

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

THEILERIA ANNULATA'NİN LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİ
KODLAYAN GENİN ANALİZİ

BELMA NURAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. DİLEK TURGUT-BALIK

İSTANBUL, 2014

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***THEILERIA ANNULATA*'NİN LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİ**
KODLAYAN GENİN ANALİZİ

Belma NURAL tarafından hazırlanan tez çalışması 16 / 06 / 2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Alper YILMAZ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT
Yıldız Teknik Üniversitesi

ÖNSÖZ

Lisans hayatımda çalışma alanımı belirlerken rol modelim olan, lisansüstü laboratuvar ve tez çalışmamda bilgi ve deneyimi ile yol gösteren ve karşılaştığım her türlü zorluk karşısında sabırla çözüm üreten, akademik çalışma hayatıma başlayabilmem ve ilerlemem için her zaman destek olan, akademik çalışma hayatım dışında da fikir ve deneyimlerini paylaşan, kendisinden çok şey öğrendiğim değerli danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Dilek Turgut-Balık'a,

Tez çalışmasının yürütülmesine destek sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Başkanlığı'na ve bölümümdeki tüm hocalarıma,

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde desteklerini esirgemeyen Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne, Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Nimetullah Burnak'a ve Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Ahmet Çabuk'a,

Sağlamış oldukları destekten dolayı TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'na,

Tez çalışmamın yürütülmesi ve tamamlanmasında destek ve katkılarını esirgemeyen Uzman Ayşegül Erdemir, Araş. Gör. Ebru Çayır, Araş. Gör. Emrah Sarıyer, Araş. Gör. Özal Mutlu, Sinem Yakarsönmez, Ekrem Akbulut, Dr. Ebru Özkan, Zeynep Büşra Bolat, Zeliha Kaplan, Erennur Uğurel, Osman Uğurel ve İlke Güntan ile birlikte Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü'nde bulunan diğer yüksek lisans/doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Lisans hayatımın bana kazandırdığı değerli dostlarıma,

Hayatımın her anında olduğu gibi akademik hayatımın başlangıcında da yanımda olan ve aldığım kararlarda desteklerini hiç esirgemeyen sevgili aileme,

Bana ve bu teze emeği geçen herkese çok teşekkür ederim.

2014

Belma NURAL

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT.....	xvi
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.1.1 Yapıya Dayandırılmış İlaç Tasarımı	1
1.1.2 <i>Theileria</i>	3
1.1.2.1 <i>Theileria annulata</i> 'nın Yaşam Döngüsü	4
1.1.3 Theileriosis.....	7
1.1.4 <i>Theileria annulata</i> 'nın İlaç Direnci.....	12
1.1.5 Theileriosisin Tedavisinde Kullanılabilecek Potansiyel Yeni İlaç Hedeflerinin Tespiti.....	15
1.1.5.1 Laktat Dehidrogenaz Enzimi.....	16
1.1.5.2 Katalitik Mekanizması	17
1.1.5.3 Substrat İnhibisyonu	19
1.2 Tezin Amacı	20
1.3 Hipotez	20
BÖLÜM 2	
MATERYAL YÖNTEM	21
2.1 Materyaller	21
2.1.1 Kimyasallar, Enzimler ve Kitler	21

2.1.2	İfade Vektörü	22
2.1.3	<i>Escherichia coli</i> Soyu	23
2.1.4	Rekombinant DNA	23
2.1.5	Primerler	23
2.1.6	Deneyleerde Kullanılan Cihazlar	24
2.1.7	Bakteriyolojik Gelişim İçin Besiyerleri ve Solüsyonlar	25
2.1.8	Stok Solüsyonlar ve Tamponlar	26
2.2	Yöntem	34
2.2.1	Yönlendirilmiş Mutagenез ile <i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz Gen Dizisinden İntronların Uzaklaştırılması	34
2.2.1.1	PCR ürünlerinin Kristal-Viyole Jelde Yürütülmesi ve Saflaştırılması.	36
2.2.1.2	PCR ürünlerinin Etidyum-Bromür Jelde Yürütülmesi ve Saflaştırılması	36
2.2.2	İntronları Uzaklaştırılan <i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin İfade Vektörüne Aktarılması	36
2.2.2.1	aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) Sistemine Uygun Primerlerin Tasarlanması	37
2.2.2.2	<i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin İfade Vektörüne Aktarılmak Üzere Sisteme Spesifik Primerler ile Amplifikasyonu	37
2.2.2.3	LIC Reaksiyonu ve Rekombinant Plazmid DNA'ların <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu	38
2.2.2.4	Klonlanan <i>Ta</i> LDH Enzimini Kodlayan Genin Koloni PCR Metodu ile Kontrolü.	39
2.2.3	<i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz Enziminin Ekspresyonu	40
2.2.4	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi	41
2.2.5	<i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesinin Spektrofotometre İle Tayini	42
2.2.6	<i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz Enziminin Western Blot ile Analizi.	42
2.2.7	Klonlanan <i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin DNA Dizi Analizi ile Kontrolü	43
2.2.8	<i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Gende Belirlenen Mutasyonların Yönlendirilmiş Mutagenез ile Düzeltilmesi ve İfadelerinin Yapılması.....	43
2.2.9	<i>Theileria annulata</i> 'nın Laktat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması.	45
2.2.10	Enziminin Molekül Ağırlığı ve Molar Absorblama Katsayısının Değerlerinin Hesaplanması	46
2.2.11	Saflaştırılmış Enzimin Konsantrasyonunun Hesaplanması.....	46
2.2.12	Saflaştırılmış Enzimin Optimum pH ve Spesifik Aktivite Değerlerinin Belirlenmesi	47
2.2.13	Saflaştırılmış Enzimin Termostabilitesinin Belirlenmesi	47
2.2.14	Saflaştırılmış Enzimin Kinetik Analizi	48

2.2.15 <i>Theileria annulata</i> 'nın Laktat Dehidrogenaz Enziminin İleri Modellenmesi ve Muhtemel İlaç Bağlanma Bölgelerinin Belirlenmesi	50
--	----

BÖLÜM 3

SONUÇLAR VE TARTIŞMA	52
3.1 Yönlendirilmiş Mutagenез ile <i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz Gen Dizisinden İntronların Uzaklaştırılarak Açık Okuma Çerçevesinin Elde Edilmesi	52
3.2 İntronları Uzaklaştırılan <i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin İfade Vektörüne Aktarılarak Alt Klonlanması	55
3.2.1 <i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin İfade Vektörüne Aktarılması İçin Sisteme Özgü Primerler ile Amplifiye Edilmesi	55
3.2.2 LIC Reaksiyonu ve Rekombinant Plazmid DNA'ların <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu	56
3.2.3 Klonlanan <i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin Koloni PCR Metodu ile Kontrolü	57
3.3 <i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz Enziminin İfade Edilmesi	57
3.4 <i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesinin Kontrolü	59
3.5 <i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz Enziminin Western Blot ile Analizi	59
3.6 Klonlanan <i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin DNA Dizi Analizi ile Kontrolü ve Gendeki Mutasyonların Belirlenmesi	60
3.7 <i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Gende Belirlenen Mutasyonların Yönlendirilmiş Mutagenез ile Düzeltmesi ve İfadelerinin Yapılması.....	63
3.8 <i>Theileria annulata</i> 'nın Laktat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması	67
3.9 Enziminin Molekül Ağırlığı ve Molar Absorblama Katsayısının Değerlerinin Hesaplanması	70
3.10 Saflaştırılmış Enzimin Optimum pH ve Spesifik Aktivite Değerlerinin Belirlenmesi	70
3.11 Saflaştırılmış Enzimin Termostabilitesinin Belirlenmesi	72
3.12 Saflaştırılmış Enziminin Kinetik Analizi.....	73
3.13 <i>Theileria annulata</i> 'nın Laktat Dehidrogenaz Enziminin İleri Modellenmesi ve Muhtemel İlaç Bağlanma Bölgelerinin Belirlenmesi	78

BÖLÜM 4

DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER	93
4.1 Değerlendirme	93
4.2 Öneriler	97
KAYNAKLAR	98
ÖZGEÇMİŞ	107

SİMGE LİSTESİ

A	Absorbans
A°	Angstrom
Bç	Baz çifti
C	Konsantrasyon
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Kalsiyum klorür iki sulu
CV	Kristal viyole
dH ₂ O	Distile su
EtBr	Etidyum bromür
H ₂ O	Su molekülü
H	Hidrojen atomu
HCl	Hidroklorik asit
Ig	İmmüoglobulin
KCl	Potasyum klorür
Kg	Kilogram
kDa	KiloDalton
k _{cat}	Dönüşüm sayısı
K _i	İnhibisyon katsayısı
K _M	Michealis Menten sabiti
L	Litre
L	Hücre yol uzunluğu
LB	Luis Brooth
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Magnezyum klorür altı sulu
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Magnezyum sülfat yedi sulu
mg	Miligram
mM	Milimolar
M	Molar
MW	Moleküler ağırlık
Nm	Nanometre
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄	Sodyum fosfat
OD	Optik yoğunluk
V _{max}	Maksimum hız

V_E	Toplam hacim
U	Enzim Ünitesi
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
ϵ	Molar absorblama katsayısı
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece

KISALTMA LİSTESİ

ADH	Alkol dehidrogenaz
<i>B. bigemina</i>	<i>Babesia bigemina</i>
<i>B. bovis</i>	<i>Babesia bovis</i>
<i>B. divergen</i>	<i>Babesia divergen</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>Bacteriodes fragilis</i>
<i>Bf</i>	<i>Bacteriodes fragilis</i>
<i>BfLDH</i>	<i>Bacteriodes fragilis</i> laktat dehidrogenaz
<i>Bt</i>	<i>Bos taurus</i>
<i>BtLDHA</i>	<i>Bos taurus</i> laktat dehidrogenaz A enzimi
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Ethilendiamintetraasetik asid
HIV/ AIDS	İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü/Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
IFAT	İndirekt Floresans Antikor Testi
IPTG	İsopropil β -D-1-thiogalaktopiranosid
GAPDH	Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz
LDH	Laktat dehidrogenaz
LIC	Ligaz bağımsız klonlama reaksiyonu
MDH	Malat dehidrogenaz
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asit
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
Ni-NTA	Nikel-Nitritotriasetik asit
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>PfLDH</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> laktat dehidrogenaz
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>Pv</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>PvLDH</i>	<i>Plasmodium vivax</i> laktat dehidrogenaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
SAB	Örnek Yükleme Tamponu
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfata PoliAkrilamid Jel Elektroforezi
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>

<i>T. annulata</i>	<i>Theileria annulata</i>
<i>Ta</i>	<i>Theileria annulata</i>
<i>TaLDH</i>	<i>Theileria annulata</i> laktat dehidrogenaz
<i>T. buffeli</i>	<i>Theileria buffeli</i>
<i>T. mutans</i>	<i>Theileria mutans</i>
<i>T. taurotragi</i>	<i>Theileria taurotragi</i>
<i>T. velifera</i>	<i>Theileria velifera</i>
<i>T. orientalis</i>	<i>Theileria orientalis sergenti/buffeli</i>
<i>T. lestiquardi</i>	<i>Theileria estiquardi</i>
<i>T. ois</i>	<i>Theileria ois</i>
<i>T. parva</i>	<i>Theileria parva</i>
<i>T. sergenti</i>	<i>Theileria sergenti</i>
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamin
UV	Ultravijole

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. 1	İlaç tasarımının basamakları 2
Şekil 1. 2	<i>Theileria</i> türlerinin dünya üzerindeki dağılımı 3
Şekil 1. 3	<i>Theileria</i> türlerinin yaşam döngüsü 5
Şekil 1. 4	<i>Theileria annulata</i> 'nın enfekte ettiği hayvanların bulunduğu ülkelerin dünya üzerinde dağılımını gösteren harita 8
Şekil 1. 5	LDH'nin çift yönlü katalizlediği reaksiyon 16
Şekil 1. 6	Laktat dehidrogenazın çift yönlü katalizlediği reaksiyon 17
Şekil 1. 7	Substratın enzimin bağlanma bölgesinde etkileştiği rezidüel..... 18
Şekil 1. 8	Kofaktör ve substratın enzimin bağlanma bölgesinde etkileştiği rezidüel 19
Şekil 2. 1	pLate31 ifade vektörü..... 22
Şekil 2. 2	T4 DNA polimeraz ve dGTP ile ilgili genin yapışkan uçlarının oluşturulması 37
Şekil 2. 3	Birinci mutasyonun yönlendirilmiş mutagenез ile düzeltilmesi..... 43
Şekil 2. 4	İkinci mutasyonun yönlendirilmiş mutagenез ile düzeltilmesi 44
Şekil 3. 1	Genomik <i>Ta</i> LDH'nin yapısal analizi..... 52
Şekil 3. 2	Birinci intronun çıkarılmasından elde edilen saf PCR ürünleri 53
Şekil 3. 3	İkinci intronun çıkarılmasından sonra elde edilen saf PCR ürünleri..... 54
Şekil 3. 4	Birinci intronun uzaklaştırıldığını gösteren kromatogram görüntüsü..... 54
Şekil 3. 5	İkinci intronun uzaklaştırıldığını gösteren kromatogram görüntüsü..... 55
Şekil 3. 6	Amplifikasyon sonucunda elde edilen <i>Ta</i> LDH geni 56
Şekil 3. 7	Koloni PCR sonrasında elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü 57
Şekil 3. 8	Hücrelerin 5 saat inkübe edilmesinin ardından elde edilen ekspresyon sonucu..... 58
Şekil 3. 9	Farklı IPTG konsantrasyonlarda IPTG indüklemesi sonrası ifade edilen <i>Ta</i> LDH..... 59
Şekil 3. 10	<i>Ta</i> LDH ifade edilmesi sonrası Western blot analizi. 60
Şekil 3. 11	Klonlanan gen dizisi ile <i>Theileria annulata</i> 'nın referans dizisinin eşleştirilmesi 61
Şekil 3. 12	Alt klonması yapılan <i>Ta</i> LDH geninde belirlenen ilk nokta mutasyonu..... 62
Şekil 3. 13	Alt klonması yapılan <i>Ta</i> LDH geninde belirlenen ikinci nokta mutasyonu . 62
Şekil 3. 14	143. pozisyondaki amino asit farklılığının belirlenmesi..... 63
Şekil 3. 15	194. pozisyondaki amino asit farklılığının belirlenmesi..... 63

Şekil 3. 16	Birinci mutagenез sonrası elektroforez jel görüntüsü.	64
Şekil 3. 17	İkinci mutagenез sonrası elektroforez jel görüntüsü.	64
Şekil 3. 18	Transformasyon sonuçları	65
Şekil 3. 19	Birinci mutagenез sonrası seçilen kolonilerin PCR ile kontrolünün jel elektroforez görüntüsü.....	65
Şekil 3. 20	İkinci mutagenез sonrası seçilen kolonilerin PCR ile kontrolünün jel elektroforez görüntüsü.....	66
Şekil 3. 21	Hücrelerin indüklemeden sonra 3 saat, 5 saat ve 16 saat inkübasyonu sonucunda ölçülen aktivite değerlerinin grafiği	67
Şekil 3. 22	Mutagenезler sonrası elde edilen genden üretilen proteini inaktif proteinle karşılaştırmalı olarak gösteren SDS-PAGE görüntüsü.....	67
Şekil 3. 23	Poli-His tag'daki komşu rezidüer ile Ni-NTA matriksinin etkilişemi.....	68
Şekil 3. 24	Saflaştırma protokolünün uygulanması	69
Şekil 3. 25	Saflaştırma sonrası örneklerin SDS-PAGE analizi.....	69
Şekil 3. 26	Gliserol içeren tamponlar ile gerçekleştirilen saflaştırma sonrası jel görüntüsü	70
Şekil 3. 27	Optimum pH belirleme deneyinde pH değerine karşılık absorbans değerleri grafiği.....	72
Şekil 3. 28	Termostabilite deneyinde zamana karşı absorbans değerleri	73
Şekil 3. 29	Enzimin kinetik davranışı	75
Şekil 3. 30	Enzimin kinetik davranışı	77
Şekil 3. 31	<i>Theileria annulata</i> ve <i>Plasmodium falciparum</i> LDH'ları arasında amino asit düzeyinde eşleştirme.....	79
Şekil 3. 32	Hedef ve kalıp dizi benzerliği ve elde edilen homoloji modelleme içeriği arasındaki ilişki	79
Şekil 3. 33	<i>Ta</i> LDH 'ın seçilen en iyi modelinin görüntüsü	80
Şekil 3. 34	<i>Ta</i> LDH ve <i>Pf</i> LDH enzimlerinin aminoasit dizilerinin süperimpozisyonu....	81
Şekil 3. 35	<i>Ta</i> LDH ve <i>Bt</i> LDHA enzimlerinin aminoasit dizilerinin süperimpozisyonu.	82
Şekil 3. 36	Model <i>Ta</i> LDH'ın minimizasyon öncesi ERRAT programı sonucunun görüntüsü	83
Şekil 3. 37	Model <i>Ta</i> LDH'ın minimizasyon sonrası ERRAT programı sonucunun görüntüsü	83
Şekil 3. 38	Optimizasyon sonrası <i>Ta</i> LDH modelinin Z-skor sonucu	84
Şekil 3. 39	Optimizasyon sonrası <i>Ta</i> LDH modelinin enerji düzeyi grafiği.....	85
Şekil 3. 40	Optimizasyon sonrası <i>Ta</i> LDH modelinin Ramachandran diyagramı.	86
Şekil 3. 41	<i>Ta</i> LDH model proteinin ikincil yapı sonuçları	87
Şekil 3. 42	Protein yüzeyinde muhtemel ilaç bağlanma bölgesi olarak belirlenen bölgeler.....	88
Şekil 3. 43	Protein yüzeyinde belirlenen bölgelerin kalıp protein ile karşılaştırılarak dizi üzerinde kapladığı yerlerin gösterimi.....	89
Şekil 3. 44	Protein yüzeyinde belirlenen bölgelerinin dizi üzerinde kapladığı yerlerin gösterimi.	90
Şekil 3. 45	Belirlenen her bir bölgenin model protein üzerinde gösterilmesi.	91
Şekil 3. 46	Model proteinin aktif bölgelerinin DoGSiteScorer görüntüsü	92

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1	Tez çalışmasında kullanılan primerler 23
Çizelge 2. 2	Birinci intronu uzaklaştırmak amacı ile fragman 1 ve 2'nin elde edildiği PCR bileşenleri..... 34
Çizelge 2. 3	Fragman 1 ve 2 'nin birleştirme reaksiyonu için gerekli olan PCR bileşenleri 35
Çizelge 2. 4	İkinci intronu uzaklaştırmak amacı ile fragman 1 ve 2'nin elde edildiği PCR bileşenleri..... 35
Çizelge 2. 5	Fragman 1 ve 2'nin birleştirme reaksiyonu için gerekli olan PCR bileşenleri 35
Çizelge 2. 6	<i>Ta</i> LDH genini amplifiye etmek için kullanılan reaksiyon bileşenleri 38
Çizelge 2. 7	<i>Ta</i> LDH geninde 5' ve 3' yapışkan uçları oluşturmak için gerekli olan reaksiyon bileşenleri 38
Çizelge 2. 8	Koloni PCR bileşenleri..... 40
Çizelge 3. 1	<i>Ta</i> LDH ve BL21 (DE3) aktivite değerleri ($\Delta A_{340}/\text{min}$)..... 59
Çizelge 3. 2	Hücrelerin indüklemeden sonra 3 saat, 5 saat ve 16 saat inkübasyonu sonucunda ölçülen aktivite sonuçları..... 66
Çizelge 3. 3	Optimum pH değerinin belirlenmesi için yapılan çoklu tekrarlar sonucunda elde edilen aktivite değeri ($\Delta A_{340}/\text{dk}$)..... 71
Çizelge 3. 4	Termostabilite deneyinde çoklu tekrarlar sonucu elde edilen aktivite değeri ($\Delta A_{340}/\text{dk}$) 73
Çizelge 3. 5	Elüsyonların 280 nm'de ölçülen absorban değerleri 74
Çizelge 3. 6	A_{340}/dk 'da saf <i>Ta</i> LDH'ın farklı pirüvat konstrasyonlarındaki aktivite değerleri 74
Çizelge 3. 7	Saf <i>Ta</i> LDH enziminin Michealis-Menten sabitleri 76
Çizelge 3. 8	A_{340}/dk 'da saf <i>Ta</i> LDH'ın farklı pirüvat konstrasyonlarındaki aktivite değerleri 76
Çizelge 3. 9	Saf <i>Ta</i> LDH enziminin Michealis-Menten sabitleri 78
Çizelge 4. 1	Farklı türlerdeki laktat dehidrogenaz enzimlerinin pirüvat için kinetik değerlerinin karşılaştırılması 95

***THEILERIA ANNULATA*'NİN LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİ
KODLAYAN GENİN ANALİZİ**

Belma NURAL

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

Yapıya dayandırılmış ilaç tasarımı multidispliner yaklaşımlardan oluşan bir tekniktir. Bu teknik kullanılarak enfeksiyonların ve hastalıkların moleküler seviyede kontrolü sağlanmaktadır. Enzimler biyokimyasal reaksiyonlarda sahip oldukları önemli roller ve aktif ceplerine bağlanan küçük moleküller dolayısıyla yapıya dayandırılmış ilaç tasarımı için mükemmel ilaç hedeflerinden biridir. *Theileria annulata* sığırlarda theileriosis hastalığına neden olan bir parazittir. Parazitin kullanılan ilaçlara karşı gösterdiği direncin rapor edilmesiyle yeni ilaçların tasarlanması için yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasında parazitin biyokimyasal yolağında önemli bir enzim olan laktat dehidrogenaz enzimi yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmalarında hedef biyomolekül olarak seçilmiştir. Açık okuma çerçevesinde iki intron içeren *Theileria annulata* 'nın laktat dehidrogenaz enzimi daha önceki çalışmamızda klonlanmıştır.

Bu çalışmada iki intron PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез yöntemi ile uzaklaştırılarak pLATE31 vektörüne klonlaması yapılmış ve *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan kinetik analiz, SDS-PAGE ve Western Blot teknikleri ile proteinin inaktif formda olduğu gösterilmiştir. Dizilemesi yapılan gende bir tanesi yüksek derecede korunmuş nükleotid bağlanma bölgesinde bulunan iki mutasyon gözlenmiştir. Yabani hale dönüştürülmesi için yönlendirilmiş

mutagenез yöntemi kullanılarak gen dizisinde değişiklikler yapılarak mutasyonlar uzaklaştırılmıştır. Düzeltilen gen aynı ifade vektörüne klonlanmıştır. Çözülebilir formda elde edilen protein afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ile yüksek konsantrasyonda saf protein elde edildiği gösterilmiştir (≥ 95). Kinetik deneylerde kullanılması için optimum pH değeri belirlenmiş ve stabil olduğu sıcaklıkların gösterildiği termostabilite deneyi yapılmıştır. Kinetik analiz farklı pirüvat konsantrasyonları kullanılarak pH değeri 7,5 olan tamponda 25°C'de UV visible Spektrofotometre 'de ölçüm alınarak gerçekleştirilmiştir. Pirüvat için K_M değeri 0,1324 mM; V_{max} değeri 0,2304 ve substrat inhibisyonu dolayısıyla K_i değeri 4,295 mM olarak belirlenmiştir. Parametreler Graphpad Prism 6.0 programında substrat inhibisyon modülü seçilerek elde edilmiştir. Substratın ürüne dönüşümünü veren k_{cat} ve katalitik etkinlik değerini veren k_{cat}/K_M değerleri sırasıyla 44,55 s⁻¹ ve 3,3693 x 10⁵ M⁻¹s⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Tezin son bölümünde yapıya dayandırılmış ilaç tasarımının son aşaması olan homoloji modelleme elde edilen protein için de oluşturularak, proteinin muhtemel ilaç bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. Yüksek saflıkta aktif protein üretilmesi ileriki inhibitör çalışmalarının uygulanmasını sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Theileria annulata*, laktat dehidrogenaz, mutasyon, yönlendirilmiş mutagenез, yapıya dayandırılmış ilaç tasarımı, homoloji modelleme

**ANALYSIS OF GENE FROM *THEILERIA ANNULATA* CODING LACTATE
DEHYDROGENASE ENZYME**

Belma NURAL

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

Structure based drug design is a technique that consists of multidisciplinary approaches. This technique enables controlling of diseases and infections at molecular level. Enzymes are one of magnificent drug targets for structure based drug design because they have crucial role in biochemical pathways and small molecules bind to their active site to inhibit them. *Theileria annulata* is a parasite that causes theileriosis in cattle. Report of articles about resistance to currently available anti-theilerials requires development of new approaches to design new drugs.

In this thesis, LDH has been chosen as a target molecule for applying structure based drug design studies as this enzyme is crucial for the anaerobic life style of parasite. LDH gene from *T. annulata* was cloned in our previous studies, with having two introns in open reading frame.

In this study, these two introns were removed by site-directed mutagenesis, the gene was then inserted into vector pLATE31 and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells. Analysis of protein by kinetic assay, SDS-PAGE and Western blotting showed that protein was produced in inactive form. As this was not an expected result; the subcloned gene was resequenced and two mutations were observed, one of them being in highly conserved nucleotide binding domain of the protein. These mutations were removed by making exchange on the gene sequence to obtain wild type enzyme

using the site-directed mutagenesis technique. The corrected gene was then subcloned into the same expression vector. After confirmation of availability of soluble active enzyme, protein was purified by affinity chromatography. Purity of protein in high concentration was evaluated by SDS-PAGE (≥ 95). Optimum pH of enzyme was determined prior to kinetic analysis and its thermostability was defined. Kinetic analysis was performed using different pyruvate concentrations, at pH 7,5 at 25 °C by using UV visible spectrophotometer. K_M (0.1324 mM) for pyruvate, V_{max} (0,2304) and K_i (4,295mM) were calculated by choosing substrate inhibition module in Graphpad Prism 6.0. k_{cat} and k_{cat}/K_M was found as 44,55 s⁻¹ and 3,3693X10⁵ M⁻¹s⁻¹ respectively. All kinetic results were confirmed by using a microplate spectrophotometer. In the final section of thesis homology modelling of protein was built up and possible drug binding domains were determined. Production of highly pure active protein will enable application of further inhibitor studies.

Key words: *Theileria annulata*, lactate dehydrogenase, mutation, site-directed mutagenesis, structure based drug design, homology modelling

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Yapıya Dayandırılmış İlaç Tasarımı

İlaçlar hastalıkların tedavi edilebilmesi ve önlenmesi için hayati bir öneme sahiptir. Multidisipliner basamakların birleşiminden oluşan yaklaşım yapıya dayandırılmış ilaç tasarımının temelini oluşturmaktadır [1], bu teknik ile hastalığın ve enfeksiyonun moleküler ve fizyolojik düzeyde nasıl kontrol altına alınabileceği anlaşılabilir [2].

Bu yaklaşımda ilaç hedefi, temel olarak biyolojik ya da biyokimyasal temelli seçilmektedir [3]. Genomik, metabolomik ve proteomik bilgilerinin artması, biyolojik hedeflerin tercih edilmesini sağlamaktadır [4]. Proteomik bilgisi ve yapılarının ortaya çıkması ile proteinler, yapıya dayandırılmış ilaç tasarımında pazarlanabilecek ilaç ürünlerinin geliştirilmesinde optimize edilecek öncü moleküllerin hedefi olarak kullanılabilirler [5]. Proteinler, hastalıkların patolojisi, teşhisi ve tedavisini içeren temel biyolojik işlemlerin anlaşılmasında kilit rolüne sahip olmasının yanı sıra hastalık ve gen arasındaki kritik bağlantıyı da açıklayan makromoleküllerdir. Hücre mekanizmasını oluşturan proteinler, hücrelerin iletişim kurmasını, organizmanın kontrollü büyümesini ve ölmesini sağlamaktadır. Bu nedenle ilaç tasarımında en önemli hedef moleküllerden biri olmaktadır [4].

Protein yapısında olan enzimler, biyokimyasal reaksiyonların katalizlenmesinden sorumlu olan makromoleküllerdir [4], [6]. Küçük bir molekülün, aktif ceplerine bağlanmasıyla inhibisyona uğrayabilmektedirler. Sahip oldukları bu aktif ceplere uygun

tasarlanabilecek inhibitörlerin bulunabilmesi nedeniyle de enzimler mükemmel ilaç hedeflerinden biridir. Patojenik organizmaları hedef olarak geliştirilen inhibitörlerin tek amacı ise patojeni yok edebilmektir [4]. Bu durumun iyi çalışılmış örnekleri bulunmaktadır. Yapıya dayandırılmış ilaç tasarım yaklaşımı ile geliştirilen başarılı ilaçlar bulunmaktadır. Kronik miyeloid lösemi için kullanılan Imatinib; HIV/AIDS, malaria gibi hastalıklar için geliştirilen proteaz inhibitörleri bu ilaçlar arasında yer almaktadır [7], [1], [8].

Yapıya dayandırılmış ilaç tasarımı süreci genel olarak hedef biyomolekülün belirlenmesi ile başlayıp, belirlenen moleküle uygun inhibitör bileşiğin tasarımıyla tamamlanmaktadır [4]. Bu sürecin ilk aşaması, bileşiğin tasarlanacağı hedef biyomolekülün seçilmesi, validasyonu, klonlanması, ifade edilmesi ve uygun saflıkta elde edilmesi basamaklarından oluşmaktadır [2], [9]. Elde edilen saf molekül sürecin ikinci aşaması olan tekrarlı döngüye girmekte ve öncü molekül optimize edilinceye kadar bu süreçte işlenmektedir. Bu basamaklar ise; molekülün üç boyutlu yapısının belirlenmesi, bilgisayar temelli araçlar ile modellenmesi, bileşiğin elde edilmesi ve optimizasyonunun yapılmasıdır [2], [3], [9]. Son aşamada ise optimize edilen bileşiğin biyolojik testlerinin tamamlanması, klinik öncesi çalışmalar, klinik denemeler ve ticari olarak ilaç üretilmesi basamakları yer almaktadır [3] (Şekil 1. 1).

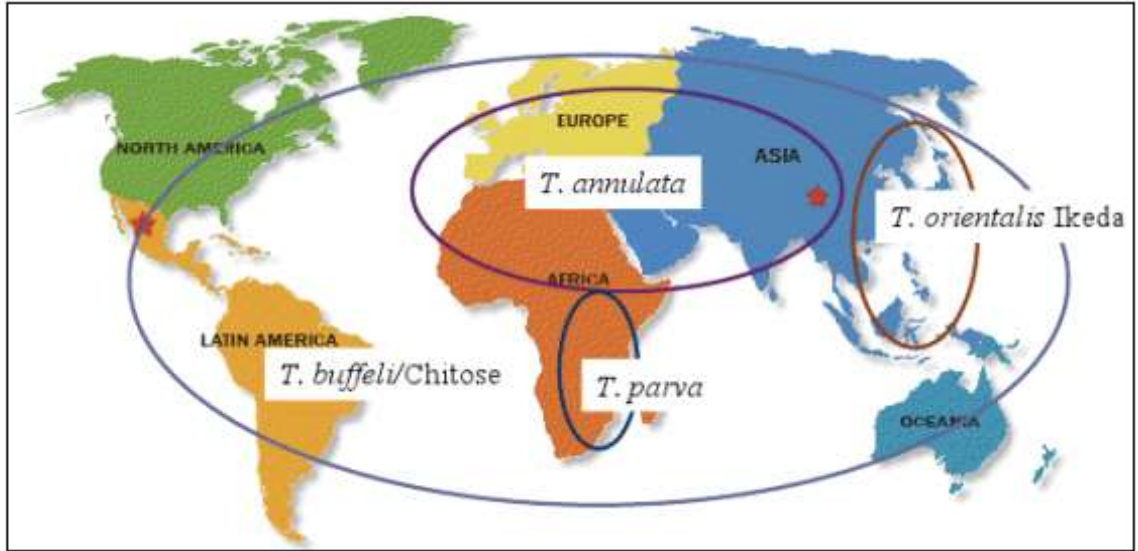
Yöntemin sağladığı üstünlükler ile birlikte, yaklaşımın *Theileria annulata*'nın (*T. annulata*) anaerobik metabolizmasındaki enzimlere uygulanabilirliği nedeniyle bu tez çalışması yapılmıştır.



Şekil 1. 1 İlaç tasarımının basamakları [10]

1.1.2 Theileria

Theileria; çiftlik hayvanları ve diğer memelilerin lenfositlerini ya da makrofaj/monosit soyu hücrelerini enfekte ederek konakların dolaşım ve kan sistemlerini etkilemektedir [11]. Ölümsüzlük yeteneğine sahip [12] hücre içi bu patojen kene kaynaklı theileriosis adı verilen parazitik protozoer hastalık oluşumuna neden olmaktadır [13], [14]. *Babesia*, *Eimeria*, *Plasmodium* ve *Toxoplasma*'nın bulunduğu apikompleksa şubesine aittir [12], [13]. Sığır, koyun ve keçilerde hastalığa sebep olan pek çok alt türü bulunmaktadır. *T. parva* (*lawrenci*, *parva*, *bovis*), *T. annulata*, *T. mutans*, *T. taurotragi*, *T. velifera*, *T. orientalis sergenti/buffeli* (sığırlarda); *T. lestiuardi* ve *T. ois*'dir (koyun/keçi) [15]. Sığırlarda sık görülen *Theileria* türlerinin kıtalar üzerindeki dağılımı Şekil 1. 2 'de verilmektedir.



Şekil 1. 2 *Theileria* türlerinin dünya üzerindeki dağılımı [15]

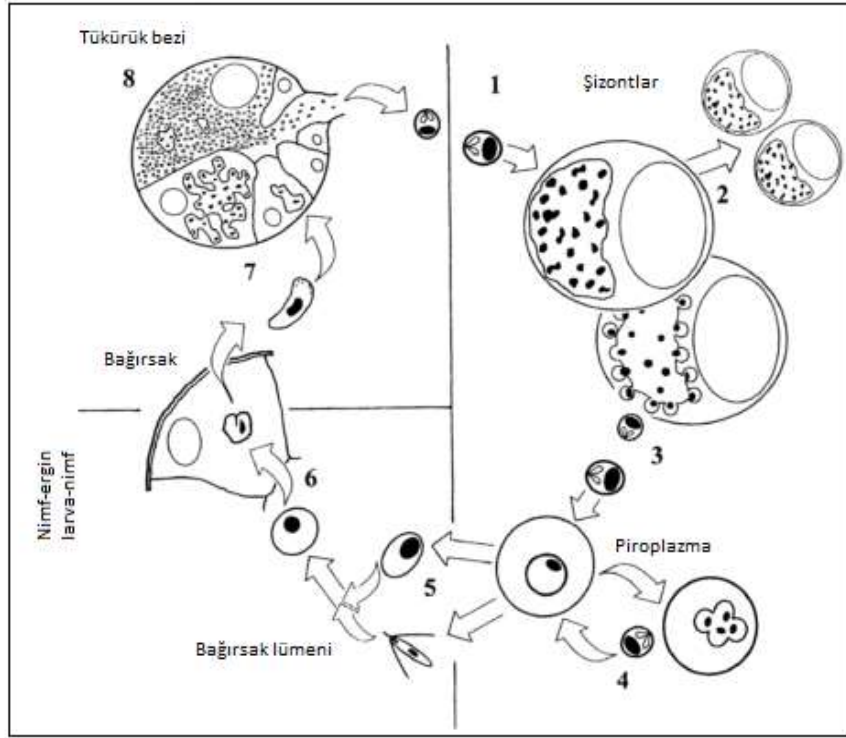
Theileria alt türleri geviş getiren hayvanları *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, *Hyalomma* ve *Haemaphysalis* cinsine ait keneler ile enfekte etmektedirler [16].

Neden oldukları ekonomik kayıp sebebiyle en önemli türler *T. parva* ve *T. annulata* olarak gösterilmektedir [16]. *T. annulata* ilk olarak 1904 yılında Transkafkasya sığırlarındaki tropikal plasmosis denilen hastalıkla tespit edilmiş ve *Piroplasma annulatum* olarak adlandırılmıştır [17]. 20. Yüzyılın ilk 20 yılında dünyanın endemik bölgelerinde çok fazla karışık terim kullanılmasına rağmen, parazitin yaşam döngüsünün şizont aşaması farkedilince *Theileria annulata* adı ile tekrar

sınıflandırılmıştır [13], [17]. 2005 yılında *T. parva*'nın genom analizinin [18] yapılmasından sonra karşılaştırmalı olarak Pain vd.[14] tarafından 2005 yılında *T. annulata*'nın da genom analizi yapılmıştır. *T. annulata* ve *T. parva* sığırlarda lenfoproliferatif hastalıklara neden olan yakın ilişkili parazitlerdir. *T. annulata*'nın nükleer genomu *T. parva*'ya benzer 8,35 Mb büyüklüğünde ve 4 kromozomdan oluşmaktadır. *T. annulata*'nın protein kodlayan 3792 geninin olduğu tahmin edilmektedir. Bunlara ek olarak, toplam 49 transfer RNA (tRNA) ve 5 ribozomal RNA (rRNA) geni bulunmuş ve türler arasında rRNA birimlerinin ortak özellikleri ortaya çıkarılmıştır. *T. annulata* ve *T. parva* türlerinin telomer ve olası sentromer baz bileşimi, büyüklüğü ve düzenlemede benzer olduğu tespit edilmiştir [14].

1.1.2.1 *Theileria annulata*'nın Yaşam Döngüsü

Theileria kompleks bir yaşam döngüsüne sahiptir ve tüm türlerinde benzer olmasına karşın, bu türlerin replikasyon seviyesinde ve gelişimlerinin zamanlamasında farklılıklar ortaya çıkmaktadır [19]. Şekil 1.3'teki yaşam döngüsünün adımları gösterilen numaralar ile özetlenmektedir[19]: Memelilerdeki döngü sporozoitlerin kenelerden bulaşması ile başlamaktadır (1). Sporozoitler lenfositlere girmekte ve çok çekirdekli şizontlara dönüşürken aynı zamanda da hücre transformasyonunu ve proliferasyonunu uyarmaktadır (2). Şizontlar merozoitlere farklılaşmaktadırlar (3) Bazı türler için eritrositlerin bölünmesi ve işgal edilmesi gerçekleşmektedir (4). Enfekte edilmiş eritrositler keneler tarafında yutulmakta ve kenelerin mide lümeninde gametogenesis ve döllenme meydana gelmektedir (5). Zigot oluşumu mide epitel hücrelerini istila etmektedir (6). Hareketli kinetler mide hücrelerinden çıkıp tükürük bezlerini istila etmektedirler (7). Sporogoni oluşumu ile çok fazla sporozoit oluşturmaktadırlar (8). Kenelerin kan emmesiyle sporozoitler memeli konağına geçmektedirler (1) [19].



