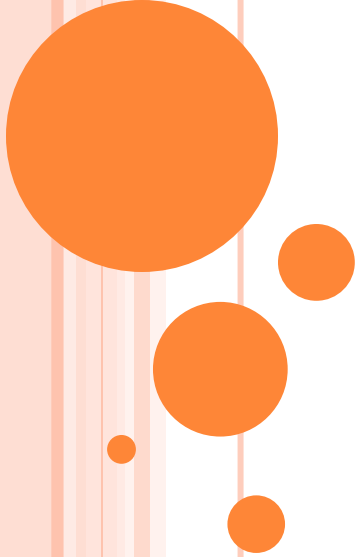


PARAZİTLERİN GLİKOLİTİK ENZİMLERİNİN İLAÇ TASARIM ÇALIŞMALARINDA KULLANIMI

PROJE SUNUMU

Sena Didem ERKAL



SUNUM İÇERİĞİ

○ GENEL BİLGİLER

- Sıtma
- Sıtmanın Türkiye'deki ve Dünyadaki Önemi
- Sıtmanın Vektörleri
- Sıtma Parazitlerinin Yaşam Döngüleri
- *Plasmodium*'ların Metabolizması
- Enolaz Enzimi
- *Plasmodium falciparum*'un Enolaz Enzimi

○ DENEYSEL KISIM

- Biyoinformatik Çalışması
- Materyal ve Yöntem
- PvENO'nun Amplifikasyonu

○ SONUÇLAR



SITMA

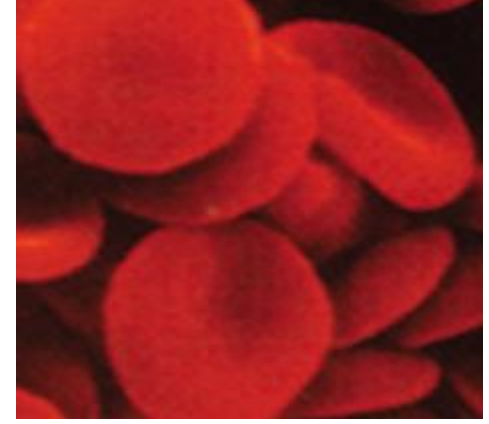
Sıtma, dişi anofel cinsi sivrisineklerin kan emerken konak canlıya bulaştırdıkları, *Plasmodium* parazitlerinin sebep olduğu tüm dünyada özellikle de tropikal ÷lkelerde yaygın olarak gör÷len, çok eski çağlardan beri bilinen ve her dönemde toplum sağlığını önemli boyutlarda tehdit etmiş parazitler bir hastalıktır.



Anopheles superpictus



- Parazit, esas olarak, karaciğer hücrelerini ve alyuvarları tutar.



alyuvarlar

- Hastalığın en önemli belirtisi, üşüme, titreme, yüksek ateş, bol terleme ile karakterlenen akut sıtma nöbetleridir.
- Fizik muayene bulguları arasında ateş ile birlikte taşikardi, dalak büyümesi ve sarılık gözlenir.



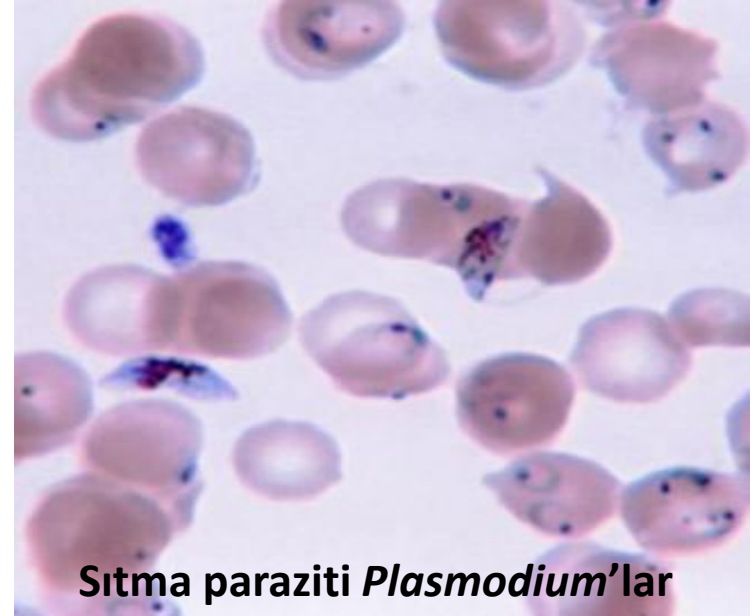
Sıtma nöbeti üç aşamada gözlenir.

- Üşüme titreme döneminde hasta üşüme hissi ile çeneleri birbirine vurarak titrer, yüzü soluktur, başı ağrır ve midesi bulanır.
- Yüksek ateş döneminde hasta artık üşümez vücudu yanar, yüzü kırmızı, gözleri parlak ve derisi kurudur. Ateşi 40⁰C'ye çıkar, başı ağrır ve dalağı büyür.
- Terleme döneminde ise önce yüzde, ellerde ve bacaklarda başlayan ter bütün vücudu kaplar. Ateş terleme ile birlikte normale döner, dalak küçülür, hasta rahatlar ve normale döner.



İnsanda sıtma hastalığını oluşturan beş *Plasmodium* türü bulunmaktadır.

- *Plasmodium vivax*
- *Plasmodium falciparum*
- *Plasmodium ovale*
- *Plasmodium malariae*
- *Plasmodium knowlesi*

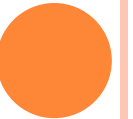


Sıtma paraziti *Plasmodium*'lar



Plasmodium vivax

- *Plasmodium vivax*, Türkiye ve dünyada en fazla sıtmaya neden olan türdür.
- *P.vivax* sıtması iyi seyirli ve nadir olarak yaşamı tehdit etmektedir. Bu nedenle benign sıtma olarak adlandırılır.
- *P.vivax* sıtması üç günde bir nöbet gösterdiğinden tersiyana sıtması olarak da adlandırılmaktadır.
- Kliniği hafif olmakla birlikte tedavi edilmezse nükslerle seyretmesi en önemli özelliğidir.



Plasmodium falciparum

- *Plasmodium falciparum* sıtması insan sağlığını ciddi anlamda tehdit eden ve esas sıtma ölümlerinin sebebidir.
- *P.falciparum*'a bağışıklığı olmayan kişilerde hastalık çok çabuk ilerler ve bazı durumlarda belirtilerin ortaya çıkışından 24 saat sonra hastalar hayatını kaybedebilir.
- Bu sıtma türünde nöbetler sürekli ateşli bir şekilde veya kötü nöbetler şeklinde görölmektedir. Bu nedenle bu sıtma türü malign yani kötü huylu sıtma olarak adlandırılmaktadır.



Plasmodium ovale ,Plasmodium malariae ve P.knowlesi

- *P.ovale* yalnızca Batı Afrika ve Pasifik yerlilerinde hastalık oluşturmakta ve bu tür ile enfekte kişilerde hastalık hafif seyretmektedir.
- *P.malariae* dört günde bir gelen nöbetlerle seyrettiğinden quartana sıtması olarak adlandırılmaktadır ve olgusuna pek rastlanılmamaktadır.
- *Plasmodium knowlesi* Doğu ve Güney Asya boyunca çok geniş bir alanda dağılım gösterir.



