer bir yapısı olarak geliştirilmiştir. Pentamidin gibi DB289’in de farklı protozoon parazitleri, Plasmodium, Tripanasoma gibi parazitlere karşı geniş bir aktivite spektrumu vardır [29].

AQ-13 (Yeni Bir Aminoquinolin)

AQ-13 ([N1- (7- chlora-quinolin-4 yl)-3- (N3, N3- dietilamino) propilamin] dehidroklorid trihidrat) kısa halkalı aminokinolin antimalarial bir ilaçtır ve *P.falciparum*’a karşı etkili olduğu gösterilmiştir [29,31].

Pironaridin- Artesunat

Pironaridin ve artesunat’ın sabit kombinasyonu akut komplike olmayan *P. falciparum* ve *P. vivax*’ lı malaria hastalığı olan yetişkin ve çocuklarda tedavi için kullanılmaktadır. Faz I’in çok amaçlı hedefi 2005 yılında tamamlanmış ve çocuklardaki toleransı, güvenliği ve farmokinetiklerinin çalışması 2006 yılında başlatılmıştır. Bu çalışmayı takiben hem Afrika hem de Güneydoğu Asya’da çocuk ve yetişkin hastalarda kullanılmak üzere 2006 yılında faz II programı hazırlanmıştır [29,30].

Isokuin

Keşfedildiği yer olan Liverpool Üniversitesi ve Glaxo Smith Kline ortaklığında geliştirilmektedir. İkinci nesil bir aminoquinolindir. 2005’de klinik öncesi aşama tamamlanmıştır ve ilk kez 2006 yılında insanda denenmesi planlanmıştır [29,30].

4(1H)-Pirodonlar

2004’de 4(1H) pirodon türevi GW844520 buluş aşamasından gelişme aşamasına geçmiştir. Klinik öncesi program bu spesifik molekülün daha fazla gelişmesinde problemler ortaya çıkarmıştır. Pirodonları optimizasyon programı başlatılmıştır [30].

8- Aminokinolinler

Son birkaç yıl içerisinde ölümlerin *P. vivax*’tan kaynaklandığı konusunda artan bir ilgi vardır ve klorokin dayanıklılığın da yayılmakta olduğuna inanılmaktadır [30]. *P. vivax*’ın akut ve tekrar nükseden aşaması için yeni, güvenli, etkili ve kullanılabilir bir tedaviye ihtiyaç duyulduğu görülmüştür [30]. Bugüne kadar anti-nüksetme tedavisi olarak etkili olan tek bileşik sadece 8- aminokinolinler gösterilmiştir [30]. NPC1161B 8- aminoquinolinin (-) enantiomeridir. Hem *in vitro* hem de *in vivo* farmakolojik aktiviteler potansiyel kalmasına rağmen (+) enantiomerden daha az toksik olduğu belirgin olarak gösterilmiştir [30].

1.2.3. Gelecekteki Yöntemler

Son yıllarda malaria tedavisinde kriptolepin, antiplazmodial aktivitede *in vitro* potansiyeli olmasına rağmen oral olarak verildiğinde farelerde malaria tedavisinde başarısız olmuştur. Bu durum kriptolepinin antimalarial ilaç olarak geliştirilmesi için iyi bir aday olmadığını göstermektedir. Bundan dolayı artmış antiplazmodium aktivitesi olan ve azalmış toksitesi olan kriptolepin analoglarını hazırlamak olasıdır [32].

Cinchonanın antimalarial özellikleri 300 yıldan fazladır bilinmektedir ve artemisin türevlerinin daha yakın zamanlardaki geliştirilmesi, bitki türlerinin malaria tedavisinde daha etkili olduğunu göstermiştir. Bu tarihe kadar artemisin rezistanslı malarianın hiçbir raporu olmamasına rağmen bu gelişmekte olan olasılığın göz ardı edilemeyeceği ve yeni antimalarial araştırmaların devamının önemli olduğunu gösterir. Aynı zamanda küçük çocuklardaki etkilerinin geleneksel bitkisel antimalariallerin değerlendirilmesi için acil ihtiyaç vardır. Çünkü malaria kurbanlarının çoğu 5 yaşının altındakilerdir ve RITAM (Research Initiative for Traditional Systems of Health)’ın bunu başarmada önemli bir rol oynayacağı ümit edilmektedir. Son 25 yılda bunun çoğu başarılmıştır. Ama malariaya bağlı ölümler bu süre içerisinde gerçekten bir artış göstermiştir. Bu da gelecekteki mücadele için önemli görülmektedir [32].

1.3. *Plasmodium vivax*'ın Laktat Dehidrogenaz Enzimi:

Laktat dehidrogenaz enzimi L-laktatın pürivata oksidasyonunu veya pürivatın laktata redüksiyonunu koenzim nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) aracılığıyla katalizler [33].

LDH, molekül ağırlığı 140.000 dalton olan tetramerik bir yapıya sahiptir. Enzim iki farklı altbirimin farklı konfigürasyonlarda dizilimi sonucunda oluşan 5 izoenzime sahip olup LDH-1 (H_4), LDH-2 (H_3M), LDH-3 (H_2M_2), LDH-4 (HM_3) ve LDH-5 (M_4) formları olarak ifade edilmektedir [34]. Bu izoenzimler kimyasal kompozisyon, kinetik ve immünolojik özellikleriyle birbirinden ayırt edilebilirler [33]. Özellikle H4 ve M4 formları farklı kinetik özelliklere sahiptir [34].

Plasmodium'un izole edilen glikolitik enzimleri hem yeni antimalarial ilaçlar için hedef moleküller olarak hem de kandaki parazitemi oranının belirlenmesinde birer indikatör olarak tanımlanmıştır [10,11,12,13]. Glikolitik enzimlerden çoğu izole edilmiş, klonlanmış ve tamamen nükleotid dizileri belirlenmiştir [35]. Bunlardan bazıları; fruktoz bifosfat aldolaz, glukoz fosfat izomeraz, 3- fosfogliserat kinaz, enolaz, trioz-fosfat izomeraz ve laktat dehidrogenazdır [35].

Yapılan çalışmalar sonucu tanımlanan glikolitik enzimlerin bazı özellikleri ile konukçudaki homologue olan enzimden farklı olduğu tespit edilmiştir [12]. LDH, konukçudaki homologundan farklılığı gösterilen ilk sıtma paraziti enzimlerinden biridir [35].

LDH enzimi insan sıtma parazitlerinin karbohidrat metabolizmasında önemli bir rol oynar. Parazit, bu enzim sayesinde glikolizin son ürünü olan pürüvik asidi dönüşümlü bir reaksiyonla laktik aside çevirmektedir. Dolayısıyla bu enzimin inhibisyonu parazitin yaşamının sonlandırılmasını sağlayacaktır [15]. Ancak aynı enzim hem insanda hem de parazitte bulunduğu için insan LDH'nin etkilenmeden kalması büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla *Pf* LDH'nin elektroforetik, kinetik ve yapısal olarak insan LDH'ndan farklı olduğu gösterilmiştir. Bu farklılıklar aşağıda belirtilmiştir:

- i. İnsan M4-LDH'ndan farklı olarak *Pf* LDH, aktif bölge halkasında 5 ilave aa (aspartik asit, lizin, glutamik asit, triptofan ve asparajin) içermektedir [36].
- ii. İnsan M4-LDH'ndan farklı olarak, *Pf* LDH 3-asetilpiridin adenin dinükleotit (APAD^+) adlı koenzimi 0,5 M laktat konsantrasyonunda daha hızlı kullanabilme yeteneğine sahiptir [13].

- iii. İnsan LDH'ından farklı olarak *Pf* LDH yüksek pirüvat konsantrasyonunda inhibe olmamaktadır [14].
- iv. *Pf* LDH'nin gossilik nitril diasetat ve türevleri tarafından inhibisyona insan LDH'ından daha duyarlı olduğu bildirilmiştir [15].

Sıtma parazitleri metabolizmaları için gerekli olan ATP ihtiyacını glikoliz ile sağlarlar. Sıtma parazitleri konukçudaki eritrositik döngüler arasındaki dönem süresince (eşaysız faz) 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 [37], çünkü sıtma parazitleri ve konukçu oldukları memeli eritrositleri, etkin bir sitrik asit döngüsü ve aktif bir mitokondriden yoksundurlar [11,38]. Glikozun hemen hemen tamamı glikolizde kullanılır ve neredeyse tamamı laktik asit oluşumu için metabolize edilir [11,39]. *P. falciparum* sadece bir mitokondriye sahiptir, fakat henüz mitokondrinin metabolik rolü tam olarak açıklanmamıştır. *P. falciparum* ile infekte edilmiş eritrositler, infekte olmamış eritrositlerden yaklaşık olarak 100 kat fazla glikoz kullanırlar [10]. Bu verilerin, anti-glikolitik inhibitör kökenli antimalarialların ortaya çıkarılması yönünde yapılacak çalışmalara katkı sağlayabileceği tahmin edilmektedir.

Pf LDH, amino asit dizisi bilinen diğer türlerin LDH'ları ile karşılaştırılmış ve *Bacillus stearothermophilus* LDH'ı ile %29, köpek balığı LDH'ı ile %29, insan M₄-LDH'ı ile %31, domuz LDH'ı ile %33, insan H₄-LDH'ı ile %29 oranında amino asit düzeyinde benzerlik görüldüğü belirlenmiştir. Bu karşılaştırmalar yapılırken gözlenen en önemli farklılık *P. falciparum*'un LDH enziminde, insan LDH enziminden farklı olarak aktif bölgede Serin-108 ve Arjinin-109 amino asitleri arasında ilave 5 amino asidin (aspartik asit, lisin, glutamik asit, triptofan ve asparajin) var olmasıdır [16,36]. Yapılan X ışını kristallografi çalışmaları; bu 5 aa ilavesinin enzim yüzeyinde bir yarık oluşturduğunu, insan LDH'ında ise aynı bölgede ilave 5 aa bulunmadığı için söz konusu bir yarığın oluşmadığını göstermiştir [18]. Bu bölge, çeşitli enzim inhibitörlerine yer sağlayacak bir potansiyele sahip olduğu için yeni antimalarial ilaç tasarımında hedef olarak seçilmiştir [40]. *P. falciparum* LDH enzimini kodlayan genin klonlanmasından sonra *P. vivax* Belem soyu (Fransa) genomik DNA'sından LDH enzimini kodlayan gen izole edilmiş, klonlanmış ve nükleotid dizisi belirlenmiştir [19].

