

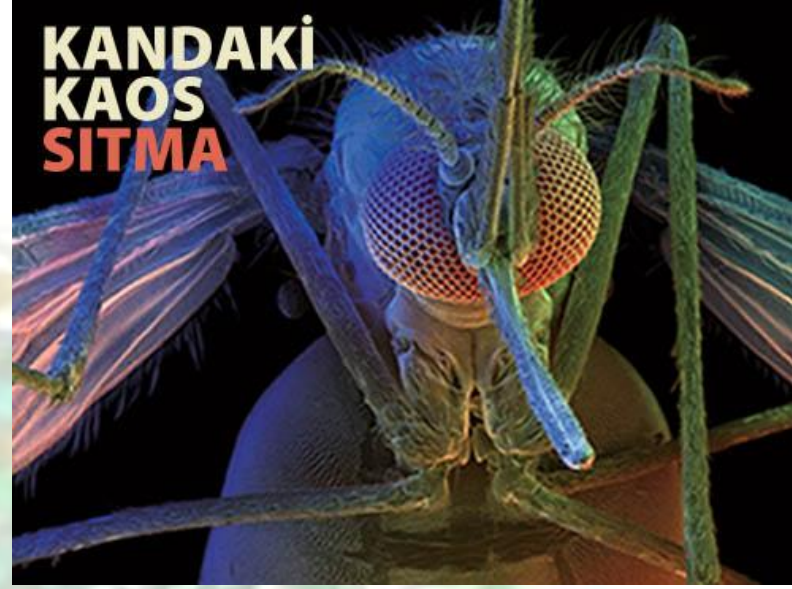


DNA Üzerinde Mutagenezler Yapılarak Enzimlere İstenilen Özelliklerin Kazandırılması

Özgün Mavuk

07056001

SITMA



Mal+aria = kötü hava

- Anofellerin yaşamlarını sürdürebilmeleri ve sivrisinekteki evrimin yürütülebilmesi, tropikal ve subtropikal iklimde, sıcak ve nemli iklim koşullarında; yani, 17-300 °C sıcaklık ve % 60-80 nemde mümkündür.
- Su birikintilerinin sivrisinek yetişmesine imkân sağlaması için derinliğin 70 cm'den az ve suyun hareketsiz olması gereklidir.

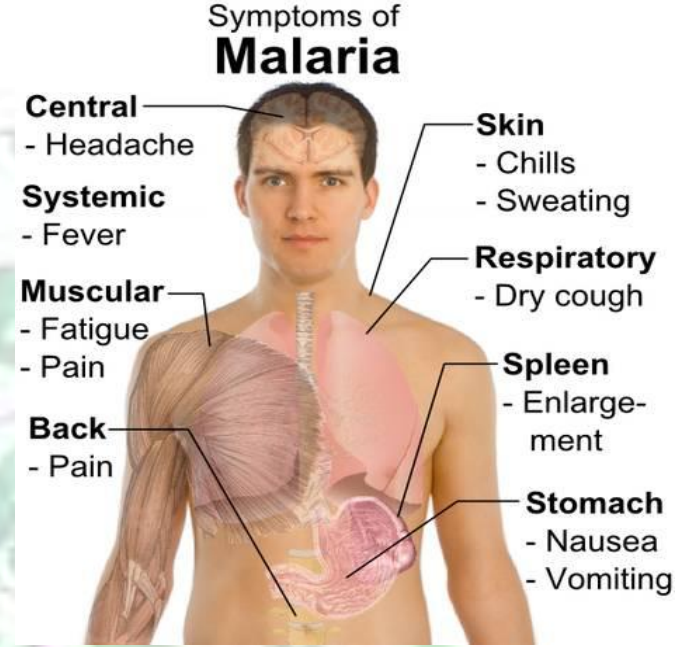
Semptomlar

Birçok hastada tipik sıtma nöbetleri başlamadan önce halsizlik, baş ağrısı, kas ağrısı, kırıklık, hafif ishal gibi 14-30 gün süren prodromal belirtiler görülür. Daha sonra tipik sıtma nöbetleri başlar.

Tipik bir sıtma nöbetinde 3 dönem bulunur;

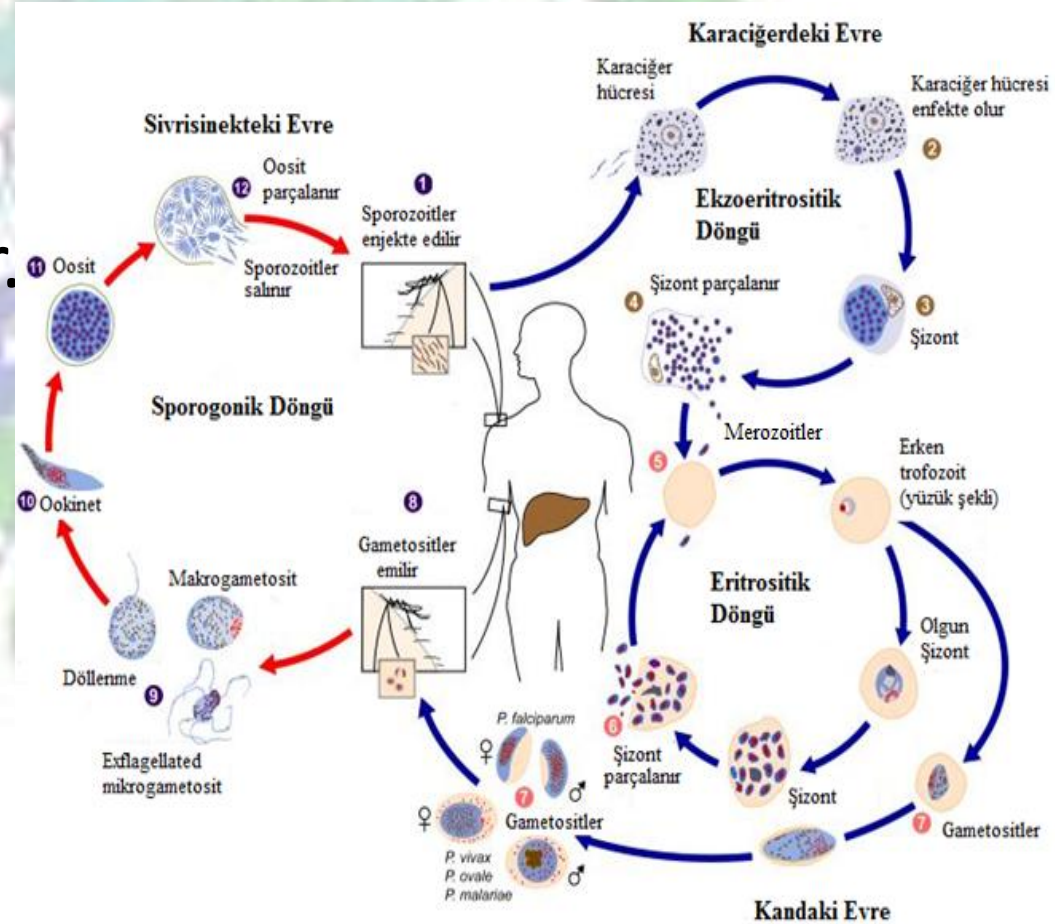
- Üşüme-titreme dönemi: Hasta şiddetli bir üşüme ve titreme hisseder. Bu dönem 30 dk. – 2 saat arasında sürer.
- Ateş Dönemi: Yoğun baş ağrısı ve ateş vardır. Bazen sanrı görülebilir. Ateş 40-41 °C ye kadar yükselebilir. Solunum sık, nabız taşikardiktir. Bu dönem 2-6 saat bazen daha da uzun sürebilir.
- Terleme dönemi: Hastanın ateşi terlemeyle birlikte düşer. Bu dönem 2-3 saat sürer ve çok fazla terleme görülür.