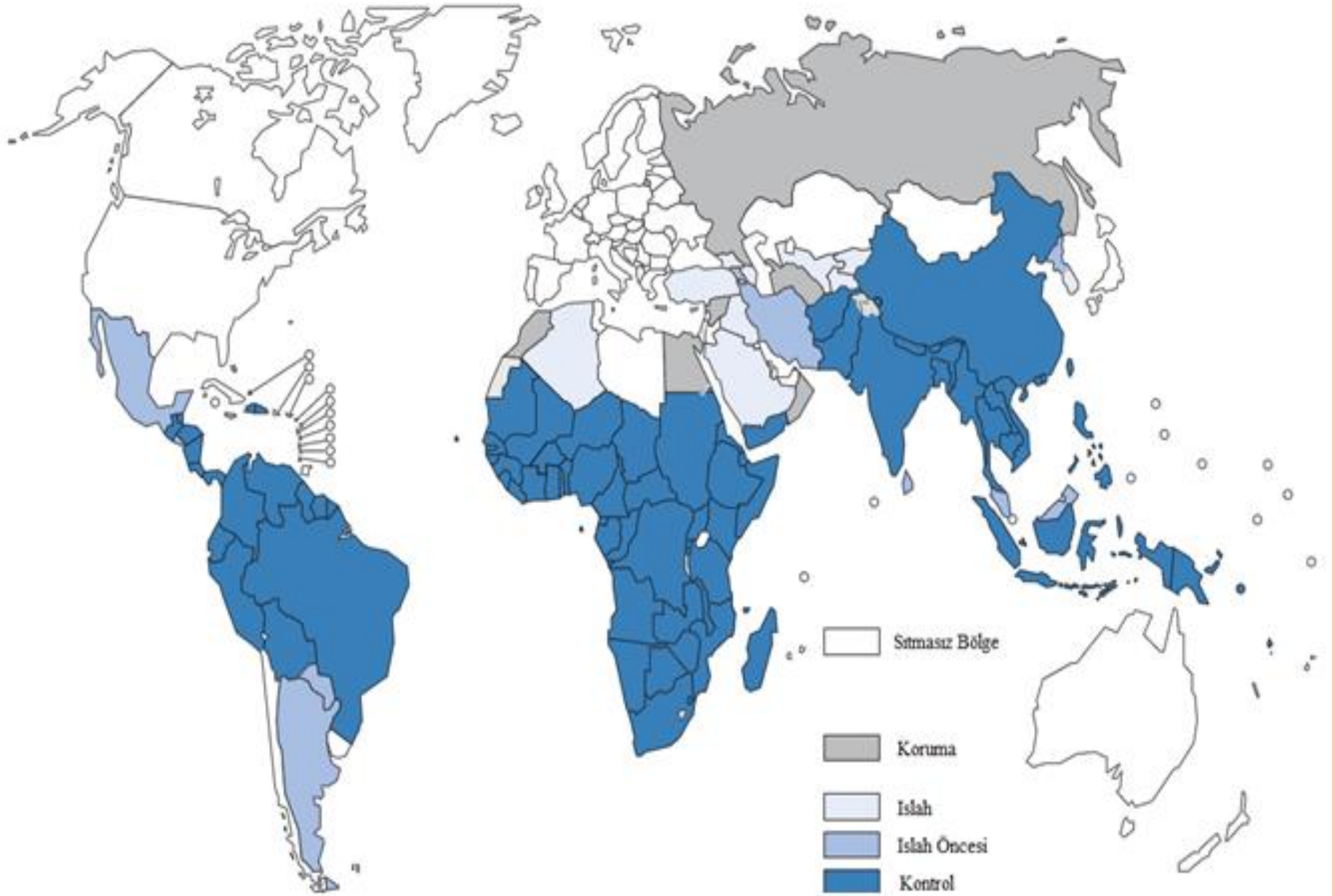
SITMANIN DÜNYADAKİ ÖNEMİ

- Sıtma tüm dünyada yaygın bir paraziter enfeksiyon olup dünyada 3,3milyar insan sıtmanın bulaşma riskinin olduğu bölgelerde yaşamaktadır.
- Her yıl dünyada 250 milyon yeni sıtma olgusu meydana gelmekte olup bunların yaklaşık 1 milyonu ölmektedir.
- Ölümlerin çoğu 5 yaş altı çocuklarda görülür.



Dünyada ilk 10 sırada yer alan infeksiyon hastalıkları (Özcel,1999)

Hastalık	İnsidans	Ölüm
Akut Alt Solunum Yolu İnf	395 000 000	3 745 000
Tüberkülozis	7 250 000	2 910 000
İshal	4 000 000	2 455 000
HIV/AIDS	5 800 000	2 300 000
Sıtma	300 000 000	1 500 000
Kızamık	31 075 000	960 000
Hepatit B	67 730 000	605 000
Boğmaca	45 050 000	410 000
Yeni doğan tetanozu	415 000	275 000
DİĞER		950 000
TOPLAM		17 310 000



Dünya genelinde sıtmanın dağılım haritası (WHO,2009)

Dünya sağlık örgütünün 2009 yılı sıtma raporuna göre;

○ 2008 yılında,

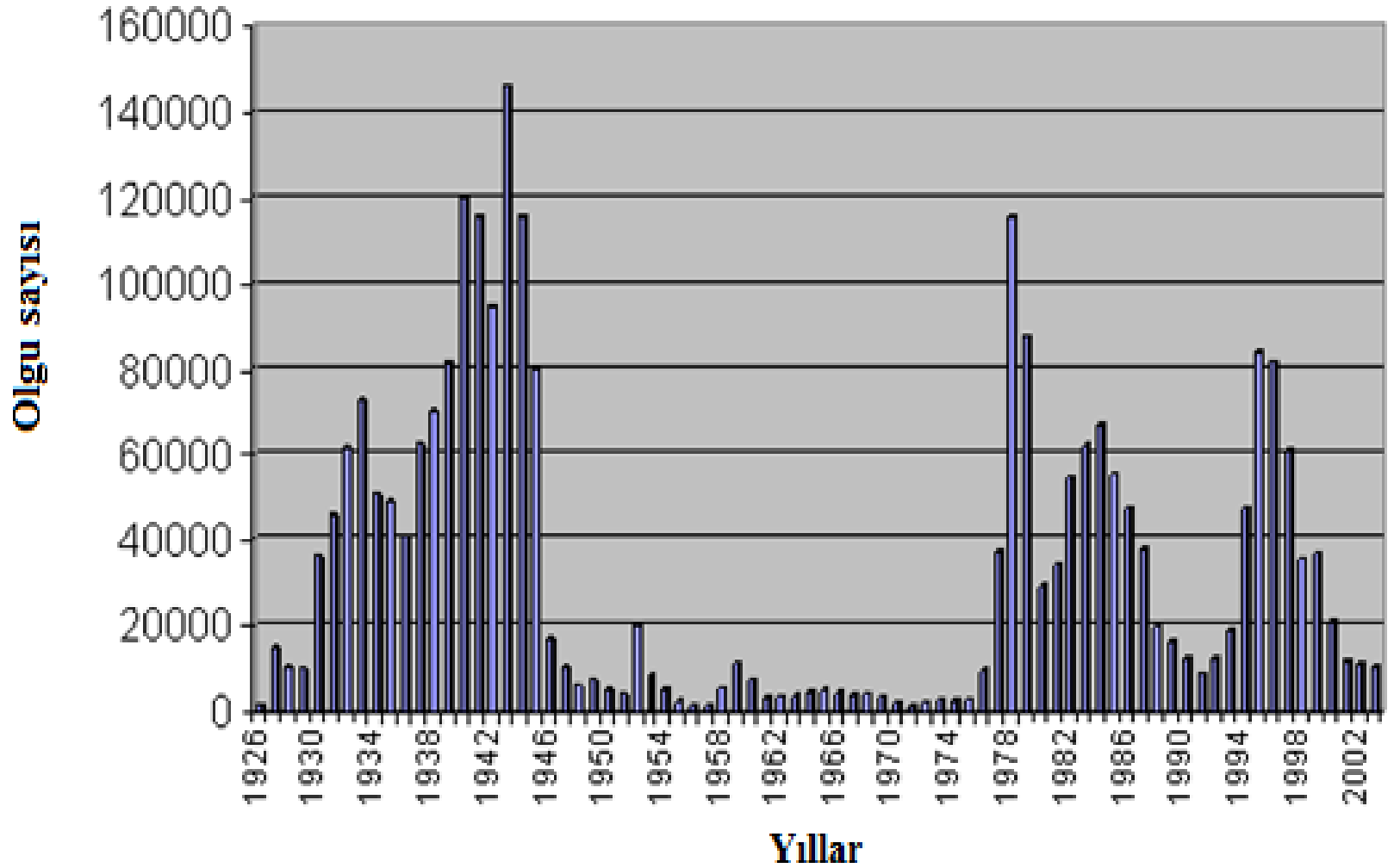
- Dünya genelinde yaklaşık 243 milyon sıtma olgusu gözlemlenmiştir. Bu olguların %85'i Afrika Bölgesi, %10'u Güney Doğu Asya ve %4'ü Akdeniz Bölgesi'nin doğusunda görülmüştür.
- Dünya genelinde 863.000 ölüm rapor edilmiştir. Ölümlerin %89'u Afrika Bölgesi'nde, %6'sı Doğu Akdeniz Bölgesi'nde ve %5'i Güney Doğu Asya Bölgesi'nde gerçekleşmiştir.