P. falciparum ve *P. vivax* LDH genlerinin nükleotid dizileri karşılaştırıldığı zaman *Pf* LDH ve *Pv* LDH genlerinin nükleotid dizileri arasında %90 oranında bir benzerlik olduğu belirtilmektedir. Bu benzerliğe dayanarak; *Pv* LDH geninde de, *Pf* LDH geninde olduğu gibi

aktif bölgede ilave 5 amino asidin bulunduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda *Pf*LDH enziminin yapısal ve kinetik özellikleri üzerinde yapılan çalışmaların, *Pv*LDH enzimi üzerinde de yapılabileceği ve benzer sonuçlar alınacağı ümit edilmektedir [5]. Son yapılan bir çalışma bu fikri desteklemiştir. *Pv*LDH proteininin X-ışını kristallografisi ile yapı analizi ve bazı kinetik analizleri yapılmış ve bu yapı eşdeğeri olan *P.falciparum*'un proteininin yapısı ile karşılaştırılmıştır [5]. Her iki enzimin de aktif bölgeleri ve kofaktör bağlanma ceplerinin son derece benzer olduğu ve *Pf* LDH'da bulunan ilave 5 amino asidin, *Pv*LDH'da da enzim yüzeyinde bir yarık oluşturduğu gözlemlenmiştir [5]. Yüksek orandaki bu benzerlikler dolayısıyla genel olarak geliştirilecek olan bir inhibitör ile her iki enzimin de engellenmesinin mümkün olacağı fikrini kuvvetlendirmiştir. Buradan yola çıkarak bu tez çalışmasında *Pv* LDH'ın aktif bölge halkasındaki ilave 5 amino asidin kısalması ile meydana gelen yapısal değişikliğe proteinin ne kadar toleranslı olduğunun araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan *Taq* DNA Polimeraz enzimi, tampon çözelti ve $MgCl_2$ solüsyonu Promega'dan, USA; *Pfu Turbo* DNA Polimeraz enzimi ve tampon çözelti Stratagene'den, USA; DNA'nın kesilmesi için kullanılan *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon enzimleri ve tampon çözeltileri, ligasyon için kullanılan T4 DNA Ligaz enzimi ve tampon çözeltisi Promega'dan, USA; plazmid DNA izolasyonunda kullanılan QIAprep Spin Miniprep Kit, PCR ürünlerinin jelde koşturulduktan sonra saflaştırılmasında kullanılan QIAquick Gel Extraction Kit QIAGEN' den, Almanya, temin edilmiştir. Agaroz jel elektroforezi sırasında DNA bantlarının molekül ağırlıkları ve konsantrasyonunun tayininde kullanılan Hyper Ladder 1 Bioline'dan, USA; Lambda DNA Hind III Digest Amersham Pharmacia Biotech'den, USA; sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi sırasında protein bantlarının molekül ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılan SDS 7B Sigma'dan, USA; Low Molecular Weight (LMW) Kalibrasyon Kit Amersham Pharmacia Biotech'den, USA, temin edilmiştir.

Western Blot aşamasında kullanılan primer antikor, yabancı tip *Pf* LDH proteini ile hazırlanan emülsiyonun Yeni Zelanda beyaz tavşanlarına enjeksiyonu ile elde edilmiş [17] sekonder antikor Goat Anti-Rabbit IgG ise Bio-Rad'dan, UK, ticari olarak temin edilmiştir.

Deneysel çalışmalarda kullanılan diğer bütün kimyasallar BDI-I, Sigma, Bio-Rad ve Merck'ten sağlanmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan primerler MWG-Biotech, Almanya ve İontek tarafından sentezlenmiştir [41].

2.1.1. Ekspresyon Vektörü

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

2.1.2. *Escherichia coli* Soyları

JM105 : { *supE endA sbcB15 hsdR4 rpsL thiAl (lac-proAB)*

F' [traD36 proAB⁺ lacI^f lacZ ΔM 15] }

DH5α : { *supE44 ΔlacU69 (Φ80 lacZ ΔM 15) hsdR 17 recA 1 endA 1 gyrA96 thi- 1 re/A1 }*

(sadece D delesyonunda kullanıldı)

2.1.3. Bakteriyolojik Gelişim İçin Besiyerleri ve Solüsyonlar

Çift Kuvvetli Yeast-Tripton (2xYT) Buyyon

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

Çift Kuvvetli Yeast-Tripton (2xYT) Agar

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

Minimal Agar

2x Minimal Tuzlar	500 ml/l
% 3,3 Agar	500 ml/l
% 20 Glukoz	10 ml/l
% 20 MgSO ₄ .7H ₂ O	1 ml/l
% 0,1 Tiamin hidroklorür	0,5 ml/l

2x Minimal Tuzlar

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

Amfisilin

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

2.1.4. Stok Solüsyonlar ve Tamponlar

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

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

dH₂O ile 1x TAE'ye seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlanır.

Agaroz Jel İçin SAB (Sample Amplification Buffer)

Sükroz	4 g/10ml
2 M Tris HCl	0,5 ml/10 ml
0,5 M EDTA	2 ml/10 ml
Bromfenol mavisi	4 mg/10 ml

Kristal Viyole (CV) Solüsyonu

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

SAB+CV

Gliserol	50 ml/ml
Kristal viyole	2 µg/ml

CaCl₂ Solüsyonu

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

Bis-Tris Solüsyonu

0,02 M Bis-Tris	4,184 g/l
0,05 M KCl	3,725 g/l
pH: 6.0	

SDS-PAGE İçin SAB (Sample Amplification Buffer)

% 10 SDS	1 g/10 ml
0,5 M Tris HCl (pH : 6.8)	0.6 g/10 ml
% 5 Gliserol	0,5 ml/10 ml
% 25 2-Merkaptoetanol	0,25 ml/10 ml
% 0,05 Bromfenol mavisi	0,005 g/10 ml

5x Tank Tamponu

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

dH₂O ile 1 x'e seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlanır ve 5 defa aynı tampon kullanılabilir.

Protein Boyama Solüsyonu

% 0,1 Coomassie Brilliant Mavisi
% 40 Metanol
% 10 Glasiyel Asetik Asit

Boya Uzaklaştırıcı (Destaining) Solüsyon

% 5 Metanol
% 7 Asetik Asit

Transfer Tamponu

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

PBS (Phosphate Buffered Saline)

0,15M NaCl 900 ml/l
0,1 M Na₂HPO₄ (pH: 7.4) 100 ml/l

PBS Tween 20

PBS 1000 ml
Tween 20 2 ml

% 5'lik Süt tozu

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

2.1.5. Primerler

*Pv*LDH enzimini kodlayan genin amplifikasyonu ve aktif bölgedeki ilave 5 amino asidin yönlendirilmiş mutagenез çalışmalarıyla delesyonu için aşağıda verilen spesifik primerler kullanılmıştır.

pKK N-terminal: 5' CGA CAT CAT AAC GGT TCT GG 3'

pKK C-terminal: 5' GTA TCA GGC TGA AAA TCT TC 3'

***Pv*7:** 5' GCC GAC CCG GAA TTG ATG ACG CCG AAA ATT GTG 3' ***Eco* RI**

***Pv*13:** 5' TTT TCT GCA GTT AAA TGA GCG CCT TCA TCC TTT TAG TCT CC 3' ***Pst* I**

D-1: 5' CCA GGA AAG AGT AAA GAA TGG AAT AG 3'

D-2: 5' CTA TTC CAT TCT TTA CTC TTT CCT GG 3'

K-1: 5' CCA GGA AAG AGT GAA TGG AAT AGA G 3'

K-2: 5' CTC TAT TCC ATT CAC TCT TTC CTG G 3'

E-1: 5' CCA GGA AAG AGT TGG AAT AGA GAT G 3'

E-2: 5' CAT CTC TAT TCC AAC TCT TTC CTG G 3'

W-1: 5' CCA GGA AAG AGT AAT AGA GAT GAT TTA TTA C 3'

W-2: 5' GTA ATA AAT CAT CTC TAT TAC TCT TTC CTG G 3'

N-1: 5' CCA GGA AAG AGT AGA GAT GAT TTA TTA CC 3'

N-2: 5' GGT AAT AAA TCA TCT CTA CTC TTT CCT GG 3'

2.1.6. DNA Örneği

Bu tez çalışmasında, *Plasmodium vivax*'ın Belem soyundan klonlanan laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan geni taşıyan DNA örneği yapılan bütün yönlendirilmiş mutagenез çalışmalarında kalıp olarak kullanılmıştır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 PvLDH enzimini kodlayan genin nükleotid dizisi verilmiştir.

```
ATGACGCCGAAACCCAAAATTGTGCTCGTCGGGTCGGGCATGATCGGAGGCGTGATGGCC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACTGCGGCTTTGGGTTTAAACACGAGCAGCCAGCCGTAAGCTCCTCCGCACTACCGG

ACGCTGATTGTGCAGAAGAACCTGGGGGACGTAGTGATGTTTGACGTAGTGAAAAACATG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
TGCGACTAACACGTCTTCTTGACCCCTGCATCACTACAACTGCATCACTTTTGTAC

CCCCAAGGAAAGGCACTAGATACGTCTCACTCGAATGTGATGGCTTATTCCAATTGCAAG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GGGGTTCTTTCCGTGATCTATGCAGAGTGAGCTTACACTACCGAATAAGGTTAACGTTC

GTGACTGGCTCGAACTCGTATGATGACTTGAAGGGAGCCGACGTGGTGATCGTCACTGCG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CACTGACCGAGCTTGAGCATACTACTGAACTTCCCTCGGCTGCACCACTAGCAGTGACGC

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

TTGAATAACAAAATTATGATTGAGATTGGGGGACATATTAAGAACCTTTGCCCCAATGCC
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 AACTTATTGTTTTAATACTAACTCTAACCCCTGTATAATTCTTGGAACGGGGTTACGG

TTTATCATTGTGGTGACGAACCCAGTGGACGTGATGGTGCAGTTACTCTTCGAGCATTCC
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 AAATAGTAACACCACTGCTTGGGTCACTGCCTACCACGTCAATGAGAAGCTCGTAAGG

GGAGTCCCAAAAAATAAAATCATCGGATTAGGTGGTGTGCTAGATACATCTAGACTGAAA
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 CCTCAGGGTTTTTTATTTTAGTAGCCTAATCCACCACACGATCTATGTAGATCTGACTTT

TATTACATATCGCAGAAGTTGAACGTCTGCCCAGAGATGTTAATGCACTCATTGTCGGT
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 ATAATGTATAGCGTCTTCAACTTGCAGACGGGCTCTCTACAATTACGTGAGTAACAGCCA
 GCACATGGGAACAAGATGGTTCTCCTGAAAAGGTACATCACAGTTGGAGGTATCCCATTG
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 CGTGTAACCTTGTCTACCAAGAGGACTTTTCCATGTAGTGTCAACCTCCATAGGGTAAC

CAAGAATTTATTAATAACAAAAAGATTACAGATGAAGAAGTGGAAGGCATATTTGATCGC
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 GTTCTTAAATAATTATTGTTTTTCTAATGTCTACTTCTTCACCTCCGTATAAACTAGCG

ACTGTCAACACTGCTTTGGAGATTGTGAACCTCCTTGCTCTCCTTATGTTGCCCCAGCT
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
 TGACAGTTGTGACGAAACCTCTAACACTTGGAGGAACGGAGAGGAATACAACGGGGTCGA

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

TCCACTCTACTAGAGGGACAATACGGCCACAGCAACATCTTTGGTGGTACTCCTCTCGTT
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 AGGTGAGATGATCTCCCTGTTATGCCGGTGTGTTGTAGAAACCACCATGAGGAGAGCAA

```

ATCGGGGGCACC GGAGTTGAGCAAGTCATCGAGTTGCAGCTGAATGCCGAGGAGAAGACC
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
TAGCCCCCGTGGCCTCAACTCGTTCAAGTAGCTCAACGTCGACTTACGGCTCCTCTTCTGG

