

Leishmania major ve Leishmania infantum Promastigot Formlarının Karşılaştırmalı Gen Ekspresyon Profilleri

Comparative Gene Expression Profiles of Leishmania major and Leishmania infantum Promastigotes

Özlem Ulusan Bağcı¹, Aygül Sadıqova², Ayşe Caner³

¹İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir, Türkiye

²Texas Medical Branch Üniversitesi, Enfeksiyon Hastalıkları Bölümü, Teksas, USA

³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Cite this article as: Ulusan Bağcı Ö, Sadıqova A, Caner A. Comparative Gene Expression Profiles of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* Promastigotes. Türkiye Parazitolojisi Dergisi 2021;45(2):88-94.

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, *Leishmania major* ve *Leishmania infantum* promastigotlarındaki gen ekspresyonlarının karşılaştırmalı analizi yapılarak, iki tür arasında gen ekspresyon profillerindeki farklılıkların tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: *L. major* (MHOM/IL/80) ve *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP/263) hücre hatları kullanılarak hücre kültürü oluşturulmuştur. Daha sonra, total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilerek; revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ile metabolik yollarda ve nükleik asit sentezinde rol oynayan ve her iki türde ortak olan 30 genin ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi hesaplanmıştır. LeishDB ve KEGG veri tabanları kullanılarak genlerin fonksiyonel işlevleri belirlenmiştir.

Bulgular: Bu çalışmada, *L. major* ile *L. infantum* promastigotlarında ortak olarak ifade edilen ve protein kodlayan 30 farklı gen profili değerlendirilmiş ve iki tür arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p < 0,001$). İki türde ortak olan bu genlerin %29'unun ekspresyon düzeylerinde anlamlı kat farkı tespit edilmiştir. Dokuz genin *L. major*'de ekspresyonu, *L. infantum*'a göre belirgin derecede yüksek olarak tespit edilmiştir (kat değişimi > 1). Bu genler; phosphoglycan beta 1,3 galactosyltransferase-like, lathosterol oxidase-like, fatty acid elongase, 3-oxo-5 alpha-steroid 4-dehydrogenase, calpain-like cysteine peptidase, acetyl-coA synthetase, 3'-nucleotidase/nuclease, 3'-nucleotidase/nuclease precursor ve 3-ketoacyl-coA thiolase-like olarak belirlenmiştir. İki türde ortak olan genlerin karşılık geldiği proteinlerin fonksiyonları veri tabanlarında ayrıntılı olarak incelendiğinde ise, bu genlerin parazitin lipid, protein ve karbonhidrat mekanizmalarında, nükleik asit ve metabolizma fonksiyonlarında rol oynadığı saptanmıştır.

Sonuç: *L. major* ile *L. infantum* türlerinde ortak olarak bulunan genlerin ekspresyon profillerindeki değişiklikler, parazit türleri arasında virülans, patogenez, klinik ve tedavi farklılıklarına neden olabilir. Ayrıca parazite karşı aşı ve ilaç çalışmaları için türlere özgü spesifik veya ortak hedeflerin seçilmesinde gen profillerinin değerlendirilmesi önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gen ekspresyonu, kat değişimi, *Leishmania infantum*, *Leishmania major*, promastigote

ABSTRACT

Objective: This study aimed to determine the differences between the gene expression profiles of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* promastigotes through comparative analysis of gene expressions.

Methods: Cell culture of *L. major* (MHOM/IL/80) and *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP/263) cell lines was performed. Afterwards, total RNA isolation and cDNA synthesis were performed and fold changes in the expression levels of 30 genes that play a role in metabolic pathways and nucleic acid synthesis and co-expressed in two species were evaluated by reverse transcriptase polymerase chain reaction. Functions of genes were determined using LeishDB and KEGG databases.