Şekil 1. 3 *Theileria* türlerinin yaşam döngüsü [19]

Parazitler yaşam döngülerinin büyük bölümünde haploid iken sadece zigotken diploid olmaktadır [19]. Yaşam döngüleri sığırlarda şizogoni, vektörlerde gametogoni ve sporozogoni olmak üzere 3 ana evreden oluşmaktadır. Sporozoitlerin konak kan dolaşımına girmesi sonucunda enfekte kenenin kanı emmesiyle *Theileria* yaşam döngüsü başlamaktadır. Sporozoitleri mononükleer hücrelere girmesine rağmen [17], *Theileria annulata* sporozoitleri major histokompatibilite kompleks sınıf (MHC) 2 molekülü olarak bilinen, makrofaj/monositleri ve düşük etkide de B hücrelerini hedef almaktadır [20]. Sporozoitler kenelerin tükürük bezlerinde gelişen son üründür ve kenelerin memeli konağında kan emmesi sırasında bulaştırılmaktadır [20] *Theileria* sporozoitlerin sığır lenfositlerine girişinin morfolojik adımları çeşitli araştırmacılar tarafından doğrulanmıştır [20], [21].

Theileria sporozoitleri hareketsizdir ve konak lenfositleri ile karşılaşmaları ise tesadüfen gerçekleşen bir olaydır [21]. Jura vd.[22] *T.annulata*'nın sporozoitlerinin lenfosit ile karşılaştıktan sonra membranının kendlerine özgü bazal bölgelerine bağlandığını rapor etmelerine rağmen [22], konak yüzeyindeki herhangi bir noktaya bağlandığı düşünülmektedir.

Sporozoitler sitoplazmaya girdikten sonra tek çekirdekli trifofoit evresine geçmektedir. Trofofoitler bir dizi çekirdek bölünmesinden sonra 10-20 çekirdekli sentetik makroşizont formuna dönüşmekte, konak hücre sitoplazmasında bulunan makroşizontların plasma membranı ile etrafları çevrilmektedir. Çekirdekler düzenli olarak sitoplazmaya dağılıp ve etrafları tipik porları bulunan çekirdek zarı ile çevrilmektedirler. Makroşizontların gelişimini takiben *Theileria* ile enfekte olmuş hücreler ölümsüz olup, büyüme faktörü gerekmeden *in vitro* olarak üretilebilmektedirler. Konak hücre ve parazit eş zamanlı olarak bölünmektedir. Transformasyonu yapılmış konak hücreler düzenli aralıklarla ve belirli hızda *in vitro* koşullarda bölündüğünden 3 günden daha az sürede parazit sayısında 10 kata kadar artış gözlenmektedir. Konak hücre bölünmesi sırasında şizontlar da bölünür ve yavru hücrelere aktarılmaktadır. Enfekte hücreler enfeksiyondan yaklaşık 5 gün sonra vektörün ısırıldığı bölgedeki lenf nodüllerinde belirlenebilir. Enfeksiyon süresince, şizontlar merozoitleri üretmek için merogoniye dönüşmektedirler. Merogoni yapısal ve donanımsal bir seri değişikliklerle karakterize edilmektedir. Bu değişiklikler, olgun merozoitlerin yüzeylerinin şizont plasma membranının dış yüzeyinden şekillenmesi ve endoplazmik retikulumun gelişmesini içermektedir. Çekirdek, şizontların çeperine göç ederek tek çekirdekli merozoitleri şekillendirmeye başlamaktadırlar. Merogoni sonunda konak hücrede yer alan çok miktarda olgun merozoit, konak plasma membranının yırtılması ile serbest kalmaktadırlar. Serbest kalan merozoitler piroplasm formunda eritrositlere nüfuz etmektedirler. *T. annulata*'nın konak hücreyi enfekte etmesinden 8- 10 gün sonra merozoitler belirlenebilmektedirler. Olağan üstü durumlarda eritrositlerin % 90'ından fazlasının *T. annulata* ile enfekte olduğu görülmüştür. Merozoitlerin siğir eritrositlerine girişi, sporozoitlerin tek çekirdekli hücrelere girmesine morfolojik olarak benzer bir süreçle gerçekleşmektedir. Eritrositlerden salınan merozoitler enfekte lenfositlerden salınan şizontlarla aynıdır. Kene enfekte olmuş konakla beslenirken, enfekte eritrositler işgal edilip konak ile vektör arasındaki parazitin bulaşması gerçekleşmektedir.

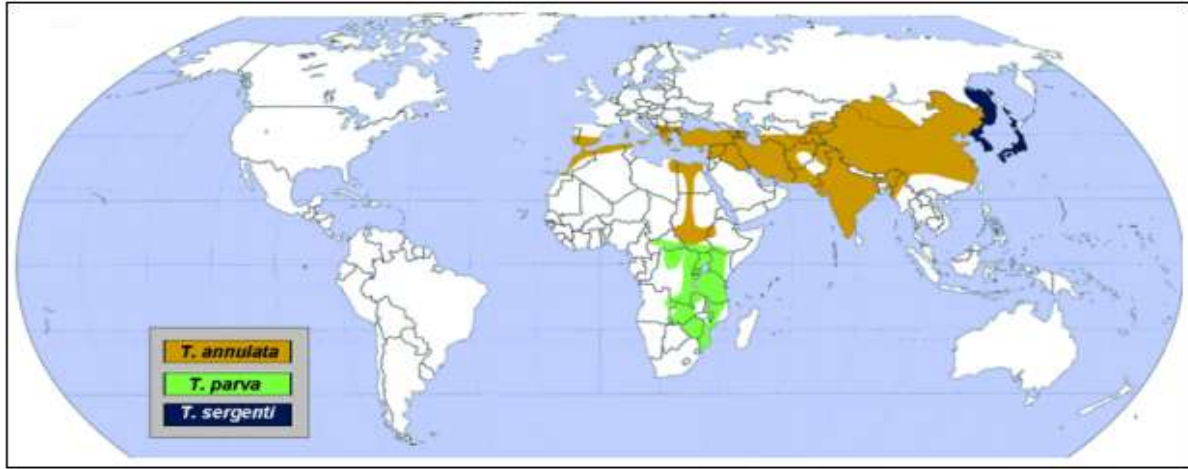
Merozoitlerin eritrositlere girişinden sonra, konak hücreyi çevreleyen membrandan konak sitoplazmasına geçerler. Kene tarafından mideye alınan enfekte edilmiş eritrositlerin saldığı piroplasmalar eşeyssel aşamada gelişime maruz kalırlar [17].

Gametositler kırmızı kan hücrelerinde gelişirler ve sonrasında kene tarafından yutulmaktadır [20]. Enfekte kandaki küresel protozoan gametositler gametlere farklılaşırlar. Gametler önce çok çekirdekli mikrogametosit sonra tek hücreli mikrogametler haline gelirler. Diğer gametositler direkt makrogametositlere transforme olurlar. Haploid mikrogametler ile haploid makrogametler kene mide epitelyal hücrelerine giren diploid zigot oluşturmak için birleşirler. Parazitin yaşam döngüsü boyunca, bu aşama sonrasındaki kinet formu yalnızca diploid formu oluşturmak için düşünülmektedir. Kene salgı bezi asiner hücrelerinde (pankreas salgı hücresi) enfekte sporozoitlerin oluşumu *T.annulata* ve *T. parva* için benzer süreçte meydana gelmektedir. Tek kinet sporoblastlara transforme olduktan sonra çoklu bölünmeye maruz kalırlar. Kenenin beslenmesi ya da yüksek sıcaklık ile uyarılmasıyla sporogoniye kadar olgunlaşma gecikmektedir. Kene beslenmesi sırasında çok çekirdekli hücre hızla geliştikçe sitoplazma bölünmesiyle binlerce tek hücreli sporozoitler meydana gelmektedir. Tek hücreli sporozoitlerin oluşumu beslenmenin 3. günü ya da ısı uyarımının 4. gününde gerçekleşmektedir [17].

1.1.3 Theileriosis

Kene yoluyla bulaşan hastalıklar hayvancılık üretiminde kısıtlamalara neden olmaktadır. Bunun yanısıra hastalıklar yalnızca gıda kaynağına etki etmemektedir. Günlük gelir ve diğer tarım faaliyetleri üzerinden tarım yapan insanlara da ekonomik açıdan olumsuz etkisi olmaktadır. Bu hastalıkların 4 alt grubu hayvancılık üretiminde etkilidir [23]: Theileriosis, anaplosmosis [24], babesiosis ve cowdiosis [23]. Theileriosis sığır, koyun, keçi, manda, deve ve diğer bazı yabani hayvanlarda görülen ekonomik açıdan önemli bir hastalıktır [25]. Hastalık sıklıkla, vektör kenelerin de aktiviteleriyle uyumlu olan, yılın sıcak aylarından Mayıs-Eylül ayları arasında görülmektedir [11], [26]. Theileriosis yüksek mortalite ve morbiditesinden dolayı çok büyük hayvan kayıplarına [25], üretimde azalmaya ve üreme problemlerine neden olmaktadır [27]. Hastalık *Theileria annulata* etkeni ile oluşursa tropikal theileriosis ya da Mediterian theileriosis olarak adlandırılmakta [27] ve Şekil 1.4'deki [28] haritada da gösterilen Güney Portekiz, İspanya, İtalya, Bulgaristan, Yunanistan, Türkiye, Güney Rusya, Orta Asya, Yakın ve Orta

Doğu, Pakistan, Hindistan, Kuzey Doğu Çin gibi ülkelerde yaygın olarak gözlemlendiği bilinmektedir [29].



Şekil 1. 4 *Theileria annulata*'nın enfekte ettiği hayvanların bulunduğu ülkelerin dünya üzerinde dağılımını gösteren harita [28]

Hastalığın teşhisi klinik bulgular ve kandan mikroskopik incelemeler, akut vakalarda ise lenf nodül simirlerinin Giemsa ile boyanmasına dayanmaktadır. Theileriosisin klinik bulgularının arasında ateş, burun ve göz kayıpları, zayıflık, iştahsızlık, solunumun hızlanması, lenf nodüllerinin genişlemesi yer almaktadır. Hastalık, ilerleyen dönemlerde sarılık ve akut anemiye yol açmaktadır [26]. Klinik belirtisi az olan enfeksiyonlarda ise sıklıkla serolojik yöntemler uygulanmaktadır. Ancak *Theileria* türlerinin morfolojik yapıları benzer olduğu için bu türler arasında ayırıcı tanı yapabilmek zordur. Uzun süre enfeksiyona maruz kalmış taşıyıcılarda immün cevapta zayıflık olduğu ve ters reaksiyon verdiği için serolojik testlerde yanlış pozitif ya da negatif sonuçlar gözlenebilmektedir. Son zamanlarda, epidemiyolojik çalışmalarda tropikal theileriosisin teşhisi için kullanılan indirekt floresan antikor test (IFAT)'i gibi geleneksel yöntemlerden daha spesifik ve duyarlı olan polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılmaktadır [30].

Theileriosis enfeksiyonu üzerine Türkiye'de yapılmış olan bazı epidemiyolojik çalışmalar bulunmaktadır [31], [30],[32], [33], [34], [35], [36].

Sayın vd.[31] 1990-1993 yılları arasında Ankara iline bağlı 12 köyden toplanan 198 sığırdan vektör kene ile *T. annulata* varlığını göstermiştir ve sığırlara tropikal theileriosis teşhisi konmuştur. Mart ayında 198 sığırdan toplanan kan örnekleri üzerinde yapılan

analiz sonucunda %11,2 prevelans ve %10,6 seroprevelans gözlenmiştir. 43 sığır seropozitiflik gösterdiği ve piroplasma barındırdığı gerekçesiyle çalışmadan çıkarılmış ve 92 seronegatif sığır piroplasmosis gösterirken, 34 seronegatif olan sığır *T. annulata* için seropozitiflik göstermiştir. 3 sezon sonunda 1 sığıra theileriosis tanısı konmuş ve tedavisinin yapıldığını rapor etmişlerdir [31].

Dumanlı vd.[30] tarafında yapılan çalışmada Türkiye'nin doğusunda bulunan Erzincan, Malatya, Adıyaman, Diyarbakır, Muş, Kars, Erzurum, Şanlıurfa, Van, Elazığ ve Bingöl illerini içeren bölgeden total kan, kan serumu ve kan simiri toplanmıştır. PCR, mikroskopik analiz ve indirekt floresan antikör testi (IFAT) ile yapılan analizler sonucunda prevelans %37,8 'dir ve diğer testlere göre daha duyarlı olan PCR ile elde edilmiştir. IFAT ile yapılan testlerde seropozitiflik seviyesi %2,7 - %81,2 arasında değişiklik göstermiş, seroprevelans ise Kars ve Erzurum illerinde çok yüksek bulunmuştur. 55 hayvana theileriosis teşhisi konulduğunu rapor etmişlerdir [30].

Karagenç vd.[32] tarafından Aydın iline bağlı 4 ilçeden sığır kan örnekleri toplanarak IFA testi ile seroprevelans çalışması yapılmıştır. 590 sığır çalışmaya alınmış, bu hayvanlardan 285'i aşılırken 305 tanesi kontrol grubu olarak bırakılmıştır. Dokuz ay süresince aşılardan önce bir kez, aşılandıktan sonra ise 4 kez olmak üzere toplamda beş kez kan örneği toplanmıştır. Aşılı hayvanlarda IFAT makroşizont antijeni kullanılarak gösterilen seropozitiflik Mart, Nisan, Haziran, Eylül, Aralık aylarında toplanan kan örneklerine göre sırasıyla şu şekildedir: 32/285 (% 11,2); 247/261 (%94,6); 185/242 (%76,5); 83/211 (%39,3); 41/127 (%32,3). Kontrol grubunda ise 58/305 (%16,1); 93/277 (%33,6); 89/273 (%31,5); 74/235 (%31,8); 66/190 (%34,7) oranlarıyla gösterilmektedir. IFAT piroplasm antijeni kullanılarak yapılan seropozitiflik sonucu aşılı hayvanlar için: 36/285 (%12,6); 39/127 (%30,7); 71/211 (%33,7); 104/242 (%43,0); 163/261 (%62, olarak verilirken; kontrol grubu için 57/190 (%30,0); 79/235 (%33,6); 67/273 (%24,5); 67/277 (%24,1); 58/305 (%16,1) oranlarıyla gösterilmiştir. Çalışma sonucunda tropikal theileriosise karşı kullanılan aşının %100 koruma sağlamadığı tespit edilmiştir. Aşılardan hayvanların 16'sında klinik theileriosis geliştiği, bunlardan 15'nin uygulanan tedaviye cevap verdiği; birinin ise öldüğü gösterilmiştir. Makroşizont ve piroplasm antijenleri kullanılarak yapılan IFA testi sonucuna göre antijenlere göre serolojik yanıtta farklılıklara rastlandığı bildirilmiştir. Hem aşılardan

hem de kontrol gruplarında aşılama sonrası piropilazmaya karşı seropozitiflik makroşizonta karşı olan seropozitiflikten daha düşük oranda olduğu gösterilmiştir. Hastalığın prevalansı açısından bölgelere göre farklılıklar saptanmasının yanısıra örnekleme zamanının da hastalığın prevalansını etkilediği görülmüştür [32].

Kaya vd.[33] yapmış olduğu çalışmada Antakya yöresinde theileriosis ve babeiosis seroprevelansı belirlemiştir. 214 sığır seçilmiş ve toplanan kan örnekleri IFAT ile analiz edilmiştir. *Babesia sp.*'ne rastlanmamasına karşın *T. annulata* 5 (2.33%) kan simirinde belirlenmiştir. Serumda ise antikor varlığı olup olmadığı IFAT ile gösterilmiştir. *T. annulata*'ya karşı 24 serum ve *B. bigemina*'ya karşı 2 serum test edilmiştir. *B. bovis* ve *B. divergen* 'e karşı antikor tespit edilmemiştir. Elde edilen bu sonuçlara karşın daha detaylı olarak, moleküler biyolojik serolojik ve epidemiyolojik çalışmalar yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır [33].

İnci vd.[34] 1999 Nisan ve 2001 Kasım ayları arasında, Kayseri, Nevşehir ve Niğde illerini kapsayan Kapadokya bölgesinde 24 köydeki 16.000 sığırdan 554 tanesi toplanarak epidemiyolojik çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada toplanan sığırlar aşılama durumlarına göre gruplandırılmış, mikroskopik analiz ve IFAT ile *T. annulata*'nın varlığı araştırılmıştır. 554 sığırın *T. annulata* prevelans değeri mikroskopik analiz ile % 60, IFAT ile yapılan analizde % 67,5 elde edilirken, morbidite ve mortalite yüksek bulunmuştur. 554 sığırın 156'sında akut tropikal theileriosis bulgusuna rastlanmış ve 86 tanesi enfeksiyon kaynaklı olarak ölmüştür. Çalışma sonucunda, Kapadokya bölgesinin theileriosis için endemik bölge olduğu gösterilmiştir. Kapadokya, kenelerin gelişimi için uygun iklim ve ekosisteme sahiptir; bu nedenle kene kaynaklı hastalıkların oluşumu için oldukça riskli bir bölgedir. Yüksek prevelans ve düşük seropozitiflik aşı ve aşısız gruplar karşılaştırıldığında, aşının etkisini açıklamaktadır ancak aşı grubundaki sığırlardan da enfeksiyona yakalanan hayvanlar olduğu için aşılama uygulanmasında hatalar olabileceği düşünülmektedir [34].

Aysul vd.[35] tarafından Çine, İncirova, Nazilli ve Merkez ilçelerini içeren Aydın ilinde tropikal theileriosis yaygınlığı ve aşılama sığırlarda hastalık sezonu ve sonrasında oluşan bağışıklık gösterilmiş ve çalışma 2001 Mart ve Aralık aylarını içeren süreçte gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 466 sığır kullanılmış; 236 tanesi aşılanmış, 230 tanesi ise

kontrol grubu olarak bırakılmıştır. Bir kere aşılanmadan önce; 4 kere de aşılandıktan sonra hastalığın en sık görüldüğü dönemlerde toplam 5 kez kan örneği alınarak laboratuvarda geliştirilmiştir. Çalışma sonucunda aşılanan hayvanlardan 10 tanesi, aşılanmayanlardan ise 12 tanesine theileriosis tanısı konmuş ve mikroskopik analiz ile de doğrulanmıştır. Theileriosis tanılarında aşılanan ve aşılanmayan gruplar arasında anlamlı bir farklandırma yapılamamıştır. Kan örnekleri incelendiğinde ahır duvarından toplanan kenelerde farklı oranlarda enfeksiyona rastlanmıştır. Ahırdan toplanan kenelerin enfeksiyon yüzdeleri ise ilçelere göre farklılık göstermektedir. Kenelerin cinsi ise Hyalomma ve Rhiphicephalus olarak saptanmış, Hyalomma sayısının ise daha fazla olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak Aydın ilinde *T. annulata* yaygınlığı gösterilmiş, prevalansı % 1,9 ile % 14,3 arasında değiştiği gösterilmiştir. Aşılanan sığırlarda % 100 koruma sağlanamadığı belirlenmiş, aşılu gruplardaki sığırlardan bir tanesi tedaviye rağmen ölmüştür. Bundan yola çıkılarak aşılu ve aşısız hayvanlarda parazit bulunan oranlar arasında anlamlı fark oluşturulamamıştır. Aşılama yapılacak bölgelerde epidemiyolojik verilerin araştırılması ve hayvan yetiştirme şekilleri dikkate alınması gerektiği tespit edilmiştir [35].

Sevgili vd.[36] tarafından gerçekleştirilen çalışmada Şanlıurfa yöresindeki *Theileria annulata* ve *Babesia bigemina* seroprevalansı gösterilmiştir. Toplanan 191 sığır kan örnekleri IFAT ile analiz edilmiştir. Serumlar analiz edildiğinde 191 sığırın 19'unda *Theileria annulata*, 17'sinde ise *Babesia bigemina* gözlemlenmiştir. IFAT testi ile antikor varlıkları da tespit edilmiştir. 138 sığır serumunda (% 72,25) *T. annulata*, 84 sığır serumunda (%43,97) ve *B. bigemina* tespit edilmiştir [36].

Theileriosis kaynaklı ekonomik kayıplar ise İnci vd.[37] 1999-2001 yıllarında Niğde, Nevşehir ve Kayseri illerinin bulunduğu Kapadokya bölgesinde 554 sığır için yaptığı çalışmayla rapor edilmiştir. Akut theileriosis 156 sığırdan teşhis edilmiş, 86 tanesi ölmüştür. Ekonomik kaybın ise 2 yıl için 598.133 \$ olduğu tahmin edilmektedir. Tropikal theileriosisten kaynaklanan ekonomik kayıplar; üretimde kayıp, hastalığı kontrol altında tutabilmek için yapılan harcamalar ve indirekt giderler olmak üzere 3 ana parametreden oluşmaktadır. Üretimde yaşanan kayıplar; mortalite ve morbiditeden kaynaklı kayıplar (süt, et üretimi) ve indirekt üretim kayıplarıdır. Kontrol altında tutabilmek için yapılan harcamalar ise kene öldürücüleri sağlamak ve tedavi

için yapılan masraflardan oluşmaktadır. İndirekt kayıplar içinde sigorta ücretleri ve krediler bulunmaktadır. Tüm bu masraflar ve kayıplar içinde en çok etkili olanlar 2006 Şubat fiyatlarına göre morbidite oranlarından kaynaklı olanlar ve onu takip eden hayvan ölümleridir [37].

1.1.4 *Theileria annulata*'nın İlaç Direnci

Shing vd 1993'te yayımladıkları makalede, tropikal theileriosis'e neden olan *T. annulata* ile enfekte edilmiş bir grup sığıra oxytetracycline, halofuginone lactate, parvaquone ve buparvaquone ilaçlarının uygulanması sonrası sonuçları rapor etmişlerdir. Uzun süreli 20 mg.kg⁻¹ oxytetracycline enjeksiyonu *T. annulata*'ya etki etmemiştir. Halofugine lactate 1,2 mg.kg⁻¹ uygulandığında etkili olmuş ancak iştahsızlık, zayıflık gibi yan etkiler de ortaya çıkmıştır. Parvaquone ise kas içine 20 mg.kg⁻¹ verilmiş ve baskılayıcı bir etki göstermiştir. Buparvaquone, kas içine 5 mg.kg⁻¹ ya da 2,5 mg.kg⁻¹ uygulandığında *T. annulata*'nın piroplasma ve şizontları hızla elimine ettiği gösterilmiştir. 5 mg.kg⁻¹ buparvaquone uygulanan buzağılarda hızla iyileşme gözlenmiştir [38].

Paşa S. 'nin 2008 yılında yapmış olduğu çalışmada ise theileriosis tanısı konulan sığırlara kas içi 2,5 mg.kg⁻¹ buparvaquone uygulandıktan sonra tedavi öncesi ve sonrası klinik ve laboratuvar muayeneleri yapılmıştır. Enfeksiyonlu sığırlarda tek doz kas içi uygulanan buparvaquone antibiyotiğinin etiyolojik, klinik ve laboratuvar incelemeleri sonucunda etkili olduğu ancak kesin olarak doğrulama yapılabilmesi için kontrol grubu içeren benzer özellikte doğal enfekte hayvanların bulunduğu geniş kapsamlı çalışmalar ile doğrulanması gerektiği rapor edilmiştir [39].

Ancak tedavide etkili olduğu düşünülen ilaçlardan biri olan buparvaquone'a *T. annulata*'nın direnç gösterdiği ilk kez 2010 yılında rapor edilmiştir. Tunus'ta yapılan çalışma *in vivo* olarak gerçekleştirilen ilk çalışmadır ve parazitin antibiyotiğe direnç mekanizması olduğu gösterilmiştir [40]. Theileriosis 1970'lere kadar etkili tedavi olmaması sebebiyle yüksek oranda ölüme neden olan bir hastalık olarak bilinmektedir. Hidroksinaftokinon bileşeni olan menoctone'nin anti-theilerial aktivitesinin keşfini, iki aktif analog olan parvaquone ve buparvaquone geliştirilmesi takip etmiş ve sığırlarda *Theileria* enfeksiyonlarının tedavisinde yüksek etki göstermiştir. 1984-1987 yıllarında arasında Tunus'ta kullanılan Parvaquone (Clexon®, Wellcome Trust, London, UK) yerini

1988 yılında Buparvaquone (Butalex[®], Mallinckrodt, Hazelwood, MO, USA) bırakmıştır. Buparvaquone'nin tanıtılmasından beri başarılı kullanımları ile % 12'ye kadar ölümlerde düşüş gözlenmiştir. Naftokinonlara karşı *Theileria annulata* ve *Theileria parva* için literatürde direnç rapor edilmemiştir. Ancak atovaquone ilaç direnci, naphtoquinone *Plasmodium* ve *Toxoplasma* gibi protozoalar için yapılandırılmış olup temel olarak sıtma tedavisinde kullanılmaktadır. Bu türlerde mitokondriyal sitokrom b genindeki mutasyon, atovaquone direncinin belirlenebilmesini göstermektedir[40].

Mhadhbi vd.[40], bu bilgiler doğrultusunda, Tunus'taki küçük ölçekli bir çiftlikte çalışma gerçekleştirmiştir. 2-4 yaşında olan akut tropikal theileriosis semptomları gösteren 7 sığırı temmuz ayı boyunca gözlemlenmişlerdir. Giemsa ile boyalı kan simirlerinde *T. annulata* piroplazmalarının varlığının gösterilmesi ile klinik teşhis doğrulanmıştır. 7 sığır iki gruba ayrılmıştır. 1-5 numaralı ineklerden oluşan grup 1 denekleri çiftlikte *in situ* olarak tedavi edilirken; 2 inekten oluşan grup 2 denekleri hastaneye transfer edilerek orada tedavi edilmiştir. Grup 1'de hastalık oluşumunda bir iki gün içinde buparvaquone ile tedaviye başlanmış ve 2,5 mg.kg⁻¹ olacak şekilde 5. hayvana iki doz onun dışındakilere tek doz enjekte edildikten sonrası klinik şartlarında değişim gösterilmeksizin, 48-72 saat sonrasında 1-4 numaralı hayvanlara ikinci enjeksiyon yapılmıştır. Tedavinin etkinliğinin eksikliği sonucu olarak, inekler hematokrit ve parazitemiyi ve klinik durumunun değerlendirilmesi için haftada üç kez izlenmiştir. Hastaneye transfer edilen ikinci gruptaki 6 ve 7 numaralı ineklere, hastalık bulguların saptanması sonrası 72 saat içinde iki enjeksiyon buparvaquone tedavisi uygulanmış ve 7 numaralı ineğe ikinci enjeksiyondan 48 saat sonra üçüncü enjeksiyon da verilmiştir. Grup 1'deki hayvanlar ile aynı antibiyotik tedavisi verilmiş ve iki inek tedavinin ilk gününden itibaren 11 günlük süre boyunca günlük olarak izlenmiştir. Tedavi sonucunda, 4 inek hayatını kaybetmiş, 1 inek ötaniziye maruz kalmış 3 inek ise yaşamını devam ettirmektedir [40]. Bu çalışma ile geliştirilen materyallerin tamamlanması ile *T. annulata*'nın buparvaquone direncine ait genetik temelini belirlemek için analiz edilmeye başlanmıştır. *Plasmodium falciparum* [41], *Toxoplasma gondii* [42] ve *Pneumocystis carinii* [43] gibi diğer parazit sistemlerde mitokondriyal sitokrom b geninin ubikinon-bağlama bölgesindeki mutasyonlar ve

hidkrosinaftakinon direnci arasındaki ilişki açık olarak gösterilmiştir. Benzer bir mekanizma *T. annulata* direnç olayları için sorumlu olabileceği düşünülmektedir [40].

2012 yılında yayımlanan direnç ile ilgili ikinci makalede ise İran'ın güneyinde Fars ilinde tropikal theileriosis hastalığının tedavi edilebilmesi için buparvaquone enjeksiyonundan sonra hayvanlarda ölüm gözleendiği bildirilmiştir [44]. Buparvaquone etken ajanının ilaç bağlanma bölgesinde oluşturduğu mutasyonla ilişkili olarak tedaviyi sekteye uğratabileceği rapor edilmiştir [40].

Sharifiyazdi vd.[44], Aralık 2010 ve Ocak 2011 arasında, 24-64 aylık 8 İran ineği kullanarak çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Hayvanlarda görülen semptomlar arasında yüksek ateş, nazal bozukluk, göz yaşarması, tükrük salgılama, solunum güçlüğü, deri kalınlaşması, fazla göz yaşarmasından kaynaklı yüzde keçe gibi saçların uzaması bulunmaktadır. Hastalık 5 ineğe tek enjeksiyon buparvaquone tedavisi, 2 ineğe iki enjeksiyon buparvaquone tedavisi yapılmasına karşın 7 ineğin ölümüne yol açmıştır. Tedavi edilemeyen hayvanlardan alınan kandan genomik DNA izolasyonu yapılmış, PCR ile sitokrom b geni için tasarlanan primerle ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri dizilenmiştir. İlişkili apikompleksan mitokondrial sitokrom b dizileri ile elde edilen *Theileria annulata* dizileri karşılaştırılarak karşılaştırılmıştır. Sığırlardaki buparvaquone dirençli parazitlerin mitokondriyal sitokrom b gen dizileri ilaç bağlama bölgesindeki fonksiyonel olarak önemli iki mutasyonun varlığını açığa çıkarmıştır. 6 hayvanın Q₀ bölgesindeki 325. adenin nükleotiti guanine; son hayvanın ise 697. sitozin nükleotiti timine dönüşmüştür. Bu değişiklikler de korunmuş bölgelerdeki serin 109'un glisin amino asidine, prolin 233'ün serin amino asidine dönüşmesine neden olmuştur. Buna karşın buparvaquone tedavisi olmuş hayvanlarda sitokrom b'de bu mutasyonlardan hiç biri bulunmamış olması bu mutasyon bölgelerinin buparvaquone direnci ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur [44].

Rapor edilen bu direnç mekanizması farklı etki mekanizmalarına sahip ilaçların geliştirilmesini gerekli kılmaktadır.

1.1.5 Theileriosisin Tedavisinde Kullanılabilecek Potansiyel Yeni İlaç Hedeflerinin Tespiti

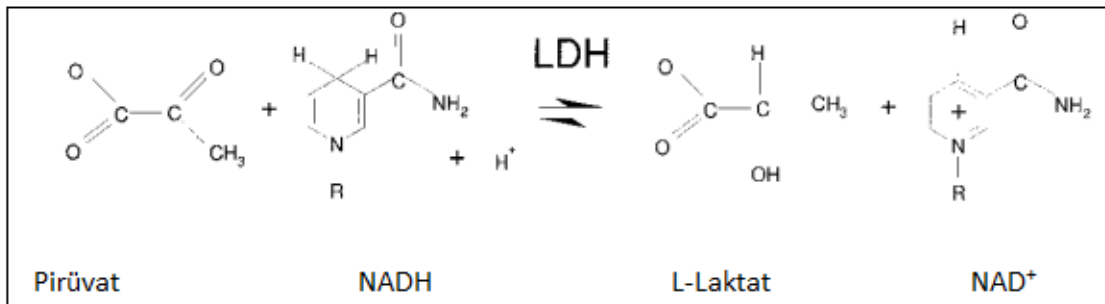
Plasmodium ve *Toxoplasma* cinsi apikompleksanları ile karşılaştırıldığı zaman, *Theileria*'nın temel karbon metabolizması ile ilgili sınırlı bilgi olduğu görülmektedir. Glikoliz ve sitrik asit döngüsü tüm ökaryotik hücrelerde korunmuş proteinlere dayanmakta olup, glikolizde görev alan 10 enzimi kodlayan genler *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Theileria* ve *Babesia* gibi apikompleksanların genomunda yer almaktadır [45]. Kiama vd.[46] tarafından *T. parva* şizontlarında glikoliz yolağının önemini belirlemek için bazı enzimlerin aktiviteleri hesaplanmıştır. Hekzokinaz, glukozfosfat izomeraz, fosfofruktokinaz, aldolaz, fosfogliserat kinaz, enolaz ve pirüvat kinaz'ın aktivite değerleri sırası ile 37,1, 98,8, 21,8, 80,9, 80,2, 50,3 ve 48,3 nmol/min/mg protein olarak bildirilmiştir. Bu sonuçlar gözetilerek, glikolizin bu parazitlerde fonksiyonel olabileceği ortaya konmuştur. Ayrıca pirüvatın laktata indirgenmesini katalizleyen laktat dehidrogenaz enziminin aktivitesi ise 100,4 nmol/min/mg protein olarak belirlenmiştir. *T. parva* şizontlarında sitrik asit döngüsündeki enzimlerin çoğunun aktivitesi düşük bulunmuştur [46]. Witschi vd.[45] sitrik asit döngüsündeki enzimlerin peptid eşleşme sayılarının glikolitik enzimlerden daha düşük olduğunu belirlemişlerdir [45]. Gliserol kinaz ve α -gliserofosfat dehidrogenaz aktiviteleri sırası ile 2,9 ve 1,0 nmol/min/mg protein olarak belirlenmiştir. Bu enzimlerin aktivitelerinin düşük olması *Theileria*'da gliserol metabolizmasının olmadığını göstermektedir. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi ise 3,8 nmol/min/mg proteindir. Bu aktivite değeri Pentoz-fosfat yolunun olabileceğini düşündürmektedir [46]. *Theileria* makroşizontları için glikoliz metabolizmasında asıl etkili olan aşamanın anaerobik yolak olduğu sonucuna varılmıştır. Glikoneogenezisin meydana gelmediği, Kiama vd.[46] tarafından belirlenen sitrik asit döngüsünün aktifliği yanı sıra şizontlarda bu yolak ile enerji elde edilmediği ve gliserol metabolizmasının da düşük seviyede gerçekleştiği sonucuna varılmıştır [45].

Organizmaların temel metabolik aktiviteleri çok benzerdir bu nedenle farklı dokulardaki ve organizmalardaki enzimler benzer reaksiyonları katalizlerler. Çeşitli fiziksel, kimyasal serolojik testlere bağlı olarak birbirinden farklı organizmalardan alınan enzimler incelendiği zaman aynı reaksiyonu katalizlemelerine rağmen yapısal olarak

farklı oldukları bulunmuştur. Protein sentezinin genetik kontrolünün gösterdikleri göz önünde bulundurulduğunda, aynı türdeki farklı genotiplerde ya da farklı türlerdeki protein sentezinde veya homolog enzimlerin yapısındaki bu farklılık sürpriz değildir [47]. Oldukça şaşırtıcı olan, bazı enzimlerin tek bir organizmada değil tek bir dokuda bile çoklu moleküler formda bulunabilmeleridir. Tek bir doku içinde farklı molekül türleri mevcut olduğu bildirilen enzimler arasında esteraz, ribonükleaz, pepsin, kimotripsin, tripsin, lizozim, sitokrom C, malat dehidrogenaz ve laktat dehidrogenaz (LDH) yer almaktadır [47].

1.1.5.1 Laktat Dehidrogenaz Enzimi

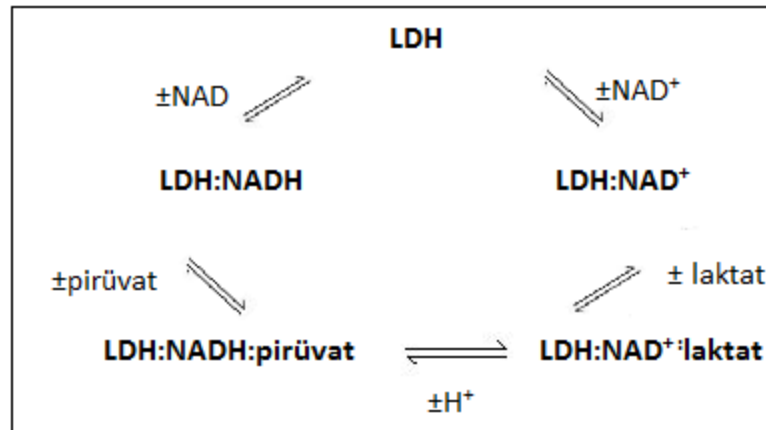
Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) bağlanma proteinleri yaygın olarak bulunmaktadır. Bu proteinler arkebakteriler, öbakteriler ve maya, bitki, hayvan ve insan gibi yüksek organizmaları da içeren çok çeşitli organizmalarda bulunmaktadır. Enzimler, nikotinamid adenin dinükleotid kofaktörününün bağlanması ile merkezi reaksiyonları katalizlemektedir [48]. L-LDH hem kompleks hem de daha basit yapıları canlılarda önemli fonksiyonu olan kofaktör olarak NADH kullanan enzimdir [49]. LDH anaerobik koşullarda enerji üretimi sağlayan canlılarda glikolizin devamını sağlamaktadır [50], [51]. 2-hidroksi asit oksidoredüktazlar ailesine ait olan LDH pirüvat-laktat ve NADH-NAD⁺ arasında çift yönlü reaksiyonu katalizlemektedir (Şekil 1.5) [51].



Şekil 1. 5 LDH'in çift yönlü katalizlediği reaksiyon [51]

Köpek balığı [52], domuz [53], [54], *Bacillus stearothermophilus* [55], *Bifidobacterium longum* [56], *Plasmodium falciparum* [7] ve *Plasmodium vivax* [57] gibi birçok türün LDH'larının kristal yapısı ve yapısal analizi kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Bu proteinlerin aminoasit düzeyinde eşleştirmeleri yapıldığında farklılık görülmesine

rağmen yüksek seviyede yapısal benzerlik olduğu görülmüştür [51]. Bu enzim genellikle tetramer formuyla reaksiyonu katalizlemektedir. 4 alt birim iki domainin bilobal yapısını oluşturmaktadır [58]. Geniş olan domaini bir çift $\beta \alpha \beta \alpha \beta$ motifi içermektedir [51]. Bu motif klasik dinükleotid bağlanma bölgesi ya da Rossmann katlanması olarak adlandırılmaktadır. Motifin başlangıcında 30-35 amino asitlik finger print (Parmak izi) olarak adlandırılan bir bölge bulunmaktadır. Bu bölge Rossmann'ın incelediği 4 enzim için de yüksek derecede benzerlik göstermektedir [48]. LDH (laktat dehidrogenaz), MDH (malat dehidrogenaz), ADH (alkol dehidrogenaz), GAPDH (gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz) enzimlerinin dördünde de kofaktör aynı yönlendirme ve benzer konformasyonla bağlanmaktadır [48]. Kofaktörün nikotinamid grubuna bağlanması ile substratın bağlanması için aktif cep oluşmaktadır. Bu cep α/β karışımı bağlanma domaini ile ara yüzde oluşmaktadır [51]. Substratın bağlandığı bu bölge 163-247 ve 267-331 rezidüleri arasındadır. İkinci domain olan bölge 4 β tabaka ve 3 heliksten oluşmaktadır [51]. LDH'lar genellikle NADH'ın bağlanmasının ardından substratın bağlandığı düzenli bir mekanizmayı takip etmektedirler [59]. LDH, NADH yokluğunda substrat ile kompleks oluşturmamaktadır [60]. Şekil 1.6'da laktat dehidrogenaz enziminin reaksiyonu çift yönlü katalizlemesi şematize edilmektedir [61].