Ateşe bağlı oluşan damar genişlemesi yaşamsal organlara kan akımını azaltır. Bu durumdan tüm dokuların etkilenebilmesine karşın en fazla beyin (serebral sıtma) etkilenir



Yaşam döngüsü

İnsan sıtma parazitinin yaşam döngüsünde Anofel'de omurgasız faz (ekstrinsik faz), insanda omurgalı faz (intrinsik faz) olmak üzere iki dönem vardır.



Omurgasız Canlıdaki Yaşam Döngüsü

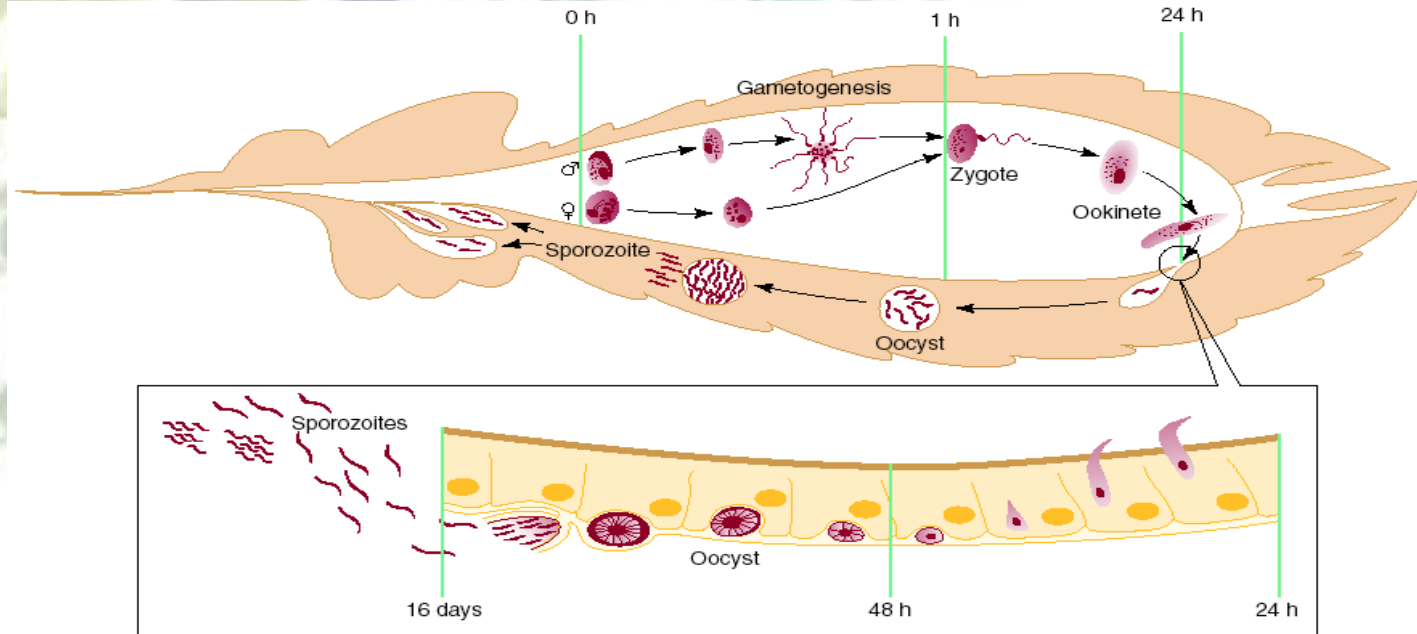
Sıtma parazitleri, sivrisinekte eşeyli üremenin (döllenme) ve sporogoninin görüldüğü iki evre geçirmektedir.

Döllenme:

Mikrogametosit (erkek) ve makrogametosit (dişi), sivrisineğin midesinde hızla gametlere dönüşür. Makrogamet ve mikrogamet in döllenmesiyle zigot meydana gelir ve bundan kısa süre sonra da zigot hareketli ookinete dönüşür. Ookinet mide duvarını delerek mide epitelyum hücreleri ve basal membran arasındaki boşlukta ookist adı verilen yuvarlak şekilli bir duvar oluşturmaktadır

Sporogoni:

Ookist hızla gelişir ve sivrisineğin vücut boşluğuna doğru şişerek binlerce sporozoit meydana getirir. Ookist patlar, sporozoitler sineğin vücut boşluğundan tükürük bezlerine hareket eder. Sivrisinek kan emerken tükürük bezindeki bu sporozoitler konak canlıya geçip konak canlıdaki yaşam döngüsünü başlatır.



Omurgalı Canlıdaki Yaşam döngüsü

Omurgalı konak canlıdaki yaşam döngüsü, karaciğerdeki dönem ve alyuvardaki dönem olmak üzere ikiye ayrılır.

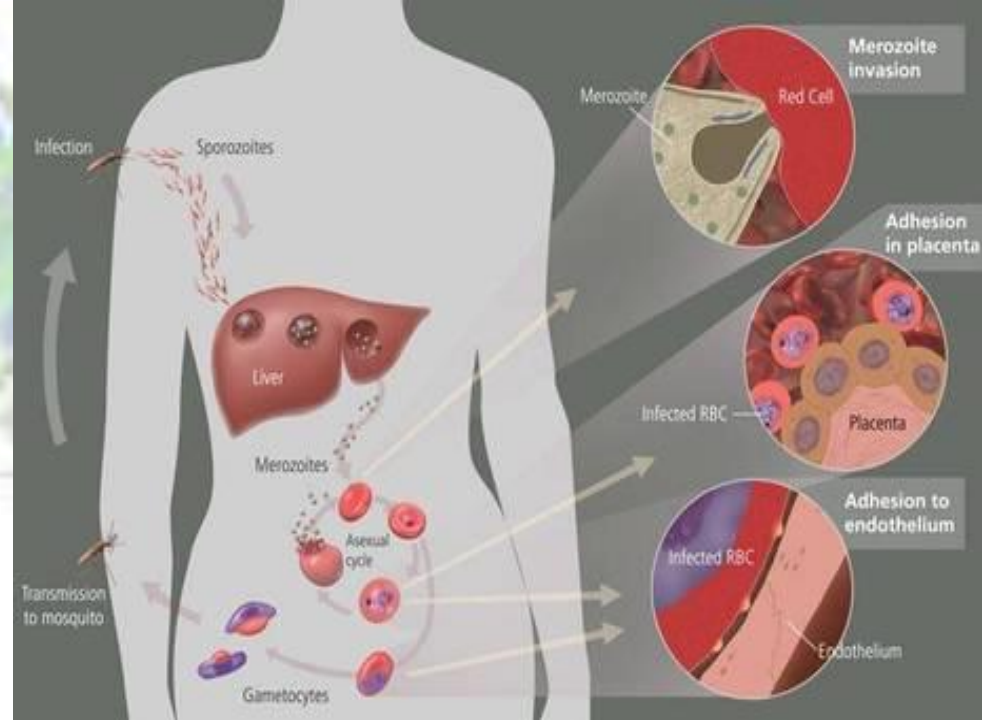
Egzoeritrositik dönem:

Sivrisinek konak canlıdan kan emerken binlerce sporozoit dolaşım sistemine girer. Sporozoitler kan yolu ile eşeysiz üremenin gerçekleşeceği karaciğer hücrelerine girer. Burada çok çekirdekli bir yapı olan hepatik şizontu oluştururlar ve sitoplazmik bölünmeler sonucunda bir karaciğer hücresinde binlerce merozoit oluşur. Karaciğer hücresi patlar, merozoitleri kan dolaşımına karıştırır.