SITMANIN TÜRKİYE'DEKİ ÖNEMİ

- Türkiye'de sıtmanın tarihi çok eskilere dayanmaktadır. Anadolu'daki eski medeniyetlerin çöküşünde sıtmanın önemli bir rolü olduğu bilinmektedir.
- Kurtuluş Savaşı ve izleyen yıllarda, en yaygın olan hastalıkların başında sıtma gelmektedir.
- Türkiye'de sıtma kontrol çalışmaları 1926 yılında başlatılmış ancak 1955 yılından sonra yapılan etkili çalışmalarla olgu sayısı 1970'te 1263'e kadar düşürülmüştür.



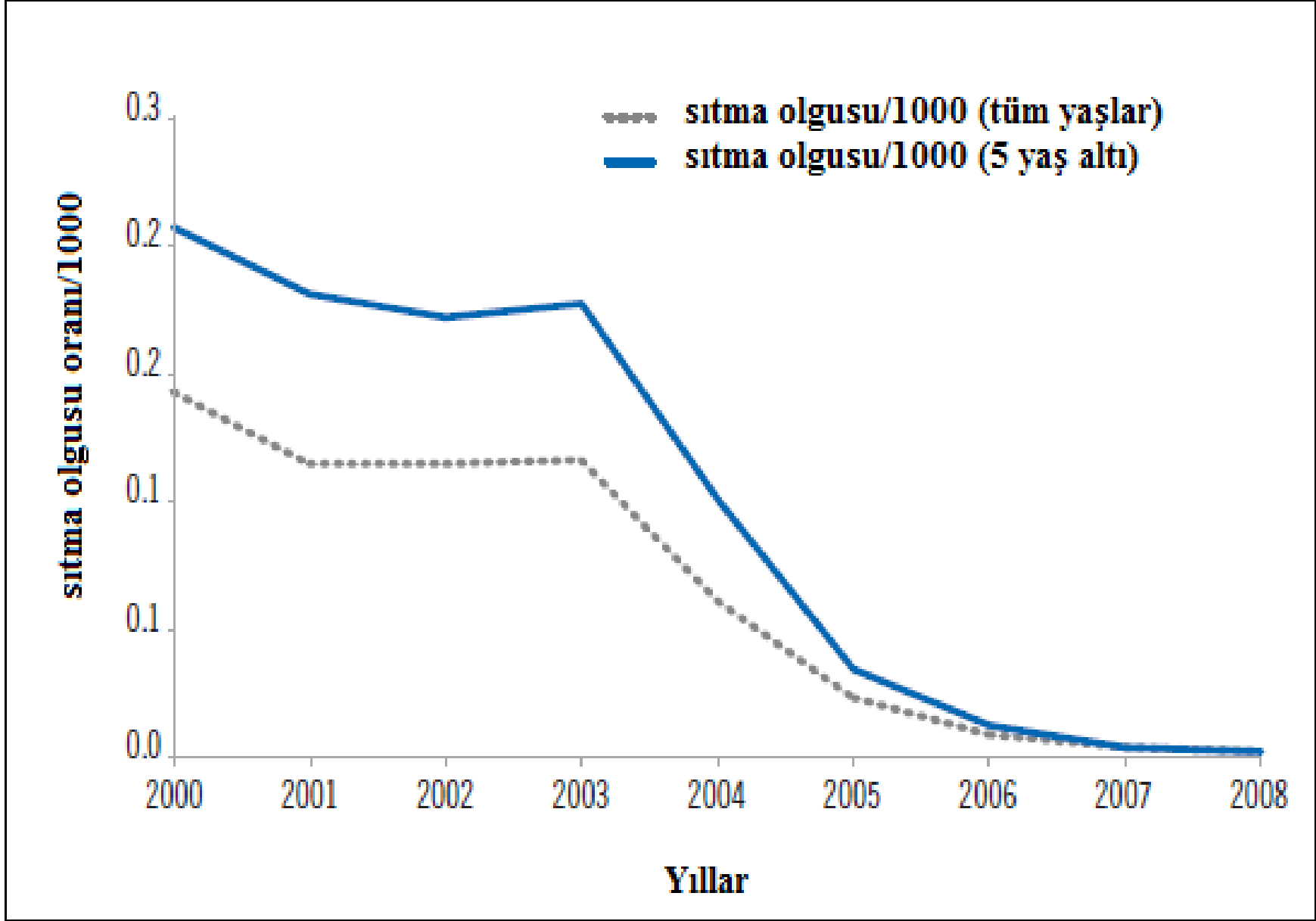


Türkiye’de 1926-2002 yılları arası sıtma olgularının şematik gösterimi



- 1971'den itibaren, Çukurova ve Amikova da gözlemlenen sıtma olgusu sayısı artmaya başlamıştır. 1976 ve 1977 yıllarında salgın boyutuna ulaşmıştır. Sırasıyla 37.320 ve 115.512 olgu rapor edilmiştir.
- Tekrar yoğunlaştırılan savaş çalışmalarıyla olgu sayıları 1990 yılına kadar düşmeye devam etmiştir. 1990'dan 1996'ya, sıtma durumu kritikliğini korumuştur. Bu süreçte en yüksek olgu sayısı 1994'te, 84.321 ile bildirilmiştir.
- 2007 yılında ise bütün ülkede toplam 313 *P. vivax* sıtma vakası rapor edilmiştir.





Türkiye'de 2000-2008 yılları arası sıtma olgusu oranlarının şematik gösterimi

Sıtmanın tüm dünyada kontrol dışına çıkmasının iki temel nedeni vardır.

- Bunlardan ilki, sıtma parazitlerinin tek konağı olan anofel cinsi sivrisineklerin bilinen insektisidlere karşı direnç kazanması
- İkincisi ise bazı sıtma parazitlerinin mevcut antimalarial ilaçlara karşı direnç kazanmış olmasıdır.

Antimalarial ilaçlara ve insektisidlere karşı olan direnç, halk sağlığı alt yapısının bozulması, populasyon hareketleri, politik kargaşalar ve çevresel değişimler sıtmanın yayılmasına katkıda bulunmaktadır.



SITMANIN VEKTÖRLERİ

- Sıtma etkeni olan *Plasmodium*'ları sivrisineklerin yalnız *Anopheles* türleri insana bulaştırırlar.
- Anofeller için bulaşma kaynağı kanlarında gametositleri bulunduran insanlardır.



Anopheles maculipennis



- Türkiye’de rapor edilen *Anopheles* cinsi sivrisineğin 13 türü vardır.

- Başlıca hastalık taşıyan türler *An. sacharovi* ve *An. superpictus* ‘tur.

- Bu türlere ek olarak *An. maculipennis*, *An. pulcherimus*, *An. algeriensis*, *An. claviger*, *An. hyrcanus*, *An. marteri*, *An. multicolour*, *An. plumbeus* ve *An. sergenti* de ikincil hastalık taşıyan türler olarak sayılabilir.