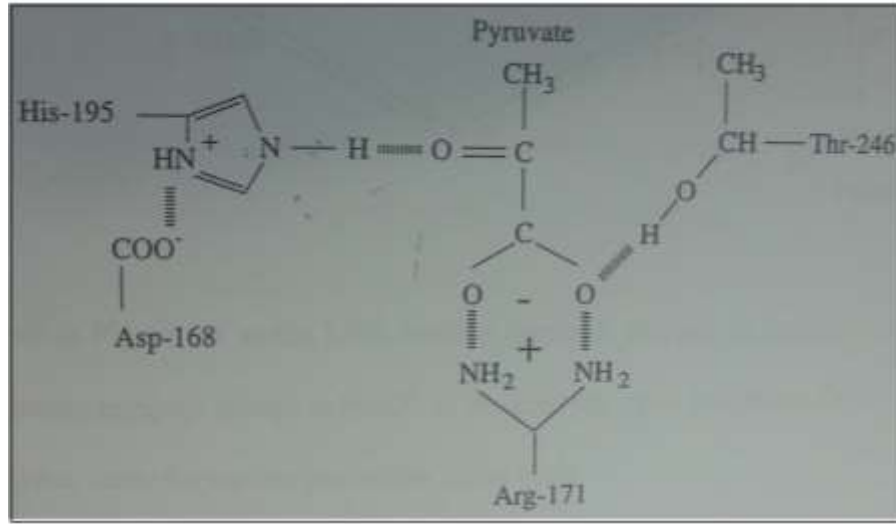


Şekil 1. 6 Laktat dehidrogenazın çift yönlü katalizlediği reaksiyon [61]

1.1.5.2 Katalitik Mekanizması

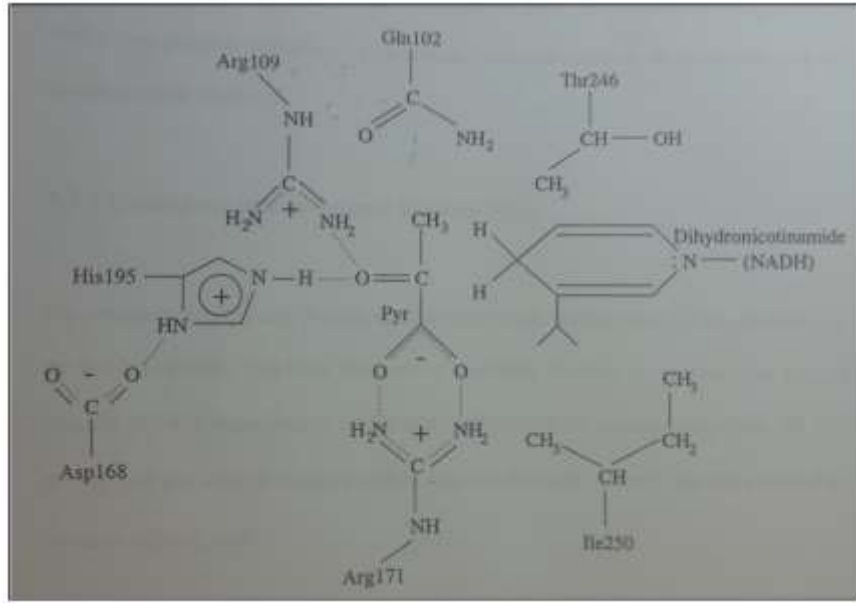
Substrat eklenmesi ile ternari kompleks oluşmakta ve aktif cebin yaklaşık 10 \AA derinliğine gömülü olarak bulunmaktadır [58]. Substrata özgülüğünü sağlayan 95-113. rezidüleri hareketli loop (halka) içermektedir. Substratın bağlanmasından sonra, bu

bölüm aktif bölgenin ayrılması ile kapanmaktadır. Nikotinamidin A zincirine hidrid transferi ve histidin 195 tarafından proton çıkarılması arjinin 109 ve aspartik asit 168 aminoasitleri yardımı ile gerçekleşmektedir [51]. Arjinin 109, histidin 195'i aktive ederek geçiş durumunu stabilize etmektedir. Aspartik asit 168 histidin 195'in pK_a değerinin değişiminde görevlidir [49]. Bu durum da sırasıyla tetrahedral oksianyonun ve histidin protonlanmasının stabilizasyonunu sağlamaktadır. Arjinin 171 yan zinciri substratın karboksil ucu ile iki hidrojen bağı kurmaktadır. Loop'un tekrar açılması NADH ve priüvatın salınması ile gerçekleşmektedir [59]. Şekil 1.7'de substrat LDH ile etkileştiği histidin 195, aspartik asit 168, arjinin 171 ve threonin 246 rezidüleri şematize edilmektedir [62].



Şekil 1. 7 Substratın enzimin bağlanma bölgesinde etkileştiği rezidüler [62]

Şekil 1.8'de kofaktör merkezdeki β tabakanın sonunda yer alan oluğa bağlanarak histidin 195, aspartik asit 168, arjinin 171 ve threonin 246 rezidüleri ile aktif bölgedeki katalitik geometriye katkı sağladığı görülmektedir. Ternari komplekste 99-110 rezidülerinden oluşan aktif bölge loop'u arjinin 109 rezidüsünün substratın karbonil grubuna hidrojen bağı ile bağlanmasıyla aktif bölgeyi kaplamaktadır [51].



Şekil 1. 8 Kofaktör ve substratın enzimin bağlanma bölgesinde etkileştiği rezidüler [62]

1.1.5.3 Substrat İnhibisyonu

LDH'ların yaygın karakteristik özelliği pirüvat tarafından oluşturulan substrat inhibisyonuna duyarlılığıdır. Memeli ve bakteriyel LDH'ları, yüksek substrat konsantrasyonunda pirüvatın laktata indirgenmesi sırasında inhibisyon göstermektedir [63]. Substrat inhibisyonunun kabul edilen mekanizmasına göre; pirüvatın NAD^+ salınmadan önce LDH-NADH binari formuna bağlanması ile birlikte NAD^+ ve pirüvat arasında kovalent bağ oluşmakta ve enzim bu forma sıkıca bağlanmaktadır. Bu nedenle NAD^+ 'nın yavaş salınmasının substrat inhibisyonundaki asıl faktör olduğu düşünülmektedir [59]. Substrat inhibisyonu olmayan ilk LDH 163. pozisyonda lösün bulunduran *Pf*LDH olarak bildirilmiştir [64].

Yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmalarının bir örneği *Theileria* paraziti ile çok yakın ilişkili olan ve aynı filumda yer alan *Plasmodium*'lar üzerinde yapılmıştır. *Plasmodium*'ların metabolizmasında hayati öneme sahip olan LDH enzimi klonlanmış [65], protein üretimi sağlanmış (UK Patent application no: GB9622648.5) [66] ve literatürde ilk defa glikolitik bir enzimin üç boyutlu yapısı tanımlanarak [7] azol bazlı bileşiklerin, *Plasmodium*'ların LDH'ını konak LDH'ından yaklaşık olarak 100 kat daha düşük konsantrasyonda inhibe ettiğini göstermiştir [67].

Toxoplasma gondii LDH1 ve LDH2'de 163. pozisyonda metiyonin bulunmasına rağmen, LDH2'de substrat inhibisyonu görülmemektedir. Metiyoninin karbonil oksijeni nikotnamid amid nitrojeni ile hidrojen bağı kurmaktadır. Metiyonin yan zinciri, genellikle 163. pozisyondaki Serinin O_γ molekülüne bağlanan su molekülünün bağlanmasını engellemektedir. Su molekülü kofaktöre affinite sağlayarak, substrat inhibisyonunu arttırıcı ve ayrılmayı azaltıcı bir etki göstermektedir [59].

İnsan LDHA4 [63] LDHB4 [68] ve *Bs*LDH'da [64] 163. pozisyondaki serinin lösine çevrilmesiyle substrat inhibisyonu ortadan kaldırılmıştır.

Yapılmış olan literatür araştırmasına göre *Toxoplasma gondii* LDH1 şu ana kadar çalışılmış olan Apikomplexan LDH'ları arasında substrat inhibisyonu gösteren tek LDH enzim olup 163. pozisyonunda metiyonin bulundurmaktadır [59]. *Theileria annulata* LDH'nin da bu tez çalışmasında ilk defa kinetik analizi gerçekleştirilmiş ve substrat inhibisyonu analiz edilmiştir.

1.2 Tezin Amacı

Önerilen tez çalışmasının amacı, *Theileria annulata*'nın laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan genin intronlarından arındırılarak tam uzunlukta klonlanması, ifade edilen enzimin yüksek saflıkta elde edilmesi, kinetik ve yapısal karakterizasyonu yapılarak muhtemel ilaç bağlanma bölgelerinin belirlenmesi ile *Ta*LDH'ın yapıya dayandırılmış ilaç tasarımı yaklaşımı için hedef biyomolekül olma potansiyelinin gösterilmesidir.

1.3 Hipotez

Theileria annulata'nın laktat dehidrogenaz enziminin yüksek verimde ve saflıkta bir prototip olarak üretilmesinin theileriosisin tedavisinde kullanılabilecek yeni bir ilacın enzimin yapısına dayandırılarak tasarımının önünü açacağı öngörülmektedir.

MATERYAL YÖNTEM

2.1 Materyaller

2.1.1 Kimyasallar, Enzimler ve Kitler

Kalıp DNA'yı amplifiye etmek için yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'nda kullanılan Long PCR Enzyme Mix ve tampon çözeltisi, Thermo Scientific'den (ABD); *Taq* DNA Polimeraz enzimi, tampon çözeltisi ve MgCl₂ solüsyonu Fermantas'tan (Litvanya) temin edilmiştir.

Plazmid DNA izolasyonu için kullanılan Wizard® Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma Kiti ile PCR ürünlerini temizlemek ve jelden geri kazanmak için kullanılan Wizard® SV Gel ve PCR Clean-Up Kiti Promega'dan (ABD) sağlanmıştır.

Agaroz jel elektroforezinde yürütülen DNA'nın baz büyüklüğünü belirlemek için markır olarak kullanılan O'GeneRuler DNA Ladder Mix Fermantas (Litvanya), konsantrasyonunu belirlemek için kullanılan Lambda DNA/Hind III Digest markır ise Amersham Pharmacia Biotech (ABD) firmalarından temin edilmiştir.

*Ta*LDH'in ifade edilebilmesi için kullanılan pLATE31 vektörü, tampon çözeltisi ile T4 DNA Polimeraz ve EDTA içeren aLICator vektör sistemi Thermo Scientific'den (ABD) temin edilmiştir.

*Ta*LDH enziminin saflaştırılması için kullanılan nikel-nitriлотriasetik asit (Ni-NTA) agaroz QIAGEN'den (Almanya) sağlanmıştır.

İfade edilen ve saflaştırılan proteinlerin, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi ile (SDS-PAGE) analizinde markır olarak Thermo Scientific (ABD) tarafından üretilen Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder kullanılmıştır.

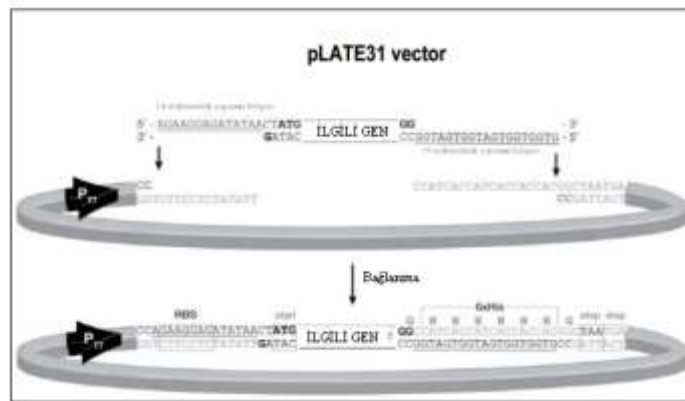
Western blot analizinde birincil antikor olarak kullanılan *Pf*LDH Antibody grubumuzun önceki çalışmaları kapsamında üretilmiştir [69] ve ikincil antikor olarak kullanılan Blotting Grade Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) BioRad (ABD) firmasından temin edilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan diğer bütün kimyasallar BDH (Germany), Sigma (Germany), Promega (ABD), Roche (İsviçre) Merck (Almanya), Riedel de Haeume (Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

Amplifikasyon ve DNA dizileme için kullanılan primerler İontek (Türkiye) ve Biogen (Türkiye) firmalarından temin edilmiştir. Klonlanan genlerin DNA dizilemesi ise Biogen firmasına yaptırılmıştır.

2.1.2 İfade Vektörü

pLate31 ifade vektörünün 6 Histidin içeren C terminal bölgesi, ifade edilen proteinin saflaştırma sırasında kolona afinitesini sağlamaktadır. Şekil 2.1'de belirtilen vektör üzerinde gen ile ligasyonunu sağlayan yapışkan uç bölgeleri ve IPTG indüklemesi ile mRNA üretimini sağlayan T7 promotör bölgesi bulunmaktadır [70].



Şekil 2. 1 pLate31 ifade vektörü [70]

2.1.3 *Escherichia coli* Soyu

Etkili transformasyon için ifade vektöründeki T7 promotörüne uygun T7 RNA polimerazı içeren BL21 (DE3): fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hds *E. coli* soyu kullanılmıştır.

2.1.4 Rekombinant DNA

Grubumuzda daha önce yapılmış olan tez çalışması kapsamında TaLDH enzimi intronları uzaklaştırılmadan pGEMT®-Easy vektörüne klonlanmış ve dizi analizi gerçekleştirilmiştir [71]. Yapılan bu çalışmada, önceki tezde oluşturulmuş olan yabancı tip TaLDH içeren rekombinant DNA plazmidi mini prep ile izole edilerek kalıp olarak kullanılmıştır.

2.1.5 Primerler

Çizelge 2. 1 Tez çalışmasında kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Dizisi	Kullanım Amacı
Ta 3	5' CGCGCGGGATCCATGGCAAGAAATAATAAGAGG 3'	Genin 5' ucu primeri
Ta 4	5'TTTTCTGCAGTTAGTGATGGTGATGGTGATGTTTAATGAG TGCTTCTAAACG 3'	Genin 3' ucu primeri
Ta 7	5' TCCTTGATATTGTTCCAAATATTGGTGCTGGAAAATC 3'	Birinci intronu uzaklaştırmak için tasarlanan 5' primeri
Ta 8	5' GATTTTCAGCACCAATATTGGAACAATATCAAGGA 3'	Birinci intronu uzaklaştırmak için tasarlanan 3' primeri
Ta9	5' CTGCATTGTTACTGCTGGGTTGGCAAAGCACCTACA 3'	İkinci intronu uzaklaştırmak için tasarlanan 5' primeri
Ta10	5' TGTAGGTGCTTTTGCCAACCCAGCAGTAACAATGCAG 3'	İkinci intronu uzaklaştırmak için tasarlanan 3' primeri
TaLDH LIC F	5'AGAAGGAGATATAACTATGGCAAGAAATAATAAGAG 3'	Genin ifade vektörüne aktarılmak için tasarlanan 5' ucu primeri
TaLDH LIC R	5'GTGGTGGTGATGGTGATGGCCTTTAATGAGTGCTTC 3'	Genin ifade vektörüne aktarılmak için tasarlanan 3' ucu primeri
TaLDH Δ G F	5'GATTACGAACCCGATGGGCGTGATGGTGCAATTTG 3'	Birinci mutasyonu düzeltmek için tasarlanan 5' primeri
TaLDH Δ G R	5'CAAATGCACCATCACGCCATCGGGTTCGTAATC 3'	Birinci mutasyonu düzeltmek için tasarlanan 3' primeri
TaLDH Δ T F	5'GGAAGTGTAATTGGAGTACATGGAGACAGTATG 3'	İkinci mutasyonu düzeltmek için tasarlanan 5' primeri
TaLDH Δ T R	5'CATACTGTCTCCATGTACTCCAATTACTTCC 3'	İkinci mutasyonu düzeltmek için tasarlanan 3' primeri

2.1.6 Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Su Banyosu- Kerman

Çalkalamalı İnkübatör- GFL

pH Metre- CyberScan

Ultrasonikasyon- Bandelin

Mikrodalga Fırın- Beko

Etüv- Binder

Hassas Terazi- Ohaus

Buz Makinası- Optic Ivymen System

Distile Su Cihazı- GFL

Otoklav- Systec

-20 °C Buzdolabı- Beko

+4 °C Buzdolabı- Beko

-80 °C Buzdolabı- Heto

Kabin

Mikrosantrifüj- Sigma

Soğutmalı Santrifüj- Sigma

UV Visible Spektrofotometre- Thermo Scientific

Termal Döndürücü- Eppendorf

Vorteks- Heidolph

Şarlı Pipet Ünitesi- Hirschmann

Manyetik Karıştırıcı- Heidolph

Dikey Elektroforez Sistem- BioRad

Çalkalayıcı – Labn

PCR Çalışma Kabini- Esco

Yatay Elektroforez Sistem- BioRad

Yatay Elektroforez Sistem

Jel Görüntüleme Sistemi- BioRad

Trans-Blot Semy-Dry- BioRad

Bilgisayar- LG

2.1.7 Bakteriyolojik Gelişim İçin Besiyerleri ve Solüsyonlar

LB (Luria-Bertani) Sıvı Besiyeri

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

Otoklav ile 121 °C'de sterilizasyon yapılır.

LB (Luria-Bertani) Agar

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

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

SOC Medium (25 ml)

Maya Ekstraktı	0,5 g
Tripton	0,125 g
1 M NaCl	0,25 ml
1 M KCl	0,0625 ml
2 M Mg ⁺² Çözeltisi	0,25 ml
2 M Glikoz	0,25 ml

Bacto tryptone, bacto yeast extract, 1 M NaCl ve 1 M KCl tartıldıktan sonra 22 ml'ye kadar distile su eklenerek otoklav ile 121 °C'de sterilize edilir. Sıcaklığı oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 2 M Mg⁺² ve 2 M Glikoz çözeltileri eklenir. pH 7 ve son hacim 25 ml olmalıdır.

2.1.8 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar

Amfisilin (100 mg/ml)

Stok amfisilin 1 ml'ye 100 mg olacak şekilde sulandırılır ve filtre ile sterilize edilir.

Hazırlanan tampon -20 °C'de saklanır.

X-GAL (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranosid)

0,02 g X-Gal, 1 ml N,N-dimetilformamid (DMF) içerisinde çözülerek 20 mg/ml stok X-Gal çözeltisi hazırlanır ve filtre ile sterilize edilir. Hazırlanan tampon -20 °C'de saklanır.

IPTG (İzopropil-β -D- tiyogalaktopiranosid)

100 mM 1,5 ml stok IPTG için 35,74 mg IPTG tartılır ve distile su ile 1,5 ml'ye tamamlanır. Filtre ile sterilize edilir. Hazırlanan tampon -20 °C'de saklanır.

50X TAE (Tris-Asetat-EDTA) Tampon Çözeltisi (100 ml)

Trizma Base	24,2 g
Asetik Asit	5,71 ml
1 M EDTA (pH 8.0)	50 ml

Elde edilen karışım distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Çalışma sırasında distile su ile 1 X TAE'ye seyreltilir. Hazırlanan tampon karanlık ortamda saklanır.

EtBr-Agaroz Jel için Örnek Uygulama Tamponu (EtBr-SAB) (10 ml)

Sükroz	4 g
2 M Tris-HCl	0,5 ml
0.5 M EDTA	2 ml
Bromfenol mavisi	4 mg

CaCl₂ Çözeltisi (100 ml)

100 mM CaCl ₂ .2H ₂ O	1,4702 g
5 mM MgCl ₂ .6H ₂ O	0,10165 g
5 mM Tris HCl (pH: 7.6)	0,5 ml

Stok 1 M Tris-HCl (pH: 7.6)'den 0,5 ml eklenerek son konsantrasyon 5 mM olacak şekilde ayarlanır. Elde edilen çözelti 121 °C'de otoklav ile sterilize edilir.

Mg⁺² Stok Çözeltisi (100 ml)

MgCl ₂ .6H ₂ O	20,33 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	24,65 g

Yukarıda verilen kimyasal maddelere distile su eklenerek 100 ml'ye tamamlanır. Filtre ile sterilize edilir ve +4 °C'de saklanır.

Glikoz Stok (100 ml)

Glikoz	36 g
--------	------

Tartımı yapılan glikoz 100 ml distile suda çözüldükten sonra filtre ile sterilize edilir ve +4 °C'de saklanır.

Kristal Viyole (CV) Çözeltisi

Distile su ile 5 mg/ml stok çözeltisi hazırlanır ve karanlık ortamda saklanır.

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

Gliserol	500 µl/ml
1X TAE	500 µl/ml
Kristal viyole (stok 5 mg/ml)	10 µl/ml

Hazırlanan tampon karanlık ortamda saklanır.

% 30 Akrilamid/Bis Çalışma Çözeltisi (30 ml)

Akrilamid	8,7 g
N, N'-Metilen-Bis-Akrilamid	0,3 g

%10 Amonyum Persülfat Çözeltisi

30 mg amonyum persülfat üzerine 300 µl distile su eklenerek hazırlanmaktadır.

SDS-PAGE Ayırma Jeli (%12)

dH ₂ O	3,35 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
%10 SDS	100 µl
%30 Akrilamid/Bis	4 ml
% 10 Amonyum Persülfat	75 µl
TEMED	15 µl

SDS-PAGE Yükleme Jeli (%4)

dH ₂ O	3,05 ml
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
%10 SDS	50 µl
%30 Akrilamid/Bis	0,65 ml
% 10 Amonyum Persülfat	30 µl
TEMED	6 µl

SDS-PAGE Örnek Uygulama Tamponu (SDS-SAB) (10 ml)

% 10 SDS	1 g
0.5 M Tris HCl (pH: 6.8)	0.6 g
% 5 Gliserol	0.5 ml
% 25 β -Merkaptoetanol	0.25 ml
% 0.05 Bromfenol mavisi	0.005 g

5X SDS-PAGE Tank Tamponu

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

Distile su ile 1x'e seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlanır.

Protein Boyama Çözeltisi

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

Boya Uzaklaştırıcı Çözelti

- % 5 Metanol
- % 7 Asetik Asit

Boya uzaklaştırıcı çözeltisi kullanıldıktan sonra aktif karbon ile muamele edilerek

Coomassie Brilliant mavisinin çökeltilmesi sağlanır. Çözelti, filtre kağıdı ya da peçete ile süzülerek tekrar kullanılabilir.

Transfer Tamponu

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

PBS (Phosphate Tamponed Saline)

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

PBS Tween 20

PBS	1000 ml
Tween 20	2 ml

% 5'lik Süt tozu

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

0,5 M KH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH: 7.5) Tampon Çözeltisi

0,5 M Na₂HPO₄ (pH: 7.5)

0,5 M KH₂PO₄ ile pH ayarlanır.

Aktivite Tayini için Stok Substrat Solüsyonu

0,5mM pirüvat çözeltisi distile su ile hazırlanmaktadır.

Aktivite Tayini için Stok Kofaktör Solüsyonu

0,05mM β-NADH çözeltisi distile su ile hazırlanmaktadır.

Kinetik Ölçüm için Stok Substrat Solüsyonu

Konsatrasyonu 2,916 M olan pirüvat çözeltisi hazırlanarak; 4 mM, 6 mM, 12 mM, 18 mM, 54 mM 162 mM, 243 mM 486 mM 972 mM 1,458 M olacak şekilde seyreltilen farklı konsatrasyonlardaki substrat çözeltilerinin 1 ml hacmindeki reaksiyonda konsantrasyonları sırasıyla 0,016 mM, 0,024 mM, 0,048 mM, 0,072 mM, 0,144 mM, 0,216 mM, 0,432 mM, 0,648 mM, 0,972 mM, 1,296 mM, 1,944 mM, 2,332 mM, 2,916 mM, 3,888 mM, 5,832 mM, 11,664 mM, 20,412 mM, 49,572 mM olarak hesaplanmıştır.

Kinetik Ölçüm için Substrat Çalışma Solüsyonu

0,05 mM β-NADH çözeltisi distile su ile hazırlanır.

Kinetik Ölçüm Tamponu

50 mM Trizma Base ve 50 mM KCl içeren çözeltinin pH'sı 7,5'dir.

Lizis Tamponu (1 l) (pH : 8.0 ve 7,5)

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,00 g NaH ₂ PO ₄ (MW 119,99 g/mol)
300 mM NaCl	17,54 g NaCl (MW 58,44 g/mol)
10 mM imidazol	0,68 g imidazol (MW 68,08 g/mol)

Yıkama Tamponu (1 l) (pH : 8.0 ve 7,5)

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,00 g NaH ₂ PO ₄ (MW 119,99 g/mol)
300 mM NaCl	17,54 g NaCl (MW 58,44 g/mol)
20 mM imidazol	1.36 g imidazol (MW 68.08 g/mol)

Elüsyon Tamponu (1 l) (pH : 8.0 ve 7,5)

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,00 g NaH ₂ PO ₄ (MW 119,99 g/mol)
300 mM NaCl	17,54 g NaCl (MW 58,44 g/mol)
250 mM imidazol	17 g imidazol (MW 68.08 g/mol)

2.2 Yöntem

2.2.1 Yönlendirilmiş Mutagenез ile *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Gen Dizisinden İtronların Uzaklaştırılması

Grubumuzda daha önce klonlanan 1591 baz çiftlik *Theileria annulata*'nın laktat dehidrogenaz (*Ta*LDH) enzimini kodlayan gen dizisi, diğer laktat dehidrogenaz gen dizileri ile karşılaştırıldığında farklılık görülmüş ve dizide klasik intron başlangıcı ve sonlandırıcı nükleotitleri tespit edilerek iki intron varlığı gösterilmiştir [71]. Bu tezin ilk çalışması tespit edilen iki intron bölgesinin uzaklaştırılmasıdır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu temeline dayandırılarak yapılan yönlendirilmiş mutagenез protokolü ile tespit edilen intronlar uzaklaştırılmıştır. Yönlendirilmiş mutagenез methodu Turgut-Balık vd.[66] makalesinde tanımlanan protokol esas alınarak yapılmıştır. Birinci olarak, iki fragman Çizelge 2.2'de tanımlanan bileşenlerle, 94 °C 'de 1,5 dakika, 58 °C 'de 2 dakika, 72 °C 'de 2 dakika 20 döngüden oluşan reaksiyonla elde edilmiştir. Sonraki adımda elde edilen fragmanlar Çizelge 2.3'te tanımlanan bileşenler ile iki adımda birleştirilmiştir. 94 °C 'de 2 dakika, 50 °C'de 1,5 dakika ve 72 °C 'de 2 dakika 7 döngüyü takiben primerlerin eklenmesi ile 94 °C'de 1,5 dakika, 55 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2,5 dakika 20 döngü ile amplifikasyon tamamlanmaktadır.

Çizelge 2. 2 Birinci intronu uzaklaştırmak amacı ile fragman 1 ve 2'nin elde edildiği PCR bileşenleri

Fragman 1		Fragman 2	
Bileşen	Hacim	Bileşen	Hacim
dH ₂ O	33 µl	dH ₂ O	33 µl
10x Long PCR Tampon (+MgCl ₂)	5 µl	10x Long PCR Tampon (+MgCl ₂)	5 µl
dNTPmix 10 mM	5 µl	dNTPmix 10 mM	5 µl
Ta3 20µmol/ µl	2,5 µl	Ta 7 20µmol/ µl	2,5 µl
Ta8 20µmol/ µl	2,5 µl	Ta 4 20µmol/ µl	2,5 µl
<i>Ta</i> LDH	1,5 µl	<i>Ta</i> LDH	1,5 µl
Long PCR Enzyme mix	0,5 µl	Long PCR Enzyme mix	0,5 µl
	50 µl		50 µl

Çizelge 2. 3 Fragman 1 ve 2 'nin birleştirme reaksiyonu için gerekli olan PCR bileşenleri

7 DÖNGÜ		20 DÖNGÜ	
Bileşen	Hacim	Bileşen	Hacim
dH ₂ O	15,8 µl	dH ₂ O	14,5 µl
10x Long PCR Tampon (+MgCl ₂)	2,5 µl	10x Long PCR Tampon (+MgCl ₂)	2,5 µl
dNTPmix 10 mM	2,5 µl	dNTPmix 10mM	2,5 µl
Fragman 1	2.7 µl	Ta3 20µmol/ µl	2.5 µl
Fragman 2	1 µl	Ta4 20µmol/ µl	2,5 µl
Long PCR Enzyme mix	0,5 µl	Long PCR Enzyme mix	0,5 µl
	25 µl		25 µl

İkinci intronun çıkarılması Çizelge 2.4 ve Çizelge 2.5'te tanımlanan bileşenler ve birinci intron çıkarılması için tanımlanan koşulların tekrarı ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2. 4 İkinci intronu uzaklaştırmak amacı ile fragman 1 ve 2'nin elde edildiği PCR bileşenleri

Fragman 1		Fragman 2	
Bileşen	Hacim	Bileşen	Hacim
dH ₂ O	33 µl	dH ₂ O	33 µl
10x Long PCR Tampon (+MgCl ₂)	5 µl	10x Long PCR Tampon (+MgCl ₂)	5 µl
dNTPmix 10 mM	5 µl	dNTPmix 10 mM	5 µl
Ta3 20µmol/ µl	2,5 µl	Ta 9 20µmol/ µl	2,5 µl
Ta10 20µmol/ µl	2,5 µl	Ta 4 20µmol/ µl	2,5 µl
TaLDH	1,5 µl	TaLDH	1,5 µl
Long PCR Enzyme mix	0,5 µl	Long PCR Enzyme mix	0,5 µl
	50 µl		50 µl

Çizelge 2. 5 Fragman 1 ve 2'nin birleştirme reaksiyonu için gerekli olan PCR bileşenleri

7 DÖNGÜ		20 DÖNGÜ	
Bileşen	Hacim	Bileşen	Hacim
dH ₂ O	15,8 µl	dH ₂ O	14,5 µl
10x Long PCR Tampon (+MgCl ₂)	2,5 µl	10x Long PCR Tampon (+MgCl ₂)	2,5 µl
dNTPmix 10 mM	2,5 µl	dNTPmix 10mM	2,5 µl
Fragman 1	2.7 µl	Ta3 20µmol/ µl	2.5 µl
Fragman 2	1 µl	Ta4 20µmol/ µl	2,5 µl
Long PCR Enzyme mix	0,5 µl	Long PCR Enzyme mix	0,5 µl
	25 µl		25 µl

Yapılan mutagenезler ile elde edilen PCR ürünleri kristal viyole jelde yürütülerek saflaştırılmış, etidyum bomür jelde yürütülerek doğru büyüklükte oldukları gösterilmiştir.

2.2.1.1 PCR ürünlerinin Kristal-Viyole Jelde Yürütülmesi ve Saflaştırılması

Hazırlanan hacimde 1xTAE tampon içerisinde %1'lik olacak şekilde agaroz çözülmüştür. Kristal viyole eklendikten sonra mikrodalgada kaynatılarak homojen hale gelen çözelti, tarakların olduğu tepsiye dökülerek donması sağlanmıştır. Hazırlanan jel elektroforez tankına yerleştirilmiş ve üzerine tank tamponu eklenmiştir. Yükleme tamponu ilave edilen örnekler kuyucuklara yüklenmiş; 30 mA'de yaklaşık 10 dakika yürütülmüştür [72]. Beyaz ışık altından görüntülenen jelden uygun bantlar kesilerek, Wizard® SV Gel ve PCR Clean-up sistem protokolüne göre saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir [73].

2.2.1.2 PCR ürünlerinin Etidyum-Bromür Jelde Yürütülmesi ve Saflaştırılması

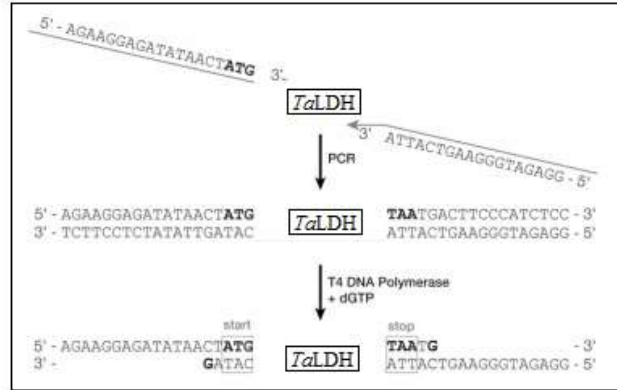
500 ile 10.000 baz çifti arasındaki DNA'yı görüntüleyebilmek için %1 agaroz içeren etidyum bromür jel hazırlanmaktadır. %1'lik konsantrasyonda olacak şekilde agaroz tartılmış ve 1xTAE içinde çözülmüştür. Homojen karışım elde edilecek şekilde mikrodalgada kaynatılmıştır. Etidyum bromür eklendikten sonra tepsiye dökülüp donması sağlanmıştır. Yükleme tamponu eklenen PCR örnekleri tank tamponu içeren elektroforez tankındaki jele yüklenmiştir. 40-50 mA'de 1,5 saat yürütülen jeldeki DNA bantları 254-312 nm dalga boyunda ultraviyole transilluminatöründe görüntülenmiştir [72].

*Ta*LDH genindeki intronların uzaklaştırıldığı genin 5' ucu primeri kullanılarak dizileme ile gösterilmiştir.

2.2.2 İtronları Uzaklaştırılan *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin İfade Vektörüne Aktarılması

aLICator LIC (Ligase Independent Cloning) Klonlama ve Ekspresyon Kit sistemi ligaz enziminden bağımsız olarak hızlı bir şekilde ekspresyon vektörüne klonlama işlemine dayanmaktadır. LIC işlemi, restriksiyon enzimleriyle kesim ve ligasyon basamaklarını elimine ederek yüksek verimde klonlama sağlamaktadır. Bunun için öncelikle protokole uygun olarak tasarlanan 5' ve 3' primerleri ile ilgili genin amplifikasyonu yapılmaktadır. Sisteme uygun primerler ile amplifiye edilen gen protokoldeki ligasyon işlemi için kullanılmaktadır. LIC sistemindeki T4 DNA polimeraz enzimi 5'→3' polimeraz aktivitesi

ve 3'→5' ekzonüklaz aktivitesine sahiptir. Ekzonükleaz aktivitesi, polimerizasyon devam ederken DNA'nın 3' ucundaki dNTP'leri kontrol ederek hata düzeltmektedir. LIC protokolü, sarmaldaki ilk sitozin oluşumunu dengelemek amacı ile sadece dGTP içermektedir (Şekil 2.2). Uzama reaksiyonunun ardından vektöre aktarılan hedef gen transformasyona hazır hale gelmektedir [70].



Şekil 2. 2 T4 DNA polimeraz ve dGTP ile ilgili genin yapışkan uçlarının oluşturulması [70]

2.2.2.1 aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) Sistemine Uygun Primerlerin Tasarlanması

Primer tasarımı, kitte pLATE31 için verilen kalıp diziler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Primerin 5' ucu vektöre spesifik dizi içerirken, 3' ucuna ilgili genin 5' ve 3' uçlarından diziler ilave edilmiştir.

pLATE31 5' primer dizaynı: 5'- AGAAGGAGATATAACTATG– hedef gene spesifik dizi 3'

pLATE31 3' primer dizaynı:5'-GTGGTGGTGATGGTGATGGCC–hedef gene spesifik dizi 3'

2.2.2.2 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin İfade Vektörüne Aktarılmak Üzere Sisteme Spesifik Primerler ile Amplifikasyonu

İntronları uzaklaştırılan genin aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) sistemine alt klonlanması için, tasarlanan 5' ve 3' primerleri ile amplifiye edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle Çizelge 2.6'da verilen bileşenler ile *Taq* Polimeraz enzimi kullanılarak amplifiyasyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2. 6 *Ta*LDH genini amplifiye etmek için kullanılan reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Hacim
dH ₂ O	30 µl
10x PCR Tampon	5 µl
25 mM MgCl ₂	3
10 mM dNTPmix	5 µl
20µmol/ µl 5' primeri	2,5 µl
20µmol/ µl 3' primeri	2,5 µl
Kalıp DNA	1,5 µl
Enzim	0,5 µl
	50 µl

2.2.2.3 LIC Reaksiyonu ve Rekombinant Plazmid DNA'ların *E. coli* BL21 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu

LIC reaksiyonunda kullanılacak kalıp DNA miktarı aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) sistemi protokolünde verilen tablodaki nükleotit uzunluğuna göre belirlendikten sonra Çizelge 2.7'de miktarları verilen bileşenler karıştırılarak yapışkan uçların oluşması sağlanmıştır.

Çizelge 2. 7 *Ta*LDH geninde 5' ve 3' yapışkan uçları oluşturmak için gerekli olan reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Hacim
5x LIC Tampon	2 µl
PCR product	0,1 pmol
Water Nuclease Free	9 µl'ye kadar kullanılabilir
T4 DNA Polimerase	1 µl
	10 µl

Reaksiyon karışımının 3-5 saniye vortekslenmesinin ardından termal döndürücüde 25 °C'de 5 dakika bekletilmiştir. 0,6 µl 0,5 M EDTA reaksiyonun durması için karışıma eklenmiştir. Enzim ile muamele edilmiş PCR ürününe uzama reaksiyonunun başlaması için 1 µl pLATE31 vektörü eklenmiştir. 3-5 saniye vortekslenmesi sonrasında termal döndürücüde 25 °C'de 5 dakika bekletilmesinin ardından transformasyon için kullanılmıştır.

-80 °C'deki *E. coli* BL21 (DE3) stoğundan LB Agar petriye sürme ekimi yapılmıştır. Bu petriden seçilen tek koloninin 5 ml'lik LB sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır. 37 °C'de 180 devir hızda 16 saat çalkamalı inkübatörde inkübasyonu yapılmıştır. Geliştirilen

kültürden 500 µl alınarak 50 ml'lik LB sıvı besiyerine aktarımı yapılmıştır. 37 °C'de 180 devir hızda, UV visible spektrofotometrede 600 nm'de optik yoğunluk (OD) absrobansı 0,3-0,4 değerine gelinceye dek geliştirilmiştir. OD 'si gelen hücreler ikiye bölünerek +4 °C'de 5000 devir hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantları dökülen pelletler 25 ml CaCl₂ ile çözülmüştür. 30 dakika buzda bekletilen hücreler, +4 °C'de 5000 devir hızda 5 dakika daha santrifüjlenmiştir. Süpernatantı dökülen pelletler 1 ml CaCl₂ ile çözüldükten sonra 2 saat buzda bekletilmiştir. Elde edilen kompetan hücreler transformasyonda kullanılmıştır [72].