Results: In this study, profiles of protein-coding 30 genes expressed in *L. major* and *L. infantum* promastigotes were evaluated and significant differences were found between the two species ($p < 0.001$). There was a significant fold change in the expression levels of 29% of genes common in the two species. The expression levels of nine genes in *L. major* were found to be markedly higher than those of *L. infantum* (fold change > 1). These genes include phosphoglycan beta 1.3 galactosyltransferase-like, lathosterol oxidase-like, fatty acid elongase, 3-oxo-5 alpha-steroid 4-dehydrogenase, calpain-like cysteine peptidase, acetyl-coA synthetase, 3'-nucleotidase/nuclease, 3'-nucleotidase/nuclease precursor and 3-ketoacyl-coA thiolase-like. When the functions of the proteins that correspond to the genes common in the two species were examined in detail using the databases, it was determined that these genes play role in lipid, protein, carbohydrate and nucleic acid metabolic functions of the parasite.



Received/Geliş Tarihi: 01.02.2021 Accepted/Kabul Tarihi: 13.04.2021

Address for Correspondence/Yazar Adresi: Özlem Ulusan Bağcı, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir, Türkiye

Phone/Tel: +90 539 860 03 31 E-mail/E-Posta: drozlemulusan@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0002-9695-5703

Conclusion: Alterations in the expression profiles of genes common to *L. major* and *L. infantum* species may cause differences in the virulence, pathogenesis, clinical features and treatment modality between these parasite species. In addition, evaluation of gene profiles is important in the selection of species-specific or common targets for vaccine and drug studies.

Keywords: Gene expression, fold change, *Leishmania infantum*, *Leishmania major*, promastigot

GİRİŞ

Leishmaniasis, protozoa grubunda yer alan *Leishmania* parazitinin farklı türlerinin neden olduğu kompleks bir hastalık grubudur. Dünya Sağlık Örgütü tarafından yedi önemli tropikal hastalıktan biri olarak tanımlanan leishmaniasis, dünya genelinde 98 ülkede görülmekte olup, Asya, Afrika, Amerika ve Akdeniz çevresindeki ülkelerde endemik seyretmektedir. Dünya'da 12-15 milyon insan *Leishmania* türleri ile enfekte olup, 350 milyon kişi risk altındadır. Her yıl 1,5-2 milyon yeni olgu ortaya çıkmakta olup, bu olguların 1-1,5 milyonu kutanöz leishmaniasis iken, 500,000 tanesi visseral leishmaniasis'tir. Her yıl 50,000 kişi hayatını bu hastalık nedeniyle kaybetmektedir (1,2). Tedavi için beş değerli antimon bileşikleri, amfoterisin B, paramomisin ve miltefosin gibi seçenekler bulunmakta, ancak bu ajanların toksisiteleri, yan etkileri ve direnç geliştirmeleri nedeniyle hastalığın tedavisinde birtakım güçlükler yaşanmaktadır (3). Etkin bir aşının geliştirilememiş olması da araştırmacıları bu parazit ile ilgili direnç mekanizmalarını anlamaya, yeni ilaç ve aşı hedefleri bulmaya yönlendirmiştir (4).

Parazitin neden olduğu klinik tablo, kendiliğinden iyileşen deri lezyonlarından (kutanöz form), ölümcül iç organ tutulumuna (visseral form) kadar değişen spektrumda olabilmektedir. Deri enfeksiyonuna neden olan türler genellikle *Leishmania tropica* ve *L. major* iken, visseral forma neden olan türler *L. donovani* ve *L. infantum*'dur (5). Yapılan çalışmalarda *Leishmania* spp.'lerde gen ekspresyonlarının farklı bir şekilde düzenlenmesinin bu klinik varyasyonlardan sorumlu olabileceği belirtilmiştir. *Leishmania*'da prokaryotlardakine benzer olarak transkripsiyon polisistronik olarak gerçekleşmekte ve genomdan uzun pre-mRNA'lar sentezlenmektedir. Devamında pre-mRNA'lar birtakım post-transkripsiyonel modifikasyonlarla birbirinden oldukça farklı mRNA'lara ve proteinlere dönüşebilmektedir (6). Bu mekanizmalar klinik varyasyonların transkripsiyon farklılıklarından kaynaklanabileceğini göstermiştir (7).

