

# *Plasmodium vivax* ve *Plasmodium falciparum*'un Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genlerinin Nükleotid Düzeyinde Karşılaştırmalı Analizi

Ekrem AKBULUT, Venhar ÇELİK, Dilek TURGUT BALIK

Fırat Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Elazığ

**ÖZET:** Bu çalışmada *Plasmodium vivax*'ın laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan genin nükleotid dizisi diğer bir sıtma paraziti olan *Plasmodium falciparum*'un aynı enzimini kodlayan genin nükleotid dizisi ile karşılaştırılmıştır. İki dizi arasındaki benzerlik %74,8' dir. *Plasmodium vivax* laktat dehidrogenazının % GC değeri (%46,6) *Plasmodium falciparum* laktat dehidrogenazından (%33) daha yüksektir. Plasmodial laktat dehidrogenazdaki 5 amino asit insersiyonuna karşılık gelen nükleotid dizisi aynı zamanda *Plasmodium vivax*'da da mevcuttur. Bu bölge *Plasmodium falciparum*'da olduğu gibi yeni antimalarial tasarımında hedef olacaktır.

**Anahtar Sözcükler:** Laktat dehidrogenaz, antimalarial, gen klonlama, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*

## **Comparative Analysis at the Nucleotide Level of the Genes Encoding the Lactate Dehydrogenase Enzyme of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum***

**SUMMARY:** In this study, the nucleotide sequence of the enzyme lactate dehydrogenase from *Plasmodium vivax* has been compared to the same enzyme from another malaria parasite *Plasmodium falciparum*. It was found that the identity between two sequences was 74.8%. The percentage of the GC value was found to be higher in the *Plasmodium vivax* lactate dehydrogenase (46.6%) than in that of *Plasmodium falciparum* (33%). The nucleotide sequence that corresponds to the 5 amino acid insertion in Plasmodium lactate dehydrogenase is also present in *Plasmodium vivax*. This site will be targeted in the design of novel antimalarials for *Plasmodium vivax* as has been for *Plasmodium falciparum*.

**Key Words:** Lactate dehydrogenase, antimalarials, gene cloning, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*

## **GİRİŞ**

Sıtmanın *Anopheles* cinsi sivrisinekler tarafından bulaştırıldığına keşfinden bu yana yüzyıldan daha fazla zaman geçmesine rağmen sıtma hala kontrol altına alınamamıştır. Bu hastalığın tüm dünyada kontrol dışına çıkmasının iki temel nedeni vardır. Bunlardan ilki; sıtma parazitlerinin tek konağı olan anofel cinsi sivrisineklerin bilinen insektisidlere karşı direnç kazanması, ikincisi ise günümüzde bazı sıtma parazitlerinin mevcut antimalarial ilaçlara karşı direnç kazanmış olmasıdır. Bu durum yeni antimalarial ilaçların geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Parazitlerin metabolik yollarında kullandıkları enzimler yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmalarının ilk hedefle-

rinden birisidir. *Plasmodium*'un glikolitik enzimleri hem yeni antimalarial ilaçlar için hedef moleküller hem de hastalığın teşhisinde kandaki parazit düzeyini gösteren birer indikatör olarak tanımlanmıştır (3-6). Bu bilgiler ışığında plazmodiyal laktat dehidrogenaz (pLDH) yeni antimalarial ilaçların geliştirilmesi için hedef enzim olarak seçilmiştir. Laktat dehidrogenaz enzimi insan sıtma parazitlerinin karbohidrat metabolizmasında önemli bir rol oynar. Parazit, bu enzim sayesinde glikolizin son ürünü olan pirüvik asidi dönüşümlü bir reaksiyonla laktik aside çevirmektedir. Dolayısıyla bu enzimin inhibisyonu parazitin yaşamının sonlandırılmasını sağlayacaktır (7). Ancak aynı enzim hem insanda hem de parazitte bulunduğu için insan LDH'nin etkilenmeden kalması büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla pLDH'nin elektroforetik, kinetik ve yapısal olarak insan LDH'ından farklı olduğu gösterilmiştir (1, 4, 7, 10, 13).