LIC reaksiyon örneğinin yaklaşık 12 µl'sinin üzerine 200 µl hazırlanan *E. coli* BL21 (DE3) kompetan hücreleri eklendikten sonra 4-6 kez ters yüz edilmiştir. Hücre parlarının açılması için önce 30 dakika buzda bekletilip ardından 42 °C'de 90 saniye ısı şokuna maruz bırakıldıktan sonra 2 dakika buzda bekletilmiştir. 800 µl SOC Medium eklenip 4-6 kez ters yüz edilen karışım 30 dakika 37 °C bekletilmiştir. Amfisilin içeren LB Agar petrilere farklı hacimlerde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. 37 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir [72].

2.2.2.4 Klonlanan TaLDH Enzimini Kodlayan Genin Koloni PCR Metodu ile Kontrolü

Transformasyonun kontrolü için koloni PCR yöntemi kullanılmıştır. Petrilere oluşan beyaz tek kolonilere kürdanla dokunularak amfisilin içeren LB sıvı besiyerine ekimi yapılmış ve 37 °C'de 180 devir hızda çalkalamalı inkübatörde 16 saat inkübasyonla gelişimi sağlanmıştır. Geliştirilen kültürlerden 100 µl alınarak 13000 devir hızda 7 dakika satrifüj edilmiştir. Süpernatantı dökülen pellet 100 µl dH₂O ile çözümlenerek 10 dakika kaynayan su buharında bekletilmiştir. Son olarak 13000 devir hızda 15 dakika satrifüjlenmesi ile oluşan süpernatanttan 10 µl kullanılarak Çizelge 2.8'de bileşenler ile PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Enzim eklenmeden 95 °C'de 5 dakika ön denatürasyon yapılmış, enzim eklendikten sonra 94 °C'de 1,5 dakika, 44 °C'de 2 dakika ve 72 °C'de 2 dakika'lık 25 döngüde koloni PCR tamamlanmıştır. Pozitif olan koloniler gliserol stoğu yapılarak -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 2. 8 Koloni PCR bileşenleri

Bileşenler	Koloni	Kontrol
dH ₂ O	21 µl	30 µl
10XTampon	5 µl	5 µl
5 mM MgCl ₂	3 µl	3 µl
10 mM dNTPs	5 µl	5 µl
5' Primer 20 pmol	2,5 µl	2,5 µl
3' Primer 20 pmol	2,5 µl	2,5 µl
Kalıp DNA	10 µl	1 µl
Enzim	1 µl	1 µl
	50 µl	50 µl

2.2.3 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enziminin Ekspresyonu

-80 °C derin dondurucu içinde *Ta*LDH genini içeren pLATE31 ifade vektörünün bulunduğu *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri ile içinde gen bulundurmeyen negatif kontrol olarak kullanılacak olan boş *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinin LB Agar petrilere sürme ekimi yapılmıştır. 37 °C'deki 16 saat inkübasyon sonrasında oluşan tek kolonilerden biri seçilerek; gen bulunan *E. coli* hücreleri amfisilin içeren 5 ml'lik LB sıvı besiyerine, gen bulunmayan boş *E. coli* hücreleri ise amfisilin içermeyen 5 ml'lik LB sıvı besiyerine pasajlanmıştır. 37 °C'de 180 devir hızda çalkalamalı inkübatörde gece boyu inkübasyonu yapılmıştır. Gelişen gen içeren kültürden 1000 µl alınarak amfisilin içeren 100 ml LB sıvı besiyerine pasajı yapılırken, boş hücre bulunan kültürden 1000 µl alınarak 100 ml LB sıvı besiyerine pasajlanmıştır. 37 °C'de 180 devir hızda çalkalamalı inkübatörde UV visible spektrofotometre ile 600 nm'de yapılan ölçümde optik yoğunluk (OD) absorbansları 0,6'ya ulaşıncaya dek inkübe edilmiştir. OD₆₀₀ 0,6 'ya ulaşıncaya 50 ml için 0,5 mM olacak şekilde IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) indüklemesi yapılmıştır. Her iki kültür grubu için de 50 ml indüklenmiş 50 ml indüklenmemiş kültürler bulunmaktadır. İndükleme sonrası sıcaklık 25 °C'ye düşürülmüştür. İndüklemeden itibaren, 3 saat, 5 saat, ve 16 saatlik bekleme sürelerinin ardından alınan 3 ml örnekler +4 °C 'de 5000 devir hızda 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantların atıldığı pelletler sonikasyon tamponu olarak kullanılan 500 µl 50 mM Tris-KCl (pH 7,5) içinde çözülerek 10 saniye sonikasyon 20 saniye bekleme sürelerinden oluşan toplam 6 döngüde 3 dakika boyunca sonike edilmiştir. Oluşan örnekler +4 °C 'de 14.000 devir hızda 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant ve pelletler ayrı tüplere hazırlanmıştır [74].

2.2.4 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SDS-PAGE, BIO-RAD Mini-PROTEAN® 3 Cell'e ait jel elektroforez sistemi kullanılarak hazırlanmıştır. SDS-PAGE yapımında kullanılan %12'lik ayırma jeli ve %4'lük yükleme jeli bileşenleri aşağıda verilmektedir. Dikey sistemde %12 ayırma jeli altta, %4'lük yükleme jeli üstte polimerleştirilmiştir. [75].

SDS-PAGE Ayırma Jeli (%12)

dH ₂ O	3,35 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
%10 SDS	100 µl
%30 Akrlamid/Bis	4 ml
% 10 Amonyum Persülfat	75 µl
TEMED	15 µl

SDS-PAGE Yükleme Jeli (%4)

dH ₂ O	3,05 ml
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
%10 SDS	50 µl
%30 Akrlamid/Bis	0,65 ml
% 10 Amonyum Persülfat	30 µl
TEMED	6 µl

Elde edilen örnekler 1:1 oranında SDS-PAGE yükleme tamponu eklenerek 5 dakika kaynar su buharında bekletildikten sonra jele yüklenmiş ve 1x Tank tamponu eklendikten sonra örnekler jelin sonuna gelinceye dek 80 V'da yürütülmüştür. Elektroforez ardından jeller boyama çözeltisinde 65 °C'de yarım saat süre ile

bekletilmiş ve boya uzaklaştırıcı çözelti ile muamele edildikten sonra görüntülemesi yapılmıştır [75].

2.2.5 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesinin Spektrofotometre İle Tayini

İfade edilen TaLDH enziminin aktivite ölçümü, Thermo Scientific UV visible spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyonda NADH'ın NAD⁺'a çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranı takip edilmiştir. Reaksiyonlar pH 7,5 olan 50 mM KCl içeren 50 mM Tris solüsyonu, ile 25 °C 'de gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için 500 mM pirüvat ve 50 mM NADH kullanılmıştır. 1 ml'lik küvetteki tampon içine pirüvat ve NADH solüsyonları eklendikten sonra en son enzim ilavesi ile reaksiyon başlatılmıştır [66].

2.2.6 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enziminin Western Blot ile Analizi

Western Blot analizi Bio-Rad Trans-Blot® Semi-Dry sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Blotlama öncesinde proteinlerin SDS-PAGE jelde ayrılması sağlanmıştır. Nitroselüloz membran jel büyüklüğünde kesilmiştir. Filtre kağıdı ve membran en az 1 saat transfer tamponu içerisinde bekletilmiştir. Elektroforez sonrasında jel 15 dakika boyunca transfer tamponu ile muamele edilmiştir. Western blota özgü kasetin kapağı açılıp, alt bölümüne sırasıyla hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek fiberped membran jel ve onun üzerine filtre kağıdı yerleştirilmiştir. Kasetin kapağı kapatılıp güç kaynağına bağlanmıştır. Mini jel için 15 dakika süre ile 15 V'da blotlama işlemi yapılmıştır. Blotlama sonrası membran, PBS Tween 20'de 10 dakika yıkanmış ve % 5'lik yağsız süt tozu içerisinde +4 °C'de bir gece bloklama yapılmıştır. Bloklamanın ardından PBS Tween 20 ile 10 dakika süresince oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. % 5'lik süt tozu ile 1/500 oranında seyreltilmiş primer antikor ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. 10 dakika PBS Tween 20 ile yıkama işlemi 3 defa tekrar edilmiştir. % 5'lik süt tozu ile 1/12.000 oranında seyreltilmiş sekonder antikor ilave edilmesinin ardından oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. 10 dakika PBS Tween 20 ile yıkama işlemi 3 kez tekrar edilmiştir. Yıkama sonrasında 60 mg 3,3'-

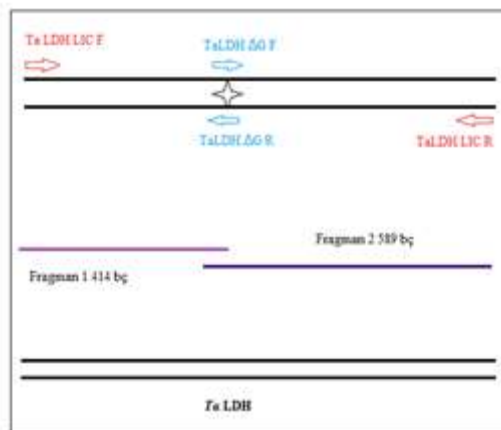
Diaminobenzidin (DAB), 100 ml PBS, 100 µl H₂O₂ içerisinde bantlar belirginleşinceye kadar bekletilmiştir. Daha sonra dH₂O içerisine alınarak reaksiyon durdurulmuştur [72].

2.2.7 Klonlanan *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin DNA Dizi Analizi ile Kontrolü

Klonlama ardından dizileme sonucu gelinceye kadar beklenecek dönemde ekspresyona başlanmış ve alınan negatif sonuçlardan dolayı dizileme sonucuna geri dönülmüştür. Wizard® Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma sistem protokolü uygulanarak pozitif kolonilerden rekombinant plazmid DNA'lar elde edilmiştir [76]. aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) sistemine göre tasarlanan 5' primerler kullanılarak dizi analizi yapılmıştır.

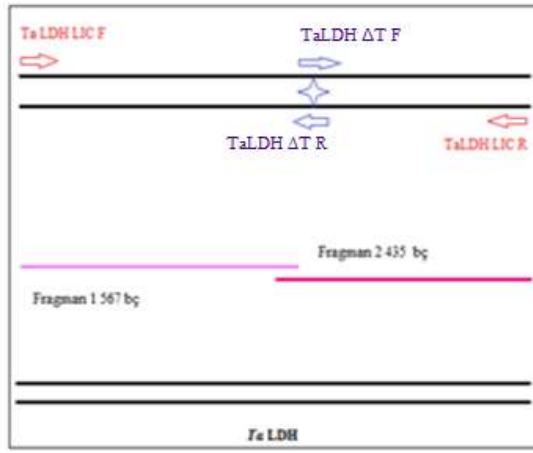
2.2.8 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Gende Belirlenen Mutasyonların Yönlendirilmiş Mutagenез ile Düzeltilmesi ve İfadelerinin Yapılması

Meydana gelen mutasyonlar Bölüm 2.2.1'de tanımlanan PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез ile düzeltilmiştir. PCR koşulları aynı kalmak üzere TaLDHLIC F - TaLDHΔG R ve TaLDHLIC R- TaLDHΔG R birinci mutagenез için; TaLDHLIC F - TaLDHΔT R ve TaLDHLIC R- TaLDHΔT R ikinci mutagenез için kullanılan primerlerdir. Şekil 2.3 ve Şekil 2.4'te şematize edilen reaksiyonlar ile mutasyonlar düzeltilerek *Ta*LDH enzimini kodlayan gen yabancı hale getirilmiştir.



Şekil 2. 3 Birinci mutasyonun yönlendirilmiş mutagenез ile düzeltilmesi

Elde edilen yabancı *Ta*LDH aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) sistemine uygun 5' ve 3' primerler ile Bölüm 2.2.2.2'de yer alan protokole göre amplifiye edilmiştir. Bölüm 2.2.2.3'teki protokole uygun olarak LIC reaksiyonu yapılarak kompetan hale getirilen *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyon sonrası hücreler amfisilin içeren LB Agar petrilere ekilmiş ve 16 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen kolonilerden seçim yapılarak Bölüm 2.2.2.4'te verilen protokole uygun olarak koloni PCR ile pozitif koloniler tespit edilmiştir. Wizard® Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma sistem protokolü uygulanarak rekombinant plazmid DNA'lar elde edilmiş ve DNA dizi analizine gönderilmiştir. Pozitif kolonilerden gliserol stoku hazırlanarak -80 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2. 4 İkinci mutasyonun yönlendirilmiş mutagenез ile düzeltilmesi

-80 °C'deki yabancı ve birinci mutasyonu düzeltilmiş *Ta*LDH genini içeren *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri ve gen içermeyen *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri LB Agarlı petrilere sürme ekimi yapılarak 37 °C'de inkübe edilmiştir. Gelişen tek kolonilere kürdanla dokunularak, gen içermeyen *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri amfisilin içermeyen 5 ml LB sıvı besiyerine, gen içeren *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri ise amfisilin içeren 5 ml LB sıvı besiyerine alınarak gece boyu 37 °C'de 180 devir hızda inkübe edilmiştir. Gen içeren kültürlerden 1000 µl hücre alınarak amfisilin içeren 100 ml LB sıvı besiyerine, boş hücre içeren kültürden ise 1000 µl alınarak 100 ml LB sıvı besiyerine pasaj yapılmıştır. UV visible spektrofotometre ile OD₆₀₀'de hücre yoğunluğu 0,6 absorbans değerine ulaşıncaya dek 37 °C'de 180 devir hızda inkübe edilmiştir. OD₆₀₀'de 0,6 absorbans görüldüğünde kültürler ikiye bölünmüş 50 ml'lik kültürler 0,5 mM IPTG indüklenerek, sıcaklık 25

°C'ye düşürülmüştür. 3 saat, 5 saat, ve 16 saatlik süreler sonunda 3'er ml örnekler alınmış ve +4 °C'de 5000 devir hızda 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar atılarak pelletler sonikasyon tamponu olarak kullanılan 500 µl 50 mM Tris-KCl (pH 7,5) içinde çözülerek, 3 dakika boyunca 10 saniye sonikasyon 20 saniye bekleme sürelerinden oluşan 6 döngüde sonike edilmiştir. Oluşan örnekler +4 °C'de 14.000 devir hızda 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant ve pelletler ayrı tüplere hazırlanmıştır [74].

SDS-PAGE jeli ve örnekler Bölüm 2.2.4'teki protokole göre hazırlanarak örnekler jelde yürütülmüş ve Bölüm 2.2.5 'teki protokole göre de enzim aktivite tayini yapılmıştır.

2.2.9 *Theileria annulata* 'nın Laktat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması

Bölüm 2.2.8'de verilen enzimin ifade edilmesinde kullanılan koşullara göre amfisilin içeren 50 ml LB sıvı besiyerine, amfisilin içeren 5 ml LB sıvı besiyerinde geliştirilen *TaLDH* geni içeren *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinin bulunduğu kültürden 500 µl alınarak pasajı yapılmıştır. OD₆₀₀'de hücre yoğunluğu 0,6 değerine ulaşıncaya dek 37 °C'de 180 devir hızda geliştirilmiş ve OD₆₀₀ 0,6'ya ulaştığında 50 ml'de son konsantrasyonu 0,5 mM IPTG ile indüklenmiş ve sıcaklık 25 °C'ye düşürülerek 16 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen hücre kültürü +4 °C'de 5000 devir hızda 20 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar atılmış ve hücre pelletleri 3 ml lizis tamponunda çözülmüştür. Lizis tampondaki hücreler, %20'lik güç kullanılarak 10 saniye sonikasyon 10 saniye bekleme olacak şekilde 6 döngüde sonike edilmiştir. Ultrasonikasyon yapıldıktan sonra; 14000 devir hızda +4 °C'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşamada süpernatantlar alınmıştır. Pelletler dH₂O ile çözülerek saklanmıştır. Elde edilen yaklaşık 4 ml hücre lizatına, 1 ml nikel nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) agaroz +4 °C'de 120 devir hızda 1 saat boyunca muamele edilmiştir. 5 ml'lik şırınganın alt yüzeyine kurutma kağıdı konularak ve 3 ml'ye kadar cam yünü eklenerek affinite kromatografisi için kolon oluşturulmuştur. Uç kısmına tubing geçirilerek kolon hazırlandıktan sonra, hücre lizatı ve Ni-NTA agaroz karışımı kolona yüklenmiştir. İlk süzüntü fraksiyonu toplanmıştır. Kolona iki defa 4 ml yıkama tamponu eklenerek yıkama fraksiyonları (Y₁, Y₂, Y₃) toplanmıştır. 5 ml elüsyon tamponu kullanılarak elüsyon fraksiyonları (E₁, E₂, .., E₁₀) toplanmıştır [77].

Toplanan örnekler; eşit miktar SDS-PAGE örnek uygulama tamponu ile Bölüm 2.2.4'te verilen protokole uygun olarak SDS-PAGE analizi için hazırlanmıştır.

2.2.10 Enziminin Molekül Ağırlığı ve Molar Absorblama Katsayısının Değerlerinin Hesaplanması

Saflaştırılan TaLDH enziminin protein konsantrasyon değerinin hesaplanması için saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı ve molar absorblama değerlerinin bulunması gerekmektedir. Bu değerler için web tabanlı "Peptide Property Calculator" kullanılmıştır [78]. Sunucuya amino asit dizisinin girilmesiyle istenen molekül ağırlığı ve molar absorblama değeri elde edilmiştir.

2.2.11 Saflaştırılmış Enzimin Konsantrasyonunun Hesaplanması

Saflaştırılan enzimin konsantrasyonunun hesaplanması için UV visible spektrofotometrik yöntemler kullanılmıştır. Bunlarında birincisi Lambert-Beer yasası kullanılarak uygulanan yöntemdir [79].

Lambert-Beer yasasına göre protein miktar tayini yapmak için, deneysel aşamada 1 cm genişliğinde kristal küvet ile A_{280} 'de spektroskopik ölçüm alınmıştır. Elde edilen veriler (2.1) ve (2.2) 'deki denklemler kullanılarak enzimin molar konsantrasyonu (mol/l) hesaplanmış ardından moleküler ağırlığı ile çarpılarak ml'de kaç mg enzim olduğu hesaplanmıştır.

$$c(\text{mol/l}) = (A_{280}) / (\epsilon \times L) \quad (2.1)$$

$$c(\text{mg/l}) = (A_{280}) \times M_w / (\epsilon \times L) \quad (2.2)$$

L, hücre yol uzunluğunu (cm) ifade etmektedir ve bu çalışmada kullanılan dispoosible küvette hücre yol uzunluğu 1 cm olduğu için (2.1) ve (2.2)'deki denklemler de L yerine 1 yazılarak sonuç olarak (2.4) denklemi kullanılmıştır [79].

$$c (\text{mol/l}) = (A_{280}) / (\epsilon) \quad (2.3)$$

$$c (\text{mg/l}) = (A_{280}) \times MW / (\epsilon) \quad (2.4)$$

2.2.12 Saflaştırılmış Enzimin Optimum pH ve Spesifik Aktivite Değerlerinin Belirlenmesi

Saflaştırılan *Ta*LDH enzimi için optimum pH değeri Thermo Scientific UV visible spektrofotometre kullanılarak NADH'ın NAD⁺'a çevrilmesi ile 340 nm'deki (ΔA_{340} /dakika) absorbans değişim oranı takip edilerek yapılmıştır. Reaksiyonlar farklı pH (pH6,5; pH7,0; pH7,5; pH8,0; pH8,5) değerlerinde 50 mM KCl ve 50 mM Tris içeren 50 mM Tris-KCl tampon ile 25 °C 'de gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için 500 mM pirüvat ve 50 mM NADH kullanılmıştır. 1 ml'lik küvetteki tampon içine pirüvat ve NADH solüsyonları eklendikten sonra en son enzim ilavesi ile reaksiyon başlatılmıştır [66]. LDH aktivite ölçümleri 2 defa tekrar edilmiştir.

*Ta*LDH enziminin belirlenen optimum pH değerindeki 50 mM Tris-KCl kullanılarak elde edilen absorbans değeri kullanılarak spesifik aktivite değeri hesaplanmıştır. Aktivite tayininde NADH'ın NAD⁺'ya dönüşümü etkili olduğu için ϵ_{NADH} (molar absorpsiyon katsayısı) değeri kullanılmıştır. Toplam reaksiyon hacmi (V_T) ve kullanılan enzim hacmi (V_E) (2.5) denkleminde gösterildiği gibi yazılarak spesifik enzim aktivitesi Ünite/ml (U/ml) olarak hesaplanmıştır:

$$U/ml = (\Delta A_{340}/\text{dakika}) \times V_T / (\epsilon_{\text{NADH}} \times V_E) \quad (2.5)$$

Belirlenen değer enzim konsantrasyonuna bölünerek 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi hesaplanmıştır.

2.2.13 Saflaştırılmış Enzimin Termostabilitesinin Belirlenmesi

Saflaştırılmış *Ta*LDH enziminin stabil olduğu sıcaklıkların bulunacağı termostabilite deneyinde Bölüm 2.2.12'de belirlenmiş olan optimum pH'daki 50 mM Tris-KCl tamponu kullanılarak yine Bölüm 2.2.12'de belirlenen aktivite tayini koşullarında termal döndürücüde ayarlanan farklı sıcaklıklarda (60 °C, 50 °C, 40 °C, 30 °C, 20 °C) 15 dakika süresince bekletilen enzim 3'er dakika arayla kullanılarak 340 nm'de aktivite değerleri belirlenmiştir. Alınan ölçümler iki kez tekrar edilmiştir.

2.2.14 Safılaştırılmış Enzimin Kinetik Analizi

Enzimler yaşayan hücreser tarafından üretilen amino asitlerden oluşan protein yapısındaki makromolekülleridir. Çeşitli biyokimyasal reaksiyonları katalizlemek için organizmalara gerekli enerjiyi sağlamaktadırlar. Hücrelerde enzimlerin olmaması durumunda kimyasal reaksiyonlar hücrelerin ölçülebilir sıcaklıklarda devam etmesi beklenemez.

Her enzimin substrata bağlanabileceği uygun bölgeyi temsil eden en az bir aktif bölgesi bulunmaktadır. Substrat bu bölgeye en iyi bağlanabildiği yönelimle sıkıca tutunmaktadır. Reaksiyonda bulunan kimyasal grupların bazıları aktif bölgenin içinde de bulunmaktadır. Enzimatik reaksiyonlar, H₂O, -OH, -H, -NH₂, gibi radikal bazı moleküllerin eklenmesi ya da uzaklaştırılması ile sonuçlanmaktadır.

Her enzimin optimum aktivite gösterdiği bir sıcaklık ya da pH değeri bulunmaktadır. Bu optimum pH ve sıcaklık, farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen testler ya da farklı pH'lardaki tamponlarda gerçekleştirilen reaksiyonlar ile kolaylıkla laboratuvar koşullarında belirlenmektedir.

Enzimler substratla ilgili olarak yüksek derecede spesifite göstermektedirler. Spesifite dereceleri enzimden enzime çeşitlilik göstermektedir. Bazı enzimler tek yönde reaksiyon katalizlerken, bazıları çift yönde reaksiyon katalizlemektedir. Enzimlerin bir ya da iki substrat molekülü kabul edenleri varken, diğerleri substrat olarak moleküllerin tüm sınıf ve alt sınıflarını kabul etmektedir. Enzim adlandırılması katalizlediği reaksiyona ya da substrata göre yapılmaktadır [80].

Enzim kinetiği, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızlarını ve deneysel koşulların değiştirilmesinin reaksiyon hızına etkilerini araştırmaktadır. Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların temel özelliği doygunluktur. Substrat konsantrasyonu arttıka reaksiyon hızı da artmakta ve konsantrasyona bağlı olmaksızın reaksiyon hızı belli bir sınıra yaklaşınca durmaktadır [81].

Substrat konsantrasyonu enzim tarafından katalizlenen reaksiyonlar için kilit faktördür ve substratın etkisinin belirlenmesi için reaksiyonun gerçekleştiği süre boyunca *in-vitro* koşullarda substratın ürüne dönüşümü substrat konsantrasyonu ile takip edilmektedir [82].

Enzimatik reaksiyonun kinetik analizi klasik olarak çeşitli substrat konsantrasyonlarında çalışılmakta ve substrat konsantrasyonunun fonksiyonu olarak ürüne dönüşüm hızının grafiği çizilmektedir. Klasik substrat kinetiğinde tipik hiperbolik Michealis-Menten eğrisi ve doğrusal karşıtı olan Lineweaver Burke grafiğinden enzimin kinetik sabitleri hesaplanmaktadır. Ancak enzimlerin bazıları klasik durumdaki gibi davranmamakta, hız eğrisi maksimum noktaya kadar çıktıktan sonra substrat konsantrasyonu arttıkça maksimum noktadan aşağı inmektedir. İnhibisyonsuz kinetikle karşılaştırıldığı zaman maksimum hızdan sonra substrat konsantrasyonuna bağılı olarak kinetik davranış karmaşıklaşmaktadır [83]. Bu durum substrat inhibisyonu olarak adlandırılmakta ve enzimlerin %20'sinde substrat inhibisyonun görüldüğü tahmin edilmektedir [84].

Substratın enzime ürün üretmeksizin bağlanması dikkate alındığında, kinetiğin tanımlanabilmesi için ek parametrelere ihtiyaç duyulmaktadır ve formül denklem (2.6)'da verildiği şekilde türetilmektedir [83].

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}} \quad (2.6)$$

Denklem (2.6)'da verilen [S], substrat konsantrasyonu, V_{max} , K_M ve K_i ise [S]'dan bağımsız sabitlerdir. Bu üç parametre lineer olmayan en küçük kareler yöntemi fiti aracılığıyla hesaplanabilmektedir. K_i sonsuza gittikçe denklem Michealis-Menten modeline dönüşecek şekilde kısalmakta ve parametrelerin değerleri Lineweaver-Burke grafiği ile hesaplanmaktadır [83].

Rekombinant DNA tekniklerinin gücü enzim üretiminin teknolojik uygulamının gerekliliğine uygun olacak şekilde tasarlanmasını sağlamaktadır. Aynı reaksiyonu katalizleyen enzimlerin kütüphaneleri yardımı ile katalitik hızları gösterilmektedir. Hangi enzimin "daha iyi" olduğunun belirlenmesi ise katalitik etkinliklerinin tanımlanması ile mümkün olabilmektedir [85]. Katalitik etkinliğin tanımlanması için belirlenen Michealis-Menten sabitleri yanı sıra, substratın ürüne dönüşümü için belirlenen katalitik sabit olarak tanımlanan k_{cat} kullanılmaktadır. Birimi s^{-1} veya dk^{-1} olabilmektedir. Enzimin karşılaştırılabilmesi için kullanılan katalitik etkinlik sabiti k_{cat}/K_M oranından elde edilmektedir. k_{cat} ve k_{cat}/K_M değerlerinin hesaplanması için kullanılan denklemler aşağıda verilmektedir.

$$A=V_{\max}/\epsilon_{\text{NADH}} \quad (2.7)$$

$$k_{\text{cat}} (\text{dönüşüm sayısı}) = (A/E_T)/60 \quad (2.8)$$

$$\text{Katalitik etkinlik} = k_{\text{cat}}/K_M \quad (2.9)$$

Bu tez çalışmasında saf olarak elde edilen *Ta*LDH enziminin kinetik analizi farklı konsantrasyonlarda hazırlanan substratlar kullanılarak yapılmıştır. Optimum pH'sı belirlenen Tris-KCl tamponuna enzimin ve kofaktör olarak NADH'ın eklenmesinin ardından pirüvat ile başlatılmıştır. 1 dakikalık reaksiyonun 340 nm'deki ölçümü ile sonlanan analiz için iki ölçüm alınmıştır.

2.2.15 *Theileria annulata*'nın Laktat Dehidrogenaz Enziminin İleri Modellenmesi ve Muhtemel İlaç Bağlanma Bölgelerinin Belirlenmesi

Bölüm 1. 1'de anlatılan yapıya dayandırılmış ilaç tasarımının basamaklarının ilk kısmı hedef biyomolekülün eldesi ile tamamlanmaktadır. İkinci kısım ise homoloji modelleme ile başlamakta ve tekrarlı bir döngüye girmektedir. Proteinin üç boyutlu yapısının belirlenmesinde kullanılan homoloji modelleme yapısal biyolojide önemli bir tekniktir [86]. Bilinen bir proteinin amino asit dizisi kullanılarak, yapısı bilinmeyen protein modellenmektedir. Bu metod, amino asit dizinin korunmasından daha çok proteinin doğal yapısal konformasyonunun gözlemine dayanmaktadır. Homoloji modelleme genel olarak 4 adımdan oluşmaktadır: katlanma belirleme, dizi eşleştirme, model geliştirme ve modelin düzeltilmesi, validasyon.

Katlanmanın belirlenme işlemi üç boyutlu yapısı bilinen bir proteinle ilişki kurularak yapısı bilinmeyen hedef proteinleri tanımlamaktadır [87]. Yapılarıyla birlikte protein dizileri veritabanlarından çekilmekte ve hedef proteine en benzer olan ile eşleştirme yapılarak kalıp ile hedef dizi arasındaki en benzer olan bulunarak kalıp olarak kullanılmaktadır. Sonraki adım olan homoloji modelleme işlemi model geliştirme fazı olarak adlandırılmaktadır. Hedef proteinin modeli, kalıp proteinin üç boyutlu yapısındaki amino asit dizisinin, eşleştirme ile tespit edilen insersiyonların ve/veya delesyonların bulunduğu kısımlardan oluşturulmaktadır [87].

*Ta*LDH aminoasit dizisi web tabanlı BLAST sunucusuna girilerek Protein Data Bank (PDB)' taki diğer proteinlerle eğleştirilmesi ile kalıp protein belirlenmiştir [88], [89]. Web tabanlı MUSCLE sunucusu kullanılarak kalıp proteinin aminoasit dizisi ile *Ta*LDH proteininin aminoasit dizisi eğleştirilerek identity (benzerlik) yzdesi belirlenmiştir [90]. Protein modellemesi MODELLER v9.12 programı kullanılarak yapılmıştır [91]. Bu yazılıma *Ta*LDH aminoasit dizisi ile kalıp proteinin üç boyutlu yapısı girilmiş ve dizi eğleştirmeleri program tarafından yapılarak 50 farklı model oluşturulmuştur. Oluřturulan 50 farklı modelden DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) skoru en dūřuk olan model seğilerek validasyon aşamalarına geğilmiştir.

Protein modelinin geometrisi, HyperChem versiyon 8.07 programında AMBER99 forcefiled (FF) kullanılarak 1000 adımda optimize edilmiştir [69]. Enerji optimizasyonu yapılan protein yapısının validasyonu yapılmıştır.

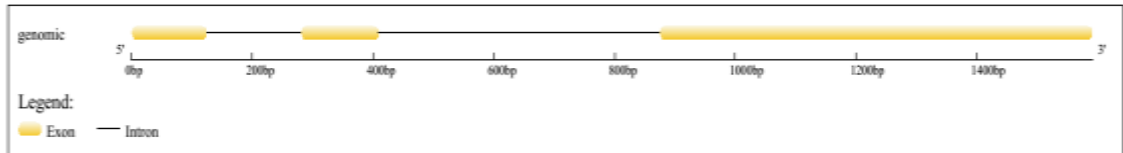
Validasyon aşamasında 3 farklı web tabanlı sunucu kullanılmıştır. İlk kullanılan sunucu olan ERRAT Versiyon 2.0 ile proteinin 3 boyutlu yapısında bulunan atomlar arasındaki hatalar istatistiksel olarak belirlenmiştir [92]. Validasyonun ikinci aşamasında ProSa programı ile proteinin, X-ray kristalografisinde ve NMR'da çözülmüş diğer proteinler ile eğleştirilmeleri yapılmış ve enerji skoru ile konformasyonu değerlendirilmiştir [93]. Validasyonun son aşamasında RAMPAGE programı kullanılmış ve Ramachandran diyagramı gōsterilmiřtir [94].

Proteinin ikincil yapısının analizi PSIPRED server kullanılarak yapılmıştır [95]. Aktif bölgelerinin belirlenmesi DoGSiteScorer [96] ve GHECOM 1.0: Grid-based HECOMi finder [97] sunucuları kullanılarak yapılmıştır.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 Yönlendirilmiş Mutageniz ile *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Gen Dizisinden İntronların Uzaklaştırılarak Açık Okuma Çerçevesinin Elde Edilmesi

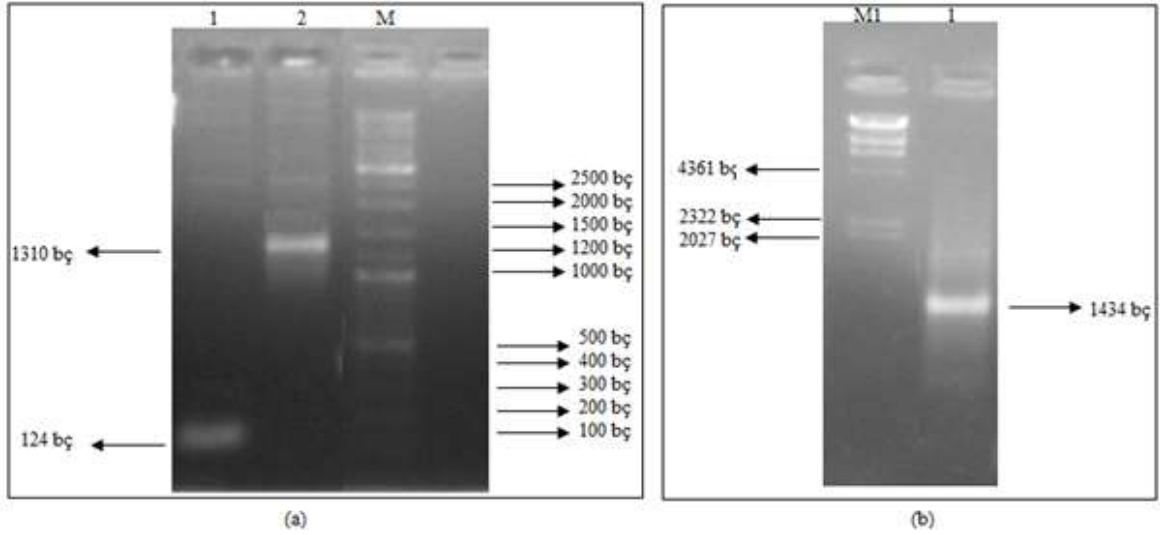
pGEMT[®]-Easy vektörüne klonlanmış ve dizi analizi gerçekleştirilmiş olan [71] *Ta*LDH gen dizisini içeren rekombinant DNA plazmidi mini prep ile izole edilerek kalıp olarak kullanılmıştır. *Ta*LDH geninde tespit edilen intronlar Gene Structure Display 2.0 programı kullanılarak Şekil 3.1'de gösterilmiştir [98]. Belirlenen intronların uzaklaştırılması için Bölüm 2.2.1'de verilmiş protokole göre Çizelge 2.2'deki bileşenler kullanılarak PCR temelli yönlendirilmiş mutageniz yöntemi uygulanmıştır.



Şekil 3. 1 Genomik *Ta*LDH'ın yapısal analizi

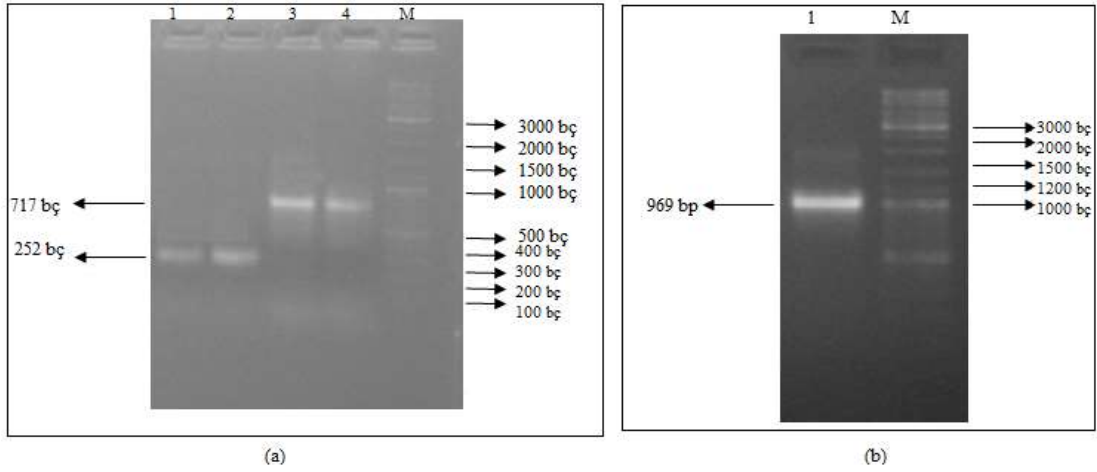
Birinci intronun uzaklaştırılması için Ta3, Ta4, Ta7 ve Ta8 primerleri ile birlikte hata okuma (proffreading) aktivitesi olan Long PCR Enzyme mix kullanılarak fragman 1 ve 2 oluşturulmuştur. Elde edilen fragman 1 ve 2 kristal viyole jelden Wizard[®] SV Gel ve PCR Clean-Up System kullanılarak geri kazanılmış ve etidyum-bromür jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 3.2a). İki aşamadan oluşan birleştirme reaksiyonu için Çizelge 2.3'te verilen bileşenlerin kullanılması sonucunda birinci intronu uzaklaştırılan 1482 bp'lik *Ta*LDH geni elde edilmiştir. Amplifiye edilen ürünler kristal

viyole jelden, Wizard® SV Gel ve PCR Clean-Up System kullanılarak geri kazanılmış etidyum bromür jel elektroforezinde yürütülmüş ve görüntüsü Şekil 3.2b'de verilmiştir.