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

```

2.2. Metod

2.2.1. Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid DNA içeren *E. coli* bakteri soyu 100 µg/ml amfisilin içeren çift kuvvetli 2x YT agar besiyerinde geliştirilir. Seçilen kolonilerden bir tanesi steril bir kürdan yardımıyla 100 µg/ml amfisilin içeren 5 ml 2x YT buyyona aktarılır ve 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, QIAGEN, kullanılarak izole edilir [42].

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Yönlendirilmiş Mutagenез

Yönlendirilmiş mutagenез, PCR metodu kullanılarak iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak *PvLDH*’ın mutasyona uğratılacak bölgeleri ile çakışan iki mutant DNA fragmenti (A ve B fragmentleri) elde edilmiştir. Bunun için *PvLDH* DNA’sının zincirlerine komplementer *Pv* 1 ve *Pv* 2 uç primerleri (pKK N-terminal ve pKK C-terminal primerleri de kullanılabilir) ile uygun mutagenез primerleri olmak üzere 4 primer kullanılmıştır. PCR şartları aşağıdaki gibidir:

10x <i>Pfu</i> Tamponu	5 µl (enzim ile beraber verilmiştir.)
dNTP’ler	5µl (stok; herbiri 10mM olan dNTP’lerden 10’ar µl ve 10 µl dH ₂ O)
5’ Primeri	2,5 µl (stok; 20 pmol/µl)
3’ Primeri	2.5 µl (stok; 20 pmol/µl)
Kalıp DNA	1 µl
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	1 µl (stok ; 2,5 u/µl)
Steril dH ₂ O	33 µl (son hacim 50 µl olacak şekilde)

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

İkinci aşama olarak %1’lik agaroz jelden saflaştırılan mutant DNA’nın A ve B fragmentlerini birleştirmek için PCR yapılmıştır. Konsantrasyonları esas alınarak belirlenen miktarlarda kullanılan A ve B fragmentleri ile son hacim 25 µl olacak şekilde gerçekleştirilen PCR’ın reaksiyon şartları 94°C’de 2 dakika, 50°C’de 1 dakika, 72°C’de 2 dakika ve 7 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. Bundan sonra uç primerlerin (*Pv7* ve *Pv13*) ve diğer PCR bileşenlerinin ilavesi ile reaksiyon 50 µl’ye tamamlanmış ve 94°C’de 1.5 dakika, 55°C’de 1 dakika, 72°C’de 2,5 dakika ve 20 döngü olarak yapılmıştır.

2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi BIO-RAD Sub-Cell®GT horizontal jel elektroforez sistemi ile gerçekleştirilmiş ve amaca uygun olarak iki farklı şekilde boyanmış olan jel elektroforezi yapılmıştır.

2.2.3.1. Etidyum Bromür ile Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi

Preparatif amaçlı elektroforez çalışmalarında etidyum bromür ile boyanan agaroz jel kullanılmıştır. Bunun için; %1 agaroz içeren 1x TAE tampon çözeltisi hazırlanıp kaynatılır. Oda sıcaklığında 55-65°C’ye kadar soğutulur. Bu esnada jelin döküleceği jel tepsi hazırlanır. Jeli tepsiye dökmeden önce son konsantrasyon 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür ilave edilir. Jel tepsiye dökülür, uygun taraklar yerine yerleştirilir ve katılaşması beklenir. Katılaştıktan sonra tarak çıkarılır. Jel üzerindeki kuyucuklara yerleştirilecek olan DNA örneklerine 2 µl SAB ilave edilir. Elektroforez rutin agaroz jeller için 40-60 mA, düşük erime noktalı agaroz jeller için 30-40 mA’de bromfenol mavisi yaklaşık olarak jelin 2/3’üne ulaşınca kadar yürütülür. Jel ortamında, DNA’lar moleküler ağırlıklarına bağlı olarak bir ayırma tabi tutulurlar. Elektroforez sonrası DNA bantları, 254-312 nm dalga boyunda UV (ultraviyole) transilluminatöründe görüntülenir. Etidyum bromür DNA’ya bağlanarak UV ışık altında flouresan etki göstermektedir. Bu sayede çok düşük miktarlardaki DNA’nın bile varlığını belirlemek mümkün olmaktadır [43].

2.2.3.2. Kristal Viyole ile Boyanan AgaroZ Jel Elektroförez

Bütün preparatif amaçlı elektroförez çalışmalarında kristal viyole ile boyanan agaroZ jel kullanılmıştır. Bunun için; %1 agaroZ içeren 1x TAE tampon çözeltisi hazırlanıp kaynatılır. Oda sıcaklığında 55-65°C'ye kadar soğutulur. Bu esnada jelin döküleceğı jel tepsi si hazırlanır. Jeli tepsiye dökmeden önce son konsantrasyon 2 µg/ml olacak şekilde kristal viyole ilave edilir. Jel tepsiye dökülür, taraklar yerine yerleştirilir ve katılaşması beklenir. Katılaştıktan sonra tarak çıkarılır. Jel üzerindeki kuyucuklara yerleştirilecek olan DNA örneklerine SAB+CV boyasından 2µl ilave edilir. Elektroförez 2 µg/ml kristal viyole içeren 1x TAE tampon çözeltisi ile 40-60 mA'da gerçekleştirilir. Elektroförez süresince DNA bantlarının ayırımı izlenir. Bantlar jelin 2/3'ünü ilerleyinceye kadar elektroförez işlemine devam edilir. DNA bantları beyaz ışık kutusunda görüntülenir [44].

2.2.4. DNA'nın Jelden Geri Kazanılması

Elektroförez sonrası jelden dilimler halinde kesilen spesifik DNA bantları 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine bırakılır ve DNA, QIAquick jel ekstraksiyon kiti, QIAGEN, kullanılarak saflaştırılır [45].

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

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

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

Reaksiyon 37°C'de thermal cyclerda 1,5 saat olarak gerçekleştirilir. Daha sonra DNA örnekleri kristal viyole ile boyalı jelde yürütülür ve QIAquick jel ekstraksiyon kiti, QIAGEN, kullanılarak jelden saflaştırılır [45].

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

DNA örnekleri, *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildikten sonra örneklerin konsantrasyonu dikkate alınarak çeşitli insert:vektör oranları ile ligasyon yapılmıştır. Ligasyon reaksiyonları ve bileşenleri aşağıda verilmiştir:

	<u>1:1 oranı</u>	<u>3:1 oranı</u>	<u>1:3 oranı</u>
10x Ligasyon Tamponu	1 µl	1 µl	1 µl
İnsert	100 ng	300 ng	100 ng
Vektör	100 ng	100 ng	300 ng
T4 DNA Ligaz (3 u/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Steril dH ₂ O	X µl	X µl	X µl
Toplam	10 µl	10 µl	10 µl

Ligasyon reaksiyonu, örnekler 4 °C'de bir gece bekletilerek gerçekleştirilir.

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

E. coli hücreleri 2x YT agarda 37°C'de bir gece inkübe edilir. İnkübasyon sonrası tek bir koloni steril bir kürdan yardımı ile alınır, 5 ml 2x YT buyyon içerisine atılır ve 37°C'de 100 rpm'de çalkalamalı etüvde bir gece inkübe edilir. Bir gecelik kültürden 500 µl alınarak 250 ml'lik erlendeki 50 ml 2x YT buyyona inoküle edilir. OD₅₅₀'deki hücre yoğunluğu 0,3-0,4 arasında bir değere ulaşıncaya kadar inkübe edilir. Kültür belirtilen yoğunluğa ulaşıncaya iki falkon tüpüne bölünür. 25 ml'lik kültürün her biri 5.000 rpm'de 5 dakika boyunca 4°C'de santrifüjlenerek hücreler çöktürülür. Süpernatant (üstte kalan sıvı faz) dökülür. Pelet (altta kalan çökelti) üzerine 25 ml CaCl₂ solüsyonu ilave edilir. 30 dakika buz içerisinde bekletilir. 5.000 rpm'de 5 dakika 4°C'de santrifüj edilir. Bu aşamada tüpleri sarsmamaya dikkat edilir. Süpernatant dökülür. Pelete 1 ml CaCl₂ solüsyonu ilave edilir. 1,5-2 saat buz içerisinde bekletilen hücreler ya hemen transformasyonda kullanılır ya da daha sonra kullanılmak üzere sıvı nitrojen içerisinde gliserol stoğu hazırlanarak -70°C'de saklanır [43].

2.2.8. Transformasyon

Ligasyonu yapılmış örneğin üzerine hazırlanan kompetant hücreden 200 µl ilave edilir ve karıştırılır. 30 dakika buzda bekletilir. Daha sonra 42°C'deki su banyosunda 90 saniye süreyle sıcak şoku uygulanır (Bu aşamada tüpler kesinlikle sarsılmamalıdır). Hemen 300 µl 2x YT buyyon ilave edilir. Çok iyi bir şekilde karıştırılır. 30 dakika 37°C'de gerçekleştirilen

inkübasyon sonrası 100 µl /mI amfisilin içeren 2x YT agar besiyeri içeren petrilere ekim yapılır [43].

2.2.9. Koloni PCR