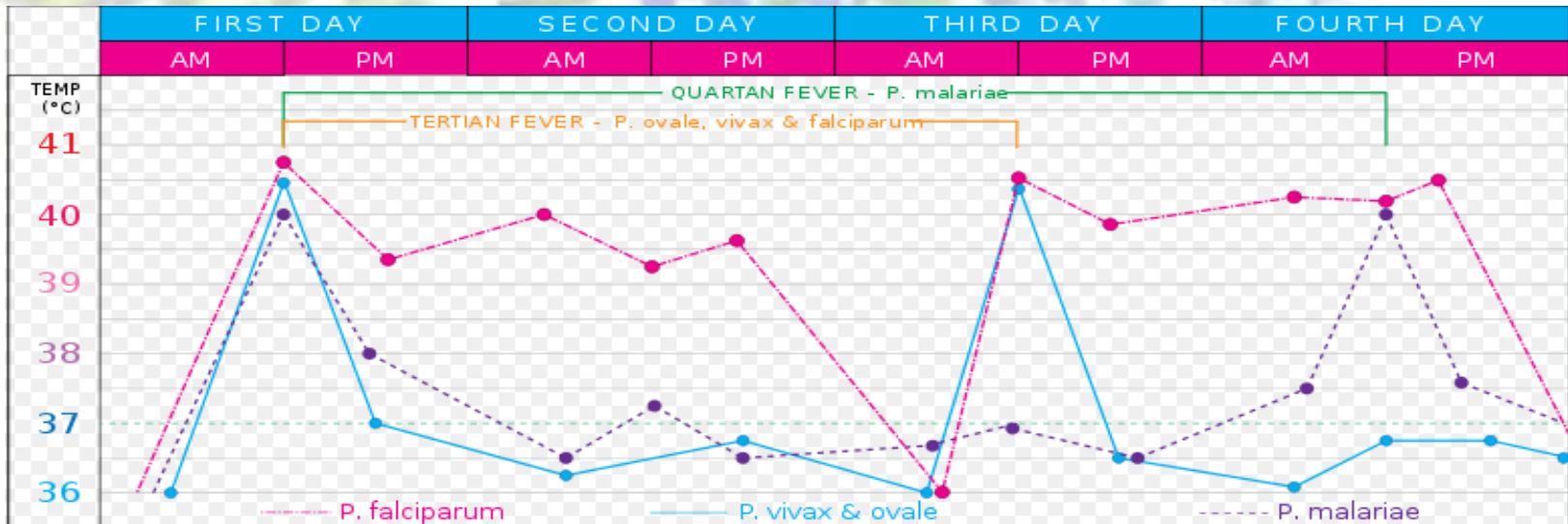
Eritrositik Şizogoni:

Merozoitlerin alyuvarlara girer.Yüzük şeklinde görünen yapı gelişerek çok çekirdekli eritrositik şizontu oluşturur.Şizont eşeysiz bölünerek çok sayıdaki merozoiti oluşturur ve merozoitlerin alyuvarları patlatarak kan dolaşımına katılmasıyla eritrositik şizogoni dönemi tamamlanır. Merozoitlerin yeni bir alyuvara girmesiyle bu eşeysiz dönem tekrarlanır.

Kısa bir zaman sonra bu döngüler belli aralıklarla olmaya başlar.



Her alyuvarın parçalandığı dönemde konak canlıda ateş nöbetleri meydana gelir. Birkaç döngü sonra bazı merozoitler eşey hücreleri olan mikrogametosit ve makrogametositlere dönüşür. Anofel sivrisinekleri, hücreleri kan emerek aldıklarında *Plasmodium*'ların da hayat döngüleri yeniden başlar ve kan dolaşımında kalan gametosit hücreleri ise belirli bir zaman sonra ölür.



Sıtma Parazitleri

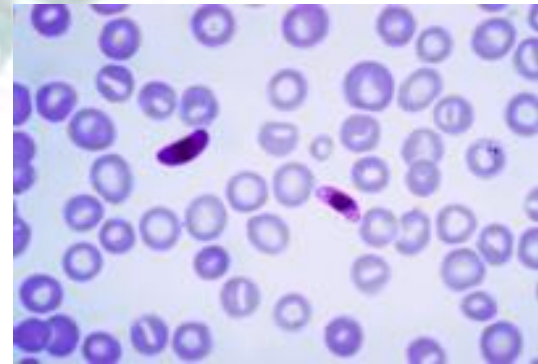
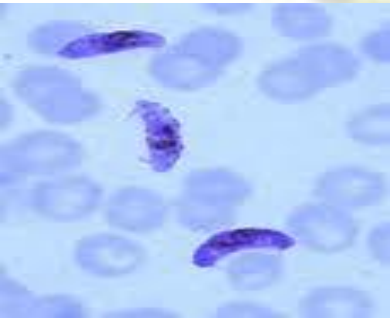
Plasmodium cinsi içinde 200 tür tanımlanmıştır ve yeni türlerin keşfi devam etmektedir. İnsanda hastalık yapan türler; *P.vivax*, *P.malariae*, *P.ovale*, *P.falciparum* ve *P.knowlesi*'dir.

P. falciparum(Afrika ve Güneydoğu Asya) en ölümcül parazitken, *P. vivax* ise dünya çapında en yaygın olan parazittir.*P. ovale*(Batı ve Pasifik yerlilerinde) ve *P.malariae* da, insanlarda genelde ölümcül değildir ve nispeten daha hafif hastalık yapar. *P.knowlesi*(Güneydoğu Asya) mikroskopik tanı aşamasında *P.malariae* ile karıştırılır.

En ağır seyirli sıtmaya *P.falciparum*'un neden olmasının nedenleri;

- her yaştaki eritrositi enfekte edebilmesi
- enfekte eritrositler içinde çok sayıda parazit bulunabilmesi
- enfekte eritrositlerin birbirine ve damar çeperine yapışma özelliği kazanması ve mikrodolaşımı bozup kan akımını azaltmasıdır .

İleri derecede parazitemi vardır ve beyin gibi önemli organlara yerleşme nedeniyle



Sıtmaya Karşı Doğal İmmünite

Plasmodium türlerine karşı insanlarda ırk ve yaşa bağlı bir doğal direnç vardır. Eritrositlerde glukoz-6-fosfat dehidrogenaz(G6PD) eksikliği ve hemoglobin bozuklukları, kişide sıtmaya karşı tolerans sağlar.