Bu yaklaşım *Plasmodium falciparum* LDH'ına (pLDH) uygulanmaktadır. Aynı yaklaşımı dünyada ve Türkiye'de en yaygın *Plasmodium* türü olan *Plasmodium vivax*'a da uygula-

Geliş tarihi/Submission date: 07 Şubat/07 February 2005

Düzeltilme tarihi/Revision date: 14 Mart/14 March 2005

Kabul tarihi/Accepted date:

Yazışma /Corresponding Author: Dilek Turgut Balık

Tel: (+90) (424) 237 00 00/ 39 44 Fax: (+90) (424) 233 00 62

E-mail: dilekbalik@gmail.com

Bu çalışma The Wellcome Trust (Grant No: 060406 UK), TUBİTAK (Proje No: TBAG 1969) ve Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 565, 682, 694) tarafından desteklenmiştir.

mak için bu türün laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen izole edilmiş ve amino asit dizisinin analizi yapılmıştır (12). Bu çalışmada ise klonlanmış olan genin nükleotid dizisi *Plasmodium falciparum* ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

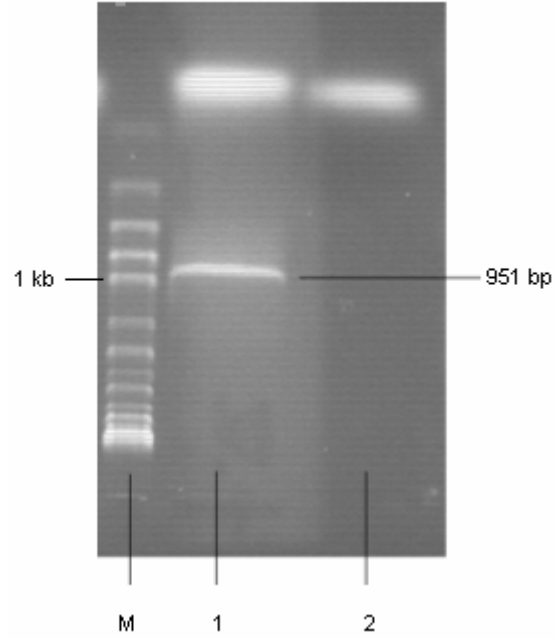
*PvLDH* enzimini kodlayan genin tamamının izole edildiği *P. vivax* Belem soyu genomik DNA ile gerçekleştirilen amplifikasyon çalışmalarında *Pv3*: 5'ATG ACG CCG AAA CCC AAA ATT GTG CTC GTC GGG3' ve *Pv4*: 5'AAT GAG CGC CTT CAT CCT TTT AGT CTC CGC AAC TGC C3') primerleri kullanılmıştır. En fazla ürün oluşumu gözlenen reaksiyon da 5 µl 10 x *AmpliTaq* Gold DNA Polimeraz taponu (enzim ile beraber verilmiştir), 3 µl MgCl<sub>2</sub> (stok; 25 mM), 5 µl dNTP'ler (stok; 10 mM'lık dNTP'lerden 10'ar µl ve 10 µl dH<sub>2</sub>O), 1 µl 5' primeri (stok; 50 pmol/µl), 1 µl 3' primeri (stok; 50 pmol/µl), 1 µl kalıp DNA (stok; 20 ng/µl), 2.5 ünite (0.5 µl) *AmpliTaq* Gold DNA polimeraz (stok; 5 ünite/µl) (Applied Biosystems) ve son hacim 50 µl olacak şekilde 33,5 µl dH<sub>2</sub>O kullanılmıştır.

Amplifikasyon 94°C'de 1,5 dakika, 55°C'de 2 dakika, 72°C'de 2 dakika ve 45 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyonu takiben DNA % 1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve DNA UV transillüminatör kullanılarak görüntülenmiştir. Jelden geri kazanılan DNA pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektörüne (Promega, UK) aktarılmış ve *E. coli* JM109 hücrelerine yapılan transformasyon sonrası elde edilen koloniler genin varlığının ön bir ispatı için önce laboratuvarında koloni PCR ile test edilmiş, daha sonra da koloni PCR ile pozitif sonuç veren kolonilerden yararlanılarak DNA ekstraksiyonu yapıp bu DNA'nın dizi analizi gerçekleştirilmiş ve doğru genin klonlandığı ispatlanmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