Alt klonlama sonrası besiyeri üzerinde gelişen kolonilere iki ayrı steril kürdan yardımı ile dokunulur. Kürdanlardan birisi 100 µl/mI amfisilin içeren 2x YT buyyon içerisine atılır. Buyyon, 37°C’de inkübasyona bırakılır. Diğer kürdan koloni PCR’ı gerçekleştirmek üzere içerisinde 50 µl steril dH₂O bulunan bir mikrosantrifüj tüpü içerisine aktarılır. Koloni kalıntısı kürdandan tamamen ayrılıncaya kadar kürdan su içerisinde karıştırılır. Daha sonra örnek 10 dakika kaynatılır, 13.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatantın 10 µl’si kalıp olarak kullanılarak aşağıda şartları verilen reaksiyon gerçekleştirilir:

<i>Taq</i> tamponu	5 µl (enzim ile beraber verilmiştir)
MgCl ₂	3 µl (stok; 25 mM)
dNTP’ler	5 µl (stok; herbiri 10mM olan dNTP’lerden 10’ar µl ve 10 µl dH ₂ O)
<i>Pv7</i> primeri	2,5 µl (stok; 20 pmol/µl)
<i>Pv13</i> primeri	2,5 µl (stok; 20 pmol/µl)
Kalıp DNA	10 µl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	0,5 µl (stok; 5 u/µl)
dH ₂ O	21,5 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 25 döngü olarak gerçekleştirilir.

Koloni PCR’dan pozitif sonuç alınması durumunda inkübasyona bırakılan kültürden stok kültür hazırlanır.

2.2.10. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE, B10-RAD Mini-PROTEAN® 3 Celli jel elektroföres sistemi kullanılarak yapılmıştır. Proteinleri ayırmak için kullanılan jel aşağıdaki gibi hazırlanmıştır (46).

Ayırma jeli (% 12)

dH₂O

1,5 M Tris HCl (pH:8.8)

% 10 SDS

% 30 Akrilamid/ Bis

% 10 Amonyum persülfat

% 10 TEMED

Yükleme jeli (% 4)

dH₂O

0.5 M Tris HCl (pH:6.8)

%10 SDS

%30 Akrilamid/ Bis

% 10 Amonyum persülfat

% 10 TEMED

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

SDS-PAGE metodu, aynı zamanda hücre ekstraktlarının genel analizini yapmak için kullanılmıştır. Bunun için 500 µl hücre kültürü 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek pelet 50 µl dH₂O ile çözülür. Eşit hacimde SDS-PAGE SAB boyasının ilavesinden sonra 5 dakika kaynatılır ve elektroforez işlemi yapılır [46].

2.2.11. Western Blot ile Mutant PvLDH Proteinlerinin Belirlenmesi

Blotlama öncesinde SDS-PAGE ile proteinlerin jelden ayrılması sağlanır. Immobilon-P transfer membranı (Millipore) jel hüyükülüğünde kesilir. Filtre kağıtları ile birlikte 1 saat transfer tamponu içerisinde bekletilir. Elektroforez sonrasında jel 15 dakika transfer tamponu içerisinde bekletilir. Western blota özgü kasetin kapağı açılır. Alt tarafa filtre kağıdı ve onun üzerine jel yerleştirilir. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek membran ve tekrar bir filtre kağıdı

yerleştirilir. Kasetin kapağı kapatılır ve elektroforez tankına yerleştirilir. Tanka buz ünitesi yerleştirildikten sonra transfer tamponu ile doldurulur ve güç kaynağına bağlanarak 100 V'da 1 saat akım verilir. Blotlama manyetik karıştırıcı üzerinde gerçekleştirilerek ısıнын dağılması sağlanır. Blotlama sonrası membran, PBS Tween 20'de 10 dakika yıkanır. % 5'lik yağsız süt tozu içerisinde 4°C'de bir gece blokama yapılır. Bloklamadan sonra PBS Tween 20'de 10 dakika yıkanır. % 5'lik süt tozu ile 1/1.000 oranında seyreltilmiş primer antikor ilave edilir. Oda sıcaklığında 1 saat bekletilir. 10 dakika PBS Tween 20'de yıkama işlemi 3 defa tekrar edilir. % 5'lik süt tozu ile 1/12.000 oranında seyreltilmiş sekonder antikor ilave edilir. Oda sıcaklığında 1 saat bekletilir. Yine aynı şekilde 10 dakika PBS Tween 20'de yıkama işlemi 3 defa tekrar edilir. Yıkama sonrasında 60 mg 3,3'- Diaminobenzidin (DAB), 100 ml PBS, 100 µl H₂O₂ içerisinde bantlar belirinceye kadar bekletilir. Daha sonra dH₂O içerisine alınarak reaksiyon durdurulur [43].

2.2.12. Mutant Laktat Dehidrogenaz Enzimlerinin Aktivitelerinin Ölçülmesi

Mutant *PvLDH* genini içeren *E. coli* hücreleri 100 µg/ml amfisilin içeren 2x YT buyyon içerisinde 37°C'de 100 rpm'de bir gece inkübe edilir. Bir gecelik kültürün 500 µl'si 100 µg/ml amfisilin içeren 50 ml 2x YT buyyon içerisine inoküle edilir ve 37°C'de 100 rpm'de OD₆₀₀ : 0,6'ya ulaşınca kadar inkübe edilir. 0,5 mM IPTG (Isopropil-B-D-thiogaltopiranosid) ilavesinden sonra belirli aralıklarla (time 0, 1. saat, 2. saat, 3. saat, 5. saat, bir gecelik) kültür örnekleri alınır.

1 ml kültür 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Pelet 500 µl, 50 mM TEA, pH:7.5 içerisinde çözülür. Hücreler, sonikatör (Bandelin Sonopuls, Almanya) ile güç 2'de iki defa 10 saniye parçalanır. 5 dakika buz içerisinde bekletilir. 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant LDH aktivitesinin ölçümü için temiz bir tüpe alınır [47].

Mutant *PvLDH* enzimlerinin aktivitelerinin ölçülmesi. UNICAM (JV-Visible spektrofotometre kullanılarak NADH'ın NAD⁺ 'a çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranı takip edilerek yapılır. Bütün reaksiyonlar 50 mM KCl içeren 20 mM Bis-Tris solüsyonu, pH:6.0 ile 25°C'de gerçekleştirilir. Reaksiyon için 500 mM pürivat ve 50 mM NADH kullanılır. 1 ml'lik küvete enzim ve NADH solüsyonları bırakılır ve en son pürivat ilavesi ile reaksiyon başlatılır. Aktivite, 10 mM ve 1 mM pürivat konsantrasyonlarında ölçülür [47], LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu projenin amacı, *PvLDH*'ın aktif bölgesini analiz etmektir. Diğer *Plasmodium* türlerinde olduğu gibi *PvLDH*'ın aktif bölge halkasında fazladan 5 amino asidin varlığı gözlenmiştir. Bundan dolayı bu çalışma yeni antimalarial ilaçlar ve ortak ilaç tasarımı için potansiyel yeni bir hedeftir [10].

Bu tez çalışmasında, *PvLDH*'ın aktif bölge halkasındaki ilave 5 amino asidin delesyonu 5 aşamada gerçekleştirilmiştir. Her aşamada, gen bir önceki aşamaya göre bir amino asit kısaltılmıştır. Elde edilen mutant proteinler Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: *PvLDH*'ın aktif bölge halkasındaki ilave 5 amino asidin delesyonunun gösterilmesi (104. amino asit tanımlanmamıştır).

	98	108	109
<i>PvLDH</i>	A G F T K A - P G K S D K E W N R		
<i>PvD</i>	A G F T K A - P G K S - K E W N R		
<i>PvK</i>	A G F T K A - P G K S - - E W N R		
<i>PvE</i>	A G F T K A - P G K S - - - W N R		
<i>PvW</i>	A G F T K A - P G K S - - - - N R		
<i>PvN</i>	A G F T K A - P G K S - - - - - R		

3.1. *PvLDH*'ın Aktif Bölge Halkasındaki Aspartik Asit_{108A} Amino Asidinin Delesyonu

PvLDH'ın aktif bölge halkasındaki 5 amino asit, serin-108 ile arjinin-109 arasında olup birinci amino asit aspartik asittir (D_{108A}). İlk aşamada yönlendirilmiş mutagenез ile bu amino asit tek başına *PvLDH* amino asit dizisinden çıkarılmıştır. Elde edilen D_{108A} amino asidi delesyona uğramış olan *PvLDH* geni, *PvDLDH* geni olarak ifade edilmiştir.

3.1.1. *PvDLDH A ve B* Fragmentlerinin Elde Edilmesi

İlk olarak *PvLDH*'ın iki mutant DNA fragmentleri elde edilmiş ve bunlar *PvDLDH A* fragmenti ve *PvDLDH B* fragmenti olarak adlandırılmıştır. PCR'da *Pv 7* ve *Pv 13* primerleri kullanılmıştır ve aşağıdaki şartlarda PCR gerçekleştirilmiştir:

PvDLDH A Fragmenti

10x *Pfu* Tamponu

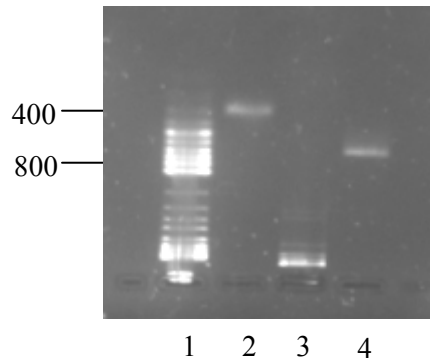
5 µl (enzim ile beraber verilmiştir)

dNTP'ler	5 µl (stok; herbiri 10mM olan dNTP'lerden 10'ar µl ve 10 µl dH ₂ O)
<i>Pv</i> 7	2,5 µl (stok; 20 pmol/µl)
D-2	2,5 µl (stok; 20 pmol/µl)
<i>Pv</i> LDH DNA	1,5 µl
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	0,5 µl (stok ; 2,5 u/µl)
Steril dH ₂ O	33 µl (son hacim 50 µl olacak şekilde)

Pv DLDH B Famenti

10x <i>Pfu</i> Tamponu	5 µl (enzim ile beraber verilmiştir)
dNTP'ler	5 µl (stok; herbiri 10mM olan dNTP'lerden 10'ar µl ve 10 µl dH ₂ O)
<i>Pv</i> 13	2,5 µl (stok; 20 pmol/µl)
D-1	2,5 µl (stok; 20 pmol/µl)
<i>Pv</i> LDH DNA	1,5 µl
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	0,5 µl (stok ; 2,5 u/µl)