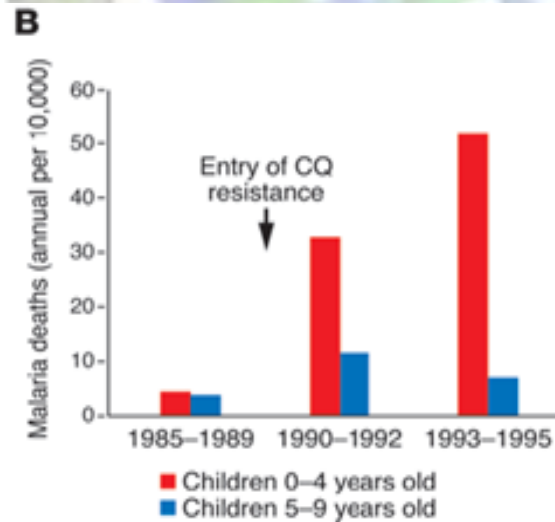
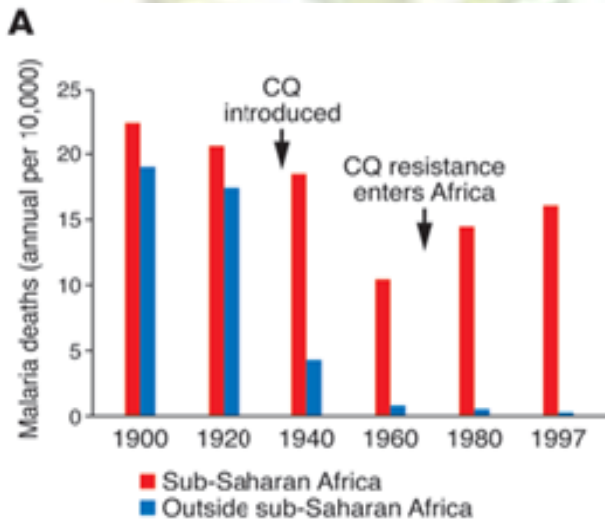
Örneğin Duffy kan grubuna sahip beyazlar, zencilere göre *P.vivax* sıtmasına daha duyarlıdır. Orak hücreli anemisi olanlar da eritrositlerinde taşıdıkları anormal hemoglobin nedeniyle *P.falciparum*'a karşı doğal dirence sahiptirler.

Table 15.11. Human Genetics and Innate Resistance.

Polymorphism	Comment
Duffy-negative	Erythrocytes resistant to <i>P. vivax</i> infection
ovalocytosis	Erythrocytes resistant to merozoite invasion
sickle-cell anemia	Heterozygous individuals exhibit lower parasitemias and less severe disease
thalassemia	Erythrocytes unfavorable for <i>P. falciparum</i> development
G6PD deficiency	Erythrocytes not able to handle increased oxidative stress associated with parasite metabolism

Sıtmanın Dünyadaki Önemi

Sıtma önlenabilir ve tedavi edilebilir olmasına rağmen her yıl yaklaşık 881000 ölüme yol açar(en çok ölüme neden olan 4. enfeksiyon hastalığıdır).Ölümlerin %90'ı Sahra Çölü'nün güney kısmında görülür ve sıtma nedeniyle ölenlerin %85'i beş yaş altı çocuklardır. Bu Afrika'da her 30 saniyede bir çocuğun sıtma nedeniyle öldüğü anlamına gelir.



- En ölümcül tür olan *Plasmodium falciparum*'un sık kullanılan hemen tüm sıtma ilaçlarına karşı direnç gösterdiği gözlenmiştir. Bu durum sıtma endemik bölgelerde yapılan hastalık kontrol çalışmaları önünde büyük bir engel teşkil eder.
- Sıtmanın ekonomik yükü de büyüktür; Afrika ülkelerine her yıl 12 milyar Amerikan dolarına mal olduğu düşünülüyor.
- 2008'de, 45'i Afrika bölgesinde olmak üzere 109 ülkenin sıtma endemik olduğu rapor edildi.
- 2006'da tahminen 247 milyon sıtma olgusu gözlemlendi.
- İklim değişikliğinin ise, 2004'te gerçekleşen dünya çapındaki sıtma nedeniyle ölümlerin %3'ünden sorumlu olduğu belirlendi.
- 3.3 milyar insan sıtmanın bulaşma riskinin olduğu bölgelerde yaşarken, 1.2 milyar insan sıtma riskinin yüksek olduğu bölgelerde yaşamaktadır

Member State	Number of reported cases							
		Cholera ^a	Diphtheria ^b	H5N1 influenza ^{c,d}	Japanese encephalitis ^b	Leprosy ^e	Malaria ^f	Measles ^b
		2007	2008	2007	2007	2007	2007	

RANGES OF COUNTRY VALUES

Minimum		1	0	0	0	0	0	0
Maximum		41 643	3 354	22	4 330	137 685	6 327 916	109 023
Median		179	0	0	0	66	15 712	7

WHO REGION

African Region		110 837	31 037	...	76 408
Region of the Americas		...	103	2 854	...	163
South-East Asia Region		4 327	3 675	...	4 772	169 528	1 477 412	69 301
European Region		...	228	6 949
Eastern Mediterranean Region		...	170	4 089	3 624 395	15 670
Western Pacific Region		2 286	80	9	4 715	5 865	...	112 280

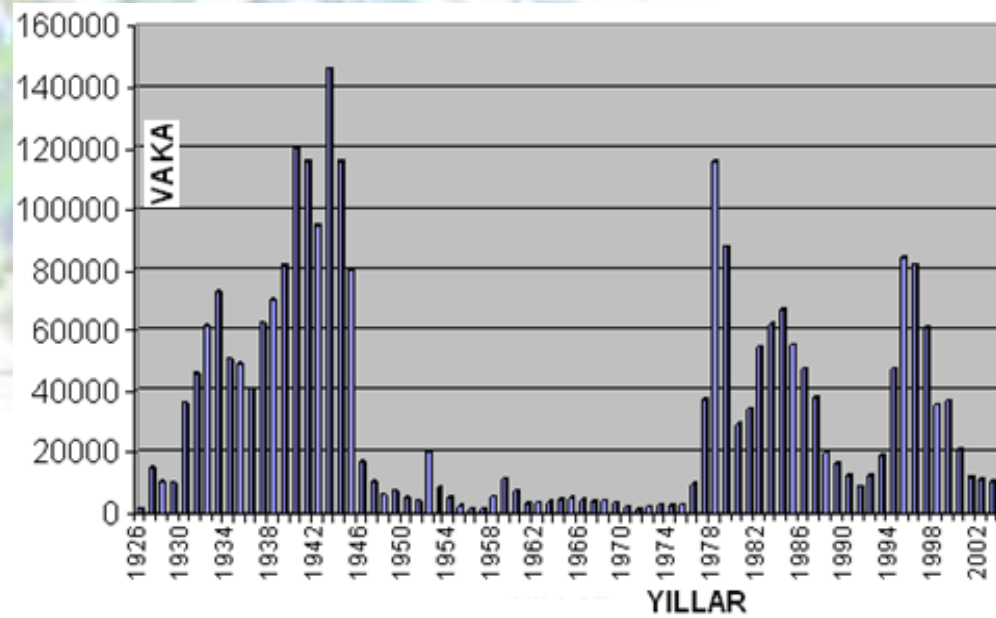
INCOME GROUP

Low income		128 450	410	44 994	...	92 211
Lower middle income		49 281	3 728	...	8 435	166 395	...	177 525
Upper middle income		...	121	1 860	...	1 689
High income		54	14	9 345
Global		177 963	4 273	...	9 487	213 373	...	280 771