Her iki *Leishmania* türü 36 kromozomdan oluşmaktadır (8). *Leishmania major* 32,8 Mb genom büyüklüğüne ve 8,038 gene sahip iken, *L. infantum* 32,1 Mb genom büyüklüğünde ve 8,045 gen içermektedir (9,10). *Leishmania major* ve *L. infantum*'un genomik yapısı %99'un üzerinde benzer olup, türe spesifik genler oransal olarak %1'in altındadır. Benzer genomik yapıya sahip olan bu iki *Leishmania* türünün kendiliğinden iyileşen bir tablodan ölümcül enfeksiyona değişen spektrumda seyredebilmesinden diferansiye ekspresyon genleri sorumlu tutulmaktadır. Diferansiye ekspresyon edilen genlerin metabolizma, hücre organizasyonu, biyogenez ve transportla ilgili olduğu gösterilmiştir. *Leishmania major* ve *L. infantum*'un promastigot formlarında 755 tane diferansiye ekspresyon gen bulunmakla birlikte, bunlardan sadece 91 (%12) tanesi ortak olarak ekspresyon edilmektedir. Her iki türde ekspresyon edilen bu genlerden %50'den fazlasının kodladığı proteinin fonksiyonu veri bankasında yer almamaktadır (11).

Bu çalışmada amacımız korunmuş genomik yapı ve organizasyonlarına rağmen farklı klinik tablolara sahip *L. major* ve *L. infantum* promastigotlarında ortak olan ve protein kodlayan genlerin ekspresyon düzeylerini karşılaştırmak ve etkenin hayatta

kalmasına, virülansına, patojenitesine katkıda bulunan genleri belirleyerek, aşı ve ilaç çalışmaları için yeni hedefler sunmaktır.

YÖNTEMLER

Leishmania Hücre Kültürü

Hücre kültürü için ticari olarak temin edilen *L. major* (MHOM/IL/80) ve *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) hücre hatları kullanılmıştır. Bunun için inaktive edilmiş %10 FBS (Invitrogen), 100 µg/mL streptomycin-100 IU/mL penicillin (invitrogen) ve %1 L-glutamin içeren RPMI-1640 (ThermoFisher) besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 15 mL kültür flasklarına eklenmiştir. Dondurulmuş olarak (-80 °C) saklanan *Leishmania* promastigotları 37 °C'de hızlıca çözündürülerek besiyeri ortamına ekim yapılmış ve 26 °C'de inkübe edilmiştir. Promastigotların logaritmik gelişimi sonunda kültür ortamı steril tüplere aktarılmış ve 1,000 x rpm'de 15 dk santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı atılarak, pellet kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) için kullanılmıştır.

Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

İzolasyondan önce iki suşa ait promastigotların sayısı hemositometri ile belirlenmiştir. Hücre sayısı mililitrede 5×10^6 olacak şekilde RNeasy mini kit (Qiagen) kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonun bütün aşamaları firma protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA konsantrasyonu nanodrop spektrofotometre cihazında (ThermoFisher) 260/280 ve 260/230 absorbanslarda ölçülerek değerlendirilmiştir. İzolasyon sonucunda 50 ng/µL RNA konsantrasyonu ile cDNA sentezi RevertAid H minus first strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi toplam 12 µL hacimde gerçekleştirilmiş ve PZR cihazında 65 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra tüplere; 4 µL reaksiyon tamponu, 2 µL dNTP, 1 µL RevertAid TR-revertaid reverse transcriptase eklenmiştir. Reaksiyon, 42 °C'de 60 dk, 70 °C'de 5 dk ve 4 °C'de ∞ dk olarak termal döngü cihazında gerçekleştirilmiştir. Kullanılmadan önce cDNA 1:10 oranında DNaz/RNaz içermeyen distile su ile dilüe edilmiştir. Oluşan cDNA örnekleri test zamanına kadar -20 °C'de saklanmıştır.