Anopheles sacharovi

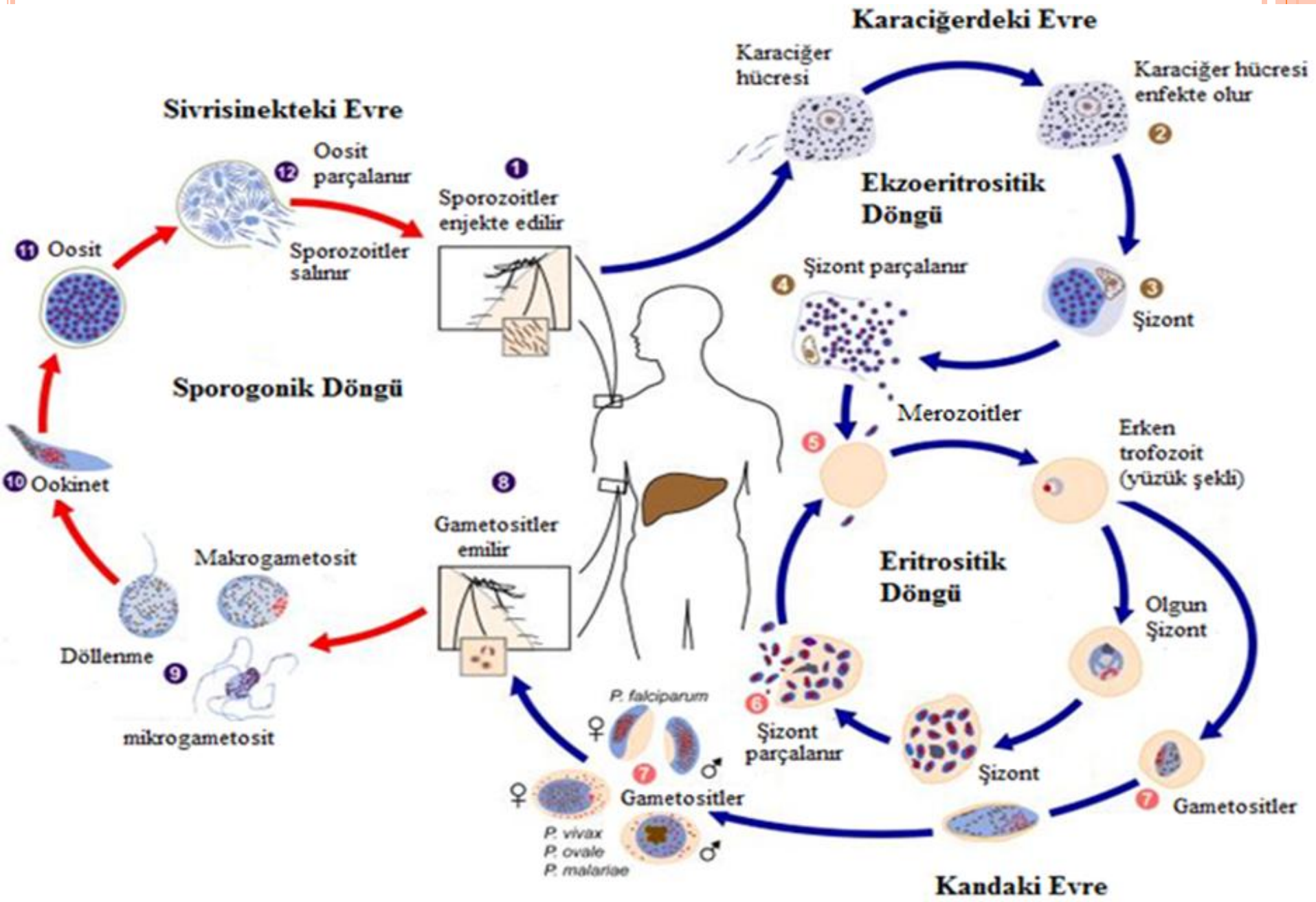


Anopheles plumbeus

SITMA PARAZİTLERİNİN YAŞAM DÖNGÜSÜ

- Sıtma parazitlerinin yaşam döngüleri,
 - omurgasız anofel cinsi sivrisineklerdeki eşeyli üremenin görüldüğü ve sporozoitlerin oluşturulduğu dönem (sporogoni)
 - omurgalı konak canlıda eşeysiz üremenin görüldüğü cinsel olmayan dönem (şizogoni) olarak iki dönemde gerçekleşmektedir.





Plasmodium'larda Yaşam Döngüsü (www.cdc.gov)

PLASMODIUM'LARIN METABOLİZMASI

- Sıtma parazitleri tüm canlıların gereksinim duyduğu karbonhidratlar, amino asitler, mineraller ve eser elementlere ek olarak parazitler pürin bazları, nükleozidler, yağ asitleri, sterol ve porfirinler gibi diğer maddelere de gereksinim duymaktadırlar.
- *Plasmodium*'ların metabolik gereksinimlerinin büyük çoğunluğunu konak plazmasından ve eritrositlerinden karşıladığı bilinmektedir.



- Genom dizi analizi yaşam döngüsü evrelerine bakılmaksızın *P.falciparum*'un metabolizması hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlar.
- *Plasmodium*'larda glikolitik metabolizma için gereken tüm enzimleri kodlayan genler tanımlanmıştır.
- Buna göre öngörülen 5268 proteinden 733 tanesi (~%14) enzim olarak belirlenmiştir. Bunlardan 435'i(~%8) ise Enzim Komisyonu(EC) tarafından numaralandırılmıştır.

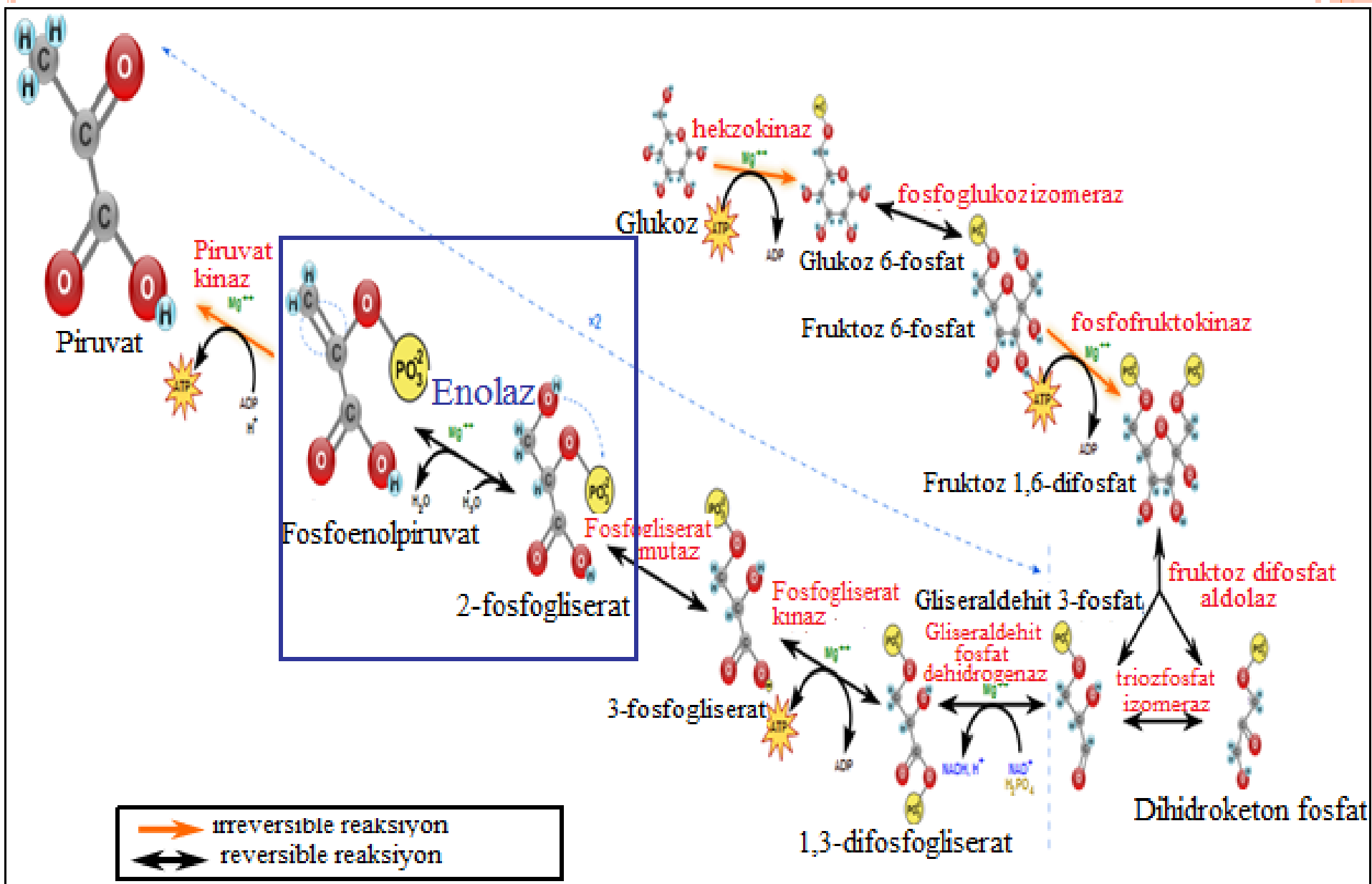


- Fruktoz difosfatı kodlayan gen saptanamamıştır. Bu durum glikojen ve diğer karbonhidrat depolarının sentezi için gereken enzimlerin üretiminin olmadığını ve bu nedenle karbonhidrat üretimi olmadığını gösterir.
- NADH dehidrogenaz kompleks I bileşenlerini kodlayan genler *P.falciparum* genomunda eksik görünmektedir (Gardner,2002).