Sıtmanın Türkiye'deki Önemi

Ülkemizde sıklıkla *P.vivax* nadiren ise seyahat kaynaklı *P.falciparum* 'un yol açtığı sıtma olguları görülmektedir

- 1924 yılına kadar memleket hastanesine müracaat eden hastaların üçte birinden fazlasının sıtma mikrobu taşıdığı anlaşıldı. 1920 ve 1921 yıllarında ölüm oranları doğum oranlarının 2,5 katına ulaştı.
- Cumhuriyetin ilanından sonra artan bir şekilde sürdürülen sıtma mücadelesi çalışmaları, İkinci Dünya Savaşı yıllarında kesintiye uğradı ve sıtma bu dönemde yeniden canlandı.
- 1955 yılından sonra sıtmanın eradike edilmesi konusunda Dünya Sağlık Örgütü'nün önerileri ile yoğun bir faaliyete geçildi.



- 1990 yılından itibaren sıtma olgularınının %87'si Güney Doğu Anadolu Bölgesindeki illerden bildirildiği görülmüştür. Türkiye'de, Adana, Mersin, Hatay en çok olgunun görüldüğü bölge olup; ikinci sıklık bölgesi Gaziantep ve Diyarbakır gibi güneydoğu illerini içermektedir.
- Türkiye'de sıtmaya en sık Eylül ayında rastlanıldığı bildirilmektedir
- Sıtmanın cinsiyet farkı gözetmeden her iki cinste de görülebildiği bilinmektedir (Akdur R, 1999). Ancak, sıtma görülme sıklığının cinsiyetlere göre dağılımı incelendiğinde kadınlara oranla erkeklerde daha sık görüldüğü bildirilmektedir

Sıtma Metabolizması

- Tek bir sıtma parazitiyle gerçekleşen bir enfeksiyonda 10 milyona kadar yeni organizma oluşturulabilir ve parazitin tüm metabolik faaliyeti bu devasa büyümeyi desteklemeye odaklıdır.
- *Plasmodium*'ların hayat döngüleri boyunca farklı organ ve dokuları istila etmeleri, gelişimleri sırasında değişik ortamlara uyum sağlamak zorunda olmaları, biyokimyasal özelliklerinin oldukça karmaşık bir şekilde gelişmesine neden olmuştur
- *Plasmodium*'ların metabolik gereksinimlerinin büyük çoğunluğunu konak plazmasından ve eritrositlerinden karşılar

Karbonhidratlar ve Enerji Üretimi

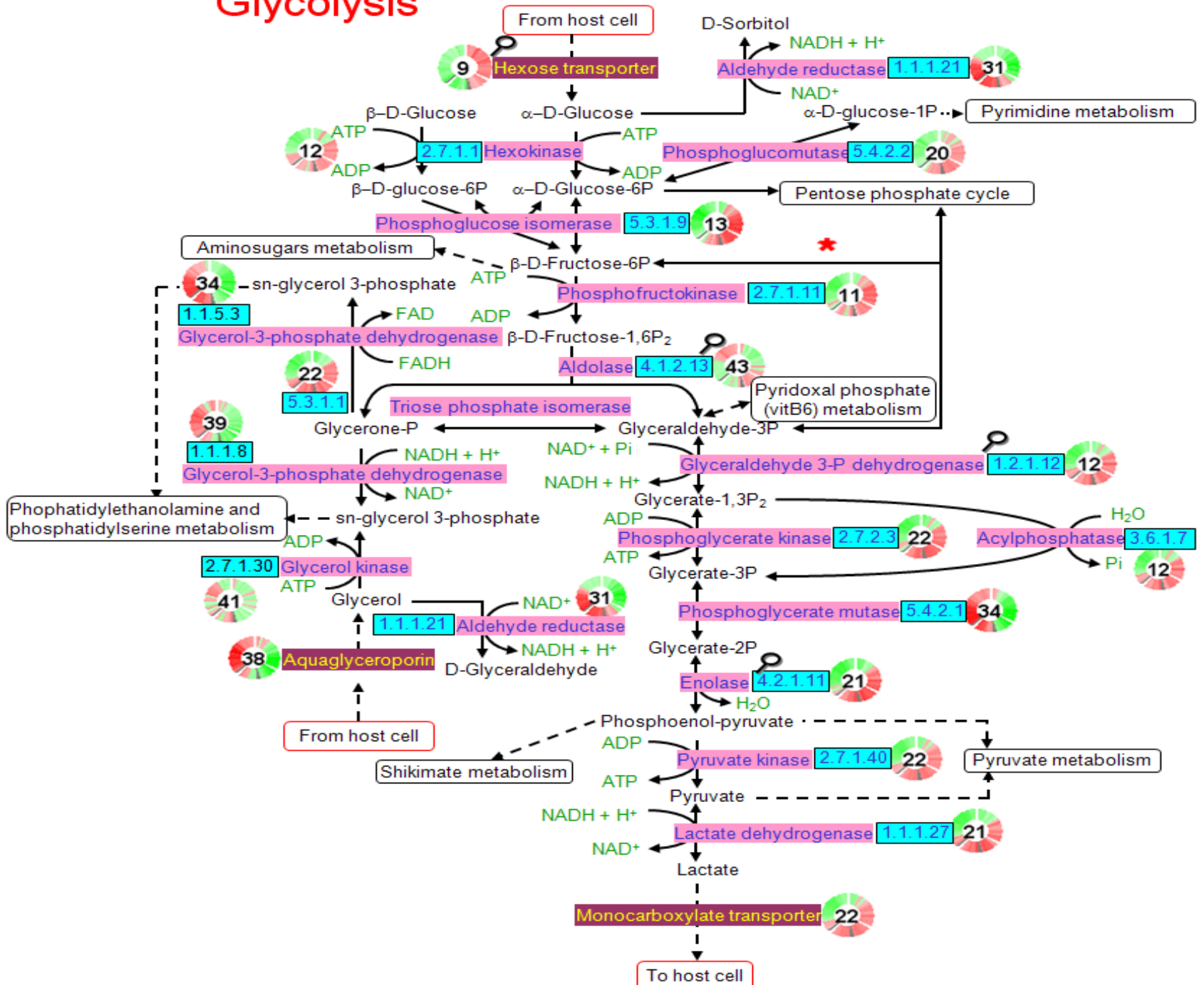
- Eritrosit evresindeki parazit öncelikli enerji kaynağı olarak glikozu fermente eder ve laktata dönüştürür (glikoliz).
- Aerobik metabolizma pirüvatın trikarboksil asit (TCA) çevrimi aracılığıyla daha ileri katabolizmasıdır. Hidrojen atomları NAD^+ 'ın $NADH$ 'a indirgenmesi sırasında yakalanır. Yakalanan hidrojenlerin elektronları bir dizi elektron taşıyıcısına verilir ve son olarak su oluşturmak üzere moleküler oksijene transfer edilir. Elektron iletimi sırasında, oksidatif fosforilasyon adı verilen bir proses aracılığıyla tutulan enerjiden ATP sağlanır.