Steril dH ₂ O	33 µl (son hacim 50 µl olacak şekilde)

Amplifikasyon 94°C'de 1.5 dakika, 58°C'de 2 dakika, 72°C'de 2 dakika ve 20 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen *Pv*DLDH A ve B fragmentleri %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. *Pv*DLDH A fragmenti için 281 baz çifti (bp), *Pv*DLDH B fragmenti için 693 bp uzunluğunda DNA bantları oluşması beklenmiş ve doğru büyüklükte bantlar gözlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 *Pv*DLDH A ve B fragmentlerinin elde edilmesi. Hatlar: (1) Marker (Hyper Ladder 1); (2) *Pv* DLDH A Fragmenti; (3) Lambda Marker; (4) *Pv* DLDH B Fragmenti.

3.1.2. *Pv* DLDH Geninin Tam Uzunluğunun Elde Edilmesi

Agaroz jelden saflaştırılan *Pv* DLDH A ve B fragmentleri *Pv*LDH geninin iki parçasıdır. İki fragment birleştirilerek *Pv* DLDH geninin tam uzunluğunun elde edilmesi amaçlanmıştır. *Pv* DLDH 'in A ve B fragmentlerini birleştirmek için iki basamaklı PCR yapılmıştır. PCR şartları aşağıda verilmiştir.

PCR Basamak I

10x <i>Pfu</i> Tamponu	2,5 µl (enzim ile beraber verilmiştir)
dNTP'ler	2,5 µl (stok; herbiri 10mM olan dNTP'lerden 10'ar µl ve 10 µl dH ₂ O)
<i>Pv</i> DLDH A fragmenti	2 µl 5-50 ng
<i>Pv</i> DLDH B fragmenti	2 µl 5-50 ng
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	0,5 µl (stok ; 2,5 u/µl)
Steril dH ₂ O	15,5 µl (son hacim 25 µl)

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

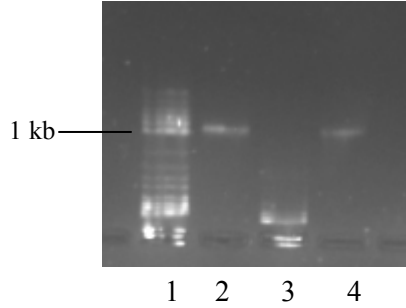
Basamak I'in tamamlanmasından sonra aşağıda verilen Basamak II bileşenleri PCR tüplerine ilave edilerek reaksiyon aşağıda verilen şekilde gerçekleştirilmiştir:

PCR Basamak II

10x <i>Pfu</i> Tamponu	2,5 µl (enzim ile beraber verilmiştir)
dNTP'ler	2,5 µl (stok; herbiri 10mM olan dNTP'lerden 10'ar µl ve 10 µl dH ₂ O)
<i>Pv</i> 7	2,5 µl (stok; 20 pmol/µl)
<i>Pv</i> 13	2,5 µl (stok; 20 pmol/µl)
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	0,5 µl (stok ; 2,5 u/µl)
Steril dH ₂ O	14,5 µl (son hacim 25 µl)

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

2 aşamalı olarak gerçekleştirilen PCR sonucunda *PvLDH* geninin tam uzunlukta amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR ile elde edilen *PvDLDH* geni %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *PvLDH* geninin tam uzunluğunun elde edilmesi.

Hatlar: (1) Marker (Hyper Ladder 1); (2) *Pv DLDH1* geni; (3) Lambda Marker; (4) *PvDLDH2* geni.

3.1.3. *Pv DLDH* Geninin ve pKK223-3 Vektörünün Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesilmesi

PCR sonrası elde edilen *PvDLDH* geni *Eco* RI ve *Pst* I restriksiyon endonükleaz enzimlerinin (RE) kesim bölgelerini içeren *Pv* 7 ve *Pv* 13 primerleri ile amplifiye edildiği için genin baş ve son kısmı bu enzimlerin kesim bölgelerini taşımaktadır. Bu nedenle *Pv DLDH* DNA örnekleri ve aynı zamanda genin aktarılacağı pKK223-3 vektörü *Eco* RI ve *Pst* I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş ve yapışkan uçlar oluşturularak ligasyona hazır duruma getirilmiştir.

3.1.4. *Pv DLDH* Geninin pKK223-3 Vektörüne Aktarılması

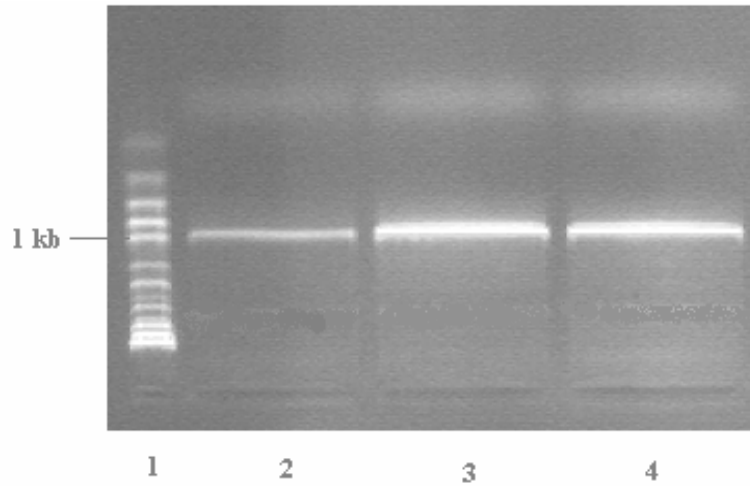
Restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılan kesim sonrasında *PvDLDH* genini DNA ligaz yardımı ile pKK223-3 vektörüne aktarmak için ligasyon reaksiyonu Bölüm 2.2.6'da anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.1.5. Rekombinant DNA'nın JM 105 Hücrelerine Transformasyonu

Ligasyon sonrası elde edilen rekombinant DNA (pKK223-3 vektörü -*Pv DLDH* geni)

örnekleri ve pozitif kontrol olarak hiçbir restriksiyon enzimi ile kesilmemiş olan 100 ng pKK223-3 vektörü JM 105 hücrelerine aktarılmıştır. Bunun için bölüm 2.2.7’ de anlatıldığı gibi kompetant hücreler hazırlanmıştır. Daha sonra ligasyonu yapılmış örneklerin üzerine hazırlanan kompetant hücreden 200 µl ilave edilip karıştırılmıştır. 30 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra 42°C’deki su banyosunda 90 saniye süreyle sıcak şoku uygulanmış, hemen 300 µl 2x YT buyyon ilave edilmiştir. Çok iyi bir şekilde karıştırılıp 30 dakika 37°C’de gerçekleştirilen inkübasyon sonrası 100 µl /ml amfisilin içeren 2x YT agar besiyeri içeren petrilere ekim yapılmıştır [43].

Transformasyon sonrası seçilen bazı kolonilerin *PvDLDH* genine sahip olup olmadıklarını anlamak için koloni PCR’ları yapılmıştır. Bunun için genin tam uzunluğunu amplifiye edecek olan *Pv* 7 ve *Pv* 13 uç primerleri kullanılmıştır. Koloni PCR sonrası jel üzerinde klonlanan genin büyüklüğünde bir bant görülmesi seçilen koloninin bu geni taşıdığını göstermektedir.

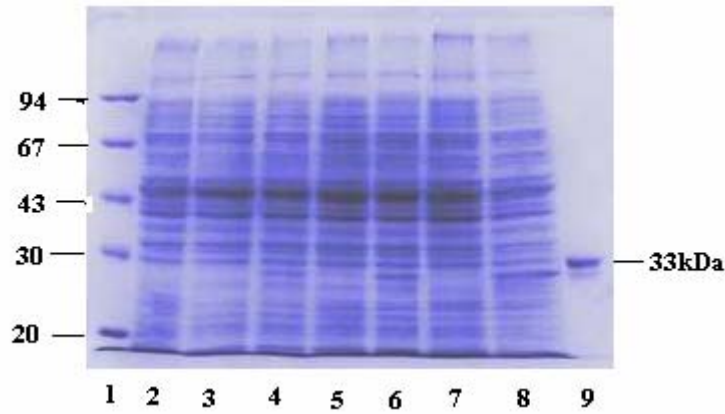


Şekil 3.3: Koloni PCR’dan sonra pozitif sonuçların jelde görüntülenmesi Hatlar: (1) Markır (Hyper Ladder I); (2,3,4) koloni PCR sonrası pozitif sonuçlar.

Hat 2, 3, 4’de yaklaşık olarak 1 kb büyüklüğünde bir bant görülmüş olup bu bantlar pozitif sonuç elde edildiğini göstermektedir (Şekil 3.3). Daha sonra dizi analizi yapılmış ve sonuçların pozitif olduğu doğrulanmıştır (Ek1).

3.1.6. *Pv* DLDH Geninin JM 105 Bakteri Soyundaki Ekspresyonu

JM 105 hücresine aktarılan *Pv*DLDH geninin mutant proteinini üretip üretmediğini kontrol etmek için SDS-PAGE ile geni içeren JM 105 hücresinin ekstraktının genel analizi yapılmıştır. Bunun için hücreler, logaritmik fazda (OD_{600} : 0,6), indükleyici madde olarak 0,5 mM IPTG ilave edilerek genin ekspresyonu teşvik edilmiştir. Bu aşamadan sonra belirli aralıklarla alınan kültür örneklerinin SDS-PAGE ile jel üzerindeki ekspresyonu kontrol edilmiştir.

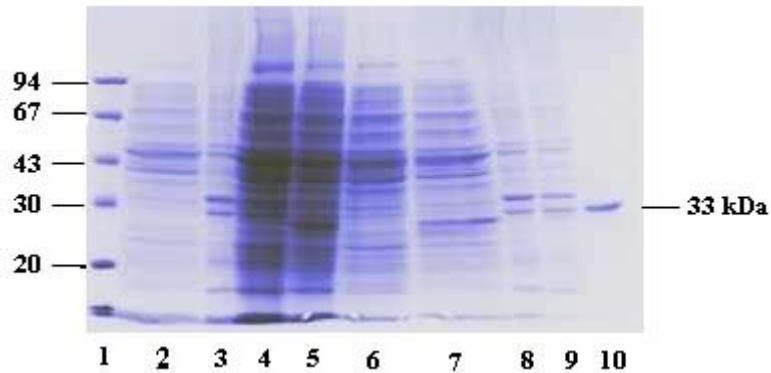


Şekil 3.4: *Pv* DLDH geni içeren JM 105 hücre ekstraktının genel protein profili. Hatlar: (1) Markır (LMW); (2) Herhangi bir genin aktarılmadığı JM 105 hücrelerinin genel protein profili; (3 ve 4) İndüklenmiş ve indüklenmemiş *Pv* DLDH geni içeren 3 saatlik JM 105 hücrelerinin protein profili; (5 ve 6) İndüklenmiş ve indüklenmemiş *Pv*DLDH geni içeren 5 saatlik JM 105 hücrelerinin protein profili; (7 ve 8) İndüklenmiş ve indüklenmemiş *Pv*DLDH geni içeren bir gecelik JM 105 hücrelerinin protein profili; (9) İnsan saf LDH proteini.

Şekilde 3.4’de *Pv*DLDH geninin ekspresyon jelinin fotoğrafı görülmektedir. Jelde logaritmik faz sonrası kültürden alınan 3 saatlik, 5 saatlik ve bir gecelik örnekler yürütülmüştür. *Pv*DLDH proteinin büyüklüğünü daha iyi tespit edebilmek için jelde aynı zamanda 33 kDa büyüklüğündeki insan saf LDH proteini yürütülmüştür. Bu protein bandı dikkate alındığı zaman yürütülen bütün örneklerde bu büyüklükteki bandın hemen altı ve üstü hizasında sabit iki bant görülmektedir. *Pv*DLDH proteini bu iki bant arasında bulutlanma benzeri bir bant olarak görülmektedir. Ancak *Pv*DLDH genini içermeyen JM 105 hücrelerinde bu bant bulunmamaktadır. Bu farklılık, LDH protein bandının JM 105 bakteri soyuna ait olmayıp bu hücreye aktarılan *Pv*DLDH geninin ekspresyon ürünü olduğunu doğrulamaktadır. LDH proteininin belirgin bir bant yerine bulutlanma benzeri bir bant olarak görülmesi protein

ekspresyonunun zayıf olmasından ileri gelmektedir [46]. En iyi protein ekspresyonu bir gecelik örneklerde gözlenmiştir. IPTG'nin *PvDLDH* geni üzerindeki indükleyici etkisini görmek için hem IPTG ile indüklenen hem de indüklenmeyen genlerin ekspresyon sonrası protein bantları karşılaştırılmış ve IPTG ile indüklenmiş *PvDLDH* geninde ekspresyonun arttığı gözlenmiştir. IPTG ile muamele edilen ve edilmeyen JM 105 hücrelerinin genel protein profilleri karşılaştırıldığı zaman bazı protein bantlarının ekspresyon düzeylerinin her ikisinde farklı olduğu görülmüştür. Birbirine eşdeğer protein bantları IPTG ile muamele edilen JM 105 hücrelerinin protein profilinde büyük bir bant olarak görülürken IPTG ile muamele edilmeyen hücrelerin protein profilinde diğerine göre daha zayıf olduğu tespit edilmiştir. Bu proteinlerin ekspresyon farkı dikkate alınarak IPTG'nin *PvDLDH* geninden farklı olarak JM 105 bakteri soyuna ait bazı genler üzerinde de indükleyici etki yaptığı tespit edilmiştir.