***PvLDH* Geninin Tam Uzunluğunun *P. vivax* Belem Soyu Genomik DNA'sından İzolasyonu ve Klonlanması:** Genomik DNA'nın amplifikasyonu sonrasında örnekler % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 1). *Pv3-Pv4* primer çifti ile gerçekleştirilen reaksiyonda muhtemel pozitif bant (1. hat) görülmüştür. 1. hattaki muhtemel pozitif bant jelden kesilerek alınmış, saflaştırılmış ve pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektörü içerisine klonlanmıştır. Koloni PCR ile istenen genin klonlandığına dair ön bir doğrulama yapılmıştır. Koloni PCR sonucunda pozitif olarak tespit edilen koloninin bir gece geliştirilmiş olan stok kültüründen DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve dizi analizinin yapılması için MWG-Biotech'e, Almanya, gönderilmiştir. pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektör içerisine aktarılan *PvLDH* DNA'sının tam uzunluğunun çift yönde dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi neticesinde okunan bu dizi *PfLDH* ve dizisi bilinen diğer LDH'lar ile karşılaştırılmıştır. Bütün LDH'ların karakteristiği olan katalitik amino asitlerin klonlanmış olan DNA'da da bulunduğu tespit edilmiş ve böylece klonlanan DNA parçasının *P. vivax* LDH'ı olduğu ispatlanmıştır.

***PvLDH* Geninin Nükleotid Dizisinin Analizi:** İzolasyonu ve klonlanması gerçekleştirilen *PvLDH*'ı kodlayan genin nükleotid dizisi *PfLDH*'ın nükleotid dizisiyle karşılaştırmalı olarak Tablo 1'de verilmiştir.



**Şekil 1.** *Pv*Belem genomik DNA kullanılarak spesifik primer çiftleri ile *PvLDH* geninin amplifikasyonu. M: Markır (Hyper Ladder I, 200 bp). **Hatlar: (1)** *Pv3-Pv4* (951 bp); **(2)** *Pv3-Pv4* Negatif kontrol

*P. vivax* laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen, *PfLDH* geninde olduğu gibi, 951 nükleotid (316 amino asit, stop kodonu hariç) içermektedir. Yine *PfLDH*'da olduğu gibi (1) *PvLDH*'ı kodlayan gen de intron içermemektedir. *PvLDH*, ATG kodonu ile başlayıp TTA kodonu ile sonlanmaktadır. *PvLDH* geninin nükleotid dizisi elde edildikten sonra veriler Gene Tool Lite 1.0 isimli yazılım programı ile değerlendirilmiştir. Buna göre *PvLDH* ve *PfLDH*'ın nükleotid düzeyindeki benzerliği %74,8'dir.

***PvLDH* Geninde Her Bir Nükleotidin Kullanım Sıklığı:** *PvLDH* geninde her bir nükleotidin kullanım sıklığı Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2.** *PvLDH* geninde her bir nükleotidin kullanım sıklığı.

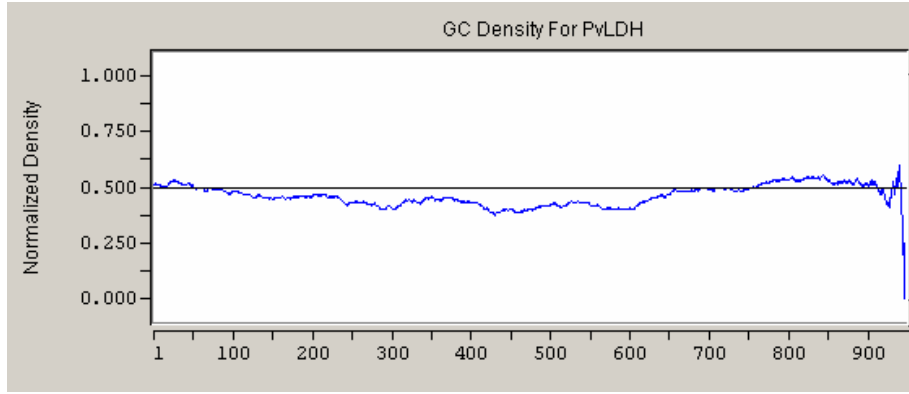
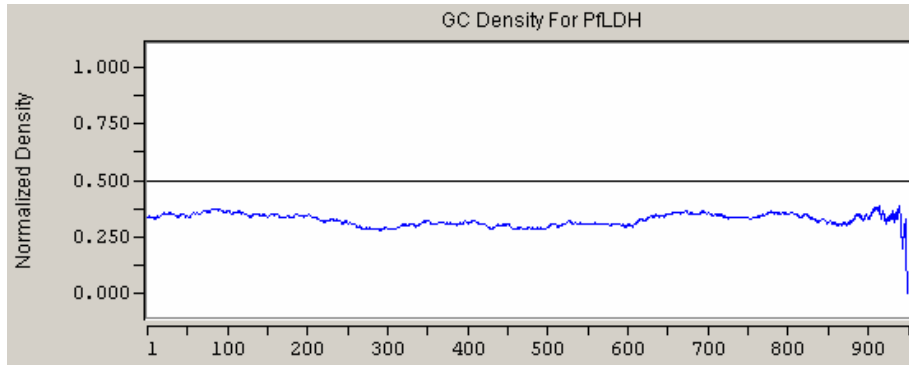
	A (Adenin)		T (Timin)		G (Guanin)		C (Sitozin)	
	Pv	Pf	Pv	Pf	Pv	Pf	Pv	Pf
<b>Sayı</b>	273	341	233	296	250	187	192	127
<b>%</b>	28,8	35,9	24,6	31,1	26,4	19,7	20,3	13,4