TCA çevrimi ve oksidatif fosforilasyon glikoz başına 38 molekül ATP oluştururken, glikoliz sadece 2 molekül ATP oluşturur.

Sıtmanın Anaerobik Metabolizması

- Tüm enzimlerin aktivitesi *Plasmodium*'da ve klonlanmış genlerle belirlenmiştir
- Sıtma parazitleri, metabolizmaları için gerekli olan ATP ihtiyacını glikoliz ile sağlar. Parazitte yüksek miktarda glikoliz görülür ve enfekte olmamış eritrositten 75 kat daha fazla glikoz kullanılır. Parazit tarafından kullanılan glikozun çoğu (yaklaşık %85'i) laktata dönüştürülür ve bu durum laktatın birikmesine neden olur.
İnsan vücudundaki glikoz miktarı, polimerleri ve glikojen de dahil, sınırsız değildir. Sonuç olarak glikoliz arttığında er geç yakıtı bitecektir.
- Sıtma hastalığındaki ölümlerin temel nedeni birçok araştırmacı tarafından dokudaki oksijen azlığının devam ettirilemeyen anaerobik metabolizmaya neden olması olarak kabul edilir

Glycolysis

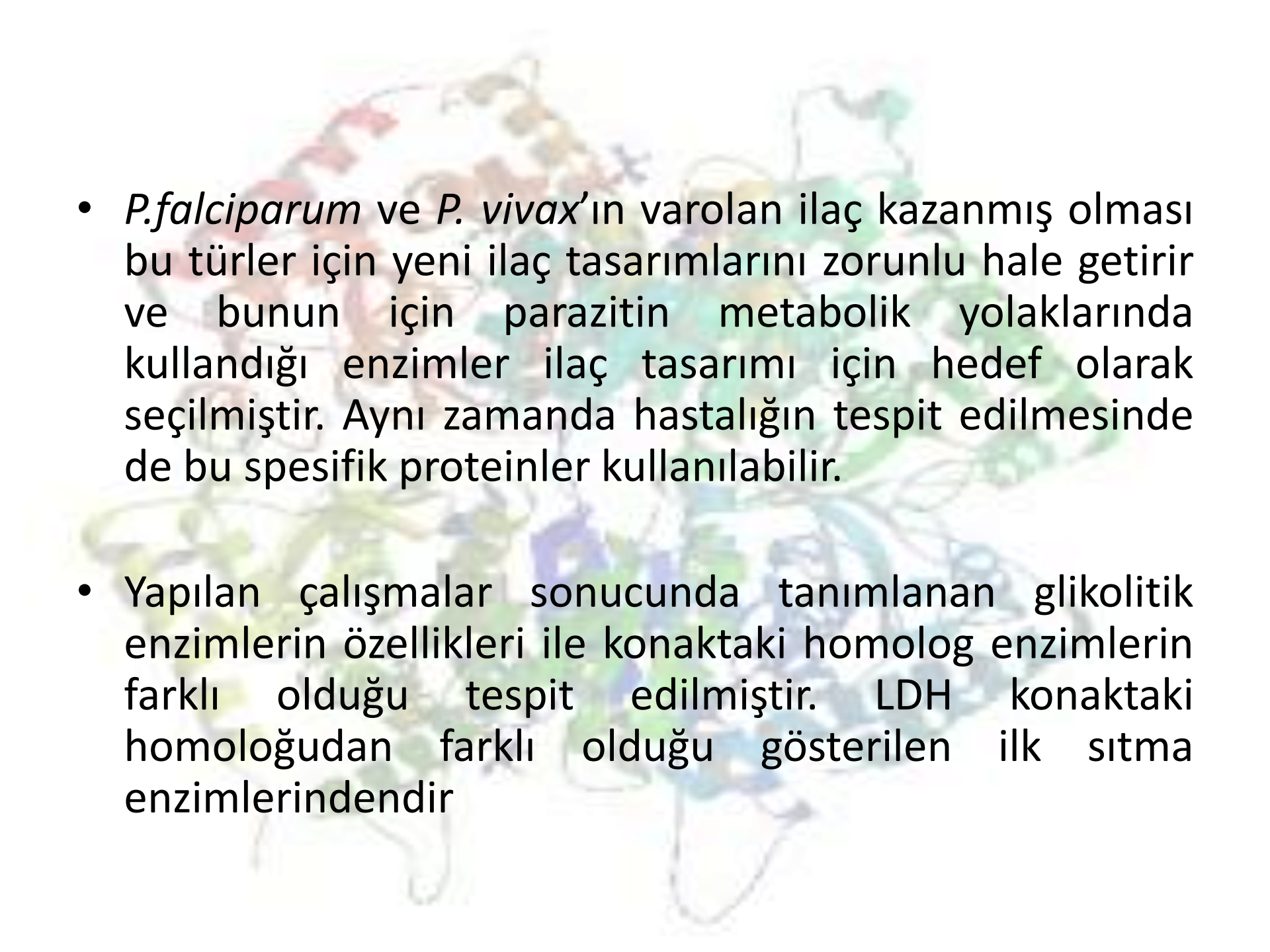


Kilit Enzimler

- *Plasmodium falciparum*'da 5.268 protein olduğu tahmin edilmektedir ve bu proteinlerin kabaca %60'ı diğer organizmalarla çok az benzerlik göstermekte ya da hiç göstermemektedir. Belirlenen proteinlerden %31'i en az bir transmembran bölgeye sahiptir ve %17.3'ü bir sinyal peptidi ya da ankoruna sahiptir. Proteinlerin sadece %6'sı parazitin yaşam boyunca görölmektedir.
- Gametositler kendilerine özgü transkripsiyon faktörlerini ve hücre döngüsü/DNA işleme proteinlerini bolca bulundurur. Sporozoitler ise *var* ve *rif* ailelerinin yanında saldırı proteinleri bulundurur

Seçici Toksisite

- parazitte benzersiz hedef
- konak ve parazit hedefleri arasında ayırım
- hedefin parazit için konaktan daha önemli olması
- ilacın parazitte birikiminin daha fazla olması
- ilacın parazit tarafından aktiveştirilmesi

- 
- *P.falciparum* ve *P. vivax*'ın varolan ilaç kazanmış olması bu türler için yeni ilaç tasarımlarını zorunlu hale getirir ve bunun için parazitin metabolik yollarında kullandığı enzimler ilaç tasarımı için hedef olarak seçilmiştir. Aynı zamanda hastalığın tespit edilmesinde de bu spesifik proteinler kullanılabilir.
 - Yapılan çalışmalar sonucunda tanımlanan glikolitik enzimlerin özellikleri ile konaktaki homolog enzimlerin farklı olduğu tespit edilmiştir. LDH konaktaki homologudan farklı olduğu gösterilen ilk sıtma enzimlerindedir

Laktat Dehidrogenaz (LDH)

Ağırlığı 140 kDa olan tetramerik bir yapıya sahiptir. İki farklı konfigürasyonlarda dizilimi ile 5 izoenzime sahiptir. LDH glikolizin son ürünü olan pirüvik asidi dönüşümlü bir reaksiyonla laktik aside çevirir ve bu nedenle parazitin karbonhidrat metabolizmasında önemli rol oynar.