qRT-PZR

Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA örnekleri spesifik primerlerin varlığında amplifiye edilmiştir. Bu işlem için Applied Biosystem cihazı ve SYBR Green I Master Mix (Applied Biosystem) kiti kullanılmıştır. Metabolik yollarda ve nükleik asit sentezinde rol oynayan ve her iki türün promastigot formunda ortak olarak ekspresyon edilen 30 gen bölgesi hedef alınmıştır. Genlerin veri bankasındaki erişim numaraları (www.genedb.org) sitesinden elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan primerler ticari olarak temin edilmiştir (https://www.macrogen.com/en/business/oligo_index.php). Her iki *Leishmania* türünde ortak olan promastigot genlerinin ekspresyon seviyeleri qRT-PZR

yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Reaksiyon 1xSYBR green master miks, 0,8 µM primer konsantrasyonu ve 1 µL cDNA ile total hacim 12,5 µL olacak şekilde hazırlanmış ve 96 kuyucuklu PZR plağına yüklenmiştir. Reaksiyon 95 °C'de 10 dk inkübasyon, 95 °C'de 15 sn, 56 °C'de 1 dk, 72 °C'de 10 sn koşulları altında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada referans gen olarak *ubiquitin hydrolase* geni çalışılmış ve normalizasyon için kullanılmıştır. PZR sonuçları rölatif kat değişimi (fold change, 2-ΔΔCt) yöntemi ile değerlendirilmiştir (12). Bütün analizler üç biyolojik ve üç teknik tekrar ile gerçekleştirilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Bütün istatistiksel analizler GraphPad Prism 6.07 (GraphPad Software Inc.) software programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırmalar ANOVA testi ile yapılmıştır. Tüm testlerde p-değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı farklılık olarak kabul edilmiştir. Genlerin fonksiyonel işlevleri (Functional Annotation) için LeishDB (www.leishdb.com) ve KEGG (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=lif ve https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=lma) veri tabanları kullanılmıştır.

BULGULAR

Leishmania major ve *L. infantum* suşları hücre kültüründe çoğaltıldıktan sonra promastigotlardan total RNA izolasyonu yapılmıştır. Her iki türün promastigotlarında ortak olan 30 genin ekspresyon seviyeleri qRT-PZR ile tespit edilmiş ve kat oranları (Fold Change; FC) araştırılmıştır. Her bir genin üç biyolojik tekrarına ait sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. *Leishmania major* ve *L. infantum* promastigot formlarında ortak eksprese olan genlerin karşılık geldiği proteinlerin fonksiyonları veri tabanlarından ayrıntılı olarak incelendiğinde, bu proteinlerin çoğunun lipit, protein/aminoasit ve karbonhidratların mekanizmasında, hücre organizasyon/biyogenezinde ve metabolizma fonksiyonlarında yer aldığı gösterilmiştir. Üç gen fonksiyonu bilinmeyen grup içinde sınıflandırılmıştır. *Leishmania major* ve *L. infantum*'daki ortak olan bu genlerin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda iki tür arasında anlamlı bir farklılık saptanmıştır (p<0,001). Her genin ekspresyon FC oranları değerlendirildiğinde, genlerin %29'unda ekspresyon düzeylerinde anlamlı fark bulunmuştur. Dokuz tane genin ekspresyon seviyesinin *L. major*'de belirgin derecede yüksek olduğu (FC>1) bulunmuştur. Bunlar; lipit metabolizması ile ilgili "phosphoglycan beta 1,3 galactosyltransferase-like (PPGT)", "lathosterol oxidase-like (LOL)", "fatty acid elongase (FAE)", "3-oxo-5 alpha-steroid 4-dehydrogenase (OSD)"; protein metabolizması ile ilgili "calpain-like cysteine peptidase (CLCP)"; karbonhidrat metabolizması ile ilgili "acetyl-coA synthetase (ACS)", DNA/nükleik asit fonksiyonları ile ilgili "3'-nucleotidase/nuclease (NUC)", "3' nucleotidase/nuclease precursor (NP)" ve metabolizma ile ilgili "3-ketoacyl-coA thiolase-like'dir (KCTL)". Dört genin ekspresyon seviyelerinin iki grupta yaklaşık aynı seviyede olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1A, B). Araştırılan tüm genlerin adı, veri bankasındaki erişim numarası, fonksiyonu ve FC değerleri Tablo 1'de verilmiştir.