- Bu nedenle *Plasmodium falciparum*'un eritrositik evresinde sitrik asit döngüsü gerçekleşmemekte olup sadece glikoliz ile enerji ihtiyacını karşılamaktadır.
- Glikoliz reaksiyonu 6 karbonlu glikoz molekülünün enzimatik aşamaların ardından iki piruvat molekülüne dönüştürülmesi reaksiyonudur.
- Tüm *Plasmodium*'larda son ürün olarak laktik asit oluşmaktadır.

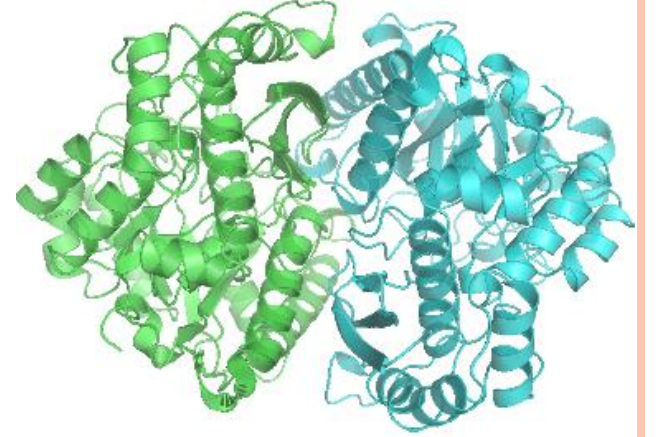




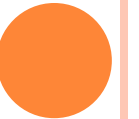
Glikoliz reaksiyonu

Enolaz Enzimi

- Fosfopiruvat dehidrataz olarak da bilinen enolaz enzimi 2-fosfogliseratın (2-PGA) fosfoenolpiruvata (PEP) dönüşümünün katalizlenmesinden sorumludur.
- Substrat konsantrasyonuna bağı olarak ters reaksiyonu da katalizler.
- Glikoliz veya fermantasyon yapan tüm doku ve organizmalarda bulunmaktadır.



Maya enolaz dimeri



- Enolaz insan kas ve kan hücreleri gibi çeşitli kaynaklardan izole edilebilir.
- Enolaz farklı hücre yerleşimlerinde, çok yönlü karmaşık bir protein olarak tanımlanmıştır.
- Son çalışmalar göstermiştir ki, çoğu patojenik türün farklı hücre tiplerinin hücre duvarlarında, hücre zarlarında ve hücre nükleusunda bulunmaktadır.



Plasmodium falciparum'un Enolaz Enzimi

- *Plasmodium falciparum*'un eritrositik evresinde sitrik asit döngüsü gerçekleşmediğinden sadece glikoliz ile enerji ihtiyacını karşılar.
- Parazitin enfekte ettiği hücrelerde glikoliz seviyesi enfekte olmamış kırmızı kan hücrelerine göre 100 kat daha fazladır.
- Bu da enfeksiyonun vücutta ilerlemesi sırasında hipoglisemi görülmesine sebep olur.



- Biyokimyasal alışmalar gösterir ki sıtma parazitlerinin kanda gerçekleşen evrelerinde enolaz yüksek seviyede aktivite göstermektedir (Roth vd.,1988).
- Glikolitik enzimler, *Plasmodium*'larda enerji üretimindeki ve diğer fizyolojik fonksiyonlarındaki önemlerinden dolayı tedaviye yönelik hedeflendirilmişlerdir ve antimalarial ilaç üretiminde kullanılması amaçlanmaktadır (Pal-Bhowmick vd., 2009).
- Bu projede, yeni antimalarial geliştirilmesinde kullanılması potansiyelinin ölçülmesi amacıyla *Plasmodium vivax*'ın glikolitik enzimi olan enolazın klonlanması hedeflenmiştir.



DENEYSEL KISIM

1. Biyoinformatik Çalışması

- Biyoinformatik çalışması için öncelikle NCBI'dan (National Center for Biotechnology Information) enolaz geninin aminoasit dizileri çakıştırılacak türlerin dizileri bulundu.

Bu türler;

- *Plasmodium vivax*
- *Plasmodium falciparum*
- *Homo sapiens alfa*
- *Homo sapiens beta*
- *Homo sapiens gama'dır.*



- *Plasmodium vivax* enolazin amino asit dizisi (XM_001614421)

```
/translation="MAHVITRISAREILDSRGNPTVEVDLETNVGIFRAAVPSGASTG  
IYEALELRDNDKSRYLGKGVQKAIKNINEHIAPKLI GLDCREQKKIDNMMVEELDGSK  
NEWGWSKSKLGANAILAISMAVCRAGAAANKVS SLYKYLAQLAGKKNDQMVLFPVCLNV  
INGGSHAGNKLSFQEFMIVPVGAPNFKEALRYGAEVYHTLKSEIKKKYGIDATNVGDE  
GGFAPNILNANEALDLLVSAIKSAGYEGKVKIAMDVAASEFYQADTKTYDLDFKTPNN  
DKSLVKTGAELVNLYIDMVKKYPIISIEDPFDQDDWENYAKLTEAIGKDVQIVGDDLL  
VTNPTRITKALEKKACNALLLVNQNIGSITEAIEACLLSQKNDWGMVSHRSGETEDV  
FIADLVVALRTGQIKTGAPCRSERNAKYNQLLRIEESLGSNALFAGEKFRHQLS"
```

- *Plasmodium falciparum* enolazin amino asit dizisi (XM_001347404)

```
/translation="MAHVITRINAREILDSRGNPTVEVDLETNLGIFRAAVPSGASTG  
IYEALELRDNDKSRYLGKGVQKAIKNINEI IAPKLIGMNC TEQKKIDNLMVEELDGSK  
NEWGWSKSKLGANAILAISMAVCRAGAAANKVS SLYKYLAQLAGKKS DQMVLFPVCLNV  
INGGSHAGNKLSFQEFMIVPVGAPSFKEALRYGAEVYHTLKSEIKKKYGIDATNVGDE  
GGFAPNILNANEALDLLVTAIKSAGYEGKVKIAMDVAASEFYNS ENKTYDLDFKTPNN  
DKSLVKTGAQLVDLYIDL VKKYPIVSIEDPFDQDDWENYAKLTAAIGKDVQIVGDDLL  
VTNPTRITKALEKNACNALLLVNQNIGSITEAIEACLLSQKNNWGMVSHRSGETEDV  
FIADLVVALRTGQIKTGAPCRSERNAKYNQLLRIEESLGNNAVFAGEKFRQLN"
```



- *Homo sapiens alfa* enolazın amino asit dizisi (NM_001428)

```
/translation="MSILKIHAREIFDSRGNPTVEVDLFTSKGLFRAAVPSGASTGIY  
EAELELRDNDKTRYMGKGVSKAVEHINKTIAPALVSKKLVNTEQEKIDKLMIEMDGTEN  
KSKFGANAILGVSLAVCKAGAVEKGVPLYRHIADLAGNSEVILPVPAFNVINGGSHAG  
NKLAMQEFMILPVGAAANFREAMRIGAEVYHNLKNVIKEKYGKDATNVGDEGGFAPNIL  
ENKEGLELLKTAIGKAGYTDKVVIGMDVAASEFFRSGKYDLDFKSPDDPSRYISPDQL  
ADLYKSFIKDYPVVSIEDPFDQDDWGAWQKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKRIAKAVNE  
KSCNCLLLKVNQIGSVTESLQACKLAQANGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQ  
IKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEELGSKAKFAGRNFNRNPLAK"
```