Aynı enzim hem insanda hem de parazitte bulunur fakat elektroforetik, kinetik ve yapısal olarak farklıdır;

- İnsan M4-LDH'ından farklı olarak *Pf*LDH aktif bölge halkasında 5 ilave aminoasit içerir.
- *Pf*LDH APAD⁺ koenzimini daha hızlı kullanabilme yeteneğine sahiptir
- *Pf*LDH yüksek pirüvat konsantrasyonunda inhibe olmaz
- *Pf*LDH'in gossilik nitril diasetat ve türevleri tarafından inhibisyona insan LDH'ından daha duyarlıdır.

P.falciparum ve *P.vivax* LDH geni dizileri karşılaştırıldığında %90 oranında benzerlik olduğu görülmüştür. *P.falciparum*'da olan aktif bölgedeki ilave 5 aminoasit *P.vivax* LDH'ında da mevcuttur

Yönlendirilmiş Mutagenез

Yönlendirilmiş mutagenез uygulamaları bir gendeki özgül değişimlerin yapıldığı işlemlerdir.

Yönlendirilmiş mutagenез ile bir gende baz değişimi ve dizi delesyon ve insersiyonu yapılabilir. Sonuç olarak proteinin dizisi ve dolayısıyla onun yapısı, hücreyel yerleşimi ve düzenlenmesi değiştirilir.

Avantajları

- Mutasyon oranı yüksek olması
- Çift zincirli DNA kalıbının kullanılabilmesi
- Yüksek ısılara dayanıklı oluşu
- Reaksiyonların hepsinin bir tüp içerisinde gerçekleşmesi
- Kolay ve hızlı olması
- Ticari kitlerinin varlığı

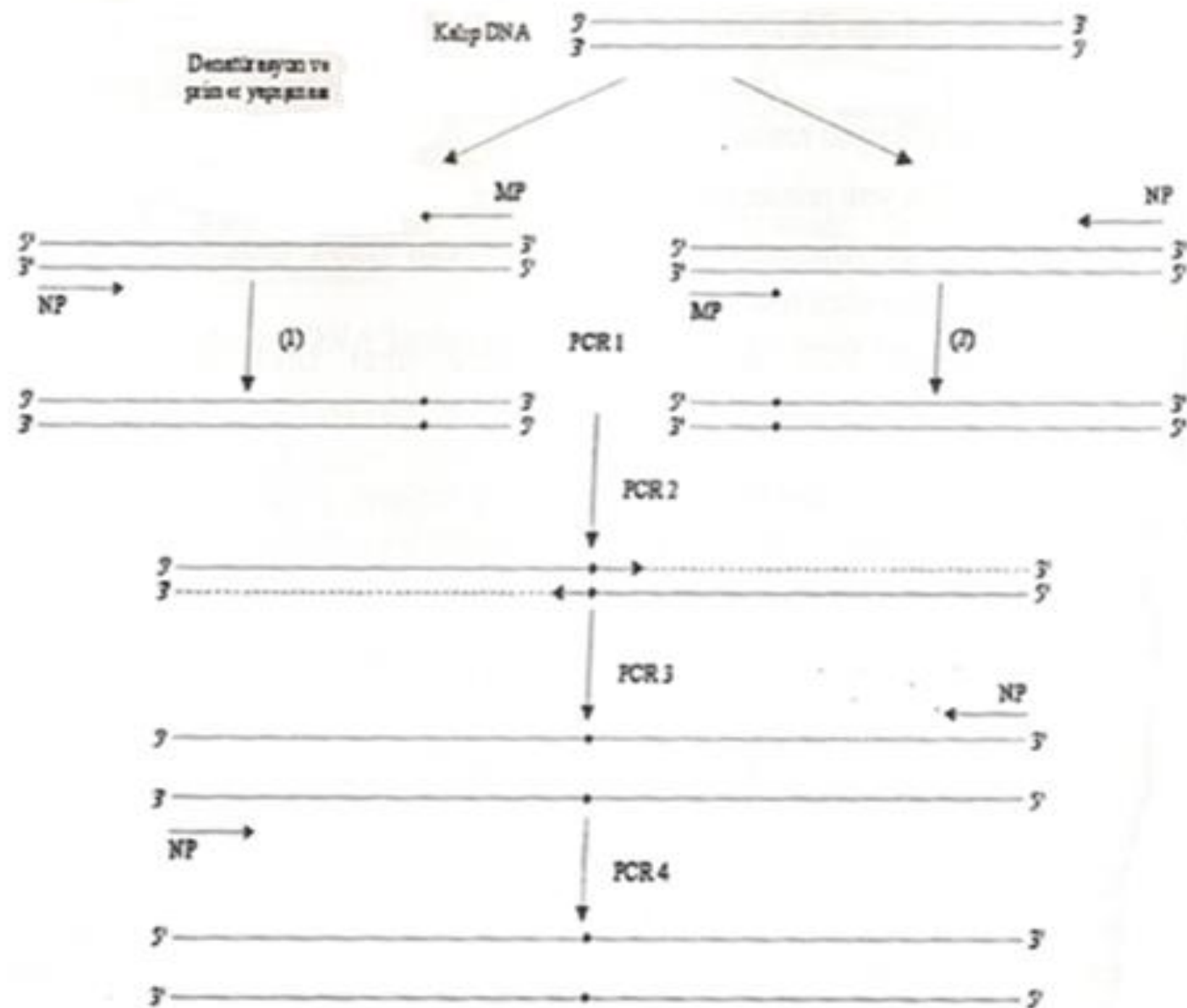
Dezavantajları

- PCR ürünlerindeki yanlış ürün oranının yüksek olması
- Amplifiye edilmiş DNA'ların 3' ucuna istenmeyen nükleotidlerin girmesi
- Bazı mutagenез çalışmaları için birden fazla primer ve amplifikasyon reaksiyonu gerekmesi.
- Her yeni kullanılan ürün için PCR optimizasyonu yapılması gereği
- PCR'da kontaminasyondan dolayı mutagenез olmayan klonlar sıkça oluşması
- PCR ile 2-3kb'dan uzun DNA fragmentlerinin amplifikasyonundaki zorluklar

- Yönlendirilmiş mutagenizde en önemli basamak, mutagenik nükleotidlerin dizaynıdır. Mutagenik oligonükleotidlerin uzunluğu, içerdiği mutasyonların kompleksliğine bağlıdır.

Tek baz değişimi içeren mutasyonlar, ortalama 25 baz uzunluğunda hazırlanır. Daha kompleks mutasyonlar 80 baz ve daha fazla uzunlukta oligonükleotid gerektirir. .

- Oligonükleotid uzunluğu tanımlandıktan sonra, mutagenizin en etkin hale gelmesi için annealing spesifitesi, ikincil yapının doğal eğilimi, T_m sıcaklığı, baz kompozisyonu ve baz sırası gibi diğer özelliklerin optimizasyonu yapılabilir.