TARTIŞMA

Leishmania türlerinin promastigot ve amastigot olmak üzere iki farklı dönemi bulunmaktadır. Promastigot formları vektörde nötral pH'de ve ortalama 25 °C'de yaşamlarını sürdürürken,

makrofajlar içerisine alındığında 35-39 °C arasında ve asidik pH'de amastigot formlara dönüşmektedir (13). *Leishmania major* ve *L. infantum* promastigotları benzer ortamda yaşamlarını sürdürmekte ve benzer morfolojiye sahip olmalarına rağmen, amastigot formları sırasıyla deri lezyonları ve visseral enfeksiyon olmak üzere farklı iki klinik tabloya yol açmaktadır. Bu kadar farklı olan klinik tablodan sorumlu bu iki türün genomik benzerliğinin %99'un üzerinde ve kodlayan gen bölgelerinin %82-94 arasında korunmuş olduğu bildirilmiştir (9). Bu nedenle klinik farklılığın hem promastigot ve amastigot formları arasındaki farklılıklardan, hem de her türe ait promastigot/amastigottaki yüksek oranda diferansiye olan eksprese genlerden ve ortak genlerdeki ekspresyon farklılıklarından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (11).

Bu çalışmada *L. major* ve *L. infantum*'un promastigot formlarında ortak olarak eksprese edilen ve protein kodlayan 30 tane genin ekspresyon profilleri PZR yöntemiyle araştırılmıştır. Promastigotlarda ortak olan bu genlerin karbonhidrat, lipit, protein, DNA/nükleik asit metabolik fonksiyonları, hücre fonksiyonları ve metabolizma ile ilgili olduğu bulunmuştur. Kamçıları sayesinde hareketli olan promastigotlar yüksek oranda ihtiyaç duydukları enerjiyi karbonhidratlardan glikoliz ve trikarboksilik asit (TCA) siklusu aracılığıyla sağlamaktadır. Bu nedenle karbonhidrat mekanizmasında rol alan genler promastigotların canlılığını sürdürmesinde önemli olduğu için, çalışmamızda iki türde de ortak olan enolase (*ENO*), acetyl-coA synthetase (*ACS*) ve aldose-1-epimerase (*AE*) genlerinin ekspresyonları incelenmiştir. *ENO* ve *AE* genleri iki *Leishmania* türünde benzer seviyede eksprese olurken, *ACS* geninin *L. major*'de daha yüksek oranda eksprese olduğu tespit edilmiştir.

Promastigotlarda, *ENO* geni glikolizde 2-fosfogliserrattan fosfoenolpiruvat arasında reversibl dönüşümü; glikoliz ve glikoneogenezde rol alan *AE* geni α-D-glukan'ın β-D-glukana dönüşmesini; *ACS* geni TCA siklusunda ATP'ye dönüşecek olan asetil-KoA'nın sentezlenmesini sağlamaktadır. *ENO*'nun yüksek oranda korunmuş bir gen olduğu, glikoliz ve glikoneogenez gibi hücre için vital olan iki metabolik yolakta görevli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *ENO* parazitin hücre membranı ile temas halinde olan sekretomu içindeki plazminojen reseptörü olup, parazitin virülansına katkıda bulunmaktadır (14). *ENO*'nun parazitin yaşamını sürdürmesi ve virülansı için oldukça önemli olması, ilaç ve aşı çalışmaları için önemli bir hedef olabileceğini düşündürmektedir. Gupta ve ark. (15) tarafından yapılan çalışmada *L. donovani* ile enfekte edilen ve visseral leishmaniasis tablosu gelişen farelere rekombinant *ENO* proteininin verilmesi ile Th1 hücrelerinin uyarıldığı, IL-12, IFN-γ, TNF-α ve iNOS düzeylerinin anlamlı seviyede yükseldiği saptanmış olup, *ENO* ile aşılamanın parazit yükünde %90 oranında azalma sağladığı gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak çalışmamızda *L. major* ve *L. infantum* türlerinde *ENO* gen ekspresyon seviyesinin eşit oranda tespit edilmesi, bu genin iki *Leishmania* türünün eradikasyonu için ortak bir hedef olabileceğini göstermektedir (11).