- *Homo sapiens beta* enolazın amino asit dizisi (NM_001976)

```
/translation="MAMQKIFAREILDSRGNPTVEVDLHTAKGRFRAAVPSGASTGIY  
EAELELRDGDKGRYLGKGVLKAVENINSTLGPALLQKLSVADQEKVDKFMIELDGTEN  
KSKFGANAILGVSLAVCKAGAAEKGVPLYRHIADLAGNPDLILPVPAFNVINGGSHAG  
NKLAMQEFMILPVGASSFKEAMRIGAEVYHHLKGVIKAKYKDATNVGDEGGFAPNIL  
ENNEALELLKTAIQAAGYPDKVVIGMDVAASEFYRNGKYDLDFKSPDDPARHITGEKL  
GELYKSFINKYPVVSIEDPFDQDDWATWTSFLSGVNIQIVGDDLTVTNPKRIAQAVEK  
KACNCLLLKVNQIGSVTESIQACKLAQSNWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQ  
IKTGAPCRSERLAKYNQLMRIEELGDKAIFAGRKFRNPKAK"
```

- *Homo sapiens gama* enolazın amino asit dizisi (NM_001975)

```
/translation="MSIEKIWAREILDSRGNPTVEVDLYTAKGLFRAAVPSGASTGIY  
EAELELRDGDKQRYLGKGVLKAVDHINSTIAPALISSGLSVVEQEKLNLMLIELDGTEN  
KSKFGANAILGVSLAVCKAGAAERELPLYRHIAQLAGNSDLILPVPAFNVINGGSHAG  
NKLAMQEFMILPVGAESFRDAMRLGAEVYHTLKGVIKDKYKDATNVGDEGGFAPNIL  
ENSEALELVKEAIDKAGYTEKIVIGMDVAASEFYRDGKYDLDFKSPTDPSRYITGDQL  
GALYQDFVRDYPVVSIEDPFDQDDWAAWSKFTANVGIQIVGDDLTVTNPKRIERA  
VEEKACNCLLLKVNQIGSVTEAIQACKLAQENGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQ  
IKTGAPCRSERLAKYNQLMRIEELGDEARFAGHNFRNPSVL"
```



*Pf*ENO'nun amino asit dizisinin, amino asit dizisi bilinen diğer bazı ENO'lar ile karşılaştırılması

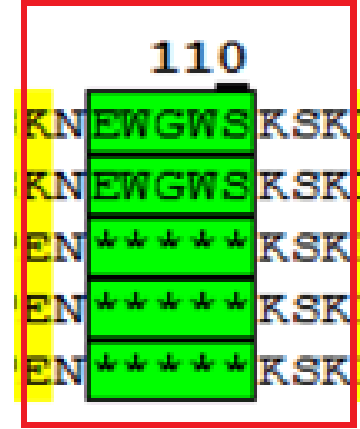
	<u>1</u>	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>
<i>P. vivax</i>	MAHVITRIS	AREIL	DSRGNPTVEVDLE	TNVGI	FRAAVPSGASTGI	YEALELRDNDKS	RYLGKGVQKAIKN	
<i>P. falciparum</i>	MAHVITRIN	AREIL	DSRGNPTVEVDLE	TNLGI	FRAAVPSGASTGI	YEALELRDNDKS	RYLGKGVQKAIKN	
<i>Homo sapiens</i> α	**MSILKIH	AREIF	DSRGNPTVEVDL	FTSKGL	FRAAVPSGASTGI	YEALELRDNDK	TRYMGKGVSKAVEH	
<i>Homo sapiens</i> β	**MAMQKIF	AREIL	DSRGNPTVEVDL	HAKGR	FRAAVPSGASTGI	YEALELRDGD	KGRYLGKGVLKAVEN	
<i>Homo sapiens</i> γ	**MSIEKI	WAREIL	DSRGNPTVEVDL	YAKGL	FRAAVPSGASTGI	YEALELRDGD	KORYLGKGVLKAVDH	

	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>	<u>130</u>	<u>140</u>
<i>P. vivax</i>	INEHIAPKLI	IGL**DCRE	QKKIDNMMVEELD	SGSKNEWGWS	KSKL	GANAILAISMAV	CRAGAAANKVSLYK
<i>P. falciparum</i>	INEI IAPKLI	IGM**NCTE	QKKIDNLMVEELD	SGSKNEWGWS	KSKL	GANAILAISMAV	CRAGAAANKVSLYK
<i>Homo sapiens</i> α	INKTIAPALV	SKKLNVT	QEKIDKLMI*EMD	GTEN*****	KSKF	GANAILGVSLAV	CKAGAVEKGVPLYR
<i>Homo sapiens</i> β	INSTLGPALL	QKKLSVAD	QEKVDFMI*ELD	GTEN*****	KSKF	GANAILGVSLAV	CKAGAAEKGVPLYR
<i>Homo sapiens</i> γ	INSTIAPALI	SSGLSVVE	QEKLDNML*ELD	GTEN*****	KSKF	GANAILGVSLAV	CKAGAAERELPLYR

	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>	<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>
<i>P. vivax</i>	YLAQLAGKKND	QMVLPVPC	LNVI	GGSHAGNKLSF	QEFMIV	PVGAPNFKEALRY	GAEVYHTLTKSEIKKKY
<i>P. falciparum</i>	YLAQLAGKKSD	QMVLPVPC	LNVI	GGSHAGNKLSF	QEFMIV	PVGAPSFKEALRY	GAEVYHTLTKSEIKKKY
<i>Homo sapiens</i> α	HIADLAGNS**	EVILPVP	AFNVI	GGSHAGNKLAM	QEFMIL	PVGAANFREAMR	GAEVYHNLKNVIKEKY
<i>Homo sapiens</i> β	HIADLAGNP**	DLILPVP	AFNVI	GGSHAGNKLAM	QEFMIL	PVGASSFKEAMR	GAEVYHHLKGVIKAKY
<i>Homo sapiens</i> γ	HIAQLAGNS**	DLILPVP	AFNVI	GGSHAGNKLAM	QEFMIL	PVGAESFRDAMR	LGAEVYHTLTKGVIKDKY

	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>	<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>
<i>P. vivax</i>	GIDATNVGDEGG	FAPNILNANEAL	DLLVSAIKS	SAGYEGKVKI	AMDVAASEFY	QADTKTYD	LDLDFKTPNNDK
<i>P. falciparum</i>	GIDATNVGDEGG	FAPNILNANEAL	DLVTAIKS	SAGYEGKVKI	AMDVAASEFY	NSENKTYD	LDLDFKTPNNDK
<i>Homo sapiens</i> α	GKDATNVGDEGG	FAPNILENKEGLE	LLKTAIGK	AGYTDKVVIG	MDVAASEFFR*SGK*	YDLDFKSPDDP*	
<i>Homo sapiens</i> β	GKDATNVGDEGG	FAPNILENNEALE	LLKTAIQ	AAGYDPKVVIG	MDVAASEFYR*NGK*	YDLDFKSPDDP*	
<i>Homo sapiens</i> γ	GKDATNVGDEGG	FAPNILENSEALE	LVKAI	DKAGYTEKIVIG	MDVAASEFYR*DGK*	YDLDFKSPTDP*	

- Bu amino asitler enzimin üç boyutlu yapısında halka oluşturmaktadır ve bu amino asitler olmadığı takdirde parazitler yaşamlarını sürdürememektedir.



- Uygun inhibitör geliştirilmesiyle enzimin inaktif hale getirilmesi amaçlanmaktadır.
- Böylece *Plasmodium*'lar için hayati öneme sahip enolaz geni inaktif olduğundan *Plasmodium*'ların yaşamlarını sürdürememeleri beklenmektedir.



2. Materyal ve Yöntem

Polimeraz zincir reaksiyonu için *P.vivax* Belem soyundan elde edilen saf genomik DNA kullanılmıştır.