Şekil 2.1 Overlap Yapan Mutant Bazlar Yardımıyla Yönlendirilmiş Mutagenез

PCR 1

PCR 1

PvKA Reaksiyonu için Gerekli Bileşenler

dH ₂ O	33 µl
10x Pfu Polimeraz tamponu	5 µl
stok dNTP solüsyonu(10 mM)	5µl
<i>Pfu</i> Polimeraz (2,5 u/µl)	0.5 µl
<i>Pv</i> in pkk(<i>Pv</i> 7-13 in pkk) (10 ng/µl)	1.5 µl
<i>Pv</i> 7 (5') (20 pmol/µl)	2.5 µl
<i>K</i> ₂ (3') (20 pmol/µl)	2.5 µl

(son hacim 50 µl olacak şekilde)

*Pv*KB Reaksiyonu için Gerekli Bileşenler;

dH ₂ O	33 µl
10x Pfu Polimeraz tamponu	5 µl
stok dNTP solüsyonu(10 mM)	5 µl
<i>Pfu</i> Polimeraz (2,5 u/µl)	0.5 µl
<i>Pv</i> in pkk (<i>Pv</i> 7-13 in pkk) (10 ng/µl)	1.5 µl
<i>Pv</i> 13 (3') (20 pmol/µl)	2.5 µl
<i>K</i> ₁ (5') (20 pmol/µl)	2.5 µl

(son hacim 50 µl olacak şekilde)

PCR 2

1. Aşama

dH ₂ O	15.5 µl
10x Pfu Polimeraz tamponu	2.5 µl
stok dNTP solüsyonu (10 mM)	2.5 µl
<i>Pfu</i> Polimeraz	0.5 µl
<i>PvKA</i>	2 µl
<i>PvKB</i>	2 µl

2. Aşama

dH ₂ O	14.5 µl
10x Pfu Polimeraz tamponu	2.5 µl
stok dNTP solüsyonu (10 mM)	2.5 µl
<i>Pv7</i> (20 pmol/µl)	2.5 µl
<i>Pv13</i> (20 pmol/µl)	2 µl
<i>Pfu</i> Polimeraz	0.5 µl

(son hacim 50 µl olacak şekilde)

Materyal

- **Genomik DNA**

Pv ACTGTCAACACTGCTTTGGAGATTGTGAACCTCCTTATGTTGCCCCAGCT
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720

Prolin

CCT

P.vivax Belem soyundan elde edilen saf genomik DNA kullanılmıştır. *Pv*LDH enziminin kilit amino asitlerinden olan 246. pozisyondaki Prolin(CCT)'in yönlendirilmiş mutagenез yardımıyla Treonin(ACG) ile değiştirilmesi amaçlanmaktadır.

- **Primerler**

P.vivax LDH enzimini kodlayan genin polimeraz zincir reaksiyonu için gerekli 5'-3' primerleri tasarlanmıştır.

Pv7 (5' primeri) TCTGGAGGGCTGGAACAAAG
Pv13 (3' primeri) GCAGAGAAGAGTAGGTGAAAGGAAG

Ek olarak *PvLDH*'ın mutasyona uğratılacak bölgeleri ile komplementer *Pv7* ve *Pv13* uç primerlerine uygun mutagenез primerleri tasarlanmıştır.

	Prolin
Orijinal iplik	5' CCT GCC TCT /CCT/ TAT GTT G 3'
	Treonin
Mutant 5' primeri (K_1)	5' CTT GCC TCT /ACG/ TAT GTT G 3'
K_2 (komplementeri)	3' GAA CGG AGA /TGC/ ATA CAA C 5'
Mutant 3' primeri (K_2)	5' C AAC ATA /CGT/ AGA GGC AAG 3'

Deneysel Yöntem

- **PCR 1**

PvLDH'in mutasyona uğratılacak bölgeleri ile çakışan iki mutant DNA fragmenti (A ve B fragmentleri) *Pv7*, *Pv13*, K_1 ve K_2 primerleri kullanılarak ayrı ayrı elde edilmiştir.

A fragmentini eldesi için *PvLDH* 5' primeri (*Pv7*) ile mutant 3' primeri (K_2), B fragmentini elde etmek için ise mutant 5' primeri (K_1) ile *PvLDH* 3' primeri (*Pv13*) kullanılmıştır. Amplifikasyon; 94°C'de 1,5 dakika, 58°C'de 2 dakika, 72°C'de 2 dakika şartlarında ve 20 döngüde gerçekleştirilmiştir.

- **PCR 2**

% 1'lik agaroz jelden saflaştırılan mutant DNA'nın A ve B fragmentlerini birleştirmek için PCR yapılmıştır.

1. Aşama

Öncelikle konsantrasyonları esas alınarak belirlenen miktarlarda kullanılan A ve B fragmentleri ile son hacim 25 μ l olacak şekilde gerçekleştirilen PCR'ın reaksiyon şartları 94°C'de 2 dakika, 50°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika ve 7 döngü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

2. Aşama

U primerlerin (*Pv7* ve *Pv13*) ve diğer PCR bileşenlerinin ilavesi ile reaksiyon 50 μ l'ye tamamlanmış ve istenen mutagenezi taşıyan geni tam uzunlukta elde etmek için 94°C'de 1.5 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 2,5 dakika şarlarında ve 20 döngü olarak amplifikasyon yapılmıştır.

Bulgular Ve Tartışma

- *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenazı ile daha önce yapılan deneyler ışığında, bu deneyde de enzimin substrata olan afinitesinin ve k_{cat} değerinin düşük olması beklenmektedir.

- Bu çalışmayı yapmamda bana her türlü destek veren ve kendisinden çok şey öğrendiğim değerli hocam Doç. Dr. Dilek Turgut-Balık'a
- Çalışmamın yürütülmesine katkıda bulunan Biyomühendislik Bölümü asistanları Biyolog Ayşegül Erdemir, Mol. Biyolog Aslıhan Balcıoğlu ve Biyolog Ayberk Akat'a
- Bu çalışmanın yürütülmesine maddi destek sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi'ne ve Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ne ve bölümdeki hocalarıma

TEŞEKKÜRLER

KAYNAKLAR

- www.nationalgeographic.com.tr
- Bynum W. F. (2002). Mosquitoes Bite More Than Once.
- ALVER O. v.d., 2007. Bursa'da Sıtma.
- Gökberk C, 1948. "Sıtma Epidemiyolojisi", Pratik Doktor, XVIII
- Perkins, S.L. and C.C Austin. (2009)
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Malaria>
- www.cdc.gov
- Kayser FH, 2005. Medical Microbiology
- Özcel MA (1999), Sıtma, Malaria
- Mendis 2001
- Cox-Singh v.d., 2008
- Unat v.d., 1995
- Gülez v.d., 2003
- Ruwende C. vd, 1995; Beutler E, 1978
- Galinski MR v.d., 1992
- http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/ch15_dr_aft.pdf
- Fersht, 1985
- Bzik v.d., 1993
- Vander v.d., 1981
- A. Telefoncu v.d, Biyoinformatik 1
- Florens, 2002
- Gomez v.d., 1997
- Klenermn v.d, 1992
- Aksu L, 1943
- T.C.sağlıkbakanlığı
- Gökberk C, 1948
- IOM
- Basco v.d., 1995
- Roth v.d., 1988; Trager, 1986
- (Dekker v.d., 1997)
- Clark v.d., 2006).
- <http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/Summary.html>Gardner, 2002
- Akdur R, 1999
- Kokwaro, 2009
- Carter ve Mendis, 2002
- Trape v.d., 1998
- Dünya Sağlık İstatistikleri, WHO; 2009
- Makler ve Hinrich, 1993
- Royer v.d., 1986
- Akbulut, Çelik, Turgut-Balık, 2005