*P. vivax* ve *P. falciparum* arasında nükleotid kullanım oranları açısından yapılan kıyaslamada; *P. vivax*'ın *P. falciparum*'a oranla adenin ve timin nükleotidlerini kullanım sayısının daha az olduğu, buna karşın guanin ve sitozin nükleotidlerini kulla

Plazmodiyal laktat dehidrogenazlarının karşılaştırmalı analizi

Pv	ATG <b>ACG</b> CCG <b>AAACCC</b> AAAAT <b>TGTGCTCGT</b> CGGG <b>TCGGGC</b> ATGAT <b>CGGAGGCGT</b> GATGGCC	
1	-----+-----+-----+-----+-----+-----+	60
Pf	AT <b>GGCTCC</b> AAA <b>AGCA</b> AAAAT <b>CGTTT</b> AG <b>TTGGCTCAGGT</b> ATGAT <b>TGGAGGAGT</b> AATGGCT	
Pv	AC <b>GGT</b> GAT <b>TGTG</b> CAGAA <b>GAACC</b> TGGGGGACGTAGT <b>GATGTTT</b> GACGTAGT <b>GAAAA</b> CATG	
61	-----+-----+-----+-----+-----+-----+	120
Pf	AC <b>CTTA</b> AT <b>TGTT</b> CAGAA <b>AAATT</b> TAGGAGAT <b>GTAGTTT</b> TG <b>TTCG</b> ATAT <b>TGTAA</b> AGAACATG	
Pv	CCCCAAGGAAAGGC <b>ACTAG</b> ATAC <b>GCTCTCA</b> CTCGAAT <b>GTGATGG</b> CTTAT <b>TCCA</b> ATTG <b>CAAG</b>	
121	-----+-----+-----+-----+-----+-----+	180
Pf	CCACATGGAAAAGCT <b>TTAG</b> ATACAT <b>CTCATA</b> CTAAT <b>GTTATGG</b> CATAT <b>TCAA</b> ATTG <b>CAAA</b>	
Pv	GTGACTGGCTCGA <b>ACTCG</b> TATGAT <b>GACTTGA</b> AGGGAGCCGACGTGGT <b>GATCGT</b> CACTGCG	
181	-----+-----+-----+-----+-----+-----+	240
Pf	GTAAGTGGTTCAA <b>ACTTAT</b> GACGAT <b>TTGGCTGG</b> AGCAGAT <b>GTAGTAA</b> TAGTAACAGCT	
Pv	GGATTTACTAAAGCACCAGGAAAGAGCGACAAGGAATGGAACCGAGATGATTTACTCCCC	
241	-----+-----+-----+-----+-----+-----+	300
Pf	GGATTTACCAAGGCC <b>CCAGG</b> AAAGAGT <b>GACAA</b> AGAAT <b>GGAATAG</b> AGATGATTTATTACCA	
Pv	TTGAATAACAAAAT <b>TATG</b> ATTGAGAT <b>TGGGG</b> ACATAT <b>TAA</b> GAACCT <b>TTGCC</b> CAATG <b>CC</b>	
301	-----+-----+-----+-----+-----+-----+	360
Pf	TTAAACAACAAGATTATGATTGAAAT <b>TGGTGG</b> TCATAT <b>TAA</b> GAAGAAT <b>TGTCCA</b> AAATG <b>CT</b>	
Pv	TTTATCATTG <b>TGGT</b> GACGA <b>ACCAG</b> TGGACGTGATGGTGCAGTTACTCTTCGAGCATTCC	
361	-----+-----+-----+-----+-----+-----+	420
Pf	TTTATTATTGTTGTA <b>ACAA</b> ACCAGTAGATGTTATGGTACAATTATTACATCAACATTCA	
Pv	GGAGTCCCAAAAATAAAATC <b>ATCG</b> GATTAGGTGGTGTGCTAGATACATCTAGACTGAAA	
421	-----+-----+-----+-----+-----+-----+	480
Pf	GGTGTTCCTAAA <b>ACA</b> AGATTATTGGTTTAGGTGGTGTAT <b>TAG</b> ATACATCAAGATTGAAG	