Karbonhidrat metabolizmasında rol oynayan genler ve kodladıkları proteinler ile ilgili çalışmalar tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi ve yeni hedef ilaçların keşfi için devam etmektedir. Beş değerli antimon bileşiklerine dirençli ve duyarlı *L. donovani* suşlarında yapılan bir transkriptomik çalışmada, dirençli suşlarda parazit için esansiyel olan ve virülansı artıran glikoliz enzimlerine daha yüksek oranda rastlanmıştır ve *AE* geni dirençli suşlarda 15 kat daha

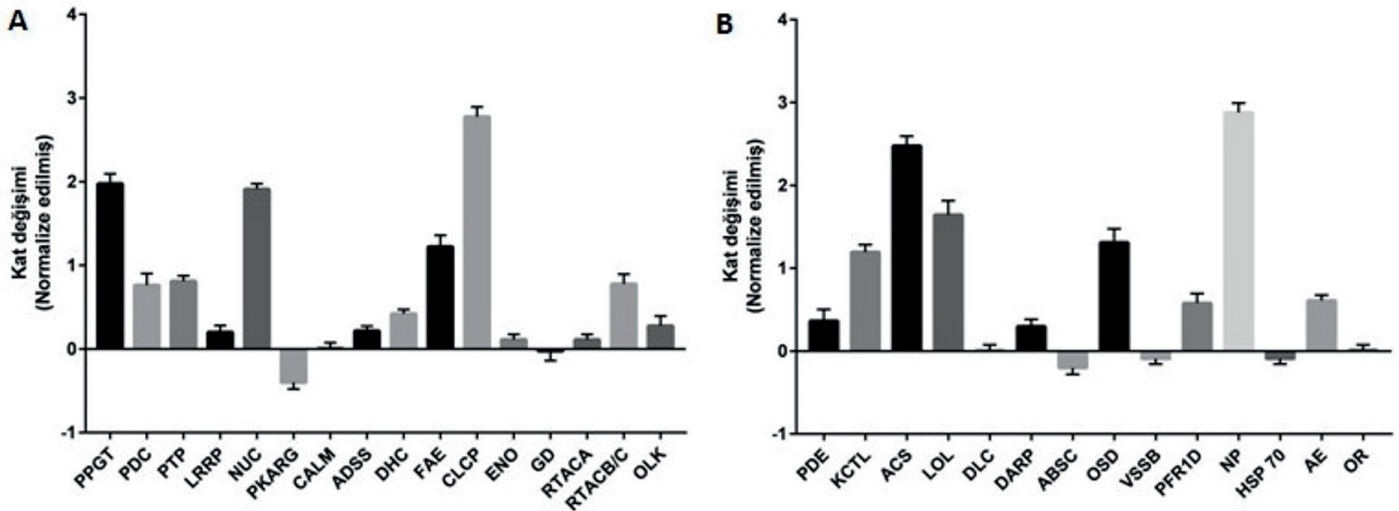
Tablo 1. *Leishmania major* ve *L. infantum* promastigotlarında ortak ifadelenen genlerin adı, fonksiyonu, veri bankasındaki erişim numarası ve FC değerleri