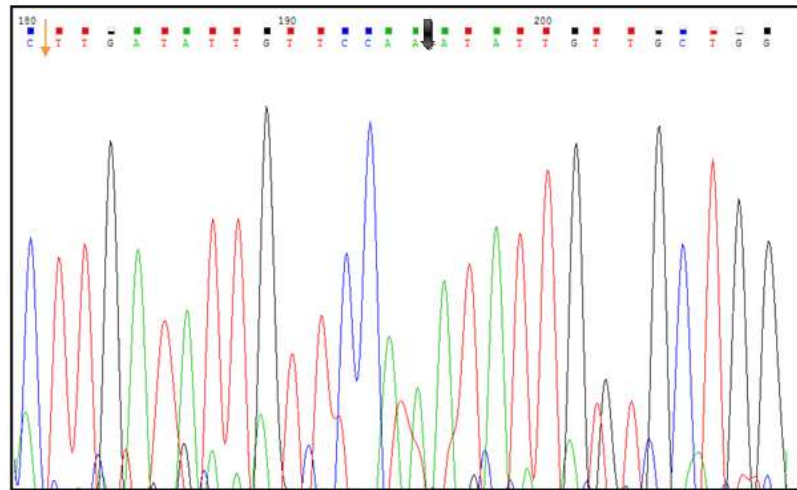
Şekil 3. 2 Birinci intronun çıkarılmasından elde edilen saf PCR ürünleri a: HatM: GeneRuler DNA Marker, Hat 1: 124 bç'lik gen parçası, Hat 2: 1310 bç'lik gen parçası b: Hat M1: Lambda DNA Hind III Markır Hat 1: 1434 bç'lik *Ta*LDH geni

Gen dizisinde bulunan ikinci intronun uzaklaştırılması için Bölüm 2.2.1'de verilen protokole göre Çizelge 2.4'te verilen diğer bileşenler ile birlikte Ta3, Ta4, Ta8 ve Ta9 primerleri kullanılarak fragman 1 ve 2 elde edilmiştir. Long PCR Enzyme mix ile gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda oluşan 252 baz çifti ve 717 baz çifti uzunluğunda fragmanlar etidyum bromür jel elektroforez sisteminde görüntülenmiştir (Şekil 3.3a). Wizard® SV Gel ve PCR Clean-Up System kullanılarak jelden kazanılan fragmanlar Bölüm 2.2.1'de verilen birleştirme reaksiyonunda kullanılarak intron içermeyen 969 baz çiftlik *Ta*LDH geni elde edilmiştir (Şekil 3.3b).

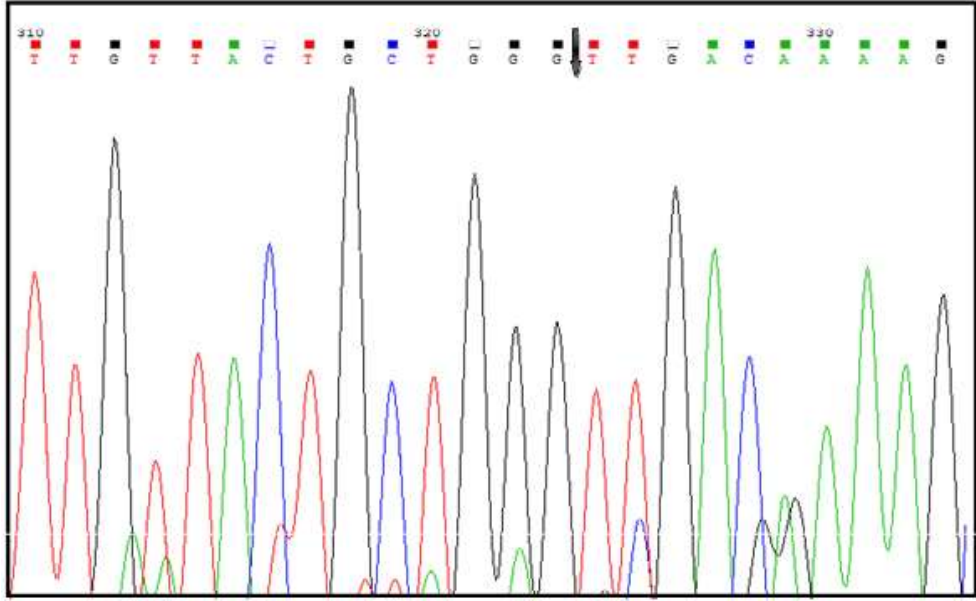


Şekil 3. 3 İkinci intronun çıkarılmasından sonra elde edilen saf PCR ürünleri a: Hat M: Gene Ruler Markır, Hat 1 ve 2: 252 bç'lik gen parçası , Hat 3 ve 4: 717 bç'lik gen parçası; b: Hat M: Gene Ruler Markır, Hat 1: intronsuz *Ta*LDH geni

İntronların bulunduğu bölgeler genin 5' ucuna yakın olarak bulunduğu için yalnızca 5' primeri ile tek yönlü Sanger dizileme yaptırılarak belirli bölgeler aracılığıyla Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'te verilen kromatogram görüntüsünde okla gösterilen kısımlardan intronun uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. Elde edilen tüm fragmanlar -20 °C'de muhafaza edilmektedir.



Şekil 3. 4 Birinci intronun uzaklaştırıldığını gösteren kromatogram görüntüsü

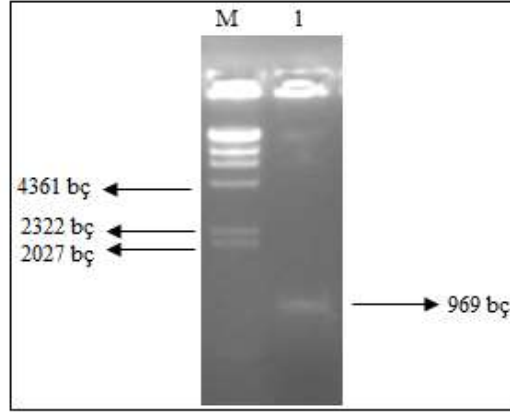


Şekil 3. 5 İkinci intronun uzaklaştırıldığı gösteren kromatogram görüntüsü

3.2 İtronları Uzaklaştırılan *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin İfade Vektörüne Aktarılarak Alt Klonlanması

3.2.1 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin İfade Vektörüne Aktarılması İçin Sisteme Özgü Primerler ile Amplifiye Edilmesi

LIC protokolüne göre klonlama yapılabilmesi için genin 5' ve 3' uçlarının yapışkan uç olmasını sağlayan TaLDHLIC 5' ve 3' primerleri kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonunda Bölüm 2.2.2.1'de verilen protokole göre Çizelge 2.6'da verilen bileşenler ile *Taq* DNA polimeraz enzimi kullanılmıştır. Amplifikasyon sonucu elde edilen 969 baz çifti uzuluğundaki *TaLDH* geninin etidyum bromür jel elektroforez sistemi ile elde edilen görüntüsü Şekil 3.6'da verilmektedir.



Şekil 3. 6 Amplifikasyon sonucunda elde edilen *TaLDH* geni Hat M1:HindIII DNA Lambda Markır Hat 1: *TaLDH* geni

3.2.2 LIC Reaksiyonu ve Rekombinant Plazmid DNA'ların *E. coli* BL21 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu

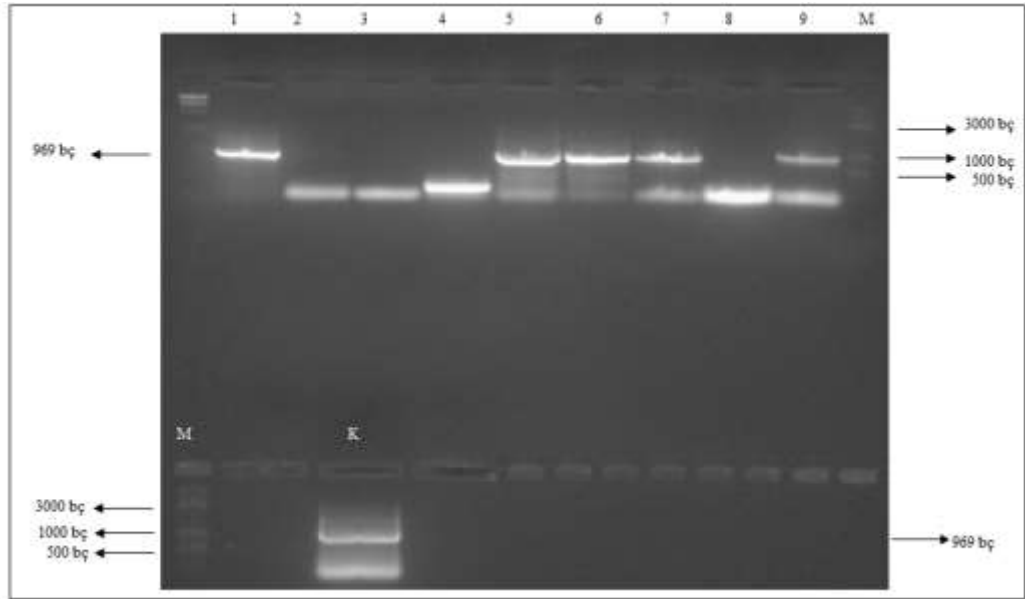
Bölüm 2.2.2.3'te verilen protokole göre ve Çizelge 2.7'de verilen bileşenler ile hedef genin pLATE31 ifade vektörüne klonlanması gerçekleştirilmiştir.

pLATE ekspresyon vektörleri, T7 bakteriyofaj elemanlarını *E. coli*'deki genlerin ifade edilmesini kontrol etmek için kullanılmaktadır. İlgili genin ifade edilmesi T7 RNA polimeraza spesifik olan T7 bakteriyofaj promotör bölgesi ile sağlanmaktadır. T7 RNA polimeraz geninin ifade edilmesi lacUV5 gibi indüklenebilen promotörün kontrolü altında olduğundan BL21 (DE3), HMS 174 (DE3) gibi *E. coli* suşlarının kullanılması gerekmektedir. IPTG indüklenmesinin ardından T7 RNA polimeraz ile T7 promotörünün kontrol ettiği genlerin ifade edilmesi başlamaktadır [70].

Transformasyon için sistemin gerektirdiği *E. coli* BL21 (DE3) suşu kullanılarak CaCl₂ metodu ile Bölüm 2.2.2.3'te verilen protokol ile kompetan hücre hazırlanmış ve LIC reaksiyonu ile pLATE31 vektörüne aktarılan *TaLDH* geninin kompetan hücrelere transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyon sonucunda amfisilin içeren LB agar petriplerde, seçici direnç geni olan amfisilin gen bölgesini içeren rekombinant DNA'yı bulduran *E. coli* hücrelerinin çoğalması beklenmektedir. Beyaz kolonilerin gözlenmesi ile pozitif seçim yapılmaktadır. Elde edilen kolonilerden 10 tanesi seçilerek amfisilin içeren 5 ml'lik LB sıvı besiyerlerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Kültürler 16 saat boyunca 37 °C 'de geliştirilmiştir.

3.2.3 Klonlanan *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin Koloni PCR Metodu ile Kontrolü

Geliştirilen kültürlerin kontrolü için Bölüm 2.2.2.4'te verilen protokoldeki koşullara uygun olarak Çizelge 2.8'de verilen bileşenler kullanılarak koloni PCR gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak ise, LIC reaksiyonunda kullanılan kalıp DNA ile PCR yapılmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinin tamamı %1'lik etidyum bromür jel elektroforezinde yürütülmüştür. Elektroforez sonrasında Şekil 3.7'de verildiği gibi 1, 5, 6, 7 ve 9. koloniler pozitif, 2, 3, 4, 8 ve 10. koloniler ise negatif olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. 7 Koloni PCR sonrasında elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü HatM: GeneRuler DNA Markır; Hat 1,5,6,7 ve 9: Pozitif PCR sonucu, Hat 2, 3, 4, 6 ve 10: Negatif PCR sonucu Hat K: *TaLDH* geni

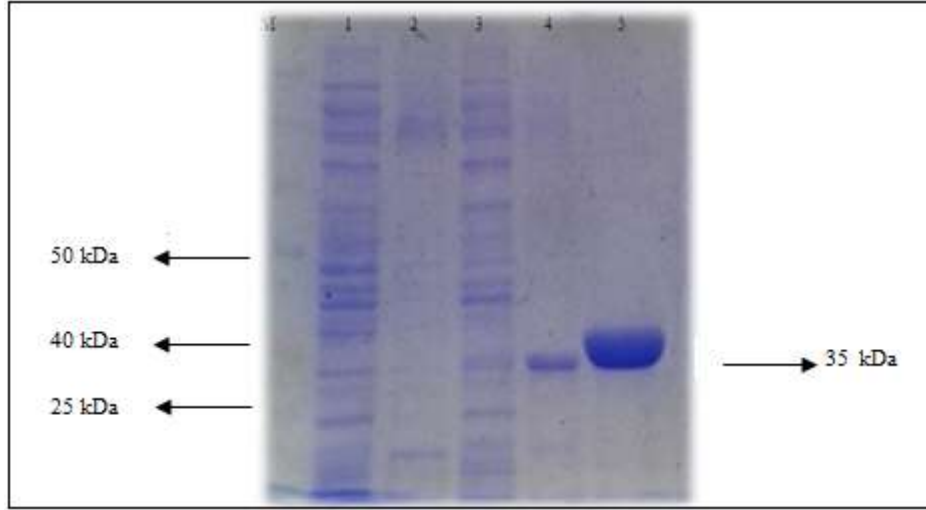
Pozitif kolonilerden bir tanesi seçilerek 5' primeri ile dizilemeye gönderilmiştir.

Ancak dizileme işleminin zaman alması nedeniyle aradaki sürenin değerlendirilmesi için klonlanan gen ifade edilmiştir.

3.3 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enziminin İfade Edilmesi

Bölüm 2.2.3'te verilen protokol uygulanarak, pozitif kolonilerden 1 numaralı hücre kültüründen genin ifadesi yapılmıştır. IPTG indüklenmesinden 5 saat sonra *TaLDH* genini içeren ve içermeyen hücrelerin olduğu kültürlerden elde edilen süpernatantlar ve pelletler sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jelde yürütülmüştür. Boya çözeltisinde

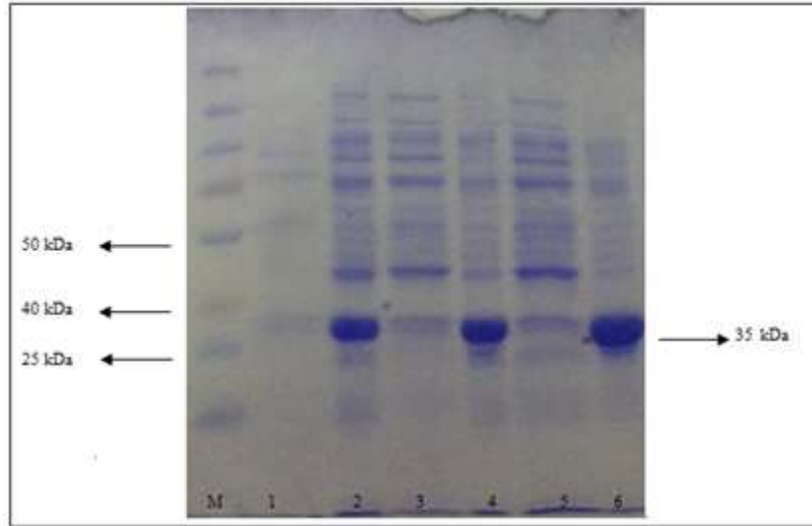
bekletilen jel daha sonra boyanın uzaklaştırılması için boya uzaklaştırıcı ile muamele edilmiş ve SDS-PAGE görüntüsü Şekil 3.8'de verilmiştir. 1 ve 2 numaralı hatlardaki süpernatant ve pellet gen içermeyen hücrelere; 3 ve 4 numaralı hatlardaki süpernatant ve pellet ise *Ta*LDH genini içeren hücrelere aittir. Proteinin süpernatantta olması beklenirken pellette olduğu görülmektedir. Bu durum proteinin çözülebilir formda elde edilmediğini göstermektedir.



Şekil 3. 8 Hücrelerin 5 saat inkübe edilmesinin ardından elde edilen ekspresyon sonucu
Hat M: Protein Ladder Markır; Hat 1 ve 2: BL21 (DE3) süpernatant; ve pellet; Hat 3 ve 4: *Ta*LDH süpernatant ve pellet; Hat 5: saflaştırılmış *Bf* D-LDH

Yüksek konsantrasyonlarda protein sentezlerinde, disülfid bağları ve hatalı katlanmalar nedeniyle protein degradasyonu, inklüzyon cisimcikleri meydana gelebilmekte ve protein pellet fraksiyonunda görülebilmektedir. Böyle durumlarda indüklenme sıcaklığı 30 °C, 25 °C ve 20 °C arasında değiştirilerek, IPTG konsantrasyonu 0,1–0,5 mM arasında ayarlanarak ya da indüklenme süresi 5 ile 10 saat arasında belirlenerek sonuca ulaşılabilmektedir [70].

İntronları uzaklaştırılan genden inaktif protein eldesi beklenmeyen bir sonuçtur. Bu nedenle pelletteki proteinin geri kazanılması amacı ile farklı konsantrasyonlarda IPTG indüklemesi ile protein ifadesi yapılmıştır. IPTG konsantrasyonları 0,1, 0,25 ve 1 mM olarak belirlenerek, yeniden indüklenme yapılmış ve ekspresyon sonuçları Şekil 3.9'da verilmektedir. IPTG konsantrasyonu değiştirildiğinde de protein çözümlü formda elde edilememiştir.



Şekil 3. 9 Farklı IPTG konsantrasyonlarda IPTG indüklemesi sonrası ifade edilen *Ta*LDH Hat M: Protein Ladder Markır, Hat 1,2: 0,1 mM IPTG indüklenen hücre süpernatantı ve pelleti Hat 3,4: 0,25 mM IPTG idüklenen hücre süpernatantı ve pelleti Hat 5,6: 1 mM IPTG indüklenen hücre süpernatantı ve pelleti

3.4 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesinin Kontrolü

Bölüm 2.2.5'te verilen enzim aktivite tayini protokolüne göre gen içeren ve içermeyen hücrelerin süpernatantlarından 10 µl kullanılarak klasik aktivite analizi uygulanmış ve 340nm dalga boyunda 3 tekrar ile elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması Çizelge 3.1'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre gen içeren hücrelerin süpernatant fraksiyonunda çözünür formda protein bulunmadığı gösterilmiştir.

Çizelge 3. 1 *Ta*LDH ve BL21 (DE3) aktivite değerleri ($\Delta A_{340}/\text{min}$)

Örnek	$\Delta A_{340}/\text{min}_{\text{Ort}}$
<i>Ta</i> LDH	0,039
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	0,019

3.5 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enziminin Western Blot ile Analizi

Western Blot analizi; arandığı proteinin varlığını ya da yokluğunu var ise büyüklüğünü belirlemek için yapılmaktadır. Elde edilen proteinin Bölüm 2.2.6'da verilen protokol uygulanarak pellet fraksiyonunda olduğu gösterilmiştir. Şekil 3.10'da web tabanlı bir sunucu ile [99] dizileri karşılaştırılan *Bf*LDH (% 10.97 benzerlik) ve *Pv*LDH (% 49.37 benzerlik) ile kıyaslama yapılarak *Pf*LDH (% 50.32 benzerlik) birincil antikörlerin kullanılmasıyla gerçekleştirilen western blot analizinin sonucu verilmektedir.



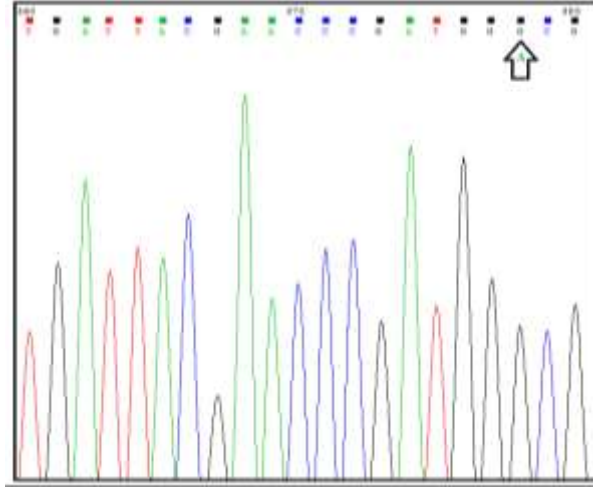
Şekil 3. 10 *Ta*LDH ifade edilmesi sonrası Western blot analizi. Hat1, 2:*Ta*LDH süpernatant ve pellet; Hat3:*Bf*D-LDH; Hat4:*Pv*LDH

Hat 1'de verilen süpernatant fraksiyonunda *Ta*LDH enziminin çözülebilir formda bulunmadığı, ifade edilen proteinin pellet fraksiyonunda olduğu gösterilmiştir. %11.50 oranında benzerlik gösteren *Pf*LDH antikorunun *Bf*LDH enzime muamele edilmesi durumunda beklenen şekilde blot oluşmadığı görülmektedir.

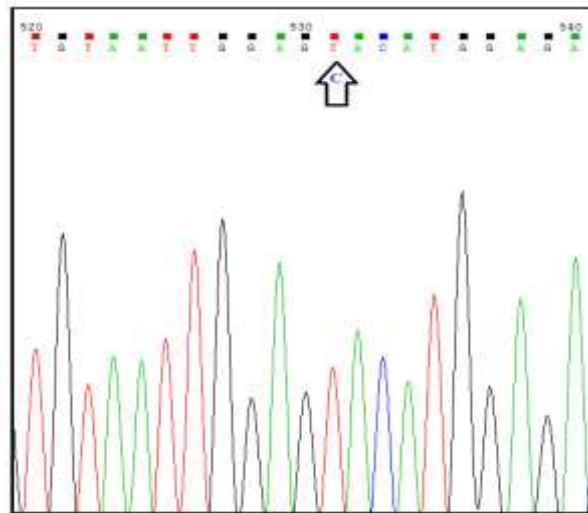
3.6 Klonlanan *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin DNA Dizi Analizi ile Kontrolü ve Gendeki Mutasyonların Belirlenmesi

İnaktif protein üretildiği SDS-PAGE ile gösterilmiş, Western blot analizi uygulanarak doğrulanmıştır. UV visible Spektrofotometre ile yapılan aktivite tayininin ardından tekrar deneyleri yapılmadan önce dizileme sonuçları ile referans dizinin, web tabanlı Clustalw2 programı kullanılarak karşılaştırılması yapılmıştır [99]. Eşleştirmenin sonucu Şekil 3.11'de verilmektedir.

Yapılan eşleştirme sonucunda görülen farklılıklar kromatogram ile de doğrulanarak iki mutasyonun varlığı tespit edilmiştir. Meydana gelen nokta mutasyonlarının pozisyonları Şekil 3.12 ve 3.13'te kromatogram görüntüleri ile verilmektedir.



Şekil 3. 12 Alt klonması yapılan *Ta*LDH geninde belirlenen ilk nokta mutasyonu



Şekil 3. 13 Alt klonması yapılan *Ta*LDH geninde belirlenen ikinci nokta mutasyonu

Tek nükleotit değişimlerinin aminoasit düzeyinde farklılık yaratıp yaratmadığının belirlenmesi için web tabanlı Sequence Translation [100] kullanılarak gen dizisinin amino asit dizisi belirlenmiş ve apikompleksan şubesine ait diğer türlerin (*P. falciparum*: *Plasmodium falciparum* DQ198261; *T. parva*: *Theileria parva* XM761610; *T. gondii*: *Toxoplasma gondii* U35118.1; *E. tenella*: *Eimeria tenella* AY 143389) ve konağın (*B. taurus*: *Bos taurus* (LDH A: BC146210 LDHB: BC151427) LDH'ları ile karşılaştırılması sonucunda iki nükleotitin amino asit değişimine neden olduğu ve tüm

LDH'larda korunmuş olan NPMD motifindeki 143. pozisyonadaki aspartik asit (D) amino asidinin yerini glisin (G) amino asidinin; 194. Pozisyonadaki histidin (H) amino asidinin yerini valin (V) amino asidinin aldığı belirlenmiştir. Bu çakışma Şekil 3.14 ve 3.15 'te gösterilmektedir.

	131	140	143	150
<i>T. gondiil</i>				
<i>E. tenella</i>				
<i>P. vivax</i>				
<i>P. knowlei</i>				
<i>P. falciparum</i>				
<i>T. annulata</i>				
<i>T. parva</i>				
<i>B. taurusA</i>				
<i>B. taurusB</i>				

Şekil 3. 14 143. pozisyonadaki amino asit farklılığının belirlenmesi. Mutasyon meydana gelen amino asit altı çizili olarak gösterilmektedir.

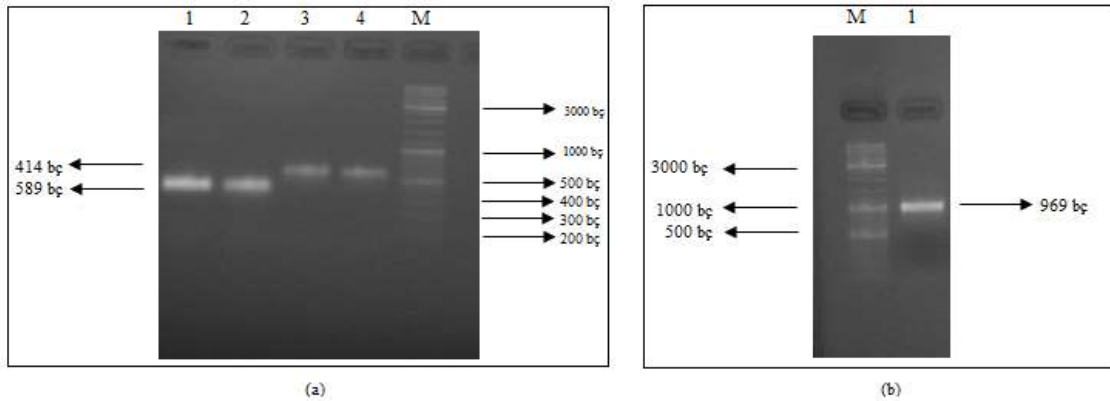
	185	190	194	200	205
<i>T. gondiil</i>					
<i>E. tenella</i>					
<i>P. vivax</i>					
<i>P. knowlei</i>					
<i>P. falciparum</i>					
<i>T. annulata</i>					
<i>T. parva</i>					
<i>B. taurusA</i>					
<i>B. taurusB</i>					

Şekil 3. 15 194. pozisyonadaki amino asit farklılığının belirlenmesi. Mutasyon meydana gelen amino asit altı çizili olarak gösterilmektedir.

3.7 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Gende Belirlenen Mutasyonların Yönlendirilmiş Mutagenез ile Düzeltilmesi ve İfadelerinin Yapılması

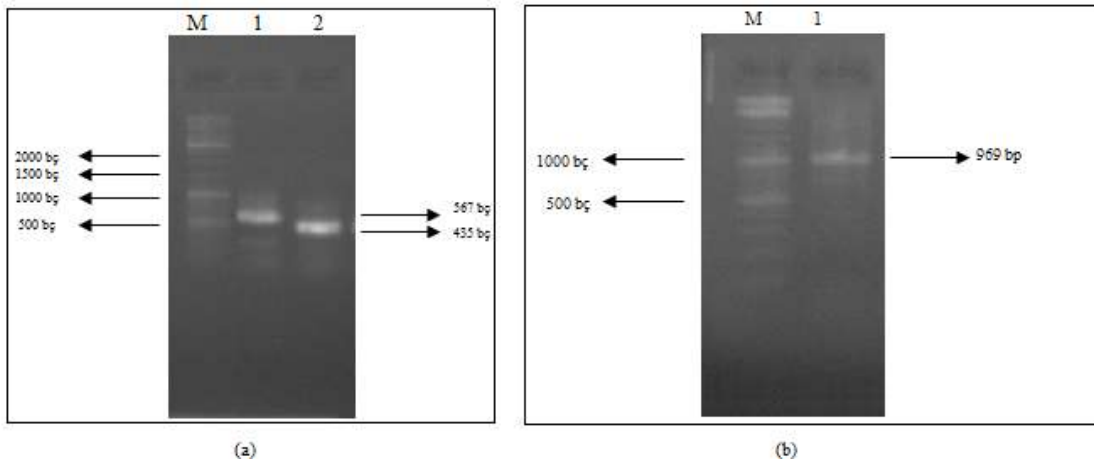
Tespit edilen mutasyonlar Bölüm 2.2.8'de verilen PCR temelli yönlendirilmiş mutagenез protokolü uygulanarak düzeltilmiştir. Birinci mutasyonun düzeltilmesi için ilk aşamada TaLDH ΔG F ve TaLDH ΔG R primerleri ile genin 5' ve 3' primerleri ve diğer bileşenler ile *Taq* DNA Polimeraz kullanılarak elde edilen 414 ve 589 bç'lik fragman 1 ve fragman 2 Şekil 3.16a'da yer alan jel görüntüsünde verilmektedir. Genin 5' ucu ve 3'

ucu primerleri kullanılarak iki adımda fragman 1 ve 2'nin birleştirme sonucu Şekil 3.16b'deki etidyum bromür jel görüntüsü ile verilmiştir.



Şekil 3. 16 Birinci mutageniz sonrası elektroforez jel görüntüsü. a: Hat 1 ve 2: 414 bp fragman 1, Hat 3 ve 4: 589 bp fragman 2, Hat M: Gene Ruler DNA Markır. b: Hat M: Gene Ruler DNA Markır, Hat 1 969 bp *Ta*LDH

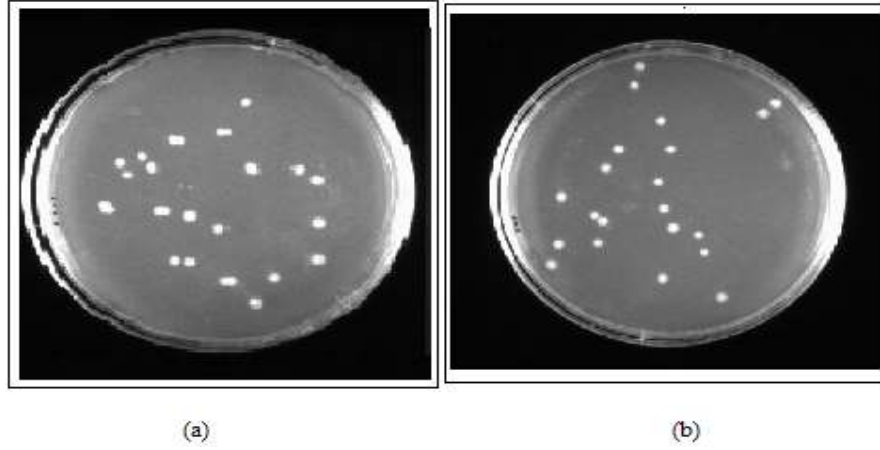
İkinci mutasyonun düzeltilmesi için *Ta*LDH Δ T F ve *Ta*LDH Δ T R primerleri ile birlikte genin 5' ucu ve 3' ucu primerleri ve diğer bileşenler ile *Taq* DNA Polimeraz enzimi kullanılarak oluşturulan 567 ve 435 bp'lik fragman 1 ve fragman 2 Şekil 3.17a'da verilen etidyum bromür jelinde gösterilmektedir. İki aşamalı polimeraz zincir reaksiyonu ile genin 5' ucu ve 3' ucu primerleri ve *Taq* DNA polimeraz enzimi kullanılarak fragman 1 ve 2 birleştirme sonucu Şekil 3.17b'de yer alan jel görüntüsünde verilmektedir.



Şekil 3. 17 İkinci mutageniz sonrası elektroforez jel görüntüsü. a: 567 ve 435 bp'lik fragmanların oluşturulması; b: fragman 1 ve 2'nin birleştirilmesi sonrası saf PCR ürünü

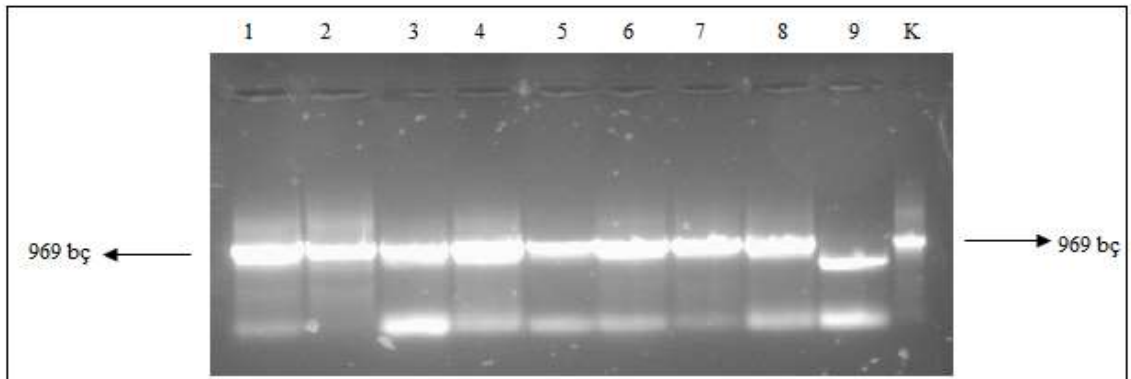
Bir mutasyonu ve iki mutasyonu düzeltilmiş *Ta*LDH geninin amplifikasyonu sonucu elde edilen saf PCR ürünleri ayrı ayrı LIC reaksiyonu gerçekleştirilerek pLATE31 vektörüne aktarılmıştır. Rekombinant DNA'nın $CaCl_2$ ile oluşturulan *E. coli* BL21 (DE3) kompetan

hücrelerine transformasyonu yapılmış ve amfisilin içeren LB-agar petrilere ekimi gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.18'te bir ve iki mutasyonu düzeltilmiş genin aktarıldığı transformasyon sonuçları verilmektedir.



Şekil 3. 18 Transformasyon sonuçları a: Birinci ve b: ikinci mutagenez sonrası transformasyon petrisi

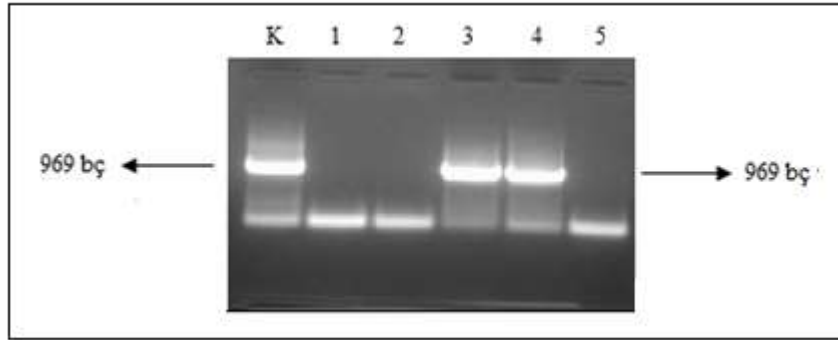
Bir mutasyonu düzeltilmiş genin transformasyonu sonrası elde edilen kolonilerden 9 tanesi seçilerek, amfisilin içeren LB sıvı besiyerinde gece boyu geliştirilmiş, koloni PCR ile kontrolü yapılmış ve Şekil 3.19'da verilen etidyum bromür jelinde sekiz tanesinin pozitif olduğu kontrol olarak kullanılan *TaLDH* geninin büyüklüğü ile karşılaştırılarak gösterilmiştir.



Şekil 3. 19 Birinci mutagenez sonrası seçilen kolonilerin PCR ile kontrolünün jel elektroforez görüntüsü

İki mutasyonu düzeltilmiş genin transformasyonu sonrası elde kolonilerden 5 tanesi seçildikten sonra amfisilin içeren LB sıvı besiyerinde gece boyu geliştirilmiş, koloni PCR ile kontrolü yapılmış ve Şekil 3.20'de yer alan etidyum bromür jelinde 5 koloniden üç

tanenin pozitif olduğu kontrol olarak kullanılan *Ta*LDH geninin büyüklüğü ile karşılaştırılarak gösterilmiştir.



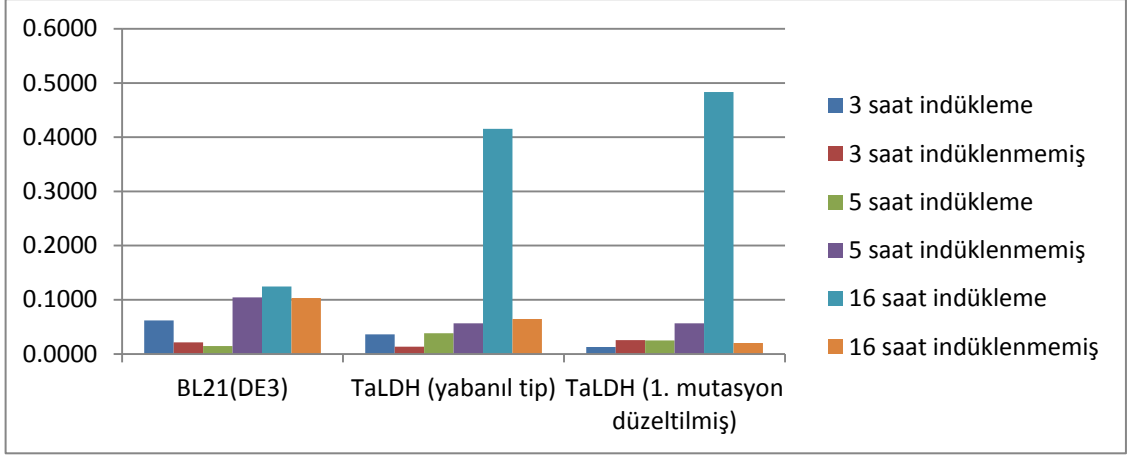
Şekil 3. 20 ikinci mutagenез sonrası seçilen kolonilerin PCR ile kontrolünün jel elektroforez görüntüsü

Bir mutasyonu düzeltilmiş genin transformasyonu sonucu elde edilen 2 numaralı koloni, iki mutasyonun düzeltildiği genin transformasyonu sonucu elde edilen 3 numaralı koloni ifade edilmek üzere LB sıvısı besiyerine alınmıştır. İndükleme sonrası 3 saat, 5 saat ve 16 saat inkübasyonu sonucunda alınan örneklerin süpernatantlarından 10 µl kullanılarak 340 nm dalga boyunda bakılan aktivite analizinin 3 kez tekrar edilmesi ile elde edilen absorbans değerlerinin ortalamaları Çizelge 3. 2 'de verilmektedir.