PvDLDH proteinin ekspresyonu kontrol edildikten sonra bu proteinin aktif olup olmadığını belirlemek için geni içeren JM 105 hücrelerinin süpernatant ve peleti Bölüm 2.2.12'de belirtilen şekilde hazırlandıktan sonra jelde ayrı ayrı yürütülmüştür. Aktif protein hücre içerisinde çözünabilir yapıda olup süpernatant fazı içerisinde bulunurken inaktif protein çözünemeyen yapıda pelet fazı içerisinde yer almaktadır. Dolayısıyla bu fazların protein profilinde, *PvDLDH* proteininin bulunup bulunmadığına bakmak için jel üzerinde yürütülmüştür. (Şekil 3.5) Bundan sonra *PvDLDH* proteinin aktivitesi spektrofotometre ile kontrol edilmiştir.



Şekil 3.5: *Pv DLDH* geni içeren JM105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının ayrı ayrı protein profillerinin gösterilmesi. Hatlar: (1) Markır (LMW); (2 ve 3) Herhangi bir genin aktarılmadığı JM 105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazları; (4 ve 5) İndüklenmiş ve indüklenmemiş *Pv DLDH* geni içeren bir gecelik JM 105 hücrelerinin genel protein profili, (6 ve 7) İndüklenmiş ve indüklenmemiş DSDKI geni içeren bir gecelik JM 105 hücrelerinin süpernatant fazı; (8 ve 9) İndüklenmiş ve indüklenmemiş *Pv DLDH* geni içeren bir gecelik JM105 hücrelerinin pelet fazı; (10) İnsan saf LDH proteini.

3.1.7. PvDLDH Proteininin Aktivitesinin Ölçülmesi

Bölüm 2.2.12’de anlatılan şekilde PvDLDH genini içeren JM 105 hücrelerinin süpernatant fazı hazırlanmıştır. PvDLDH proteininin kinetik olarak tayini ve aktivitesinin ölçülmesi bu süpernatant fazı kullanılarak ve NADH’ın 340 nm’deki absorbansı takip edilerek yapılmıştır. Tablo (3.2)’de görüldüğü gibi PvDLDH proteini aktif olup D108A amino asidinin PvLDH enziminden çıkarılması proteinin aktivitesinde hiçbir değişiklik yapmamıştır. PvLDH proteini, aktif bölge halkasındaki 5 amino asit insersiyonunda meydana gelen bu kısılmaya karşı toleranslıdır. Buna dayanarak bir amino asit kısılmasının, antimalarial tasarım çalışmalarında direnç mekanizmalarının oluşup oluşmaması konusunda etkili olmayacağı sonucuna varılmıştır.

Tablo 3.2: PvDLDH proteininin aktivitesinin ölçülmesi. (LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiş olup bu değerlerin ortalaması verilmiştir).

$\Delta A_{340}/\text{dakika}$			10 mM Pürivat	1 mM Pürivat
P_v DLDH genini içeren JM 105	İndüklenmemiş	3 saat	0,068	0,061
	İndüklenmiş		0,203	0,166
	İndüklenmemiş	Bir gece	0,155	0,165
	İndüklenmiş		0,656	0,765
JM 105	3 saat		0,007	0,002
	Bir gece		0,015	0,007

Yine tablo (3.2)’de görüldüğü gibi PvDLDH genini indükleme, logaritmik fazın 3. saatinde ve bir gecelik örneklerde aktiviteyi yaklaşık olarak 4 kat arttırdığı gözlemlenmiştir. Bununla beraber pürivat konsantrasyonunun artışı aktiviteyi artırmıştır. PvDLDH genini içermeyen JM105 hücrelerinde herhangi bir LDH aktivitesi gözlemlenmemiştir. Bu da gözlenen LDH aktivitesinin klonlanan gene ait olduğunu göstermiştir.

3.1.8. Western Blot ile Protein Aktivitesinin Doğrulanması

Daha önce bölüm 2.2.11’ de de anlatıldığı gibi blotlama işlemleri yapılmış ve LDH proteini bu mutant protein için doğru büyüklükte tanımlanmıştır.

3.2. *Pv*LDH Aktif Bölge Halkasındaki Aspartik Asit_{108A} Lisin_{108B} Amino Asitlerinin Delesyonu

*Pv*LDH aktif bölge halkasındaki aspartik asit_{108A} amino asidinin delesyonuna ilave olarak ikinci insersiyon amino asidi lisin_{108B}'in de (K_{108B}) delesyonu gerçekleştirilmiştir. Böylece iki amino asit kısalmasının proteinin aktivitesi üzerinde nasıl bir değişim meydana getireceği araştırılmıştır. Gen üzerinde delesyonun gerçekleştirilmesi için daha önce kullanılan deneysel yöntemlerin aynısı yapılmıştır. Bütün preparatif amaçlı jel elektroforezi için kristal viyole ile boyanan agaroz jel kullanılmıştır. İki amino asidinin (D_{108A}K_{108B}) delesyonu yapılmış olan gen *Pv*KLDH olarak ifade edilip, dizi analizi yapılmıştır (Ek-2). Bu gen, JM 105'e aktarılmış olup ekspresyonu yine bu bakteri soyunda yapılmıştır. Protein üretimi tespit edildikten sonra bu proteinin enzimatik aktivitesinin olup olmadığı araştırılmıştır.

*Pv*LDH proteininin aktif bölge halkasındaki iki amino asidinin delesyonu sonrası elde edilen *Pv*KLDH proteininin JM 105'de aktif olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla *Pv*LDH proteini aktif bölge halkasında yapılan iki amino asit delesyonunu tolere edebilmektedir. İnsan LDH dizisi ile karşılaştırıldığı zaman bu iki amino asit *Pv*KLDH'da ilave olarak bulunmakta olup amino asit dizisinden çıkarılmaları durumunda protein aktivitesi için önem arzetmemektedir.

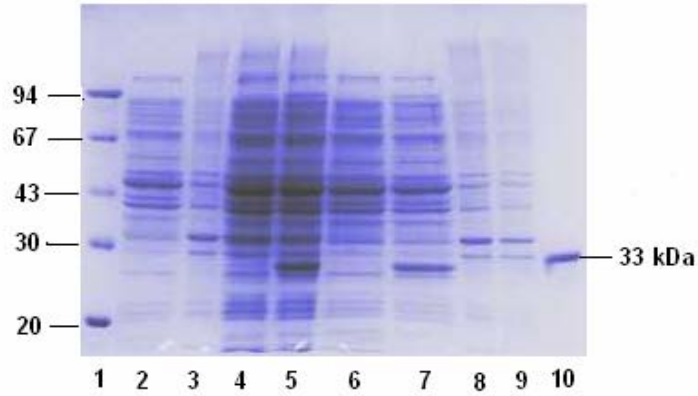
3.3. *Pv*LDH'ın Aktif Bölge Halkasındaki Aspartik Asit_{108A} Lisin_{108B} Glutamik Asit_{108C} Amino Asitlerinin Delesyonu

*Pv*LDH'ın aktif bölge halkasındaki 5 amino asit insersiyonundan her defasında bir amino asit kısaltma işleminin yapıldığı tez çalışmasının bu aşamasında aspartik asit_{108A}lisin_{108B} amino asitlerinden sonra glutamik asit_{108C} (E_{108C}) amino asidi de çıkarılarak meydana gelen üç amino asitlik bir kısalma ile protein aktivitesindeki farklılık araştırılmıştır. Bu kısımda elde edilen protein *Pv*ELDHDH olarak tanımlanmış ve dizi analizi yapılmıştır (Ek-3). Diğer delesyonların gerçekleştirilmesi sırasında yapılan bütün deneysel yöntemler aynı olmakla beraber ekspresyon JM 105 bakteri soyunda gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon sonrası proteinin aktivitesi kontrol edilmiş ve herhangi bir enzimatik aktivite görülememiştir. *Pv*ELDHDH'ın spektrofotometre ile aktivite ölçümünün sonuçları Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3: *Pv*ELDH proteininin aktivitesinin ölçülmesi (LDH aktivitesinin ölçülmesi 3 defa tekrar edilmiş olup bu değerlerin ortalaması verilmiştir).

$\Delta A_{340}/\text{dakika}$			10 mM Pürivat	1 mM Pürivat
<i>Pv</i> ELDH genini içeren JM 105	İndüklenmemiş	3 saat	0,072	0,031
	İndüklenmiş		0,067	0,052
	İndüklenmemiş	Bir gece	0,141	0,058
	İndüklenmiş		0,507	0,041
JM 105	3 saat		0,003	0,001
	Bir gece		0,018	0,007

Tablo (3.3)'de verilen ölçümlere göre, *Pv*ELDH proteininin aktivitesinin olmadığı gözlenmiştir. Proteinin inaktif olarak elde edilmesinden sonra protein ekspresyonunun jel üzerinde doğru büyüklükteki bir bant oluşturup oluşturmadığı kontrol edilmiştir. Zayıfta olsa doğru büyüklükteki bantlar gözlenmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: *Pv*ELDH geni içeren JM 105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazlarının ayrı ayrı protein profillerinin gösterilmesi. Hatlar: (1) Markır (LMW); (2 ve 3) Herhangi bir genin aktarılmadığı JM 105 hücrelerinin süpernatant ve pelet fazları; (4 ve 5); İndüklenmiş ve indüklenmemiş *Pv*ELDH geni içeren bir gecelik JM 105 hücrelerinin genel protein profili, (6 ve 7); İndüklenmiş ve indüklenmemiş *Pv*ELDH geni içeren bir gecelik JM 105 hücrelerinin süpernatant fazı; (8 ve 9); İndüklenmiş ve indüklenmemiş *Pv*ELDH geni içeren bir gecelik JM 105 hücrelerinin pelet fazı; (10) İnsan saf LDH proteini