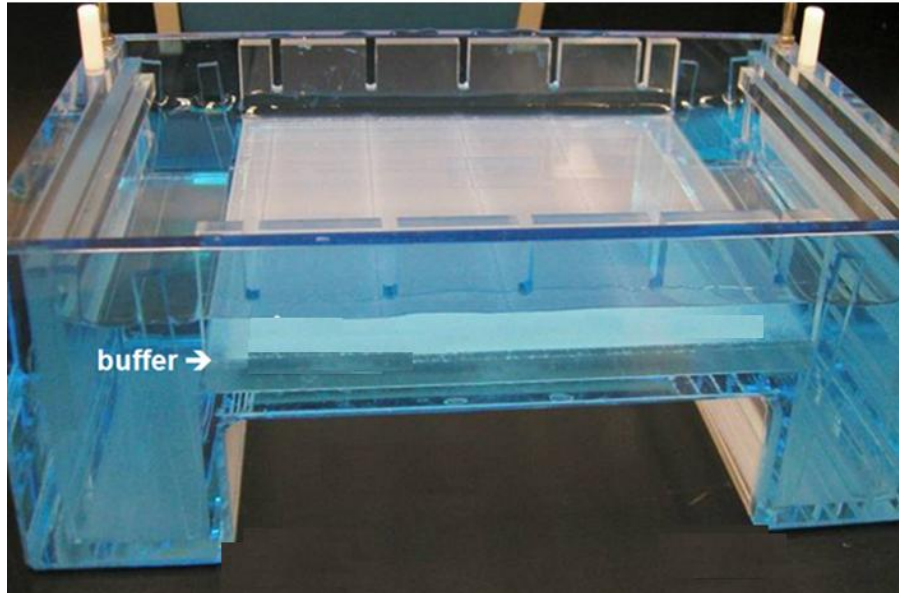
P.vivax enolaz enzimini kodlayan genin tasarlanan 5'ucu ve 3'ucu primerleri aşağıdaki gibidir:

PvENO1 (5' primeri) : CCG/GAATTC/ATG/GCCCCACGTAATTAC

PvENO2 (3' primeri) : TTTT/CTGCAG/TTA/ACTTAATTGGTGCC



- *P.vivax* enolaz enzimini kodlayan genin çalışmalarında ilk olarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlarda *Taq* DNA polimeraz enzimi, 10x *Taq* tamponu, $MgCl_2$, dNTP, dH_2O , 5'primeri olan *PvENO1* ve 3'primeri olan *PvENO2* primerleri kullanılmıştır.
- Polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda çoğalması ngrlen DNA rnekleri agaroz jelde yürütülmüştür.



3. *Pv*ENO'nun Amplifikasyonu

- *Pv*ENO'nun amplifikasyonu üç reaksiyon olarak gerçekleştirilmiştir.
- Reaksiyonlara başlamadan önce *Pv*ENO1 ve *Pv*ENO2 primerleri sulandırılarak 100uM/ μ l ana stok yapılmıştır. Ana stoktan 10 μ l alınıp 40 μ l su ilave edilerek 20uM/ μ l yapılmıştır.



Birinci Reaksiyon

- Bu çalışmada *P.vivax* DNA örneği (30µg/ml) 1:10 sulandırılarak 3µg/ml şeklinde kullanılmıştır.
- Reaksiyon şartları aşağıda verilmiştir:

10x <i>Taq</i> Tamponu	5 µl (enzim ile beraber verilmiştir)
MgCl ₂	3 µl
dNTP	5 µl
<i>Pv</i> ENO1	2,5 µl
<i>Pv</i> ENO2	2,5 µl
Kalıp DNA	1 µl (3µg/ml)
<i>Taq</i> DNA polimeraz	1 µl
dH ₂ O	30 µl (son hacim 50 µl olacak şekilde)

- Öncelikle 95⁰C'de 5 dakika enzim ilavesi olmadan ön denatürasyon basamağı gerçekleştirilmiştir. Daha sonra amplifikasyon 94⁰C'de 2 saniye, 94⁰C'de 1,5 dakika, 40⁰C'de 2 dakika, 72⁰C'de 2 dakika ve 45 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.
- Amplifikasyon sonrası PCR ürünü hazırlanan %1'lik agaroz jelde 40mA'de 1-1,5 saat süresince yürütülmüştür. Elektroforez sonrasında UV transilluminatöründe görüntülenmiştir.





Birinci reaksiyon sonrası UV transilluminatöründe görüntülenen agaroz jel



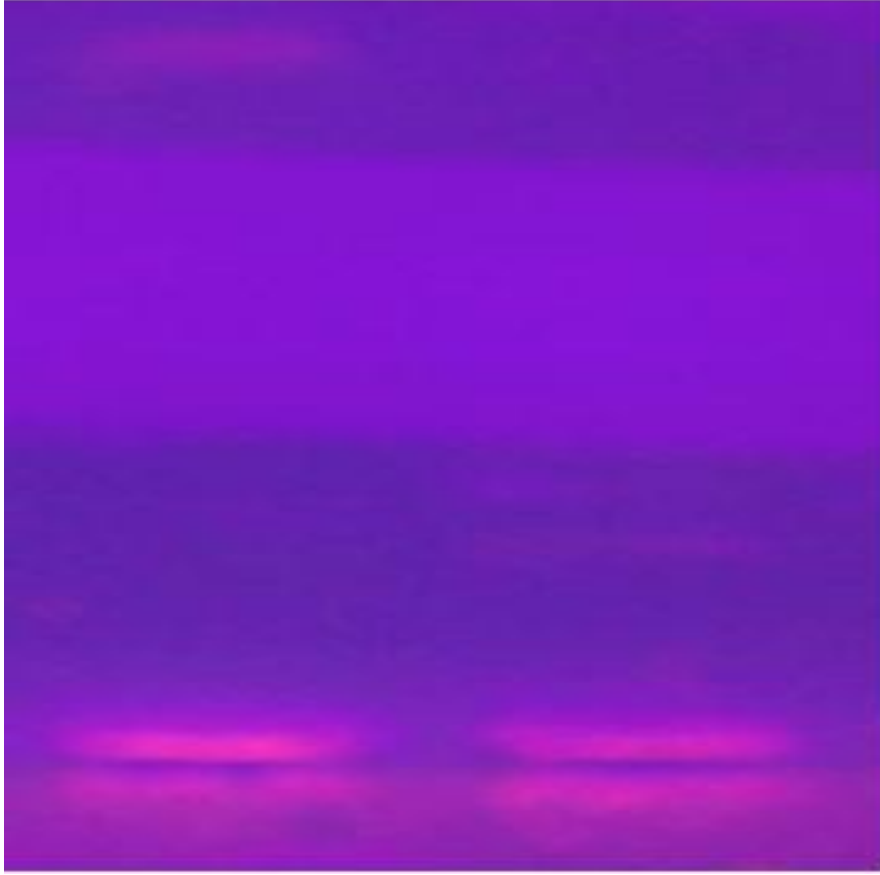
İkinci Reaksiyon

- İkinci reaksiyonda *P.vivax* DNA örneği sulandırılmamıştır ve konsantrasyonu 30µg/ml olan daha yoğun DNA ile çalışılmıştır.
- Reaksiyon şartları aşağıda verilmiştir:

10x <i>Taq</i> Tamponu	5 µl (enzim ile beraber verilmiştir)
MgCl ₂	3 µl
dNTP	5 µl
<i>Pv</i> ENO1	2,5 µl
<i>Pv</i> ENO2	2,5 µl
Kalıp DNA	1 µl (30µg/ml)
<i>Taq</i> DNA polimeraz	1 µl
dH ₂ O	30 µl (son hacim 50 µl olacak şekilde)

- Öncelikle 95⁰C'de 5 dakika enzim ilavesi olmadan ön denatürasyon basamağı gerçekleştirilmiştir. Daha sonra amplifikasyon 94⁰C'de 2 saniye, 94⁰C'de 1,5 dakika, 40⁰C'de 2 dakika, 72⁰C'de 2 dakika ve 45 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.
- Amplifikasyon sonrası PCR ürünü hazırlanan %1'lik agaroz jelde 40mA'de 1-1,5 saat süresince yürütülmüştür. Elektroforez sonrasında UV transilluminatöründe görüntülenmiştir.