Çizelge 3. 2 Hücrelerin indüklemeden sonra 3 saat, 5 saat ve 16 saat inkübasyonu sonucunda ölçülen aktivite sonuçları

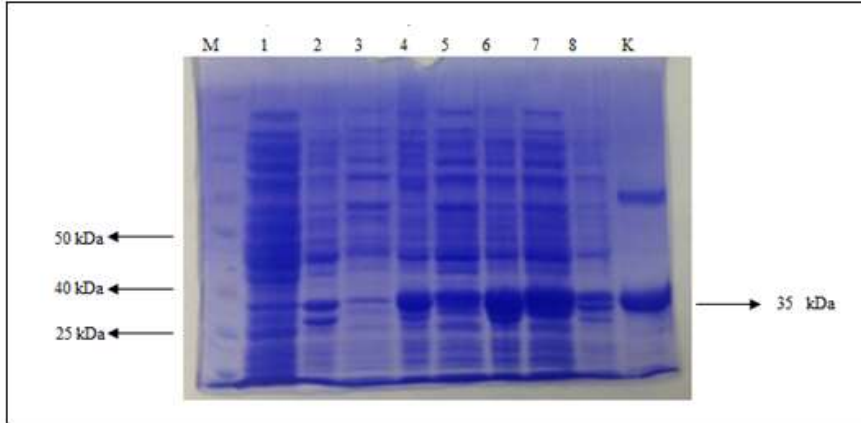
	3 saat		5 saat		16 saat	
	İndüklenmiş ($\Delta A_{340}/\text{min}_{\text{ort}}$)	İndüklenmemiş ($\Delta A_{340}/\text{min}_{\text{ort}}$)	İndüklenmiş ($\Delta A_{340}/\text{min}_{\text{ort}}$)	İndüklenmemiş ($\Delta A_{340}/\text{min}_{\text{ort}}$)	İndüklenmiş ($\Delta A_{340}/\text{min}_{\text{ort}}$)	İndüklenmemiş ($\Delta A_{340}/\text{min}_{\text{ort}}$)
BL21(DE3)	0,0620	0,0215	0,0145	0,1043	0,1245	0,1033
<i>Ta</i> LDH (yabanıl tip)	0,0363	0,0133	0,0383	0,0565	0,4153	0,0647
<i>Ta</i> LDH (1. mutasyon düzeltilmiş)	0,0128	0,0257	0,0250	0,0565	0,4833	0,0203

Mutasyonların düzeltilmesi ile aktarılan genlerin ve boş hücrenin indükleme sonrasında elde edilen absorbans değerleri karşılaştırıldığında en iyi protein üretiminin indükleme sonrası 16 saat inkübasyonu sonucunda olduğunu göstermiştir. Yapılan mutagenезler ile elde edilen yabanıl genden beklendiği gibi pozitif sonuç elde edilmiştir. 143. pozisyondaki amino asitteki değişim ile bu rezidünün enzimin aktivitesinde önemli olduğu Çizelge 3.2'deki değerler ile oluşturulan Şekil 3.21'deki grafik ile de gösterilmektedir.



Şekil 3. 21 Hücrelerin indüklemeden sonra 3 saat, 5 saat ve 16 saat inkübasyonu sonucunda ölçülen aktivite değerlerinin grafiği

16 saat indüklemeye yüksek aktivite elde edildiği için indüklenen kültürün süpernatant ve pellet fraksiyonları mutasyonlu genin indükledikten 16 saat sonra alınan örneğin süpernatant ve pellet fraksiyonunun yürütüldüğü SDS-PAGE jeli Şekil 3.22'de verilmektedir.

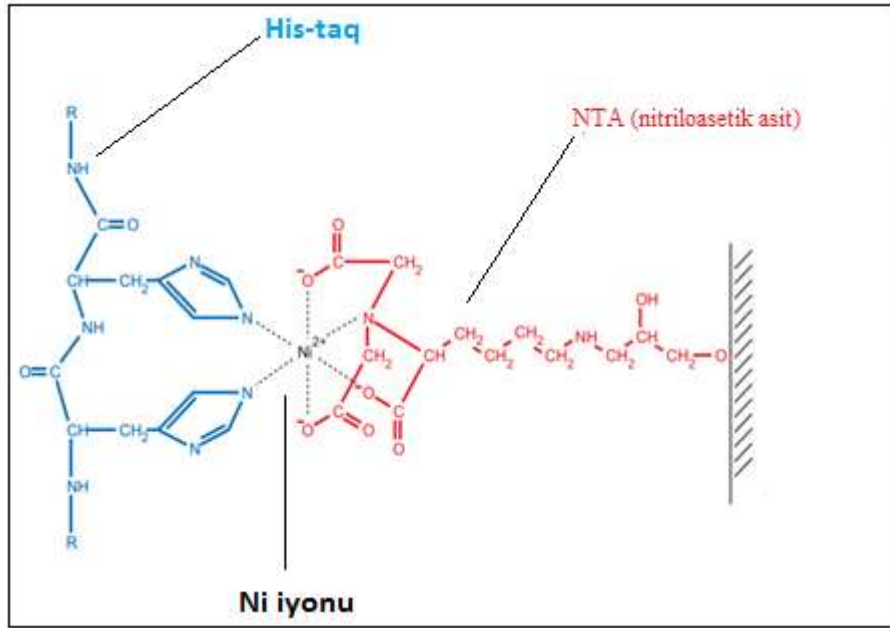


Şekil 3. 22 Mutagenезler sonrası elde edilen genden üretilen proteini inaktif proteinle karşılaştırmalı olarak gösteren SDS-PAGE görüntüsü. Hat M: Protein Ladder Markır, Hat 1 ve 2: Gen içermeyen hücre süpernatant ve pellet, Hat 3, 4: Mutasyon bulunan gen içeren hücre süpernatant ve pellet Hat 5, 6: Birinci mutasyonu düzeltilmiş geni içeren hücre süpernatant ve pelleti, Hat 7, 8: iki mutasyonu düzeltilmiş geni içeren hücre süpernatant ve pelleti, Hat 9: saflaştırılmış PvLDH

3.8 *Theileria annulata*'nın Laktat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması

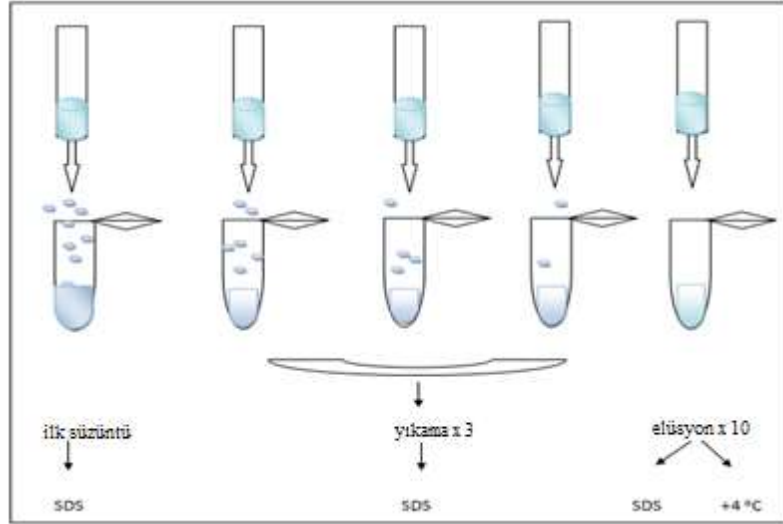
Theileria annulata'nın LDH geninin ifade edilmesi ile çözülebilir formda elde edilen rekombinant proteinin 3' ucuna eklenen C-terminal 6 his-tag bölgesi saflaştırmanın affinite kromatografisi ile yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Kolon dolgu maddesi

olarak polihistidin bölgesi ile etkileşimi bilinen nikel nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) agaroz kullanılmıştır. Şekil 3.23'te gösterildiği gibi NTA, nikel iyonunun içerdiği 6 ligand bağlanma bölgesinden dördüne bağlanmaktadır ve geri kalan 2 bağlanma bölgesi de 6-His tag ile etkileşime girmektedir. NTA, mevcut diğer şelat reçinelere göre metal iyonlarını çok daha stabil bir şekilde bağlamakta ve özellikle güçlü yıkama koşulları altında iyonları korumaktadır [77].



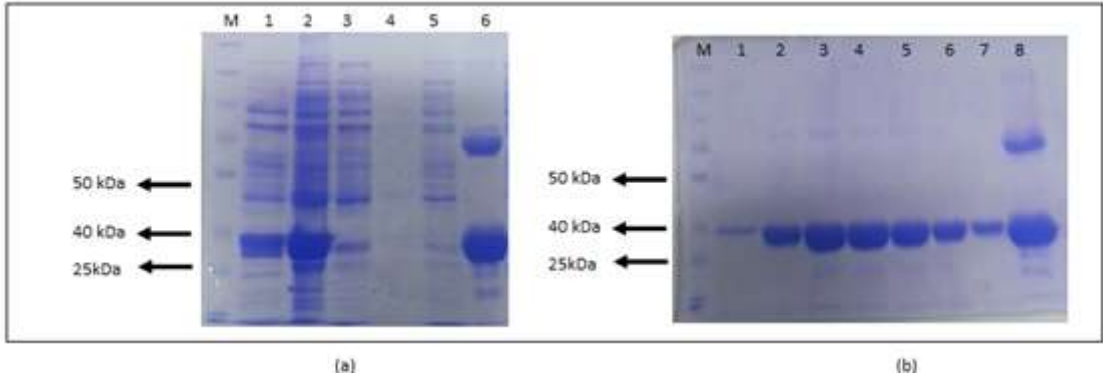
Şekil 3. 23 Poli-His tag'daki komşu rezidüer ile Ni-NTA matriksinin etkilişemi

Hücrelerin sonikasyonu 10 mM imidazol içeren lizis tampon ile yapıldığı için 6-Histag olmayan ve kontamine proteinlerin bağlanması mümkün olduğunca azaltılarak proteinin kolon ile etkileşimi arttırılmaktadır. 20 mM imidazol bulunan yıkama tamponu ile kolon yıkanmakta ve bağlanmayan proteinler uzaklaştırılmaktadır. Son olarak kolona 250 mM imidazol içeren elüsyon tamponu ile muamele edilerek Ni-NTA'nın imidazol etkileşimini arttırılması sonucu kolondan proteinler uzaklaştırılmakta ve saf olarak elde edilmektedir [77]. Şekil 3.24 ile saflaştırma süreci şematize edilmektedir.



Şekil 3. 24 Saflaştırma protokolünün uygulanması

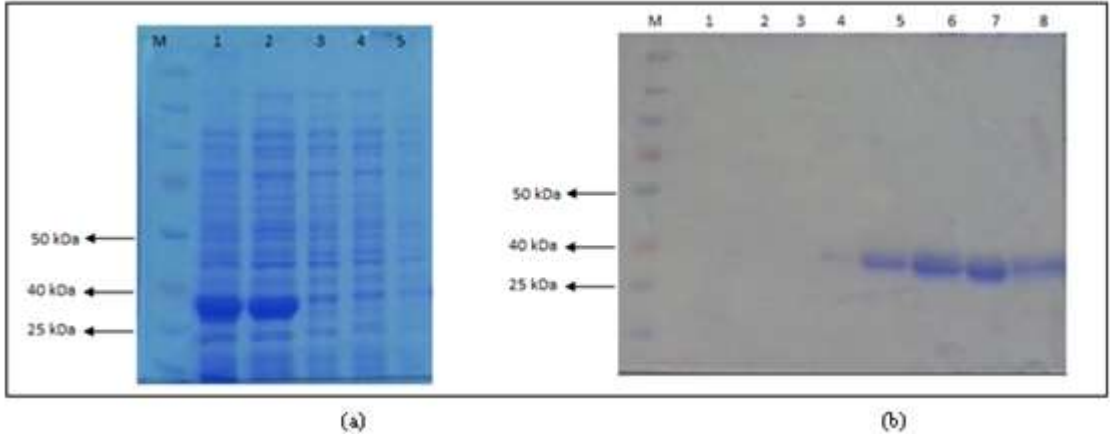
Protein kolona yükledikten sonra toplanan ilk süzüntü; yıkama tamponu ile muamele edildikten sonra toplanan yıkama fraksiyonları ve elüsyon tamponu ile kolondan alınan elüsyon fraksiyonlarının SDS-PAGE analizi Şekil 3.25'te verilmektedir.



Şekil 3. 25 Saflaştırma sonrası örneklerin SDS-PAGE analizi a: elüsyonlar dışındaki fraksiyonlar. Hat M: Protein Ladder Markır, Hat 1 ve 2: Hücre lizati ve pelleti, Hat 3: ilk süzüntü, Hat 4: ve 5: Yıkama 1 ve 2 Hat 6: saf Pv LDH b: elüsyonların bulunduğu jel görüntüsü Hat M: Protein Ladder Markır Hat 1,2,3,4,5,6,7: Elüsyon Fraksiyonları Hat 8: saf PvLDH

Saflaştırılan enzim dışında görülen bantların yok edilmesi amacı ile %5'lik gliserol içeren liziz, yıkama ve elüsyon tamponları kullanılmış ve enzimin saflık oranı yükseltilmiştir. Elde edilen protein bantlarının SDS-PAGE jel görüntüleri Şekil 3.26'da verilmektedir. Şekil 3.26a'da verilen görüntüde elde edilen elüsyon fraksiyon bantları olmas beklenen büyüklüktedir. Şekil 3.26b'de ise saflaştırılmak üzere kolona yüklenen hücre lizati ve

pellet olmak üzere elde edilen diğer saflaştırma fraksiyonları verilmiştir. Jel görüntüsünde hücre lizatına göre protein kaybı olmadığı görülmektedir.



Şekil 3. 26 Gliserol içeren tamponlar ile gerçekleştirilen saflaştırma sonrası jel görüntüsü a: elüsyonlar dışındaki fraksiyonlar Hat M: Protein Ladder Markır, Hat 1 ve 2: Hücre lizatı ve pelleti, Hat 3: ilk süzöntü, Hat 4: ve 5: Yıkama 1 ve 2 b: elüsyonların bulunduğu jel Hat M: Protein Ladder Markır Hat 1,2,3,4,5,6,7,8 : Sırasıyla 1., 2. , 3. , 4. , 5. , 6. , 7. 8. Elüsyon Fraksiyonları

3.9 Enziminin Molekül Ağırlığı ve Molar Absorblama Katsayısının Değerlerinin Hesaplanması

Web tabanlı “Peptide Property Calculator” [78] kullanılarak aminosit dizisinin istenen molekül ağırlığı ve molar absorblama değeri elde edilmiştir. Molekül ağırlığı (M_w) 35220 Da, molar absorblama değeri (ϵ) ise 27010 olarak hesaplanmıştır.

3.10 Saflaştırılmış Enzimin Optimum pH ve Spesifik Aktivite Değerlerinin Belirlenmesi

Optimum pH deneyi ile *Ta*LDH enziminin en iyi aktivite gösterdiği tampon pH değeri belirlenmektedir. Standart reaksiyonlar 6 farklı pH değerinde hazırlanan Tris-KCl tampon içerisinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar sonucu absorbands değerleri UV visible spektrofotometre kullanılarak 340 nm dalga boyunda elde edilmiştir. İki ölçüm yapılarak elde edilen sonuçların ortalama değerlerine göre optimum pH değeri belirlenmiştir. Elde edilen absorbands değerleri Çizelge 3.3'te verilmektedir.

Çizelge 3. 3 Optimum pH değerinin belirlenmesi için yapılan çoklu tekrarlar sonucunda elde edilen aktivite değeri ($\Delta A_{340}/dk$)

pH	$\Delta A_{340}/dk_1$	$\Delta A_{340}/dk_2$	$\Delta A_{340}/dk_{ort}$
6,0	0,202	0,156	0,179
6,5	0,252	0,217	0,2345
7,0	0,254	0,218	0,236
7,5	0,352	0,322	0,337
8,0	0,288	0,214	0,251
8,5	0,257	0,233	0,245

1 ml reaksiyonda kullanılan enzim miktarı hesaplaması için kullanılan elüsyonunun 20 μ l'si 980 μ l dH₂O içinde çözülerek A₂₈₀ nm dalga boyunda ölçülen absorbands değeri (3.1) denklemindeki formülde yerine koyularak enzim konsantrasyonu hesaplanmış; sonuç (3.2) ve (3.3) denklemlerinde yerine yazılarak reaksiyonda kullanılan enzim miktarı elde edilmiştir.

1/8 oranında seyreltilen enzimden 10 μ l çekilerek reaksiyonda kullanılmıştır.

$$(A_{280}/\epsilon) \times \text{seyreltme faktörü} = M \text{ (mol/l)} \quad (3.1)$$

$$M \times 1 \cdot 10^{-2} = M_s \text{ (Son molarite)} \times 1 \text{ (ml)} \quad (3.2)$$

$$M_s \times MW = C \text{ (\mu g/ml)} \quad (3.3)$$

A₂₈₀'de elde edilen absorbands 0,041'dir.

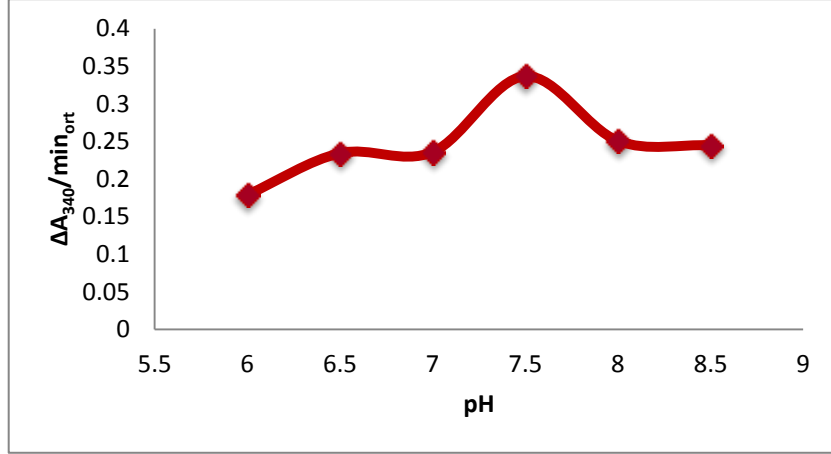
$$(0,041/27010) \times 50 \times 1000 = 0,075 \text{ mol/ml}$$

$$(0,075 \times 10 \times 10^{-3}) / 8 = M_s \times 1$$

$$M_s = 93,75 \times 10^6 \text{ mol/ml}$$

$$93,75 \times 10^6 \times 35220 = 3,3 \text{ \mu g/ml}$$

Şekil 3.27'de ise elde edilen ortalama absorbands değerinin 6 farklı pH değerine karşı oluşturulan grafik verilmektedir. Deneyi sonucunda optimum pH 7,5 olarak belirlenmiştir. Yapılan sonraki çalışmalarda pH değeri, 7,5 olan tampon kullanılmıştır.



Şekil 3. 27 Optimum pH belirleme deneyinde pH değerine karşılık absorbans değerleri grafiği

pH 7,5 olan tampon ile gerçekleştirilen reaksiyonun A_{340} nm dalga boyundaki absorbans değeri ve NADH'in molar absorblama katsayısı (3.6)'da verilen denklemde yerine yazılarak hesaplanan enzim ünitesi, denklem (3.5)'te elde edilen protein konsantrasyonuna oranlanarak spesifik aktivite değeri hesaplanmıştır.

$$c(\text{mol/l}) = (A_{280}) \times 50 / (\epsilon) \quad (3.4)$$

$$c(\text{mg/l}) = (A_{280}) \times M_w / (\epsilon) \quad (3.5)$$

$$U/\text{ml} = (\Delta A_{340}/\text{dakika}) \times V_T / (\epsilon_{\text{NADH}} \times V_E) \quad (3.6)$$

$$c(\text{mol/l}) = 0,041 \times 50 / 27010 = 7,58 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$$

$$c(\text{mg/ml}) = 7,58 \times 10^{-5} \times 35220 = 2,67 \text{ mg/ml}$$

$$1/8 \text{ oranında seyreltme yapıldığı için } 2,67/8 = 0,3375 \text{ mg/ml}$$

$$U/\text{ml} = (0,352 \times 8 \times 10^6) / 6220 \times 10 = 45,27 \text{ U/ml}$$

$$\text{Spesifik aktivite } 134,13 \text{ U/mg}$$

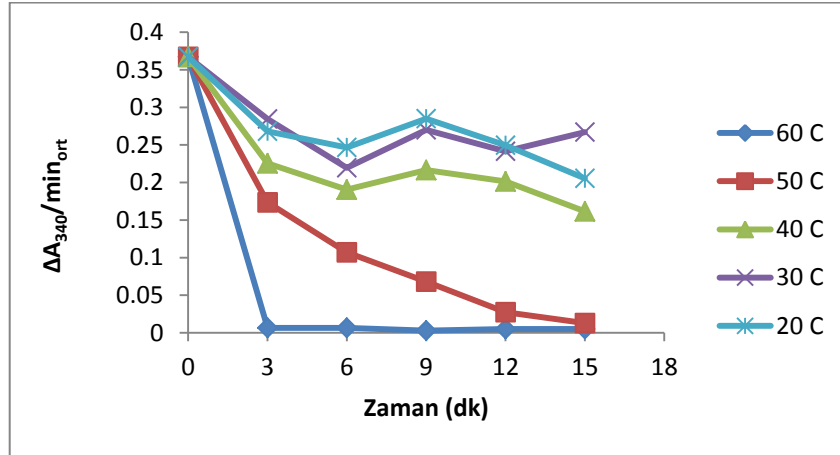
3.11 Saflaştırılmış Enzimin Termostabilitesinin Belirlenmesi

Saflaştırılan TaLDH enziminin stabil olduğu sıcaklıkları belirlemek için optimum pH deneyinde seçilen aynı elüsyon ve seyreltme katsayısı kullanılmıştır. 60 °C, 50 °C, 40 °C, 30 °C, 20 °C olmak üzere 5 farklı sıcaklık değerinde, 3'er dakika arayla 15 dakika süresince bekletilen enzim kullanılarak 1 dakikalık standart reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonların absorbans değerleri 340 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.4'te verilmektedir.

Çizelge 3. 4 Termostabilite deneyinde çoklu tekrarlar sonucu elde edilen aktivite değeri ($\Delta A_{340}/dk$)

Zaman (dakika)	$\Delta A_{340}/dk_{ort}$				
	60 °C	50 °C	40 °C	30 °C	20 °C
0	0,367	0,367	0,367	0,367	0,367
3	0,0065	0,1735	0,2255	0,2845	0,268
6	0,0065	0,107	0,1905	0,2195	0,2465
9	0,003	0,068	0,2165	0,27	0,285
12	0,005	0,0275	0,2015	0,2415	0,2495
15	0,005	0,013	0,1615	0,267	0,2055

Belirlenen absorbans değerlerinin zamana karşı çizilen grafiği Şekil 3.28'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, enzimin 50 °C 'den sonra denatüre olmaya başladığı ve 60 °C 'de yok kabul edilebilecek kadar düşük bir aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. En iyi aktiviteyi 20 °C ve 30 °C'de göstermiştir. 40 °C'de ise çok büyük fark olmamasına karşın daha düşük aktivite göstermiştir.



Şekil 3. 28 Termostabilite deneyinde zamana karşı absorbans değerleri

3.12 Saflaştırılmış Enziminin Kinetik Analizi

Bölüm 2.2.9'da verilen saflaştırma protokolüne göre *Ta*LDH enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin konsantrasyonu Bölüm 2.2.11'de verilen (2.1) ve (2.2) denklemlerindeki formüllerin uygulanabilmesi için 280 nm dalga boyunda elüsyonlardan 20 µl kullanılarak 980 µl dH₂O içinde çözülmesi ile absorbans değeri kaydedilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri Çizelge 3.5'te verilmektedir.

Çizelge 3. 5 Elüsyonların 280 nm'de ölçülen absorbans değerleri

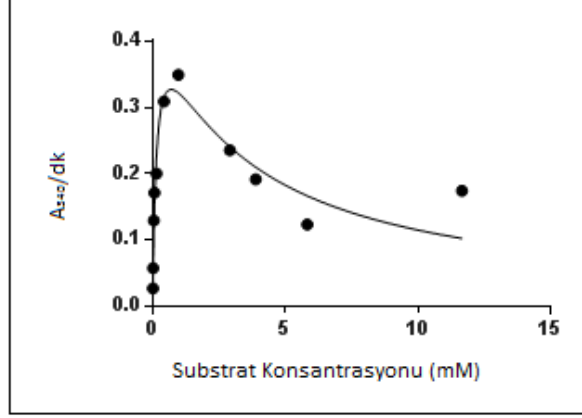
Elüsyonlar	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	E ₅	E ₆	E ₇	E ₈	E ₉	E ₁₀
Absorbans (ΔA_{280}/dakika)	0,004	0,008	0,00,4	0,013	0,024	0,025	0,027	0,020	0,023	0,023
mg/ml	0,260	0,520	0,260	0,847	1,564	1,627	1,760	1,303	1,499	1,499

Konsantrasyon sonucu ve jel görüntüsüne göre elüsyon 5 substrat kinetiği deneyinde kullanılmak üzere seçilmiştir. Kullanılan enzimin konsantrasyonu 1,564 mg/ml'dir. Enzim 1/10 oranında seyreltilerek Bölüm 2.2.14'de verilen kinetik bilgileri doğrultusunda ve kinetik analiz için verilen protokole göre ana stoktan seyreltilen farklı konsantrasyonlardaki pirüvatın eklenmesiyle başlatılan reaksiyonun UV visible Spektrofotometrede 340 nm'de ölçülmesiyle absorbans değerleri elde edilmiştir. Ölçümler en az iki kere tekrarlanmıştır. Substrat konsantrasyonları ve elde edilen değerler Çizelge 3.6'da verilmektedir.

Çizelge 3. 6 A_{340} /dk'da saf TaLDH'ın farklı pirüvat konsantrasyonlarındaki aktivite değerleri

Substrat Konsantrasyonu mM	A_{340} /dk
0,016	0,0265
0,024	0,0570
0,048	0,1290
0,072	0,1710
0,144	0,2000
0,432	0,3090
0,972	0,3495
2,916	0,2355
3,888	0,1915
5,832	0,1230
11,664	0,1740

Elde edilen absorbans değerleri ve substrat konsantrasyonları GraphPad Prism 6.0 programına girilerek grafiği elde edilmiş ve Şekil 3.29'da gösterilmiştir.



Şekil 3. 29 Enzimin kinetik davranışı

Aynı program substrat inhibisyon modülü seçilerek Michealis-Menten sabitleri V_{max} , K_M ve inhibisyon sabiti K_i değerleri elde edilmiş ve Çizelge 3.7'de verilmiştir. Elde edilen V_{max} ve K_M değerleri kullanılarak elde edilen enzimin dönüşüm sayısı ve katalitik etkinlik değeri (2.7), (2.8) ve (2.9) 'da verilen denklemlerin (3.7), (3.8) ve (3.9)'da yerine yazılmasıyla belirlenmiş ve Çizelge 3.7'de verilmiştir.

$$A = V_{max} / \epsilon_{NADH} \quad (3.7)$$

$$A = 0,4682 / 6220$$

$$A = 7,5273 \times 10^{-5}$$

$$k_{cat} (\text{dönüşüm sayısı}) = (A / E_T) / 60 \quad (3.8)$$

$$E_T = 1,567 \text{ mg/ml} / 10 = 0,1567 \text{ mg/ml} = 0,001567 \text{ mg/ml} (1 \text{ ml küvette})$$

$$E_T = 0,001567 \text{ g/l} / 35220 \text{ g/mol} = 4,4491 \times 10^{-8} \text{ M}$$

$$k_{cat} = (7,5273 \times 10^{-5} / 4,4491 \times 10^{-8}) / 60 = 28,19 \text{ s}^{-1} = 1,691 \times 10^3 \text{ dk}^{-1}$$

$$\text{Katalitik etkinlik} = k_{cat} / K_M \quad (3.9)$$

$$\text{Katalitik etkinlik} = 28,19 / 0,0001511 = 1,866 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} = 1,1191 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ dk}^{-1}$$

Çizelge 3. 7 Saf TaLDH enziminin Michealis-Menten sabitleri

Michealis-Menten Sabitleri	Michealis-Menten Değerleri	Hata Oranı
V_{max} (oran)	0,4682	$\pm 0,07966$
K_M (mM)	0,1511	$\pm 0,05594$
K_i (mM)	3,264	$\pm 1,233$
k_{cat} (s ⁻¹)	28,19	
k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	$1,866 \times 10^5$	

Substrat inhibisyonu gösteren diğer türlerdeki LDH'ların literatür taraması yapıldığında substrat konsantrasyonlarının 40-50 mM'a kadar çıktığı belirlenmiş Çizelge 3.7'de verilen konsantrasyonlar düşük kaldığı için K_i değerini doğru yansıtip yansıtmadığının belirlenmesi için sonraki analiz son substrat konsantrasyonu 50 mM ayarlanarak Epoch Microplate Spectrophotometre ile altı tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. 50mM'a kadar çıkarılan substrat konsantrasyonlarına karşılık elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Tekrar saflaştırma yapılmış ve kullanılan enzimin konsantrasyonu 280 nm dalga boyunda bakılan absorbans değeri kullanılarak (3.1)'de yerine yazılarak hesaplanmış ve Bradford yöntemi ile de doğrulanmıştır. Kullanılan elüsyonun miktarı 0,977mg/ml'dir. Enzim 1/20 oranında seyreltilmiştir. Kullanılan enzimin spesifik aktivitesi 8,23 U/ml ve seyreltme sonrası 1 ml'deki konsantrasyonu 0,04885 mg/ml ve $1,3869 \times 10^{-6}$ mol/l alınarak denklem (3.6) ya göre hesaplama yapıldığında 168,47 U/mg olarak hesaplanmıştır.

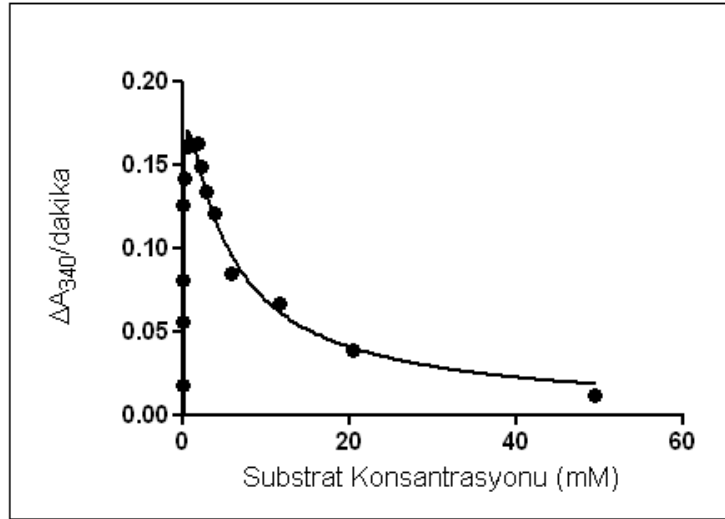
Çizelge 3. 8 A_{340}/dk 'da saf TaLDH'ın farklı pirüvat konsantrasyonlarındaki aktivite değerleri

Substrat Konsantrasyonu mM	A_{340}/dk
0,016	0,018
0,048	0,056
0,072	0,081
0,144	0,126
0,216	0,142
0,648	0,161
0,972	0,162
1,944	0,163
2,332	0,149

Çizelge 3.8 A_{340}/dk 'da saf TaLDH'in farklı pirüvat konsantrasyonlarındaki aktivite değerleri (devamı)

Substrat Konsantrasyonu mM	A_{340}/dk
2,916	0,134
3,888	0,121
5,832	0,085
11,664	0,067
20,412	0,039
49,572	0,012

Substrat konsantrasyonları ve absorbans değerleri GraphPad Prism 6.0 programına girilerek Michealis-Menten sabitleri ve reaksiyon hızı-substrat konsantrasyonu grafiği elde edilmiştir. Enzimin substrat konsantrasyonlarına karşı göstermiş olduğu kinetik davranışın grafiği Şekil 3.30 'da verilmektedir.



Şekil 3. 30 Enzimin kinetik davranışı

Graphpad Prism 6.0 ile enzim inhibisyon denklemi kullanılarak elde edilen Michealis-Menten sabitleri ise Çizelge 3.9'da verilmektedir. Elde edilen K_M , V_{max} ve belirlenen enzim konsantrasyonu denklem (3.7), (3.8) ve (3.9)'da yerine yazılarak k_{cat} ve k_{cat}/K_M değerleri hesaplanıp Çizelge 3.9'da verilmiştir.

$$A = 0,2304 / 6220 = 3,7041 \times 10^{-5}$$

$$E_T = 0,977 \text{ mg/ml} / 20 = 0,04885 \text{ mg/ml}$$

$$E_T = 0,04885 \text{ g/l} / 35220 \text{ g/mol} = 1,3855 \times 10^{-8} \text{ M (1 ml küvette)}$$

$$k_{cat} = (3,7041 \times 10^{-5} / 1,3855 \times 10^{-8}) / 60 = 44,55 \text{ s}^{-1} = 2,667 \times 10^3 \text{ dk}^{-1}$$

$$\text{Katalitik etkinlik} = 44,61 / 0,0001324 = 3,3693 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} = 2,014 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ dk}^{-1}$$

Çizelge 3. 9 Saf *Ta*LDH enziminin Michealis-Menten sabitleri

Michealis-Menten Sabitleri	Michealis-Menten Değerleri	Hata Oranı
V_{\max}	0,2304	$\pm 0,01224$
$K_M(\text{mM})$	0,1324	$\pm 0,01767$
K_i	4,295	$\pm 0,5778$
$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	44,55	
$k_{\text{cat}}/K_M (\text{s}^{-1} \text{ M}^{-1})$	$3,3693 \times 10^5$	

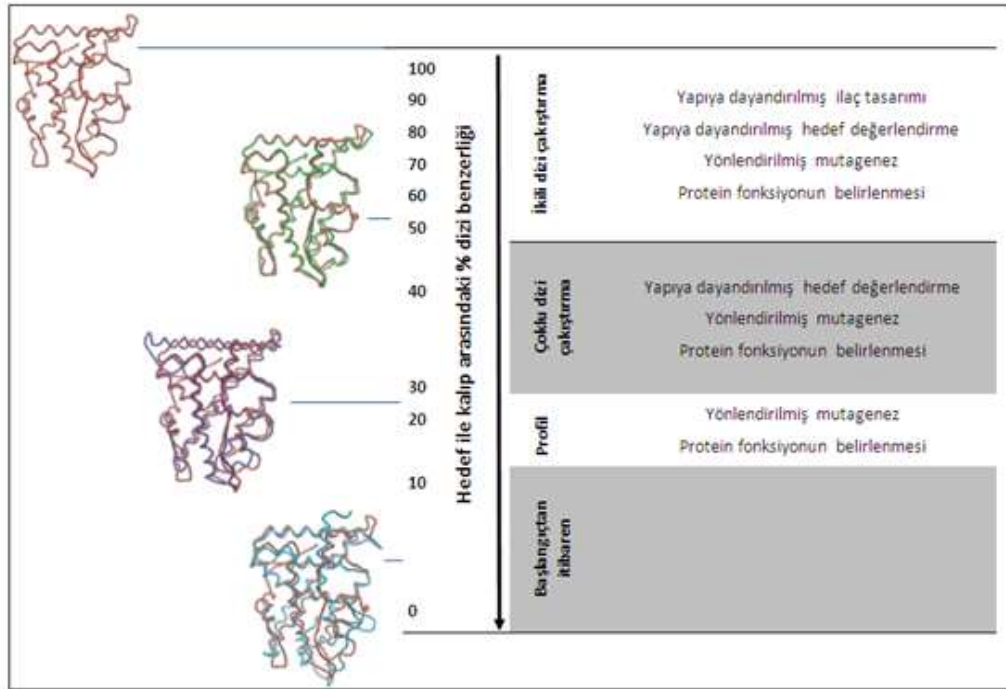
3.13 *Theileria annulata*'nın Laktat Dehidrogenaz Enziminin İleri Modellenmesi ve Muhtemel İlaç Bağlanma Bölgelerinin Belirlenmesi

Yapıya dayandırılmış ilaç tasarımında uygun ligandların bulunabilmesi için tekrarlı basamaklardan oluşan modelleme çalışmaları saf olarak elde edilen ve kinetik analizleri tamamlanan *Ta*LDH için gerçekleştirilmiştir. Enzimin modellenmesi ilk olarak Erdemir vd. [71] tarafından kullanılan web tabanlı SWISS-MODEL ile yapılmıştır. Bu tezdeki çalışmada ise SWISS-MODEL'den daha üstün olduğu düşünülen [101] Modeller v9.12 programı ile elde edilen model kullanılarak muhtemel ilaç bağlanma bölgeleri belirlenerek ileri derece modellemesi gerçekleştirilmiştir. Modellemenin birinci adımı enzimin amino asit dizisinin veritabanındaki üç boyutlu yapısı bilinen proteinler ile BLAST yapılmasıdır. Kullanılan yöntem PSI-BLAST adı verilen pozisyona spesifik BLAST'tır. 1T27 pdb numaralı apikompleksan şubesine ait olan *Plasmodium falciparum* LDH'ı yapılacak olan docking (yanaştırma) çalışmaları için de referans olabileceği için kalıp dizi olarak belirlenmiştir. *Theileria annulata* ve *Plasmodium falciparum* LDH'larının amino asitleri arasında web tabanlı bir program olan MUSCLE ile eşleştirmesi yapılmıştır. %50,7 benzerlik gösteren sonuç Şekil 3.30'da verilmiştir [90].