Diğer iki amino asitle beraber E_{108C} amino asidinin çıkarılması ile *Pv*LDH proteininde üç amino asitlik bir kısalma yapılmıştır. Protein bu kısalma ile inaktif duruma gelmiştir. Bu durum proteinin, yapısında meydana gelen kısalmayı kabul etmediğini göstermektedir. Bu önemli bir

sonuç olup üçüncü amino asidin çıkarılmasıyla beraber proteinin aktivitesini ve stabilitesini kaybettiği, dolayısıyla yeni antimalarial bulma çalışmalarında hedef bölge olarak seçtiğimiz bu bölgenin değişimlere dayanıklı olmayacağı ve bu bölgenin bloklanmasının enzim aktivitesini durduracağı sonucuna varılmıştır. Enzim aktivitesinin durması da kandaki parazitin yok edilmesi anlamına gelmektedir.

3.4. *PvLDH*'ın Aktif Bölge Halkasındaki Aspartik Asit_{108A}Lisin_{108B}Glutamik Asit_{108C} Triptofan_{108D} Amino Asitlerinin Delesyonu

Bu aşamada 5 amino asit insersiyonunun dördü (*D*_{108A}*K*_{108B}*E*_{108C}*W*_{108D}) *PvLDH* dizisinden çıkarılmış, elde edilen protein *PvWLDH* olarak adlandırılmış ve dizi analizi yapılmıştır (Ek-4).

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

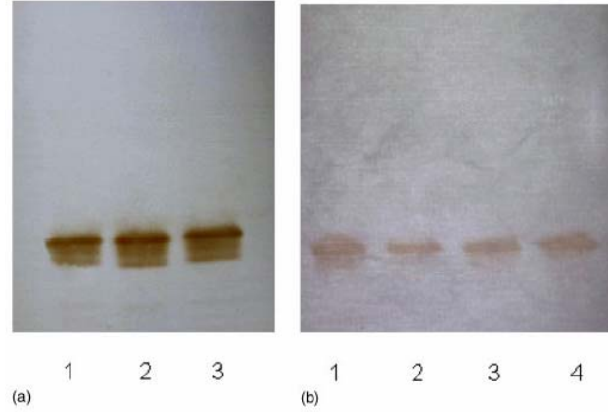
$\Delta A_{340}/\text{dakika}$			10 mM Pürivat	1 mM Pürivat
<i>PvWLDH</i> genini içeren JM 105	İndüklenmemiş	3 saat	0,011	0,003
	İndüklenmiş		0,015	0,007
	İndüklenmemiş	Bir gece	0,014	0,005
	İndüklenmiş		0,043	0,001
JM 105	3 saat		0,007	0,002
	Bir gece		0,015	0,007

Bir önceki aşamada toplam üç amino asidin delesyonu ile protein inaktif olmuştur. Dolayısıyla bu aşamada ekspresyonu yapılan *PvWLDH* proteininin ve bundan sonraki diğer delesyonun sonucunda elde edilecek proteinin aktif olmayacağı beklenmiştir. Yapılan aktivite ölçüm çalışmaları *PvWLDH* proteininin inaktif olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar tablo 3.4'de verilmiştir.

3.5. *PvLDH*'ın Aktif Bölge Halkasındaki İlave 5 Amino Asidin Tamamının Delesyon

Tez çalışmasının son aşamasında, *PvLDH*'ın aktif bölge halkasındaki ilave 5 amino asidin tamamının delesyonu yapılmış, dizi analiziyle doğrulanmış (Ek-5) ve elde edilen *Pv*

NLDH proteininin inaktif olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç Western blot çalışması ile kontrol edilmiştir. Daha önceden bahsedildiği gibi aktif protein hücre içerisinde çözünabilir yapıda olup süpernatant fazı içerisinde bulunurken inaktif protein çözünemeyen yapıda pelet fazı içerisinde yer almaktadır. Yapılan Western blot çalışması sonunda pelet fazında protein bandı görülebilmektedir. Buna rağmen süpernatant fazında herhangi bir protein bandı görülememiştir (Şekil3.7). Böylece proteinin üretildiği fakat inaktif olduğu ispatlanmıştır.



Şekil 3.7: *P* LDH’da yapılan mutasyon sonucunda mutant proteinin Western Blot ile gösterilmesi. a) 1- Kontrol LDH 2- *PvDLDH* 3- *PvKLDH* (Süpernatant) b) 1- Kontrol LDH 2- *PvELDH* 3- *PvWLDH* 4- *PvNLDH* (pelet)

Böylece insan LDH dizisi ile karşılaştırıldığı zaman *PvLDH*’da ilave olarak bulunan 5 amino asidin protein için ne kadar önem arzetmekte olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla 5 amino asidin oluşturduğu yarığa konacak bir enzim inhibitörünün bu bölgede yapacağı bir değişiklik sonucunda enzim kolaylıkla inaktif hale gelecek ve enzim aktivitesi engellenince ideal olarak kandaki parazit yok olacaktır.

Tablo3.5: PvLDH'in ve diğer bazı LDH'ların amino asit dizilerinin karşılaştırılması. İlave 5 amino asit koyu harflerle gösterilmiştir.

	1	2729	32	48	53	61	65	72	76	85	
human-m	ATLKDQLIYNL	.LKEEQTPQNKITVVGVGAVG	MACAISILMKDLADELALVDVIEDK	LKGEMMDLQHGS	LFL	.RTPKIVSGKDYNVTANSKLVI					
pfalc		MAPKAKIVLVGSGMIGGV	MATLIVQKNLGD	.VVLFDIVKNMPHGKALDTSHTNV	MAYSNCKVSGSNTYDDL	AGADVVI					
pvivax		MTPKPKIVLVGSGMIGGV	MATLIVQKNLGD	.VVMFDDVKNMPQGKALDTSHTNV	MAYSNCKVTGSNSYDDL	KGADVVI					
povale		MAPKAKIVLVGSGMIGGV	MATLIVQKNLGD	.VVMFDIVKNMPLGKALDTSHTNV	MAYSNCQVTGSNTYEDL	KGADVVI					
pmalariae		MAPKAKIVLVGSGMIGGV	MATLIVQKNLGD	.VVMFDIVKNMPYGKALDTSHMNV	MAYSNCKVTGSNSYEDL	KGADVVI					
	98	109	110	116	140	143	156	163	168	171	173
human-m	ITAGARQQEGES		RLNLVQRNVNIFKFIIPNVVKYSPNCKLLIVSNPVDILT	YVAWKISGF	PKNRVIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHP						
pfalc	VTAGFTKAPGKS	DKEWNR	DDLLPLNNKIMIEIGGHIKNC	PNAFIIVVTNPVDVMVQ	LLHQHSGVPKNKIIGLGGVLDTSRLKYYISQKLN	VCP					
pvivax	VTAGFTKAPGKS	DKEWNR	DDLLPLNNKIMIEIGGHIKNLCP	NAFIIVVTNPVDVMVQ	LLFEHSGVPKNKIIGLGGVLDTSRLKYYISQKLN	VCP					
povale	VTAGFTKAPGKS	DKEWNR	DDLLPLNNKIMIEIGGHIKNYCP	NAFIIVVTNPADVMVQ	LLHQHSGVSKNKIVGLGGVLDTSRLKYYISQKLN	VCP					
pmalariae	VTAGFTKVP	DKEWNR	DDLLPLNNKIMIEIGGHVKNYCP	NAFIIVVTNPVDVMVQ	LLHKHSGVPKNKIVGLGGVLDTSRLKYYISQKLN	VCP					
	188	195	204		237	243	246	250		270	
human-m	LSCHGWVLGEHGDSSVPVWSGMNVAGVSLKTLHPDLGTDKDKEQWKEVHKQV	VESAYEVIK	LKGYT	SWAIGLSVADLAESIMKNLRRVHPVSTM							
pfalc	RDVNAHIVGAHGNKMVLLKRYITVGGIPLQEFINNK	.LISDAE	.LEAIFDRTVNTALEIVNLHASPYVAPAAAI	EMAESYLDLKKVLICSTL							
pvivax	RDVNALIVGAHGNKMVLLKRYITVGGIPLQEFINNK	.KITDEE	.VEGIFDRTVNTALEIVNLLASPYVAPAAAI	EMAESYLDIKKVLVCSTL							
povale	RDVNAHIVGAHGNKMVLLKRYITVGGIPLQEFINNK	.KITDAE	.LDAIFDRTVNTALEIVNYHASPYVAPAAAI	EMAESYLDLKKVLICSTL							
pmalariae	RDVNALIVA	AHGNKMVPLKRYITVGGIPLQEFINNK	.KITDAE	.LDAIFDRTVNTALEIVNLHASPYVAPAAAI	EMAESYIKDLKKVLICSTL						
	280	290	297	306	311	318	322				
human-m	IKGLYGIKDDVFLSVPCILQNGISDLVKVTLTSEEEARLKK	SADTLWGIQKELQF									
pfalc	LEGQYGHS	.DIFGGTPVVLGANGVEQVIELQLNSEEKAKFDEAIAETKRMKALA*	...								
pvivax	LEGQYGHS	.NIFGGTPLVIGGTGVEQVIELQLNAEEKTKFDEAVAETKRMKALI									
povale	LEGQYGHT	.GVFGGTPLVLGCNGVEQVFELQLNAEEKKMFD	DAIAETSRMK								
pmalariae	LEGQYGHS	.DIFGGTPLVLGANGVEQVIELQLNSEEKKKFDEAIAETNR	MK								

4. SONUÇ

Malaria parazitlerinin klasik antimalariallara karşı dirençli hale gelmesi yeni ilaçların tasarımını zorunlu hale getirmiştir. Bu yüksek lisans tez çalışmasında sıtmaya karşı etkili olacak yeni ilaç tasarım çalışmalarına sağlayacağı katkıyı test edebilmek için hedef enzim olarak seçilen *PvLDH*'ın aktif bölge halkasındaki ilave 5 amino asidin kısalması ile meydana gelebilecek yapısal değişikliğe proteinin ne kadar toleranslı olduğu araştırılmıştır.

Yapılan araştırmalar sonucunda protein, aktif bölge halkasındaki 5 amino asitten 2 amino asidin çıkartılmasını tolere etmiştir. Ancak bu bölgede 2'den fazla amino asidin çıkartılmasında proteinin inaktif hale geldiği görülmüştür. Aktif bölgedeki ilave 5 amino asidin delesyonu enzimatik aktiviteyi ortadan kaldırmıştır. Çünkü aktif bölgenin kısaltılması enzimin substratı ile etkileşimini etkileyerek enzimin inaktif hale gelmesine sebep olmuştur.

Plasmodial LDH'lardaki kristalografi çalışmaları, katalitik halkadaki aktif bölgeyi çok iyi tanımlamıştır. Plasmodium türleri arasındaki LDH enzimlerinin aktif bölgelerinin yapısında belirgin bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bundan dolayı elde edilen sonuçlara göre parazitin LDH'ını engelleyen bir inhibitörün plasmodium türlerinden birine karşı geliştirilmesi aynı zamanda diğer plazmodium türlerine karşı da etkili olabileceği ve dolayısıyla yüksek seçicilik gösteren inhibitörler bulunarak enzim aktivitesinin kolaylıkla engellenip parazitin yok edilebileceği düşünülmektedir [10].

KAYNAKLAR

- 1- Knell, A. J., 1991, Malaria, Oxford University Press, Oxford, 915.
- 2- Gardner, M. J. et al, 2002, Genome Sequence of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*, 419, 498-511.
- 3- World Health Organisation (WHO) and UNICEF (2005) World Malaria Report, 2005.
- 4- <http://www.rbm.who.int>
- 5- Chaikuad, A., Fairweather, V., Connors, R., Josep-Horne, T., Turgut-Balik, D., Brody, R.L., 2005, Structure of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium vivax*: Complexes with NADH and APADH, Biochemistry Published on WEB (ASAP Article 10.1021/bio51416y S0006-2960(05) 01416-9).