Pv	TATTACATATCGCAGAA <b>GTGA</b> ACGCTCTGCCGAGAGATGTTAATGCAC <b>TCA</b> TTGTCGGT	
481	-----+-----+-----+-----+-----+-----+	540
Pf	TATTACATATCTCAGAA <b>TTAA</b> ATGTATGCCAAGAGATGTAATGCACACATTGTAGGT	
Pv	GCACATGGGAACAAGATGGTTCTCCTGAAAAGGTACATCAGATTGGAGGTATCCCAT <b>TG</b>	
541	-----+-----+-----+-----+-----+-----+	600
Pf	GCTCATGGAAATAAAATGGTTCTTTTAA <b>AA</b> AGATACATTACTGTAGGTGGTATCCCTTTA	
Pv	CAAGAATTTATTAATAACAAAAGATTACAGATGAAGAAGTGAAGGCATATTTGATCGC	
601	-----+-----+-----+-----+-----+-----+	660
Pf	CAAGAATTTATTAATAACAA <b>AGTTA</b> ATTTCTGATGCTGAATTAGAAGCTATATTTGATAGA	
Pv	ACTGTCAACACTGCTTTGGAGATTGTGAACCTCCTGCCTCTCCTTATGTTGCC <b>CCAG</b> CT	
661	-----+-----+-----+-----+-----+-----+	720
Pf	ACTGTTAATACTGCATTAGAA <b>ATTG</b> TAACTTACATGCATCACCATATGTTGCACCAGCT	
Pv	GCTGCCATCATCGAA <b>ATGG</b> CCGAATCTTATTTGAAGGATATAAAGAAAGT <b>GCTT</b> GTTTGT	
721	-----+-----+-----+-----+-----+-----+	780
Pf	GCTGCTATTATCGAA <b>ATGG</b> CTGAATCCTACTTAA <b>AGAT</b> TTGAAAAAGTATTAATTTGC	
Pv	TCCACTCTACTAGAGGGACAATACGGCCACAGCAACATCTTTGGTGGTACTCCTCTCGTT	
781	-----+-----+-----+-----+-----+-----+	840
Pf	TCAACCTTGTTAGAAGGACAATATGGACTC <b>CGAT</b> ATATTCGGTGGTACACCTGTTGTT	
Pf	ATCGGGGCACCGGAGTTGAGCAAGTCATCGAGTTGCAGCTGAATGCCGAGGAGAAGACC	
841	-----+-----+-----+-----+-----+-----+	900
Pv	TTAGGTGCTAATGGTGTGAACAAGTTATCGAATTACAATTAAATAGTGAGGAAAAGCT	
Pf	AAGTTCGACGAGGCAGTTGCGGAGACTAAAAGGATGAAGGCGCTCATT <b>TAA</b>	
901	-----+-----+-----+-----+-----+-----+	951
Pv	AAATTTGATGAAGCCATAGCTGAAACTAAGAGAATGAAGGCATTAGCT <b>TAA</b>	

Tablo 1 PvLDH ve PfLDH<sup>1</sup> kodlayan genin nükleotid dizisinin karşılaştırması

Şekil 2. *PvLDH*'in GC yoğunluğuŞekil 3 *PfLDH*'in GC yoğunluğu

nım sayısının daha fazla olduğu görülmüştür. *P. vivax*'ın guanin ve sitozin nükleotidleri açısından zengin oluşu yapılacak olan amplifikasyon çalışmalarında yüksek denatürasyon ve bağlanma sıcaklıklarının seçilerek spesifik amplifikasyonların gerçekleştirilmesini mümkün kılacaktır. Gene Tool Lite 1.0 isimli yazılım programı ile yapılan hesaplamalar bu düşüncüyü kanıtlar yönde sonuç vermiş, *P. vivax* çift sarmalının erime sıcaklığı (Tm) 78°C, *P. falciparum* çift sarmalının erime sıcaklığı 72°C olarak hesaplanmıştır.