ID=50% pP=33.1I.L#GSG.IGG#M.L....L.DV.##DIV.N#.#GK.LD..M.N.#....#K#.G.N.Y.D#.G.
TaLDH	1 MARNNRKRLISLIGSGNIGGIMGYLTQLTELADVNFLDIPVFNIGAGKSLDIMHANSIQGKAYKCKGKINNTEDISGS
1T25_a	1 ----APKARIVLVSSGMIGGVMATLIVQKNLGDVFLFDIVKNMPHGKALDTSITVVMAYSNCVKVSSNTYDDLGA
	10 20 30 40 50 60 70
TaLDH	77 DV#IVTAG#.KAP.KS..EWNRDDL#.N.KI#..#G..IKK.#P.AF#IV#INP#DVMV.L##.G#PKN.##G
1T25_a	73 DV#IVTAGLAKAPTKSNEEWNRDDLVGYSNKIIRDVGENIKKYAPEAFVIVITNPMVVMHMLKVTGFPKGMVVG
	80 90 100 110 120 130 140 150
TaLDH	153 #GG#LD.SR#.#YI..KL.V.P..V...##GANG..M##L...TV.GIP#..F...#I...#.I..RTV..A
1T25_a	149 MGGLDSSRMNCHIAEKLGWPKYVHGSVIGANGDSMIPIVSRSTVYGIFILQVVEQGYIMEDIKEIEERTVISA
	160 170 180 190 200 210 220
TaLDH	229 #EI#.L...S.Y#APA.A#IEMA.SYL.D.K.V##CS.#LEGQYGH.DI#.GTP#V#GANGVE.V#EL.L..EE.
1T25_a	225 FEILKLYGSGSSYFAPATAIEMASSYLNDRKCVFPSCYLEGQYGHARDIYCGTFAVIGANGVEKVFELKLTPEEQ
	230 240 250 260 270 280 290 300
TaLDH	305 .K#D..I.E.KR#.AL#.
1T25_a	299 AKFDEAIAETKRMKALA-
	310 320

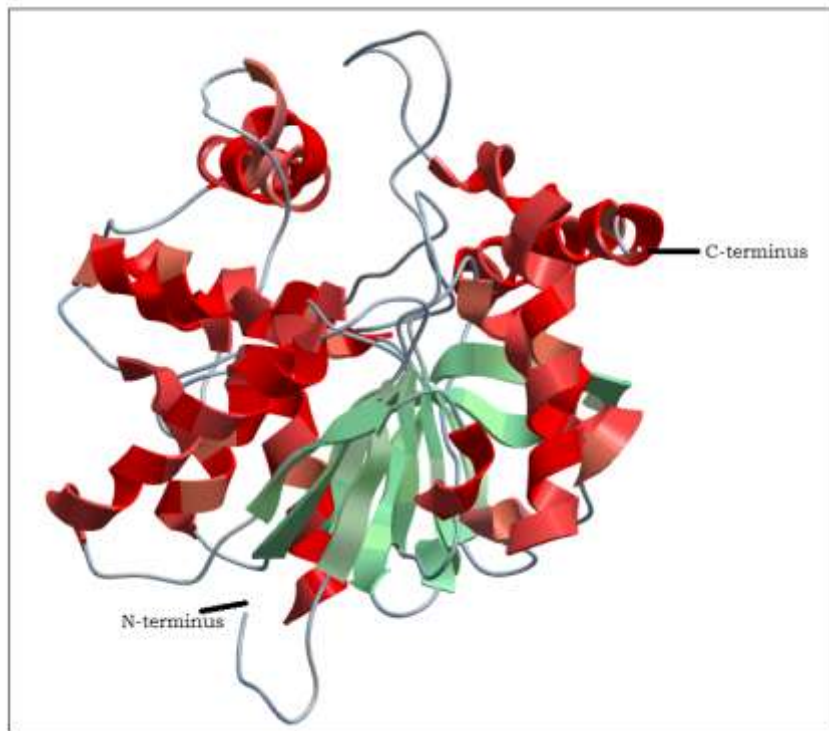
Şekil 3. 31 *Theileria annulata* ve *Plasmodium falciparum* LDH'ları arasında amino asit düzeyinde eşleştirme. TaLDH *Theileria annulata*'yı, 1T25_a *Plasmodium falciparum*'u belirtmektedir.

Elde edilen %50,7'lik oranın önemi Şekil 3.31'de verilmektedir. Bu şekle göre modelleme % 30 benzerlik oranı ile başlamakta ve bu nedenle elde edilen %50,7 yapılacak ileri modelleme çalışmaları için iyi bir benzerlik oranıdır.



Şekil 3. 32 Hedef ve kalıp dizi benzerliği ve elde edilen homoloji modelleme içeriği arasındaki ilişki [87]

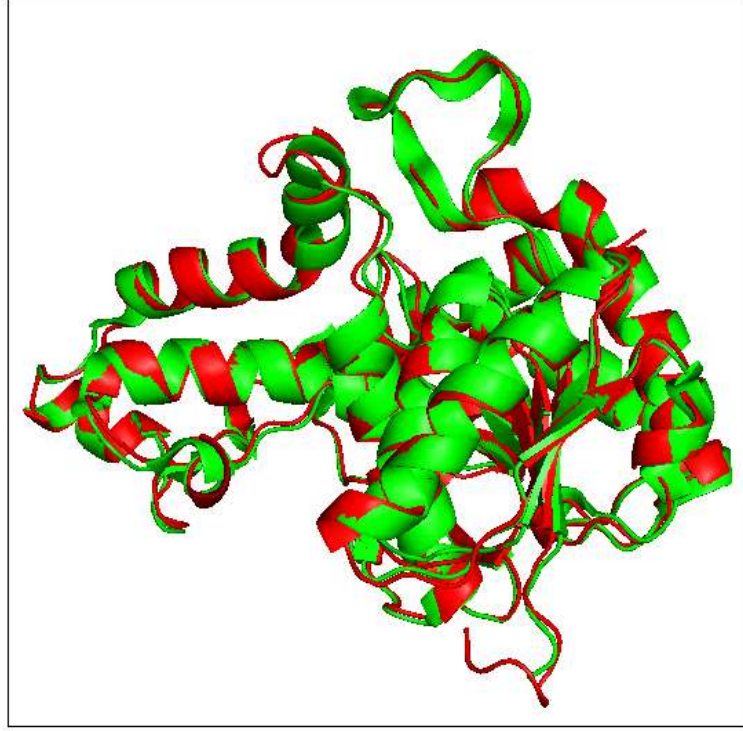
Modeller 9.12 [91] programına, kalıp protein olan *Plasmodium falciparum* LDH'in kristal yapısı, hedef protein *Ta*LDH amino asit dizisi dosyası girilerek 50 model oluşturulmuştur. DOPE skoru her bir model için hesaplanmıştır. DOPE skoru iç enerji ile ilgili olduğundan düşük olduğu zaman daha kararlı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle 50 model arasından DOPE skoru -36596,45703 kcal/mol değeri ile en düşük olan model ileriki çalışmalar için seçilmiştir. *Ta*LDH'in seçilen en iyi modelinin görüntüsü N- ve C- terminal uçları ile Şekil 3.32'de verilmektedir. Şekildeki modelde kırmızı ile gösterilen alfa heliks, yeşil ile gösterilen beta-sheet ve gri ile gösterilen random coils olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. 33 *Ta*LDH 'in seçilen en iyi modelinin görüntüsü

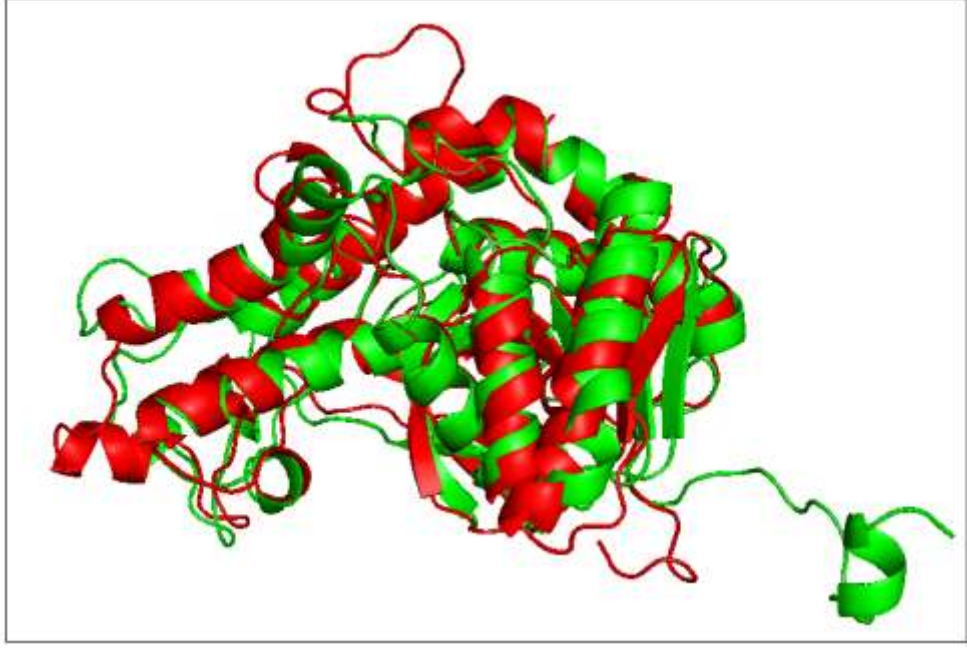
*Ta*LDH'in modellenmesi için kullanılan kalıp protein *Pf*LDH ile süperimpozisyon çalışması PyMol programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuç Şekil 3.33'te gösterilmektedir. Şekil 3.33'te yeşil renk ile gösterilen protein *Pf*LDH'a, kırmızı renk ile gösterilen protein *Ta*LDH'a aittir. Root-mean-square deviation (RMSD) değeri Pymol (1T25) ile belirlenmiştir [102]. İki protein yapısının karşılaştırılması sonucu ortaya çıkan root-mean-square deviation değeri süperimpozisyonu yapılmış proteinlerin atomları arasındaki uzaklığı belirlemektedir. RMSD değeri 0,687 olarak belirlenmiştir. RMSD

değeri sıfıra ne kadar yakınsa iki protein birbirine yapısal olarak o kadar benzemektedir. Yapısal olarak iki proteinin 1760 atomu eşleşmektedir.



Şekil 3. 34 *Ta*LDH ve *Pf*LDH enzimlerinin aminoasit dizilerinin süperimpozisyonu.
Kırmızı: *Ta*LDH, Yeşil: *Pf*LDH

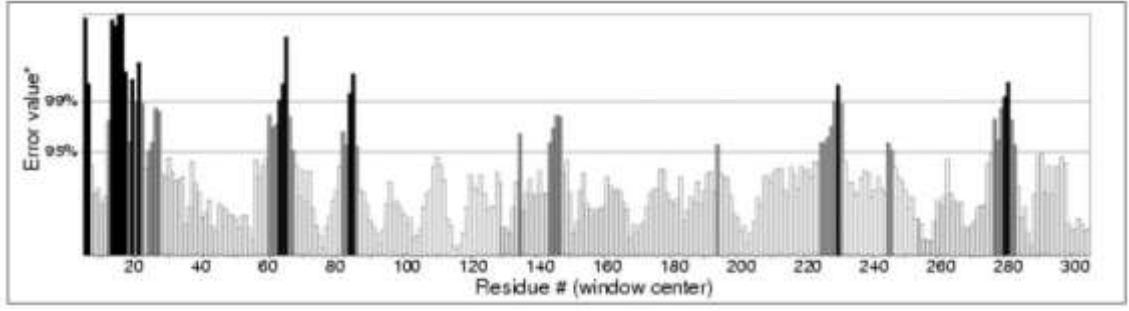
Theileria annulata'nın konağı olan *Bos taurus* LDHA (*Bt*LDHA) enzimi ile yapılan süperimpozisyon çalışması iki dizi arasındaki farklandırma açısından oldukça önemlidir. Yapılan çalışma sonucunda Root-mean-square deviation (RMSD) değeri 1.314 olarak belirlenmiş ve 1431 atom arasında eşleşme olduğu tespit edilmiştir. Edilen süperimpozisyon görüntüsü Şekil 3.35'te verilmektedir. *Theileria annulata* laktat dehidrogenaz geninin 98-109. rezidüleri arasında bulunan NEEWN insersiyon bölgesi kırmızı loop olarak görülmektedir.



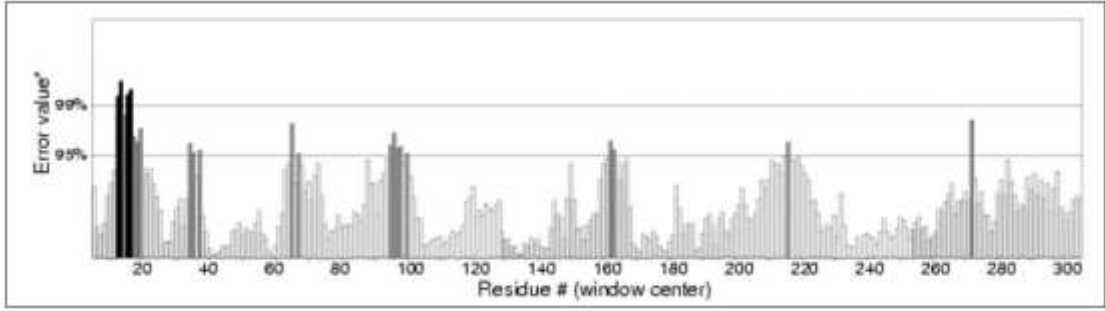
Şekil 3. 35 *Ta*LDH ve *Bt*LDHA enzimlerinin aminoasit dizilerinin süperimpozisyonu.
Kırmızı: *Ta*LDH, Yeşil: *Bt*LDH

Protein modelinin geometrisinin optimizasyonu (enerji minimizasyonu) AMBER99 forcefield (FF) kullanılarak 1000 döngüde yapılmıştır. Bu modelin optimizasyon öncesi ve sonrası enerji değerleri sırasıyla -728.624416 kcal/mol ve -8195.629509 kcal/mol olarak belirlenmiştir.

Validasyon aşamasında ilk olarak ERRAT programı kullanılmıştır. Bu program, oluşturulan proteinin üç boyutlu yapısının doğruluğunu atomik bağlar açısından değerlendirmektedir. Atomlar Karbon (C), azot (N) ve oksijen (O) olmak üzere üç kategoride sınıflandırılmaktadır. Bu atomların ikili nonkovalent bağ etkileşimleri de CC, CN, CO, NN, NO ve OO olarak altı farklı kombinasyon oluşumuna neden olmaktadır [92]. ERRAT programı kullanılarak, oluşturulan modeldeki her bir rezidünün atomları arasındaki bağlardan kaynaklanan hatalar belirlenmektedir. Programdan elde edilen çıktıya göre grafikte; %95'in üzerinde daha koyu olarak verilen alanlarda hatalı olan aminoasitleri gösterilmektedir. ERRAT skoru, protein quality factor, optimizasyon öncesi ve sonrasında sırasıyla 83,439 ve 92,971 olarak belirlenmiştir. Şekil 3.35 ve Şekil 3.36'da ise oluşturulan protein modelinin optimizasyon öncesi ve sonrasında ERRAT program sonucu gösterilmektedir.



Şekil 3. 36 Model *TaLDH*'in minimizasyon öncesi ERRAT programı sonucunun görüntüsü

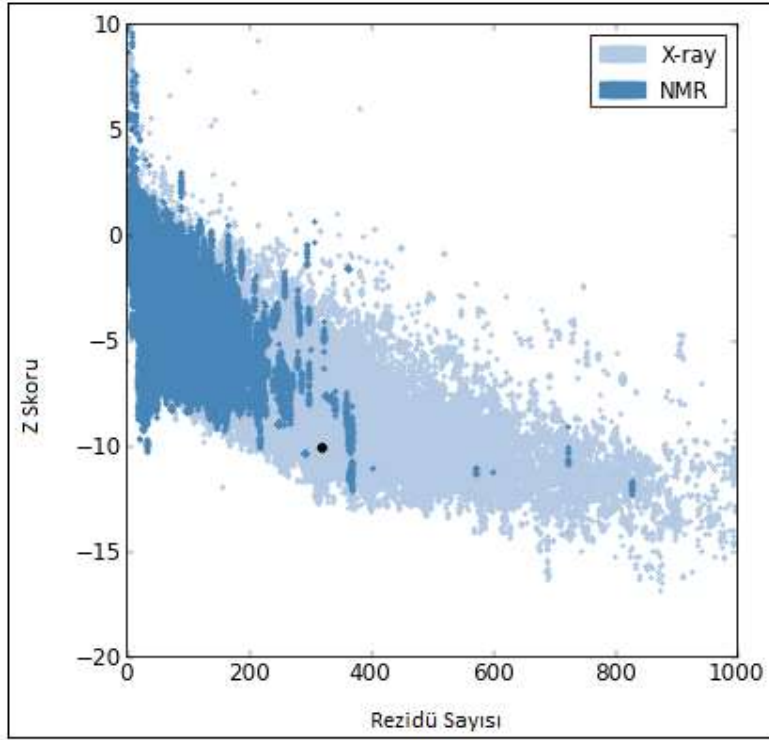


Şekil 3. 37 Model *TaLDH*'in minimizasyon sonrası ERRAT programı sonucunun görüntüsü

ProSa Programı (Protein Yapı Analizi) geniş bir kullanıcı tabanına sahip, tahmin edilen ve modellenen deneysel protein yapılarının, düzeltilmesi ve validasyonunda kullanılmak üzere kurulan bir araçtır. Protein yapılarının analizi genellikle zor bir uygulamadır. ProSa programı, skor ve enerji grafiklerinin görüntülenmesi için web tabanlı interaktif araçların avantajlarından yararlanmaktadır. Bir proteinin belirlenen skoru bilinen tüm protein yapıları kapsamında gösterilmekte ve sorunlu kısımlar üç boyutlu molekül göstericide gösterilmekte ve belirtilmektedir. ProSa programı X-ışını analizi, NMR spektroskopisi ve teorik hesaplamalardan elde edilen protein yapılarının validasyonunda karşılaşılan ihtiyaçlarını gidermektedir [93].

Program girilen yapının z-skoru ve enerji düzeyi olmak üzere iki çıktı elde edilmektedir. Z-skoru genel model kalitesini belirler ve yapısı çözümlenmiş diğer protein konformasyonların enerjilerine göre sapmayı belirlemektedir. Belirtilen proteinin z-skoru yorumlanmasını kolaylaştırmak için, özel bir değer ile protein veri bankasındaki deneysel olarak belirlenen protein zincirlerinin z-skorlarını içeren bir alan görüntülenmektedir.

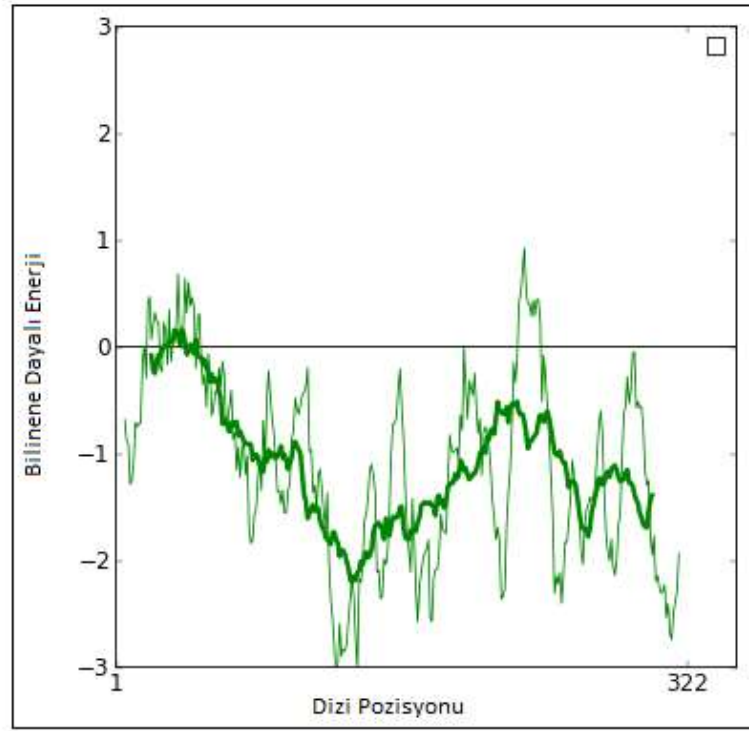
X-ışın ve NMR yapıların farklı renkler ile belirtilmiştir. Açık mavi alan X-ışını ifade etmekteyken, koyu mavi alan NMR'ı ifade etmektedir. Eğer elde edilen model deneysel olarak yapısı çözümlenmiş proteinlerin z-skoru değerlerinin dışında ise hatalı olarak kabul edilmektedir [93]. Yapılan validasyon sonucunda protein modeli X-ışını kristalografisinde çözülmüş olan proteinler arasında görülmüştür. Optimizasyon sonrası Z-skorunun -10,08 olmuştur (Şekil 3.38). Z-skoru proteinin deneysel olarak yapısı çözümlenen proteinlerin skorları arasında yer alması modelin doğru kabul edilmesini sağlamaktadır.



Şekil 3. 38 Optimizasyon sonrası *Ta*LDH modelinin Z-skor sonucu

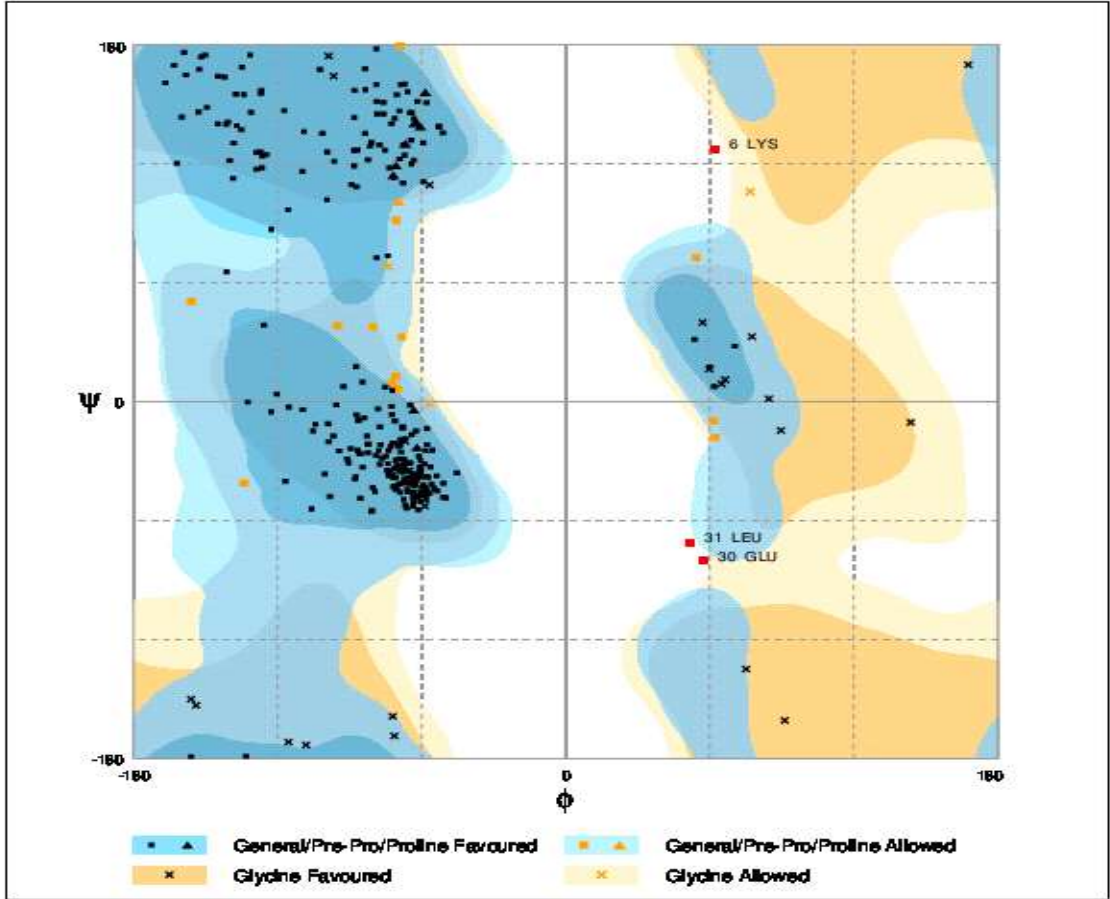
Enerji grafiği amino asit dizi pozisyonlarının fonksiyonu olarak verilen enerjileriyle yerel modelin kalitesini göstermektedir. Genel olarak, pozitif değerler modelde hatalı ya da sorunlu amino asitler olduğuna karşılık gelmektedir. Tek rezidülerin enerjilerinin grafiği geniş dalgalanmalar içermektedir. Bu nedenle her bir 40 rezidü için ortalama enerji hesaplanmasıyla grafik düzeltilmektedir [93]. Enerji düzeyine göre değerlendirildiğinde negatif bölgedeki rezidülerin çoğu dikkat çekmektedir. Bu durum model proteinin konformasyonun daha doğru bir şekilde belirlendiğini göstermektedir. Grafikte görülen

pozitif bölgedeki değerler proteindeki sorunlu veya hatalı aminoasitlerin varlığını göstermektedir (Şekil 3.39).



Şekil 3. 39 Optimizasyon sonrası *Ta*LDH modelinin enerji düzeyi grafiği

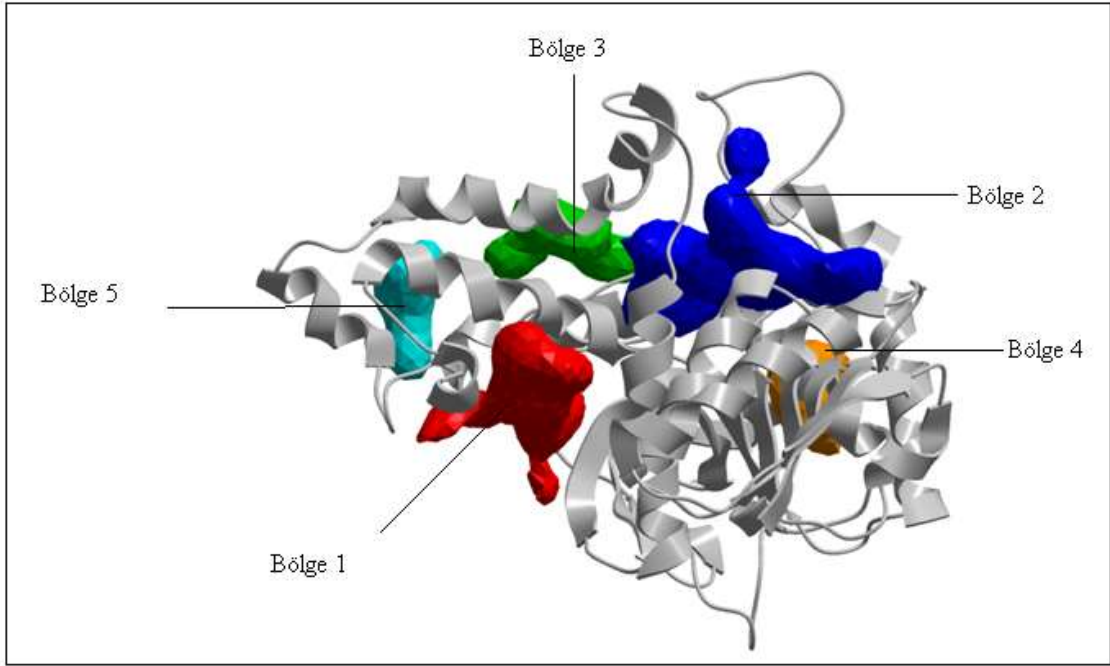
RAMPAGE programı [94], peptiddeki rezidülerin phi (ϕ) ve psi (ψ) adı verilen torsional (burulma) açılarının grafiğini veren Ramachandran diyagramını oluşturmaktadır. Diyagramda ϕ değerleri x-ekseninde, ψ değerleri y-ekseninde yer almaktadır. Ramachandran diyagramına göre proteinin üç boyutlu yapısının kabul edilir olduğu ya da olmadığı yorumu yapılabilmektedir. Şekil 3.40'da verilen *Ta*LDH proteininin optimizasyon sonrası Ramachandran diyagramındaki asıl bölge, kabul edilebilir bölge ve dış bölgedeki rezidü yüzdeleri sırasıyla, % 93.8, % 5.3 ve % 0,9'dur.



Şekil 3. 40 Optimizasyon sonrası *Ta*LDH modelinin Ramachandran diyagramı. Bu diyagramda asıl bölgeler mavi, kabul edilebilir bölgeler turuncu, dış bölgeler beyaz olarak gösterilmiştir

PSIPRED programı [95] kullanılarak proteinin ikincil yapısının analizi yapılmıştır ve bu analizden elde edilen sonuç Şekil 3.41'de verilmektedir. Bu görüntüde proteinin ana zincirinde bulunan her bir amino asidin, ikincil yapıda hangi biçimde bulunduğunu göstermektedir. SOPMA [103] kullanılarak ise ikincil yapısında bulunan modellerin yüzdeleri alfa heliks % 37,2 uzun iplik %19,25, beta dönüş %11,80, rastgele döngüler % 31,68 olarak belirlenmiştir.

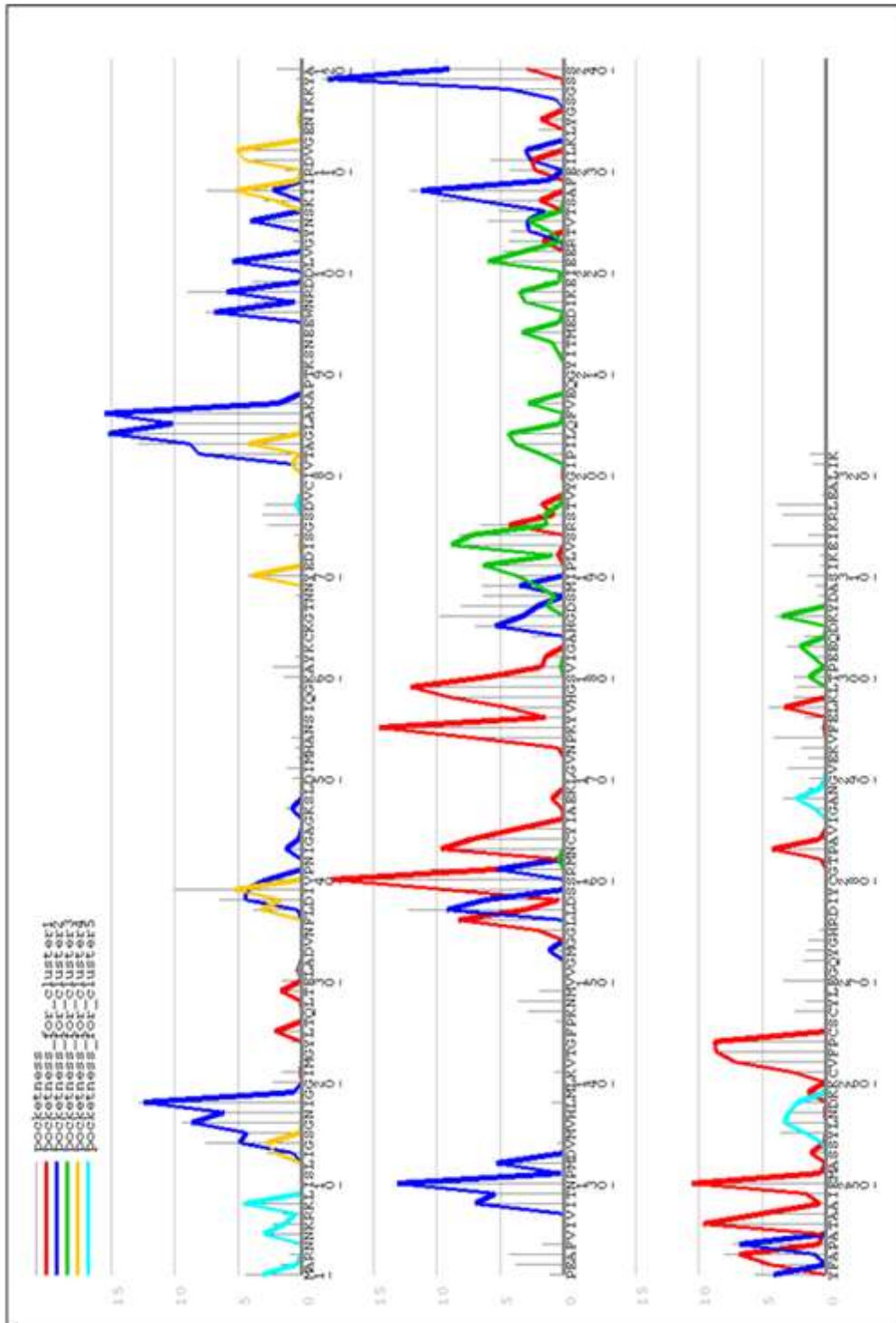
Protein yüzeyindeki ceplerin belirlenmesi küçük moleküllerin bağlanma bölgelerinin bulunması açısından önemlidir[97]. Modellenmiş proteinin yüzeyindeki cepler ve muhtemel ilaç bağlanma bölgeleri GHECOM 1.0: Grid-based HECOMi finder sunucunun matematiksel morfolojiyi kullanmasıyla belirlenmiştir [97]. Şekil 3.42'de verilen görüntüde belirlenen muhtemel cep bölgelerinin hepsi protein modeli üzerinde gösterilmektedir.



Şekil 3. 42 Protein yüzeyinde muhtemel ilaç bağlanma bölgeleri olarak belirlenen bölgeler kırmızı renk ile gösterilen bölge 1, mavi renk ile gösterilen bölge 2 (aktif bölge) yeşil renk ile gösterilen bölge 3, turuncu renk ile gösterilen bölge 4, turkuaz renk ile gösterilen bölge 5 olarak ifade edilmektedir.

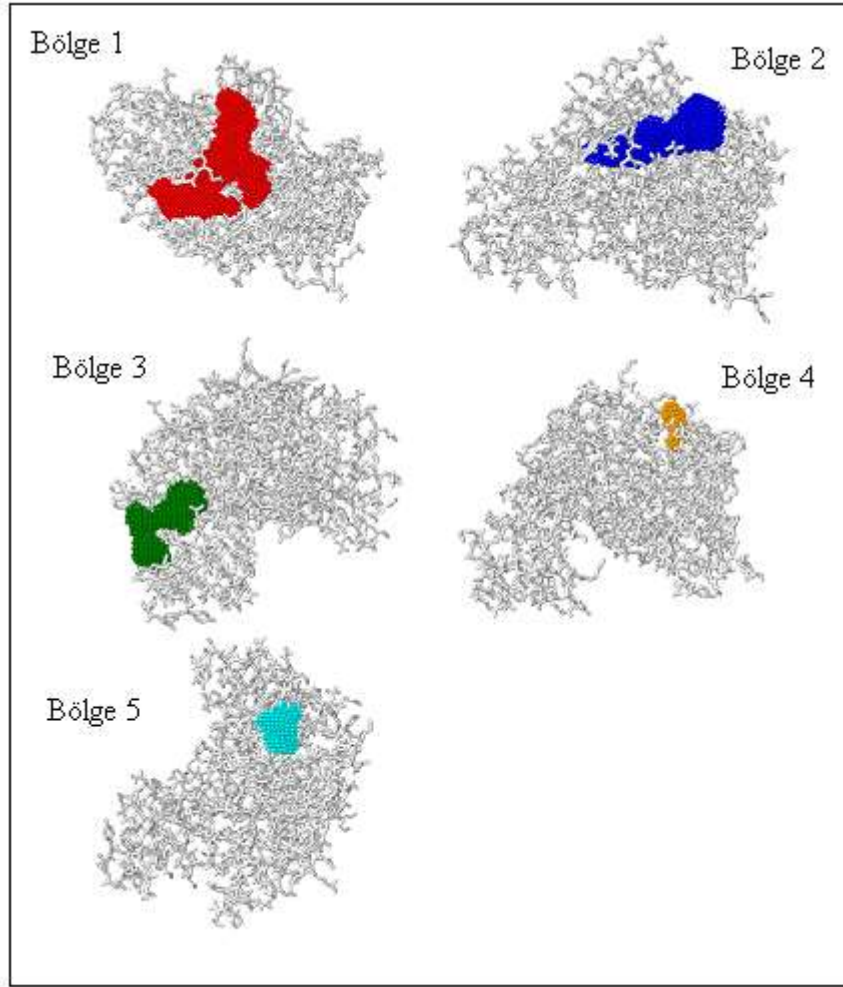
Üç boyutlu yapısı üzerinde belirtilen bölgelerin birincil yapısında etkileştiği rezidüler dizi bazında kalıp protein ile karşılaştırılarak Şekil 3.43'te gösterilmektedir. Şekil 3.43'te renklere göre yapılan rezidü eşleşmesinde mavi ile gösterilen bölge için verilen rezidüler içinde enzimin aktif bölge olarak bilinen 98-109. rezidüler arasında yer alan pentamerlik insersiyon bölge de bu cep içinde yer almaktadır. Bu bölgeyle birlikte enzimin korunmuş ve katalitik rezidüleri arasında yer alan amino asitlerde mavi renkle gösterilen bölge içinde yer almaktadır.

Şekil 3.44'te ise kalıp protein ile eşleştirilmeden yalnızca dizi üzerinde belirlenen tüm bölgelerde yer alan rezidüer gösterilmektedir.



Şekil 3. 44 Protein yüzeyinde belirlenen bölgelerinin dizi üzerinde kapladığı yerlerin gösterimi. Kırmızı renk ile gösterilen bölge 1, mavi renk ile gösterilen bölge 2 (aktif bölge) yeşil renk ile gösterilen bölge 3, turuncu renk ile gösterilen bölge 4, turkuaz renk ile gösterilen bölge 5 olarak ifade edilmektedir.

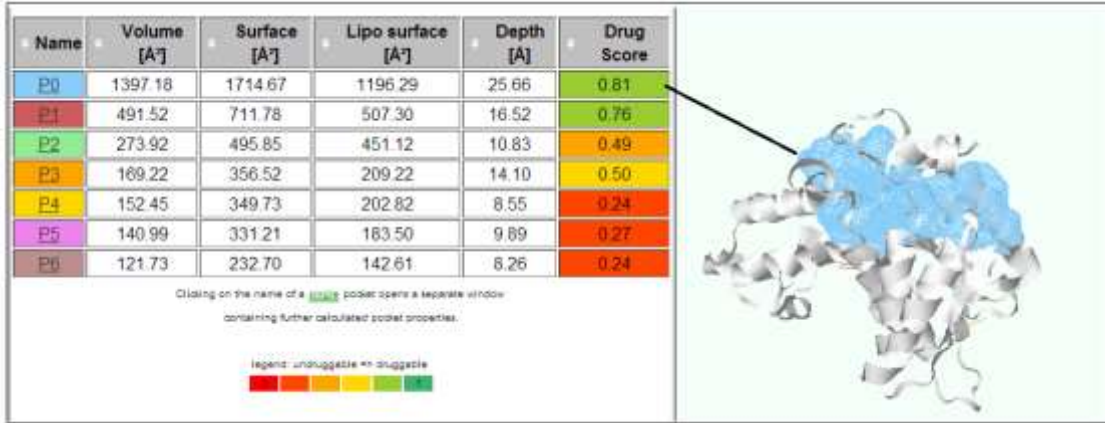
Şekil 3.45'te belirlenen muhtemel ligand bağlanma bölgeleri protein yüzeyindeki görüntüleri yer almaktadır. Bu şekillere göre yakın yerlere bağlanıyor gibi görünseler de Şekil 3.42, Şekil 3.43 ve Şekil 3.44'te verilen görüntülerde farklı bölgeler olduğu buna rağmen çakışan rezidülerin azlığı gösterilmektedir.



Şekil 3. 45 Belirlenen her bir bölgenin model protein üzerinde gösterilmesi. Kırmızı renk ile gösterilen bölge 1, mavi renk ile gösterilen bölge 2 (aktif bölge) yeşil renk ile gösterilen bölge 3, turuncu renk ile gösterilen bölge 4, turkuaz renk ile gösterilen bölge 5 olarak ifade edilmektedir.

Modellenmiş proteinin muhtemel ilaç bağlanabilecek cep bölgeleri DoGSiteScorer [96] programı kullanılarak da belirlenmiştir. DoGSiteScorer programı ile belirlenen cep bölgeslerinden ilaç skoru 1'e yakın ise ilaç geliştirilmesine daha uygun olduğu bilinmektedir [96]. DoGSiteScorer programı verilerine göre P0 bölgesinin ilaç skoru 0.81 olarak bulunmuştur ve en iyi ilaç hedef bölgesi olarak seçilmiştir (Şekil 3. 42).