- 6- Unat, E.K., Yücel, A., Altaş K., Samastı, M., 1995, Unat'ın Tıp Parazitoloji- İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıklar, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları: 15, İstanbul, 664s.
- 7- Mendis, K., 2002, The Neglected Burden of *Plasmodium vivax* Malaria American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 64,97-106.
- 8- Darwin, K., Malaria. at A Glance, 2002, Wellcome News Malaria Supplement 6 the Wellcome Trust, 36p.
- 9- Gilles, H.M., 1993, Diagnostic Methods in Malaria, in Bruce-Chwatt's Essential Malariology, 3rd Edition (Gilles, H.M., Warrel, D. A. eds), Edward Arnold, 340p.
- 10- Turgut-Balik, D., Sadak, D., Çelik, V., 2006, Analysis of Active Site Loop Amino Acids of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium vivax* by Site-Directed Mutagenesis Studies, Drug Development Research 67: 175–180.
- 11- Roth, E. F. J. R., Calvin, M.C., Max-Audit, I., Rosa, R., 1988, The Enzymes of the Glycolytic Pathway in Erythrocytes Infected with *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites, Blood, 72, NO: 6,1922-1925.
- 12- Klenerman, P., Dickson, H., 1992, Plasma Lactate Dehydrogenase Estimation in the Diagnosis of Malaria, Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 86, 563-565.
- 13- Makler, M. T., Hinrichs, D. S., 1993, Measurement of the Lactate Dehydrogenase Activity of *Plasmodium falciparum* as an Assessment of Parasitemia, Journal of Tropical Medicine And Hygiene, 48, No: 2, 205-207.
- 14- 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.

- 15- Royer, R. E., Deck, L. M., Campos, N. M., Hunsakar, L. A., Vander Jagt, D. L., 1986, Biologically Active Derivatives of Gossypol: Synthesis and Antimalarial Activities of Per Acetylated Gossypol Nitriles, *Journal of Medicinal Chemistry*, 29, 1799-1801.
- 16- Turgut-Balik, D., Hulbrook, 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.
- 17- Turgut-Balik, D., Shoemark, D. K., Sessions, R. B., Moreton, K. M. & Hulbrook, J. J., 2001, Mutagenic Exploration of the Active Site of Lactate Dehydrogenase Genes from *Plasmodium falciparum*, *Biotechnology Letters*, 23, 923-927.
- 18- Dunn, C. R., Banfield, M. J., Berker, J. J., Hijiya, C. W., Moreton, K. M., Turgut-Balik, D., Brady, R. L. & Hulbrook, J. J., 1996, The Structure of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* Reveals a New Target for Anti-malarial Design, *Nature Structural Biology*, 3, 912-915.
- 19- Turgut-Balik, D., Akbulut, E., Shoemark, D. K., Celik, V., Sessions, R., Moreton, K., Brady, R. L., 2004, Molecular Cloning Sequence Analysis and Parasite *Plasmodium vivax*, *Biotechnology Letters*, 26, 1051-1055.
- 20- Gilles, H. M., 1993, Diagnostic Methods in Malaria, In Bruce-Chwatt's Essential Malariology, 3rd Edition (Gilles, H. M., Warrel, D. A. eds), Edward Arnold, 340p.
- 21- Tracey, J., Webster, L., 1996, Drugs Used in the Chemotherapy of Protozoal Infections, (In Hardman, J., Molinoff, P., Rudon, R. and Gilman, A., Editors) Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, Pergamon Press, New York, 978-1017 pp.
- 22- Ridley, R. G., 2002, Medical Need, Scientific Opportunity and the Drive for Antimalarial Drugs, *Nature*, 415, 686-693.
- 23- John E. Hyde, 2005, Drug-resistant Malaria Trends in Parasitology Vol: 21 No: 11, 494-498.
- 24- www.who.int (Guidelines for the Treatment of Malaria).
- 25- Sanchez, C. P., Lanzer, M., 2000, Current Opinion in Infect. Dis. 13, 653-658.
- 26- Ginsburg, H., War, S. A., Bray, P. G., 1999, Parasitology Today, 15, 357-360.
- 27- Loria, P., Miller, S., Foley, M., Tilley, L., 1999, Biochemical Journal, 339, 363-370.
- 28- Foley, M., Tilley, L., 1998, Pharmacology & Therapeutics, 79, 55-87.
- 29- Giancarlo, A. B., Paul M O'Neill, Patrick G Bray and Stephan A Ward, 2005, Current Drug Development Portfolio For Antimalarial Therapies, *Current Opinion in Pharmacology*, 5: 473-478.

- 30- Ian Bathurst and Chris Hentschel, 2006, Medicines for Malaria Venture: Sustaining Antimalarial Drug Development, Trends in Parasitology Vol:22, No: 17.
- 31- De D., Krogstad F. M., Cogswell FB., Krogstad, DJ., Aminoquinolines that Circumvent Resistance in *Plasmodium falciparum* in vitro AmJ Trop Med Hyg, 1996, 55:579-583.
- 32- Colin W. Wright, 2005, Traditional Antimalarials and the Development of Novel Antimalarial Drug, Journal of Ethnopharmacology, 100, 67-71.
- 33- Holbrook, J. J., Liljas, A., Steindel, S. J., Rossmann, M. G., 1975, Lactate Dehydrogenase, in: Boyer, D. P. (Ed.), the Enzymes, Vol. XI, Academic Press, New York, 292.
- 34- Fersht, A., 1985, Structures and Mechanisms of Selected Enzymes, W. H. Freeman and Company, New York, 400.
- 35- Gomez, M. S., Piper, R. C., Hunsaker, L. A., Royer, R. E., Deck, L. M., Makler, M. T., Vander Jagt, D. L., 1997, Substrate and Cofactor Specificity and Selective Inhibition of Lactate Dehydrogenase from the Malarial Parasite *Plasmodium falciparum*, Molecular and Biochemical Parasitology, 90, 235-246.
- 36- 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.
- 37- Basco, L.K., Marquet, F., Makier, 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.
- 38- Trager, W., 1986, Metabolism, Energy Sources, Respiration, in Living Together-the Biology of Animal Parasitism, Plenum, New York, 169s.
- 39- Sherman, I.W., 1979, Biochemistry of Plasmodium (Malarial Parasites) Microbiological Reviews, 43, No: 4, 453-495.
- 40- Sessions, R.B., Dewar, V., Clarke, A.R., Holbrook J.J., 1997, a Model of *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase and Its Implications for the Design of Improved Antimalarials and Enhanced Detection of Parasitaemia, Protein Engineering, 10, No.4, 301-306.
- 41- <http://www.mwg-biotech.com>
- 42- QIAGEN, QIAprep[®] Miniprep Handbook, 2003, cat. No:27104, Germany, 46p.
- 43- Sambrook, J. And Russell, D.W., 2001, Molecular Cloning a Laboratory Manual I-II-III, Third Edit., CSHL Press, New York.
- 44- Rand, K.N., 1996, Crystal Violet can be Used to Visualize DNA Bands During Gel Electrophoresis and to Improve Cloning Efficiency, Technical Tips Online.
- 45- QIAGEN, QIAquick[®] Spin Handbook, 2002, Cat. No: 28704, Germany, 34p.

- 46- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* 227, 5259, 680-685.
- 47- 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, 923-927.

ÖZGEÇMİŞ

Dilek SADAK

Doğum Yeri: Bingöl

Doğum Tarihi: 12.02.1981

Görevi: Biyolog

İş Adresi: Çağrı Tıp Merkezi, Elazığ

Tel: 0 424 237 28 50/ 138

0 424 241 39 91

e-posta: dsadak@gmail.com

2003-2006: Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eğitimi

Yüksek Lisans Tez Konusu: *Plasmodium vivax*'da LDH enziminin Aktif Bölge Halkası Amino Asitlerinin Yönlendirilmiş Mutagenez Çalışmalarıyla Analizi

Danışman: Doç. Dr. Dilek Turgut-Balık

1999-2003: Fırat Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde Lisans Eğitimi

1995-1999: Lise eğitimi

1987-1995: İlköğretim Eğitimi

EKLER

Dizi analizi sonuçları:

Ek-1: $P_v\text{DLDH}$ 'ın dizi analizi

Ek-2 : $P_v\text{KLDH}$ 'ın dizi analizi

Ek-3: $P_v\text{ELDH}$ 'ın dizi analizi

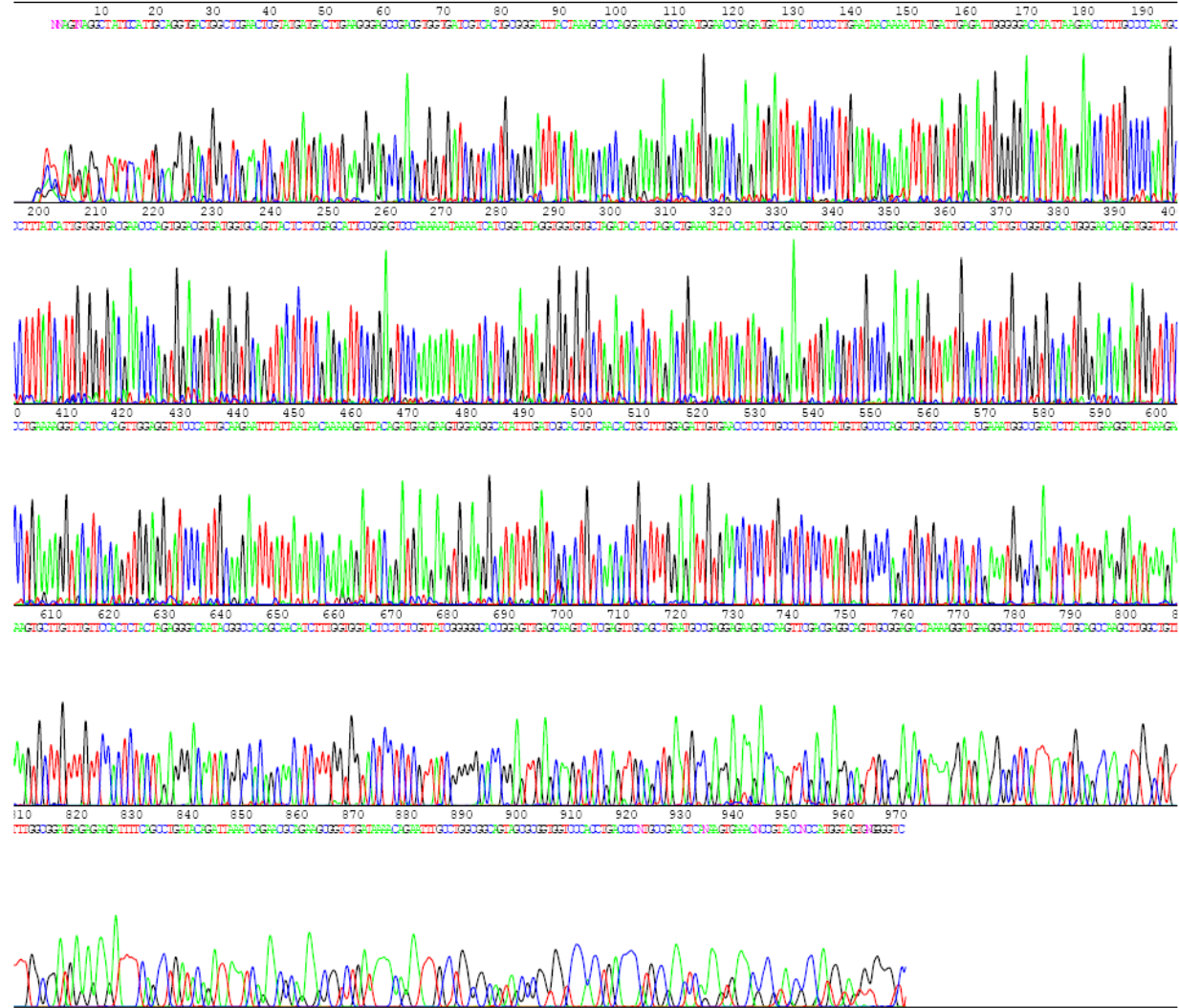
Ek-4 : $P_v\text{WLDH}$ 'ın dizi analizi

Ek-5 : $P_v\text{NLDH}$ 'ın dizi analizi

Ek-1: *Pv* DLDH'nin dizi analizi.



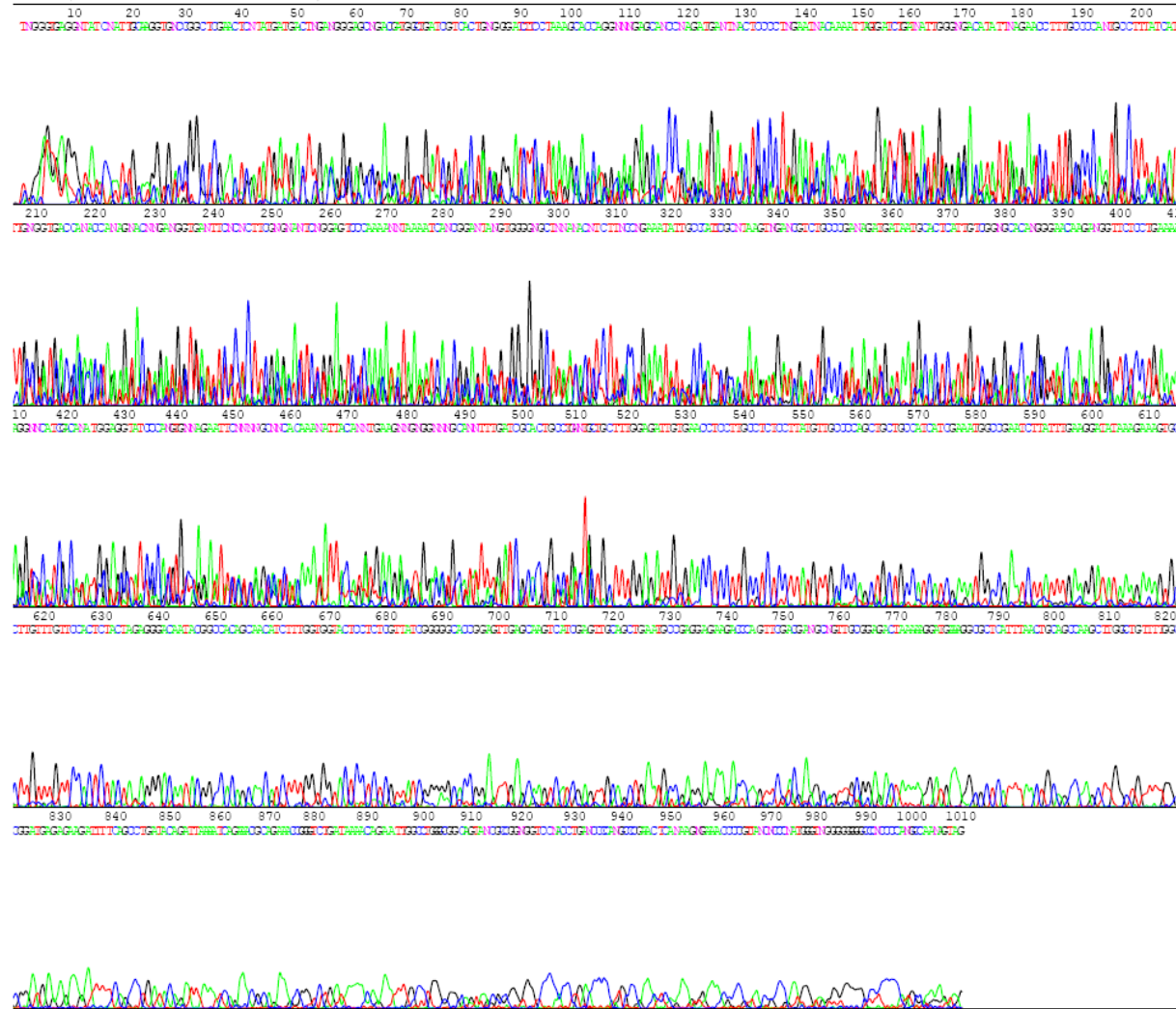
Ek-2: *Pv* KLDH'nin dizi analizi.



Ek-3: *Pv* ELDH'ın dizi analizi.



Ek-4: *Pv* WLDH'in dizi analizi.



Ek-5: Pv NLDH'ın dizi analizi.