***PvLDH*'in AT ve GC Yoğunlukları:** *P. vivax* ve *P. falciparum* LDH genlerinin AT ve GC yoğunlukları yine Gene Tool Lite 1.0 isimli yazılım programı ile değerlendirilmiştir. *PvLDH*'in GC yoğunluğu Şekil 2'de, *PfLDH*'in GC yoğunluğu da Şekil 3'de verilmiştir.

Genel olarak *PvLDH* ve *PfLDH* AT bakımından zengindirler. Ama grafiklerde de görüldüğü gibi *P. vivax*'ın *P. falciparum*'a oranla AT yoğunluğu daha az, GC yoğunluğu ise daha fazladır. *P. vivax*'ın % GC yoğunluğu %46,6 iken *P. falciparum*'da bu oran % 33'tür. *PvLDH* geni için yapılan değerlendirmede *PvLDH* geninin ortalarına doğru % GC yoğunluğunun azaldığı belirlenmiştir. Bununla beraber *PfLDH*'a oranla genin başında ve sonunda % GC yoğunluğunun oldukça arttığı görülmektedir. % AT yoğunluğu açısından yapılan değerlendirmede ise %

GC yoğunluğu ile ters orantılı olarak % AT yoğunluğunun genin ortalarına doğru artış gösterdiği yine de eşdeğeri olan bölge ile kıyaslandığı zaman *PvLDH*'in daha düşük % AT yoğunluğuna sahip olduğu görülmektedir. *P. vivax* LDH geninin baş ve son kısmında % GC yoğunluğunun yüksek olması hem bu gen ile gerçekleştirilecek amplifikasyon çalışmalarında spesifik ve yüksek erime ısısına sahip primerlerin tasarlanabilmesini mümkün kılması açısından hem de guanin ve sitozin nükleotidleri arasında üç hidrojen bağı bulunması sebebiyle daha kararlı yapı oluşturması bakımından önemlidir. Ayrıca yüksek % GC yoğunluğu termostabilitenin de göstergesidir.

Genel olarak *P. vivax*'tan izole edilen genlerin % GC yoğunluğunun diğer bazı *Plasmodium* türlerindeki eşdeğerlerinden daha yüksek olduğu bilinmektedir. Örneğin; Valin sentetaz enzimini kodlayan gen hem *P. vivax*'tan hem de *P. knowlesi*'den izole edilmiş ve *P. vivax*'taki % GC oranı %54,7, *P. knowlesi*'deki oran ise %46,7 olarak tespit edilmiştir (9).

**Sonuç olarak;** sıtma tedavisinde kullanılan antimalarial ilaçlara karşı gelişen direnç yeni antimalariaların geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Bu çalışmada *PvLDH* geni, yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmaları için hedef olarak seçilmiştir.

*PfLDH*, ilk kez Honduras I isimli soydan (1) daha sonra K1 ve *PFFCBR* isimli soylardan izole edilmiş ve klonlanmıştır (10). Elde edilen verilerden yapıya dayandırılmış ilaç tasarımı çalışmalarında yararlanılmıştır. *PfLDH*, proteini üretilen (11) ve yapısı tanımlanan (2) ilk plazmodiyal enzimdir. Plazmodiyal LDH başlıca iki özelliği ile diğer LDH'lerden ayrılmaktadır. Bunlardan ilki, NADH bağlanma cebinin diğer LDH'lerden farklı konumda bulunması, ikincisi ise enzimin katalitik halkasında 5 amino asit ilavesinin bulunmasıdır. Bu ilave 5 amino asit enzimin katalitik halkasında bir yarı oluşturmaktadır ve bu yarığın gossipol ve türevleri (7) gibi çeşitli enzim inhibitörlerini yapısına alarak enzimin inhibisyonunu sağlama potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir (8).