Şekilde protein üzerinde 7 farklı cep bölgesinin fiziksel özellikleri ve ilaç skoru verilmiştir. Protein modeli üzerinde hedef olarak ilacın en iyi bağlanacağı bölge mavi renkle gösterilen P0 bölgesi, bölgeleri GHECOM 1.0: Grid-based HECOMi finder sunucusu kullanılarak bulunan mavi renkli bölge 2 ile ayndır. Bu nedenle model proteinin cep bölgelerinin ilaç tasarımına uygun olduğu görülmektedir.



Şekil 3. 46 Model proteinin aktif bölgelerinin DoGSiteScorer görüntüsü

DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER

4.1 Değerlendirme

Laktat dehidrogenaz, *Theileria annulata* dahil tüm canlıların glikoliz metabolizmasının son basamağında görevli önemli bir enzimdir. Apikompleksa şubesine ait *Plasmodium* ve *Toxoplasma* türlerinin laktat dehidrogenaz enzimlerinin yapısal ve kinetik analizlerinin yapılmış olması [7], [57], [59], [66], [104] bu çalışmayı da değerli kılmaktadır.

Bu tez çalışmasında *T. annulata* laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan genin literatürde ilk defa klonlaması, ifade edilmesi yapılmış ve saf olarak elde edilen enzimin kinetik karakterizasyonu ve yapısal karakterizasyonu yapılmıştır.

İntron içerdiği tespit edilen 1591 baz çifti uzunluğunda *Theileria annulata* laktat dehidrogenaz enziminden [71] yönlendirilmiş mutagenез yöntemi ile intronlar uzaklaştırılarak 969 baz çifti uzunluğundaki *TaLDH* geni amplifiye edilmiştir. Gen bölgesi klonlandıktan sonra ifade edilmiştir. Üretilen proteinin SDS-PAGE, Western Blot ve aktivite analizleri ile inaktif olarak üretildiği tespit edilmiştir. Dizileme sonucu ile mutasyon olduğu belirlenmiştir. Meydana gelen mutasyonlar enzimin katalitik rezidülerinden birinde olduğu için inaktif halde protein üretilmesine sebep olmuştur. Tespit edilen mutasyonlar da yönlendirilmiş mutagenез yöntemi ile düzeltilmiştir. Mutasyonların genin -20 °C'de saklanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Theileria annulata laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen bölgesi ifade vektörüne aktarılırken kullanılan spesifik primerler ile protein dizisine 6 x Histag bölgesi eklenmiştir. SDS-PAGE analizleri ile proteinin süpernatant fraksiyonunda çözümlü formda üretildiği görülmüştür. Üretilen protein C-terminal ucunda bulunan His-tag bölgesinin kolondaki Ni-NTA ile etkileşmesiyle saflaştırılmış ve aktivite deneylerinde aktif olarak üretildiği belirlenmiştir.

Theileria annulata laktat dehidrogenaz enziminin kinetik analizinden önce optimum pH değerinin 7,5 olduğu belirlenmiştir. Sonraki kinetik analiz deneylerinde kullanılan tampon pH'sı belirlenen optimum pH'da ayarlanmıştır. Termostabilite deneyinde ise enzimin 60 °C'de aktivitesini kaybettiği, 50 °C'de aktivitesinin zamanla azaldığı, 20-40 °C arasında ise enzimin aktivitesini koruduğu gözlenmiştir.

Theileria annulata laktat dehidrogenaz enziminin farklı substrat konsantrasyonlarında 340 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlendikten sonra Graphpad Prism 6.0 programına girilerek substrat inhibisyon modülü kullanılarak V_{max} 0,2304, K_M 0,1324 mM, K_i 4,295 mM, k_{cat} 44,55 s⁻¹ ve k_{cat}/K_M 3,3693*10⁵ M⁻¹s⁻¹ olarak bulunmuştur. Belirlenen parametreler Epoch Microplate Spektrofotometre kullanılarak altılı tekrarlar ile doğrulanmıştır.

Prototip olarak % 95 ve üzeri saflık ile 168,47 U/mg spesifik aktivite değerinde üretilen laktat dehidrogenaz enzimin ticari üretiminde üstünlük sağlayacağı düşünülmektedir.

Pek çok enzimin aktivite değerlerine karşılık substrat grafiği çizildiği zaman Michealis-Menten eğrisi elde edilmektedir. Ancak bazı enzimler yüksek substrat konsantrasyonunda inhibe olmakta ve aktivite değeri düşmektedir. *Theileria annulata* laktat dehidrogenaz enzimi de yüksek substrat konsantrasyonunda inhibe olmaktadır. Elde edilen parametreler literatürdeki diğer türlerin laktat dehidrogenaz enzimlerinin pirüvat için kinetik değerleri ile karşılaştırılması Çizelge 4.1'de verilmektedir. Elde edilen K_M değeri apikompleksan türlerinden *Toxoplasma gondii* ve *Plasmodium malaria* LDH'lerinin K_M değerleri ile yakın çıkmış ancak K_i değeri için aynı yorum yapılamamıştır. Konak canlıının laktat dehidrogenaz enziminin kinetik analizi literatürde yer almadığı için konakla karşılaştırma yapılamamaktadır. Konağa yakın olduğu düşünülen *River*

buffalo'nun laktat dehidrogenaz enziminin yalnızca K_M değeri Çizelge 4.1'de yer almaktadır.

Çizelge 4. 1 Farklı türlerdeki laktat dehidrogenaz enzimlerinin pirüvat için kinetik değerlerinin karşılaştırılması

Steady State Kinetik sabiti	PfLDH	TgLDH-1	TgLDH-2	PbLDH	PolDH	PmLDH	PvLDH	River Buffalo LDH
K_M (μM)	30 ⁽²⁾ 49 (± 6) ⁽³⁾ 30 ± 3 ⁽⁴⁾ 55 ± 7 ⁽⁵⁾ 54 $\pm 3,3$ ⁽⁷⁾ 51 ± 2 ⁽¹⁰⁾	120 ⁽¹⁾ 359 ⁽⁹⁾	800 ⁽¹⁾	57 (± 20) ⁽³⁾	71 (± 4) ⁽⁴⁾	140 ± 18 ⁽⁴⁾	37,8 ⁽⁶⁾ 17 ± 1 ⁽⁴⁾ 52 ± 2 ⁽¹⁰⁾	41 ⁽⁸⁾
K_{cat} (min^{-1})	(5,6 $\pm 0,18$) $\times 10^3$ ⁽³⁾ (8,9 $\pm 0,3$) $\times 10^3$ ⁽⁴⁾ 5,7 $\times 10^3$ ⁽⁵⁾ (2,2 \pm 0,08) $\times 10^4$ ⁽⁷⁾ 2,7 $\times 10^4$ ⁽²⁾ 1,9 $\times 10^3$ ⁽¹⁰⁾	3,5 $\times 10^4$ ⁽¹⁾	4,6 $\times 10^3$ ⁽¹⁾	(6,6 $\pm 0,06$) $\times 10^3$ ⁽³⁾	(1,6 $\pm 0,03$) $\times 10^4$ ⁽⁴⁾	(7,5 $\pm 0,3$) $\times 10^3$ ⁽⁴⁾	(7,6 $\pm 0,2$) $\times 10^3$ ⁽⁴⁾ 1,9 $\times 10^3$ ⁽⁶⁾ 1,9 $\times 10^3$ ⁽¹⁰⁾	
K_{cat}/K_M	9,0 $\times 10^8$ ⁽²⁾ 3,0 $\times 10^8$ ⁽⁴⁾ 6,7 $\cdot 10^6$ ⁽⁵⁾ 4,1 $\times 10^8$ ⁽⁷⁾	2,9 $\times 10^8$ ⁽¹⁾	5,8 $\times 10^6$ ⁽¹⁾	2,3 $\times 10^8$ ⁽⁴⁾			4,4 $\times 10^8$ ⁽⁴⁾	
K_i mM	57 (± 9) ⁽³⁾ 82 ± 5 ⁽¹⁰⁾	31 ⁽⁹⁾		66 (± 4) ⁽³⁾			25 ± 2 ⁽¹⁰⁾	

¹C. Dando vd., 2001; ²M.S. Gomez vd., 1997; ³V.J. Winter vd., 2003; ⁴Brown vd., 2004; ⁵D. K. Shoemark vd, 2007; ⁶Özal M, 2009; ⁷R. Berwa vd 2008; ⁸M.S.Nadeemvd., 2011; ⁹Kavanagh vd., 2004; ¹⁰Chaikvad. Vd., 2005.

Enzimin aktivite değerinin yüksek substrat konsantrasyonunda azalması substrat inhibisyonu olarak adlandırılmaktadır. Substrat inhibisyonu olmayan ilk LDH 163. pozisyonda lösin bulunduran *PfLDH* olarak bildirilmiştir [63]. *Toxoplasma gondii*'nin LDH1 ve LDH2 enzimlerinin 163. pozisyonunda metiyonin bulunmaktadır. Ancak LDH2 yüksek substrat konsantrasyonunda inhibe olmamakta, LDH1 ise inhibe olmaktadır. Substrat inhibisyonun sebebi 163. pozisyonda bulunan amino asitlerin bağlanmasıyla açıklanmaktadır. Metiyoninin karbonil oksijeni, nikotinamid dinkleotitin nitrojeni ile hidrojen bağı kurmaktadır. Metiyonin yan zinciri, 163. Pozisyonda Serinin amino asidi olduğu durumda O_{γ} molekülüne bağlanan su molekülünün bağlanmasını engellemektedir ve su molekülü kofaktöre affinite sağlayarak, substrat inhibisyonunu arttırıcı ve ayrılmayı azaltıcı bir etki göstermektedir [59].

Substrat inhibisyonunun ortadan kaldırılması için İnsan LDHA4 [63] LDHB4 [68] ve *BsLDH*'da [64] 163. pozisyondaki serin amino asidi lösin amino asidine çevrilmiştir. Yapılmış olan literatür araştırmasına göre *Toxoplasma gondii*'nin LDH1 enzimi şu ana kadar çalışılmış olan Apikomplexan LDH'ları arasında substrat inhibisyonu gösteren tek LDH enzim olup 163. pozisyonunda metiyonin bulundurmaktadır [59]. *Theileria annulata* LDH'nin da bu tez çalışmasında ilk defa kinetik analizi gerçekleştirilmiş ve substrat inhibisyonu analiz edilmiştir.

Kinetik karakterizasyonu yapılan *Theileria annulata* laktat dehidrogenaz enziminin homoloji modellemesi yapılarak üç boyutlu yapısı oluşturulmuşturElde edilen üç boyutlu yapının konak laktat dehidrogenaz enziminin modeli ile süperimpozisyonu yapılmış ve alignment ile farkedirilen 98-109 rezidüler arasında yer alan NEEWN insersiyonu gösterilmiştir. Bu bölgenin seçici inhibisyonunda üstünlük sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca enzimin aktif bölgesi belirlenerek muhtemel ilaç bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. Belirtilen bölgeler arasında insersiyonu içeren aktif bölge ve hem substrat hem de kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotit bağlanma bölgeleri yer almaktadır.

4.2 Öneriler

Bu tez çalışması ile *Ta*LDH proteininden elde edilen sonuçların kullanılmasıyla;

1. Substrat inhibisyonunda etkili olan 163. pozisyondaki metiyoninin lösin amino asidi ile yer değiştirilmesi ve substrat inhibisyonuna olan etkisinin görülmesi,
2. Konak ve parazit laktat dehidrogenazı ile yapılan eşleştirmeler göz önüne alınarak; belirlenen insersiyon bölgesinin çalışılarak enzim aktivitesine olan etkisinin görülmesi,
3. Belirlenen bu bölge için seçilen bileşikler ile docking yapılarak inhibitör çalışmalarının gerçekleştirilmesi,
4. İnhibitörler ile muamele edilen enzimin kinetik karakterizasyonunun yapılması,
5. Protein için belirlen inhibitörlerin kullanılması ile yeni ilaç tasarımına yönelik *in vivo* çalışmalarının yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Mandal, S. Moudgil, M. ve Mandal, S.K., (2009). "Rational drug design", *Eur J Pharmacol*, 625: 90-100.
- [2] Reddy, P.R., TS.; Krushna, GS., (2011). "Advantages of Bio and Cheminformatics tools in drug design", *Current Research in Drug Targeting*, 1: 6-17.
- [3] Anderson, A.C., (2003). "The Process of Structure-Based Drug Design", *Chemistry & Biology*, 10: 787-797.
- [4] Pugazhenti, D.R.S., (2007). "An Approache to Molecular Drug Target and Structure Based Drug Design.pdf", *Research Journal of Pharmacology*, 1: 50-55.
- [5] Agrawal, P., (2013). "Structure Based Drug Design", *Pharmacovigilance*, 1.
- [6] Nelson, D.L. Lehninger, A.L. ve Cox, M.M., (2008). *Lehninger principles of biochemistry*: Macmillan.
- [7] Dunn CR, B.M., Barker JJ, Higham CW, Moreton KM, Turgut-Balik D, Brady RL, Holbrook JJ., (1996). "The structure of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* reveals a new target for anti-malarial design", *Nat Struct Biol*, 3: 912-915.
- [8] Lombardino, J.G. ve Lowe, J.A., (2004). "The role of the medicinal chemist in drug discovery--then and now", *Nat Rev Drug Discov*, 3: 853-862.
- [9] Kuntz, I., (1992). "Structure-Based Strategies for drug design and discovery", *Science*, 257: 1078-1082.
- [10] "Yapıya Dayandırılmış İlaç Tasarımının Baamakları", Available at: <http://www.cmbi.ru.nl/redock/images/SBDD.png>. Accessed.
- [11] Pekcan, M. NalbantoğLu, S. FİDanci, U.R. ve Sel, T., (2013). "Türkiye'de *Theileria annulata* Suşlarının Karakterizas[1] Mandal, S. Moudgil, M. ve Mandal, S.K., (2009). "Rational drug design", *Eur J Pharmacol*, 625: 90-100.
- [2] Reddy, P.R., TS.; Krushna, GS., (2011). "Advantages of Bio and Cheminformatics tools in drug design", *Current Research in Drug Targeting*, 1: 6-17.

- [3] Anderson, A.C., (2003). "The Process of Structure-Based Drug Design", *Chemistry & Biology*, 10: 787-797.
- [4] Pugazhenth, D.R.S., (2007). "An Approache to Molecular Drug Target and Structure Based Drug Design.pdf", *Research Journal of Pharmacology*, 1: 50-55.
- [5] Agrawal, P., (2013). "Structure Based Drug Design", *Pharmacovigilance*, 1.
- [6] Nelson, D.L. Lehninger, A.L. ve Cox, M.M., (2008). *Lehninger principles of biochemistry*: Macmillan.
- [7] Dunn CR, B.M., Barker JJ, Higham CW, Moreton KM, Turgut-Balik D, Brady RL, Holbrook JJ., (1996). "The structure of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* reveals a new target for anti-malarial design", *Nat Struct Biol*, 3: 912-915.
- [8] Lombardino, J.G. ve Lowe, J.A., (2004). "The role of the medicinal chemist in drug discovery--then and now", *Nat Rev Drug Discov*, 3: 853-862.
- [9] Kuntz, I., (1992). "Structure-Based Strategies for drug design and discovery", *Science*, 257: 1078-1082.
- [10] "Yapıya Dayandırılmış İlaç Tasarımının Baamakları", <http://www.cmbi.ru.nl/redock/images/SBDD.png>. 01,05,2014
- [11] Pekcan, M. Nalbantoğlu, S. Fıdancı, U.R. ve Sel, T., (2013). "Türkiye’de *Theileria annulata* Suşlarının Karakterizasyonu ve Tür İdentifikasyonunda Glukoz Fosfat İzomeraz İzoenzim Elektrofrezisi", *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19: 319-323.
- [12] Bishop, R. Musoke, A. Morzaria, S. Gardner, M. ve Nene, V., (2004). "*Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks", *Parasitology*, 129: S271-S283.
- [13] Weir, W., (2006). *Genomic and Population Genetic Studies On Theileria Annulata*, eds. Division of Veterinary Infection and Immunity. University of Glasgow.
- [14] Pain, A. Renauld, H. Berriman, M. Murphy, L. Yeats, C.A. Weir, W. Kerhornou, A. Aslett, M. Bishop, R. Bouchier, C. Cochet, M. Coulson, R.M. Cronin, A. de Villiers, E.P. Fraser, A. Fosker, N. Gardner, M. Goble, A. Griffiths-Jones, S. Harris, D.E. Katzer, F. Larke, N. Lord, A. Maser, P. McKellar, S. Mooney, P. Morton, F. Nene, V. O’Neil, S. Price, C. Quail, M.A. Rabbinowitsch, E. Rawlings, N.D. Rutter, S. Saunders, D. Seeger, K. Shah, T. Squares, R. Squares, S. Tivey, A. Walker, A.R. Woodward, J. Dobbelaere, D.A. Langsley, G. Rajandream, M.A. McKeever, D. Shiels, B. Tait, A. Barrell, B. ve Hall, N., (2005). "Genome of the host-cell transforming parasite *Theileria annulata* compared with *T. parva*", *Science*, 309: 131-133.
- [15] "*Theileria* lecture note", http://classes.uofk.edu/file.php/700/Undergrads/Theileria_lecture_note_PDF.pdf. 13.04.2014.

- [16] Bishop R. , M.A., Skilton R. , Morzaria S. , Gardner M. , NeneV. , (2008). *Theileria*: life cycle stages associated with the ixodid tick vector, P.A.N. Alan S. Bowman, ed. Ticks- Biology, Disease and Control. Cambridge University Press,.
- [17] Karagenc, T., (1999). Diagnostic methods for epidemiological studies of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection of cattle), ed^eds.: Philosophy University of Edinburgh.
- [18] Gardner MJ, B.R., Shah T, de Villiers EP, Carlton JM, Hall N, Ren Q, Paulsen IT, Pain A, Berriman M, Wilson RJ, Sato S, Ralph SA, Mann DJ, Xiong Z, Shallom SJ, Weidman J, Jiang L, Lynn J, Weaver B, Shoaibi A, Domingo AR, Wasawo D, Crabtree J, Wortman JR, Haas B, Angiuoli SV, Creasy TH, Lu C, Suh B, Silva JC, Utterback TR, Feldblyum TV, Perteau M, Allen J, Nierman WC, Taracha EL, Salzberg SL, White OR, Fitzhugh HA, Morzaria S, Venter JC, Fraser CM, Nene V., (2005). "Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes", *Science.*, 309: 134-137.
- [19] Shaw, M.K., (2002). *Theileria* development and host cell invasion, ed. *Theileria*. Springer, 1-22.
- [20] Shaw, M.K., (1997). "The same but different: the biology of *Theileria* sporozoite entry into bovine cells", *Int J Parasitol*, 27: 457-474.
- [21] Shaw, M.K. Tilney, L.G. ve Musoke, A.J., (1991). "The entry of *Theileria parva* sporozoites into bovine lymphocytes: evidence for MHC class I involvement", *The Journal of Cell Biology*, 113: 87-101.
- [22] Jura, W.G.Z.O. Brown, C.G.D. ve Kelly, B., (1983). "Fine structure and invasive behaviour of the early developmental stages of *Theileria annulata* in vitro", *Vet Parasitol*, 12: 31-44.
- [23] Marcelino, I. de Almeida, A.M. Ventosa, M. Pruneau, L. Meyer, D.F. Martinez, D. Lefrancois, T. Vachier, N. ve Coelho, A.V., (2012). "Tick-borne diseases in cattle: applications of proteomics to develop new generation vaccines", *J Proteomics*, 75: 4232-4250.
- [24] Nazifi, S. Razavi, S.M. Mansourian, M. Nikahval, B. ve Moghaddam, M., (2008). "Studies on correlations among parasitaemia and some hemolytic indices in two tropical diseases (theileriosis and anaplasmosis) in Fars province of Iran", *Tropical Animal Health and Production*, 40: 47-53.
- [25] Alsaad K.M. , S.E.G., Al-Obaidi Q.T. , (2013). "Theileriosis In Newborn Calves In Mosul, Iraq", *Bas.J.Vet.Res.*, 12.
- [26] Oryan, A. Namazi, F. Sharifiyazdi, H. Razavi, M. ve Shahriari, R., (2013). "Clinicopathological findings of a natural outbreak of *Theileria annulata* in cattle: an emerging disease in southern Iran", *Parasitol Res*, 112: 123-127.
- [27] Temiz, M. Altug, N. ve Yüksek, N., (2014). "Relationship between degree of anemia and blood gases in cattle with theileriosis", *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 38: 82-87.
- [28] "Distribution of *theileria* spp in the world.", <http://www.theileria.org/ahdw/pictures/largemap.gif>. 02.03.2014

- [29] Ahmed J., Y.H., Bakheit M., Liu Z., Mehlhorn H., Seitzer U., (2011). Small ruminant Theileriosis, H. Mehlhorn, ed. Progress in Parasitology. Springer.
- [30] Dumanli, N. Aktas, M. Cetinkaya, B. Cakmak, A. Koroglu, E. Saki, C.E. Erdogmus, Z. Nalbantoglu, S. Ongor, H. Simsek, S. Karahan, M. ve Altay, K., (2005). "Prevalence and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey", Vet Parasitol, 127: 9-15.
- [31] Sayin F., D.Ş., Karaer Z., Çakmak A., İnci A., Yukarı BA., Eren H., Vatanserver Z., Nalbantoglu S., (2003). "Studies on the Epidemiology of Tropical Theileriosis (Theileria annulata Infection) in Cattle in Central Anatolia, Turkey.", Tropical Animal Health and Production, 35: 521-539.
- [32] Karagenç T. , A.N., Bakirci S. ,Aypak S. ,Eren H., (2005). "Aydın İli Sığırlarında Theileria annulata Seroprevelansı", 14. Ulusal Parazitoloji Kongresi. İzmir.
- [33] Kaya, G.C., A.; Karaer, Z., (2006). "Seroprevalence of theileriosis and babesiosis of cattle ", Medycyna Weterynaryjna, 62: 156-158.
- [34] İnci A, İ.A., Yildirim A, Vatanserver Z, Cakmak A, Albasan H, Cam Y, Ataserver A, Duzlu O., (2008). "Epidemiology of tropical theileriosis in the Cappadocia region", Turkish Journal Of Veterinary & Animal Sciences, 32: 57-64.
- [35] Aysul N., K.T., Eren H., Aypak S., Bakirci S., (2008). "Aydın İli Sığırlarında Tropikal Theileriosisin Yaygınlığı ve Theileria annulata Şizont Aşısının Sahada Etkinliğinin Değerlendirilmesi", Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32: 322-327.
- [36] Sevgili M., C.A., , Gokcen A., Altas MG., ErgunG., (2010). "Prevalence of Theileria annulata and Babesia bigemina in Cattle in the Vicinity of Sanliurfa", Journal of Animal and Veterinary Advances, 9.
- [37] İnci, A. İca, A. Yildirim, A. Vatanserver, Z. Cakmak, A. Albasan, H. Cam, Y. Ataserver, A. Sariozkan, S. ve Duzlu, O., (2007). "Economic impact of tropical theileriosis in the Cappadocia region of Turkey", Parasitol Res, 101 Suppl 2: S171-174.
- [38] Singh, D.K. Thakur, M. Raghav, P.R.S. ve Varshney, B.C., (1993). "Chemotherapeutic trials with four drugs in crossbred calves experimentally infected with Theileria annulata", Research in Veterinary Science, 54: 68-71.
- [39] S., P., (2008). "Therapeutic efficacy of buparvaquone (buparvon) in cattle with theileriosis", Türkiye Parazitoloji Derg., 32: 317-321.
- [40] Mhadhbi, M.N., A.; Boumiza, A.; Chaabani, M. F.; BenAbderazzak, S.; Darghouth, M. A., (2010). "In vivo evidence for the resistance of Theileria annulata to buparvaquone", Vet Parasitol, 169: 241-247.
- [41] Srivastava, I.K. Morrisey, J.M. Darrouzet, E. Daldal, F. ve Vaidya, A.B., (1999). "Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites", Molecular microbiology, 33: 704-711.
- [42] McFadden, D.C. Tomavo, S. Berry, E.A. ve Boothroyd, J.C., (2000). "Characterization of cytochrome b from Toxoplasma gondii and

- Q_o domain mutations as a mechanism of atovaquone-resistance", *Molecular and biochemical parasitology*, 108: 1-12.
- [43] Walker, D.J. Wakefield, A.E. Dohn, M.N. Miller, R.F. Baughman, R.P. Hossler, P.A. Bartlett, M.S. Smith, J.W. Kazanjian, P. ve Meshnick, S.R., (1998). "Sequence polymorphisms in the *Pneumocystis carinii* cytochrome b gene and their association with atovaquone prophylaxis failure", *Journal of Infectious Diseases*, 178: 1767-1775.
- [44] Sharifiyazdi, H. Namazi, F. Oryan, A. Shahriari, R. ve Razavi, M., (2012). "Point mutations in the *Theileria annulata* cytochrome b gene is associated with buparvaquone treatment failure", *Vet Parasitol*, 187: 431-435.
- [45] Witschi, M. Xia, D. Sanderson, S. Baumgartner, M. Wastling, J.M. ve Dobbelaere, D.A., (2013). "Proteomic analysis of the *Theileria annulata* schizont", *International journal for parasitology.*, 43: 173-180.
- [46] Kiama TN, K.J., Konji VN, Musoke AJ., (1999). "Enzymes of Glucose and Glycerol Catabolism in in vitro Propagated *Theileria parva* Schizonts", *Veterinary journal*, 158: 221-227.
- [47] Møller, C.L.M.a.F., (1959). "Multiple forms of Enzyme: Tissue, Ontogenetic, and Species Specific Patterns", *PNAS*, 45: 753-763.
- [48] Bellamacina, C.R., (1996). "The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins.", *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10: 1257-1269.
- [49] Hou, R. Chen, Z. Yi, X. Bian, J. ve Xu, G., (2000). "Catalytic reaction mechanism of L-lactate dehydrogenase: an ab initio study", *Science in China Series B: Chemistry*, 43: 587-599.
- [50] Al-Anouti, F. Tomavo, S. Parmley, S. ve Ananvoranich, S., (2004). "The expression of lactate dehydrogenase is important for the cell cycle of *Toxoplasma gondii*", *J Biol Chem*, 279: 52300-52311.
- [51] Read JA, W.V., Eszes CM, Sessions RB, Brady RL., (2001). "Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase.", *Proteins*, 43: 175-185.
- [52] White, J.L. Hackert, M.L. Buehner, M. Adams, M.J. Ford, G.C. Lentz Jr, P.J. Smiley, I.E. Steindel, S.J. ve Rossmann, M.G., (1976). "A comparison of the structures of apo dogfish M4 lactate dehydrogenase and its ternary complexes", *Journal of Molecular Biology*, 102: 759-779.
- [53] Grau, U.M. Trommer, W.E. ve Rossmann, M.G., (1981). "Structure of the active ternary complex of pig heart lactate dehydrogenase with S-lac-NAD at 2.7 Å resolution", *Journal of Molecular Biology*, 151: 289-307.
- [54] Dunn CR, W.H., Halsall DJ, Atkinson T, Clarke AR, Muirhead H, Holbrook JJ., (1991). "Design and Synthesis of New Enzymes Based on the Lactate Dehydrogenase Framework", *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 332: 177-184.

- [55] Piontek K., C.P., Schär H.P., Rossmann M.G., and Zuber H., (1990). "Structure determination and refinement of *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 7: 74-92.
- [56] Iwata, S. ve Ohta, T., (1993). "Molecular Basis of Allosteric Activation of Bacterial L-Lactate Dehydrogenase", *Journal of Molecular Biology*, 230: 21-27.
- [57] Chaikuad A, F.V., Connors R, Joseph-Horne T, Turgut-Balik D, Brady RL., (2005). "Structure of lactate dehydrogenase from *Plasmodium vivax*: complexes with NADH and APADH.", *Biochemistry*, 44: 16221-16228.
- [58] Pineda, J.R. Callender, R. ve Schwartz, S.D., (2007). "Ligand binding and protein dynamics in lactate dehydrogenase", *Biophys J*, 93: 1474-1483.
- [59] Kavanagh KL, E.R., Wilson DK., (2004). "Structure of *Toxoplasma gondii* LDH1: active-site differences from human lactate dehydrogenases and the structural basis for efficient APAD+ use.", *Biochemistry.*, 43: 879-889.
- [60] Holbrook J J. , G.H., (1973). "Approaches to the study of enzyme mechanisms lactate dehydrogenase.", *FEBS letters*, 31: 157-169.
- [61] Adams MJ, B.M., Chandrasekhar K, Ford GC, Hackert ML, Liljas A, Rossmann MG, Smiley IE, Allison WS, Everse J, Kaplan NO, Taylor SS., (1973). "Structure-Function Relationships in Lactate Dehydrogenase.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70: 1968-1972.
- [62] Turgut Balik, D., Overproduction Of The Enzyme Lactate Dehydrogenase Opens A Route To The Design Of New Antimalarials, ed^eds. Medikal Bilimler, Moleküler Tanıma Merkezi. Bristol Üniversitesi.
- [63] Hewitt C.O., E.C.M., Sessions R.B., Moreton K.M., Dafforn T.R., Takei J., Dempsey C.E., Clarke A.R., Holbrook J.J. , (1999). " A general method for relieving substrate inhibition in lactate dehydrogenases", *Protein Eng*, 12: 491-496.
- [64] Hewitt CO, S.R., Dafforn TR, Holbrook J.J. , (1997). "Protein engineering tests of a homology model of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase", *Protein Eng*, 10: 39-44.
- [65] Turgut Balik, D.a.J.J.H., (2001). "Determination of the DNA and aminoacid sequences of lactate dehydrogenase gene from *Plasmodium falciparum* strains K1 and PF FCBR: A route to the design of new antimalarials", *Turkish Journal of Biology*, 25: 241-250.
- [66] Turgut-Balik, D., D. Shoemark, K. M. Moreton, R.B. Sessions, and J. J. Holbrook, (2001). "Over-production of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* opens a route to new antimalarials", *Biotechnology Letters*, 239: 917-921.
- [67] Cameron A., R.J., Tranter R., Winter VJ., Sessions RB., Brady RL., Vivas L., Easton A., Kendrick H., Croft SL., Barros D., Lavandera JL., Martin JJ., Risco F., Garcí'a-Ochoa S., Gamo FJ., Sanz L., Leon L., Ruiz JR., Gabarro R., Mallo A., and Gómez de las Heras F., (2004). "Identification and Activity of a Series of Azole-

- based Compounds with Lactate Dehydrogenase-directed Anti-malarial Activity", *Journal of Biological Chemistry*, 279: 31429-31439.
- [68] Eszes CM, S.R., Clarke AR, Moreton KM, Holbrook JJ, (1996). "Removal of substrate inhibition in a lactate dehydrogenase from human muscle by a single residue change", *FEBS Lett.*, 399: 193-197.
- [69] Dilek Turgut-Balik, D.K.S., Richard B. Sessions, Kathleen M. Moreton, J. John Holbrook, (2001). "Mutagenic exploration of the active site of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*", *Biotechnology Letters*, 23: 923-927.
- [70] Scientific, T.F., "Thermo Scientific aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System".
http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/coa_k1291.pdf.
19.03.2014
- [71] Erdemir A Aktas M Dumanli N ve Turgut-Balik D, (2012). "Isolation, cloning and sequence analysis of the lactate dehydrogenase gene from *Theileria annulata* may lead to design of new antitheatrical drugs", *Veterinari Medicina*, 57: 559-562.
- [72] Sambrook, J., Russell, D.W., (2001). *Molecular Cloning A Laboratory Manual I-II-II*, New York: CSHL Press.
- [73] Corporation, P., (2010). "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Quick Protocol".
<http://worldwide.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/101/Wizard%20SV%20Gel%20and%20PCR%20Clean-Up%20System%20Protocol.pdf>. 23.03.2014
- [74] Shoemark, D., (2000). The kinetic characterization of the lactate dehydrogenase enzyme from *Plasmodium falciparum*, ed^eds. Department of biochemistry. Bristol University.
- [75] Laemmli, U.K., (1970). "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature*, 227: 680-685.
- [76] Corporation, P., (2010). "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System Protocol".
<http://worldwide.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/Wizard%20Plus%20SV%20Minipreps%20DNA%20Purification%20System%20Protocol.pdf>. 23.03.2014
- [77] Qiagen, Q., (2003). "A handbook for high - level expression and purification of 6xhis - tagged proteins".
http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAexpressionist_EN.pdf. 23.04.2014
- [78] " Peptide Property Calculator",
<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html>. 23.04.2014

- [79] Grimsley, G.R., Pace, C.N., (2003). Current Protocols in Protein Science, ed. New Jersey: John Wiley and Sons. Inc.
- [80] Bassiri, D.E., "EnzymeKinetics-Theory. [http://www.sas.upenn.edu/LabManuals/biol123/Table of Contents files/8d-EnzymeKinetics-Theory.pdf](http://www.sas.upenn.edu/LabManuals/biol123/Table_of_Contents_files/8d-EnzymeKinetics-Theory.pdf). 30.03.2014
- [81] Biology, C.S., (2009). "enzyme_kinetics. [http://www.inf.ed.ac.uk/teaching/courses/csb/CSB lecture enzyme kinetics.pdf](http://www.inf.ed.ac.uk/teaching/courses/csb/CSB_lecture_enzyme_kinetics.pdf). 30.03.2014
- [82] Nelson DL., C.M., (2008). Enzymes, ed. Lehninger's Principles of Biochemistry. 183-227.
- [83] Wang J., A.T., Ogawa T., Matsuoka M., Fukuda H., (1999). "A Method of Graphically Analyzing Substrate-Inhibition Kinetics", Biotechnology and Bioengineering, 62.
- [84] Reed, M.C. Lieb, A. ve Nijhout, H.F., (2010). "The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions", Bioessays, 32: 422-429.
- [85] Eisenthal, R. Danson, M.J. ve Hough, D.W., (2007). "Catalytic efficiency and k_{cat}/K_M : a useful comparator?", Trends in biotechnology, 25: 247-249.
- [86] Bishop, A. De Beer, T.A. ve Joubert, F., (2008). "Protein homology modelling and its use in South Africa", South African Journal of Science, 104: 2-6.
- [87] Hillisch, A. Pineda, L.F. ve Hilgenfeld, R., (2004). "Utility of homology models in the drug discovery process", Drug discovery today, 9: 659-669.
- [88] "ProteinDataBank, X - ray Resolution", <http://www.rcsb.org/pdb>. 02 05 2014.
- [89] "NCBI,PSI Blast", <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. 02 05 2014.
- [90] "MUSCLE 'Multiple Sequence Alignment'", <https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=muscle-120140507-131345-0643-88742194-pg&analysis=summary>
- [91] Eswar, N. Webb, B. Marti-Renom, M.A. Madhusudhan, M. Eramian, D. Shen, M.y. Pieper, U. ve Sali, A., (2006). "Comparative protein structure modeling using Modeller", Current protocols in bioinformatics: 5.6. 1-5.6. 30.
- [92] Colovos, C. ve Yeates, T.O., (1993). "Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions", Protein Science, 2: 1511-1519.
- [93] Wiederstein, M. ve Sippl, M.J., (2007). "ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins", Nucleic Acids Res, 35: W407-W410.
- [94] Lovell, S.C. Davis, I.W. Arendall, W.B. de Bakker, P.I.W. Word, J.M. Prisant, M.G. Richardson, J.S. ve Richardson, D.C., (2003). "Structure validation by $C\alpha$ geometry: ϕ, ψ and $C\beta$ deviation", Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 50: 437-450.

- [95] McGuffin, L.J. Bryson, K. ve Jones, D.T., (2000). "The PSIPRED protein structure prediction server", *Bioinformatics*, 16: 404-405.
- [96] Volkamer, A. Kuhn, D. Grombacher, T. Rippmann, F. ve Rarey, M., (2012). "Combining global and local measures for structure-based druggability predictions", *Journal of chemical information and modeling*, 52: 360-372.
- [97] Kawabata, T., (2010). "Detection of multiscale pockets on protein surfaces using mathematical morphology", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78: 1195-1211.
- [98] "Gene structure display server",
http://gsds.cbi.pku.edu.cn/GeSS_result.php?ran=E38XC6&scale=0.553111250786. 30.04.2014
- [99] "Cookies on EMBL-EBI website ClustalW2",
<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. 29.03.2014
- [100] "Cookies on EMBL-EBI website Sequence Translation",
http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=emboss_transeq-I20140329-210252-0326-78489261-oy. 29.03.2014
- [101] Wallner, B. ve Elofsson, A., (2005). "All are not equal: a benchmark of different homology modeling programs", *Protein Sci*, 14: 1315-1327.
- [102] Maiti, R. Van Domselaar, G.H. Zhang, H. ve Wishart, D.S., (2004). "SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition", *Nucleic Acids Res*, 32: W590-W594.
- [103] Geourjon, C. ve Deleage, G., (1995). "SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments", *Computer applications in the biosciences: CABIOS*, 11: 681-684.
- [104] Turgut-Balik, D. Sadak, D. ve Celik, 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.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Belma NURAL
Doğum Tarihi ve Yeri :05.05.1989
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :nuralbelma@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2012
Lise	Sayısal/Fen Bilimleri	Kartal Anadolu Lisesi	2007

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2011	TST Tıbbi Aletler	Stajyer
2010	T.C. Maltepe Üniversitesi Hastanesi	Stajyer
2014-devam ediyor	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

YAYINLARI

Makale

1. Yakarsonmez S., Cayir E., Mutlu O, Nural B., Sariyer E., Milward MR., Cooper PR., Turgur-Balik D. Cloning and Analysis Of The Gene Encoding Enolase Enzyme From *Fusobacterium nucleatum* (makale yazım aşamasında)

Bildiri

1. Nural B., Erdemir A., Aktaş M., Dumanlı N., Turgut-Balık D. "Evaluation Of The Lactate Dehydrogenase Gene Sequence Of *Theileria annulata* To Find A Possible Solution For Protein Being Synthesized From Inactive To Active Form." 2nd International Congress of Molecular Biology Association of Turkey. Istanbul, Türkiye, 22-23 Kasım 2013.
2. Nural B., Erdemir A., Turgut-Balık D. " Production of Lactate Dehydrogenase from *Theileria annulata* in High Purity". 2nd International BAU Drug Design Congress. Istanbul, Türkiye, 17-19 Nisan 2014.

ÖDÜLLERİ ve BURSLARI

1. Bölüm Üçüncüsü (2012)
2. Fakülte Üçüncüsü (2012)
3. TUBİTAK BİDEB BURSUSU (Son Sınıf Lisans Öğrencileri İçin Lisansüstü (Yüksek Lisans/Doktora) Burs Programı (2228)) 2012-2014.