İkinci reaksiyon sonrası UV transilluminatöründe görüntülenen agaroz jel



Üçüncü Reaksiyon

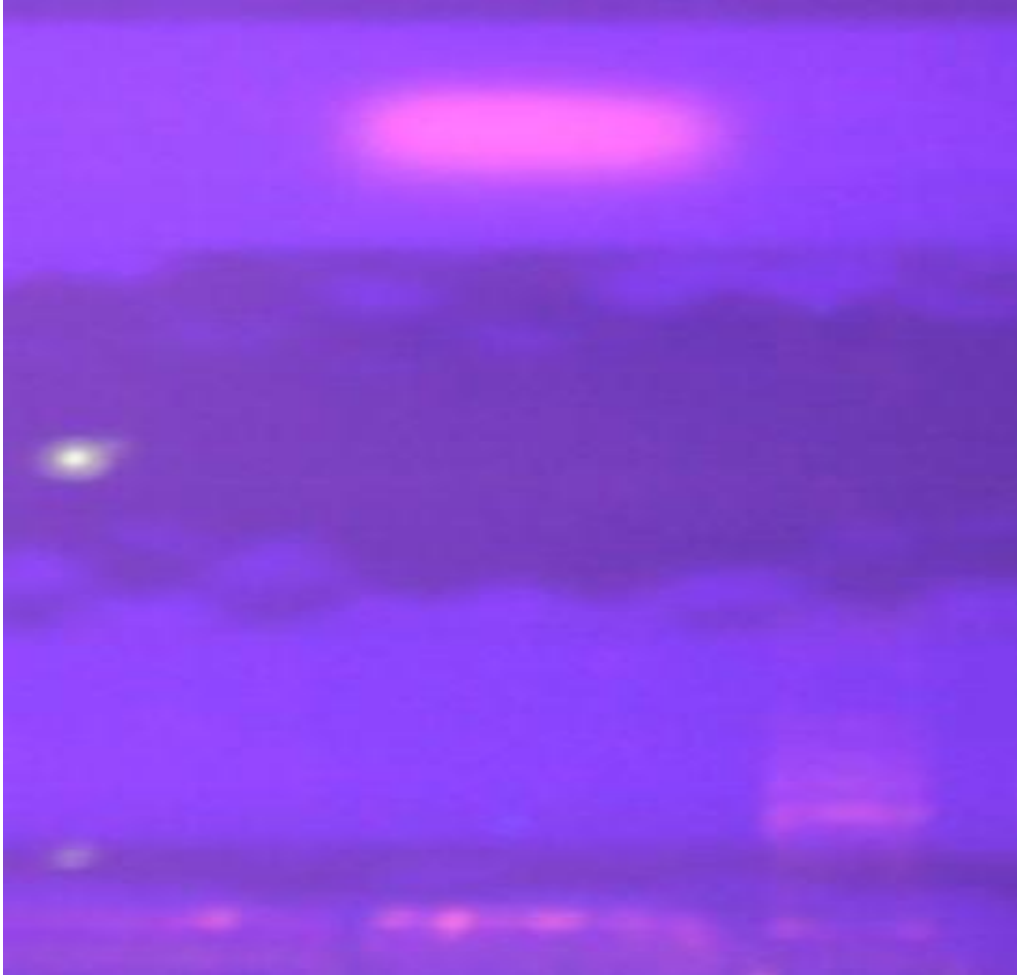
- İkinci reaksiyonun da olumsuz sonuç vermesi nedeniyle üçüncü reaksiyonda *P.vivax* DNA örneği (30µg/ml) 1:10 sulandırılarak 3µg/ml şeklinde kullanılmıştır, kullanılan *P.vivax* DNA miktarı arttırılmıştır ve amplifikasyonun gerçekleştirileceği sıcaklık ve süreler değiştirilmiştir.
- Reaksiyon şartları aşağıda verilmiştir:

10x <i>Taq</i> Tamponu	5 µl (enzim ile beraber verilmiştir)
MgCl ₂	3 µl
dNTP	5 µl
<i>Pv</i> ENO1	2,5 µl
<i>Pv</i> ENO2	2,5 µl
Kalıp DNA	4 µl (3µg/ml)
<i>Taq</i> DNA polimeraz	1 µl
dH ₂ O	27 µl (son hacim 50 µl olacak şekilde)



- Amplifikasyon 95⁰C'de 3dakika, 95⁰C'de 30 saniye, 55⁰C'de 40 saniye, 68⁰C'de 7 dakika,30 saniye ve 20 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.
- Amplifikasyon sonrası PCR ürünü hazırlanan %1'lik agaroz jelde 40mA'de 1-1,5 saat süresince yürütülmüştür. Elektroforez sonrasında UV transilluminatöründe görüntülenmiştir.





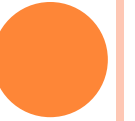
Üçüncü reaksiyon sonrası UV transilluminatöründe görüntülenen agaroz jel

SONUÇLAR

- *Pv*ENO'nun klonlanması amacıyla üç reaksiyon gerçekleştirilerek reaksiyon koşulları optimize edilmeye çalışılmıştır.
- Reaksiyonların olumsuz sonuçlanmasını PCR bileşenleri, PCR koşulları ve kullanılan DNA örneği etkilemiş olabilir.
- İleride yapılacak çalışmalarda reaksiyon şartlarının optimize edilmesi durumunda olumlu sonuç alınması beklenmektedir.



TEŐEKKÜRLER



KAYNAKLAR

- **Akdur R**, 2001. Sıtma, Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü, Ankara.
- **Akdur R**,2004. Sıtma ve Sıtma Salgınları Tarihi, Ankara.
- **Alver O, Akalın H, Mıstık R, Helvacı S, Töre O**, 2005. Bursa'da Sıtma Epidemiyolojisi. *Türkiye Parazitolojisi Derg*, 29(2):68-72.
- **Canda MŞ** 1991. Sıtmanın ekopatolojisi ve ülkemiz açısından önemi. *T Parazitolojisi Derg* 15(1): 1-12.
- **Cox-Singh J, Davis TME, Lee, Kim-Sung, Shamsul, S.S.G., Matusop, A., Ratnam, S., Rahman, H.A., Conway, D.J. ve Singh, B.**, 2008. "Plasmodium knowlesi Malaria in Humans is Widely Distributed and Potentially Life Threatening" *Clinical Infectious Diseases*, 46: 165-171.
- **Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DMA, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM,Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Frase CM, Barrell B**, 2002. Genome sequence of the Human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 419(6906): 498-511.
- **Greenwood B ve Mutabinga T**, 2002. "Malaria in 2002", *Nature*, 415:670-672.
- **Kayser FH**, 2005. *Medical Microbiology*, Thieme, Stuttgart-New York.
- **Kocaçiftçi İ**, 2007. "Plasmodium vivax'ın Tanısında Kalın Damla ile İmmunokromatografik Yöntemin Karşılaştırılması", Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı.
- **Kuman HA**. Gap ve Parazit Hastalıkları; Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın No:11, İzmir:1993
- **Önlen Y, Çulha G, Ocak S, Savaş L, Güllü M**, 2007. Yurtdışı kökenli *Plasmodium falciparum* sıtması: Dört olgu sunumu. *Türkiye Parazitolojisi Derg*, 31(4): 256-259.

- **Özbilgin A**, 2009. Parazit Hastalıklarının Türkiye'deki Durumu, Tanısı ve Sorunları. ANKEM Dergisi Yayınları(Ek2):216-220.
- **Özcel MA**, 1999(a) Sıtma. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No:16, 1-190.
- **Özcel MA**, 1999. Sıtma, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- **Pal-Bhowmick I, Kumar N, Sharma S, Coppens I, Jarori GK**, 2009. *Plasmodium falciparum* enolase: stage-specific expression and sub-cellular localization. *Malaria Journal* 8:179
- **Read M, Hicks KE, Sims PFG, Hyde JE**, 1993. Molecular characterisation of the enolase gene from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* Evidence for ancestry within a photosynthetic lineage. Department of Biochemistry and Applied Molecular Biology, University of Manchester Institute of Science and Technology, Manchester, England.
- **Roth EF, Calvin MC, Max-Audit I, Rosa J & Rosa R**, 1988. The enzymes of the glycolytic pathway in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites, *Blood* 72, 1922-1925
- **Unat EK, Yücel A, Altaş K ve Samastı M**, 1995. Unatı'nın Tıp Parazitolojisi – İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları: 15, İstanbul.
- **Vander-Jagt DL, Hunsaker LA ve Heidrich JE**, 1981. "Partial Purification and Characterization of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*", *Molecular and Biochemical Parasitology*, 4:255-264.
- World Health Organization (WHO), 2009. World malaria report, 2009.
- www.euro.who.int/malaria/
- www.ncbi.nlm.nih.gov