*P. vivax* laktat dehidrogenaz enzimi günümüze kadar klonlanmış olan ikinci insan sıtma paraziti laktat dehidrogenazıdır. *PvLDH* dizisi, dizisi bilinen diğer LDH'lar ile karşılaştırıldığı zaman tüm anahtar amino asitlere sahip olduğu görülmüştür. *PvLDH*'ın *PfLDH* ile nükleotid düzeyinde %74,8 ve amino asit düzeyinde %90,1 oranında benzerlik göstermesi *PfLDH*'a özgü yapısal ve biyokimyasal özelliklerin *PvLDH*'da da görülebileceği fikrini kuvvetlendirmektedir. Daha önce *PfLDH*'da gösterilen, yeni antimalarial ilaçların tasarlanması için hedef bölge olarak nitelendirilen aktif bölge halkasındaki ilave 5 amino asidin, *PvLDH*'da da tespit edilmiş olup *PfLDH*'a uygulanan yaklaşımların *PvLDH*'a da uygulanabileceğini tavsiye etmektedir.

*P. vivax* dünya üzerinde en geniş yayılım gösteren *Plasmodium* türü olması sebebiyle, bu parazite karşı geliştirilecek yeni antimalarial ilaçlar sıtma ile mücadelede büyük öneme sahiptir. Yapılan bu çalışma ile *PvLDH* enzimini kodlayan genin nükleotid dizisi analiz edilmiş olup, yeni bir antimalarial ilacın geliştirilmesi çalışmalarında hedef bölge olan enzim aktif bölgesi tanımlanmıştır.

Daha sonraki çalışmalarda protein saflaştırılacak ve enzimin yapısal ve kinetik analizlerinin yapılmasında kullanılarak elde edilecek veriler yeni antimalarialların tasarlanması çalışmalarında kullanılacaktır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı destekleyen The Wellcome Trust (Grant No: 060406 UK), TÜBİTAK (Proje No: TBAG 1969) ve Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 565, 682, 694)'ne teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. **Bzik DJ, Fox BA, Gonyer K**, 1993. Expression of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol*, 59: 155-166.
2. **Dunn CR, Banfield MJ, 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. *Nature Structural Biology*, 3 (11): 912-915.

3. **Klenerman P, Dickson H**, 1992. Plasma lactate dehydrogenase estimation in the diagnosis of malaria. *Ann Trop Med Parasitol*, 86: 563-565.
4. **Makler MT, Hinrichs DJ**, 1993. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *J Trop Med Hyg*, 48 (2): 205-210.
5. **Makler MT, Piper RC, Milhous WK**, 1998. Lactate dehydrogenase and the diagnosis of malaria. **Parasitology Today**, 14 (9): 376-377.
6. **Roth EFJR, 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 (6): 1922-1925.
7. **Royer RE, Deck LM, Campos, NM, Hunsaker LA, Vander Jagt DL**, 1986. Biologically active derivatives of gossypol: Synthesis and antimalarial activities of peri-acylated gossylic itriles. *J Med Chem*, 29: 1799-1801.
8. **Sessions RB, Dewar V, Clarke AR, Holbrook JJ**, 1997. A model of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase and its implications for the design of improved antimalarials and the enhanced detection of parasitaemia. *Protein Engineering*, 10 (4): 301-306.
9. **Snewin VA, Khouri E, Mattei D, Tekai F, Delarue M, Mendis KN, David PH**, 1996. Cloning and characterisation of a gene from *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi*: Homology with valine-tRNA synthetase. *Gene*, 173: 137-145.
10. **Turgut-Balik D, Holbrook JJ**, 2001. Determination of the DNA and amino acid sequences of the lactate dehydrogenase gene from *Plasmodium falciparum* strains K1 and PF FCBR: A route to the design of new antimalarials. *Turkish J Biology*, 25: 241-250.
11. **Turgut-Balik D, Shoemark DK, Moreton KM, Sessions RB, Holbrook JJ**, 2001. Over-production of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* opens route to new antimalarials. *Biotechnology Letters*, 23: 917-921.
12. **Turgut-Balik D, Akbulut E, Shoemark DK, Celik V, Moreton KM, Sessions RB, Holbrook JJ, Brady RL**, 2004. Cloning, sequence and expression of the lactate dehydrogenase gene from the human malaria parasite, *Plasmodium vivax*. *Biotechnology*, 26: 1051-1055.
13. **Vander-Jagt DL, Hunsaker LA, Heidrich JE**, 1981. Partial purification and characterization of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 4: 255-264.