Gen adı	Kısaltma	Fonksiyonu	<i>L. major</i> gen DB AN	<i>L. infantum</i> gen DB AN	FC1	FC2	FC3
Phosphoglycan Beta 1,3 Galactosyltransferase-like	PPGT	Lipit	LmjF.02.0160	LinJ.02.0140	2	1,85	2,08
Fatty Acid Elongase	FAE		LmjF.14.0670	LinJ.14.0700	1,2	1,1	1,37
Lathosterol Oxidase-Like	LOL		LmjF.23.1300	LinJ.23.1560	1,7	1,45	1,78
3-oxo-5-alpha-Steroid 4-Dehydrogenase	OSD		LmjF.25.1770	LinJ.25.1850	1,3	1,15	1,48
Peptidyl Dipeptidase C	PDC	Protein/aminoasit	LmjF.27.2660	LinJ.01.0850	0,8	0,61	0,88
Calpain-Like Cysteine Peptidase	CLCP		LmjF.27.0500	LinJ.14.0910	2,8	2,65	2,88
Protein Kinase A Regulatory Subunit	PKARG		LmjF.13.0160	LinJ.13.0160	-0,4	-0,48	-0,32
Glutamate Dehydrogenase	GD		LmjF.15.1010	LinJ.15.1070	0	-0,15	0,08
HSP 70	HSP 70	Karbonhidrat	LmjF.32.1940	LinJ.32.2050	-0,1	-0,15	-0,02
Enolase	ENO		LmjF.14.1160	LinJ.14.1240	0,1	0,05	0,18
Acetyl-CoA Synthetase	ACS		LmjF.23.0710	LinJ.23.0880	2,5	2,35	2,58
Aldose 1-Epimerase	AE		LmjF.35.0980	LinJ.35.1000	0,6	0,55	0,68
3'-Nucleotidase/Nuclease	NUC	DNA/nükleik asit	LmjF.12.0400	LinJ.12.0350	1,9	1,85	1,98
3' Nucleotidase/Nuclease Precursor	NP		LmjF.31.2310	LinJ.31.2380	2,9	2,75	2,98
ATPase Beta Subunit C	ABSC		LmjF.25.1180	LinJ.25.2590	-0,2	-0,28	-0,12
Adenylosuccinate Synthetase	ADSS		LmjF.13.1190	LinJ.13.1090	0,2	0,17	0,28
Calmodulin	CALM	Hücre	LmjF.13.1160	LinJ.13.1060	0	-0,05	0,08
Dynein Heavy Chain	DHC		LmjF.13.1650	LinJ.13.1390	0,4	0,38	0,48
Dynein Light Chain	DLC		LmjF.24.1030	LinJ.24.1050	0	-0,05	0,08
Dynein-Associated Roadblock Protein	DARP		LmjF.35.1750	LinJ.35.1740	0,3	0,21	0,38
Receptor-Type Adenylate Cyclase A	RTACA		LmjF.17.0200	LinJ.17.0120	0,1	0,05	0,18
Receptor-Type Adenylate Cyclase B/C	RTACB/C		LmjF.17.0237	LinJ.17.0160	0,8	0,65	0,88
OSM3-Like Kinesin	OLK		LmjF.17.0800	LinJ.17.0890	0,3	0,15	0,38
Phosphodiesterase	PDE		LmjF.18.1090	LinJ.18.1100	0,4	0,21	0,48
PFR1D c	PFR1D		LmjF.29.1770	LinJ.29.1890	0,6	0,45	0,68
3-Ketoacyl-CoA Thiolase-Like	KCTL		Metabolizma	LmjF.23.0690	LinJ.23.0860	1,2	1,1
Vacuolar ATP Synthase Subunit B	VSSB	LmjF.28.2430		LinJ.28.2610	-0,1	-0,15	-0,02
Protein Tyrosine Phosphatase	PTP	Bilinmiyor	LmjF.05.0280	LinJ.05.0280	0,8	0,75	0,88
Leucine-Rich Repeat Protein	LRRP		LmjF.10.0180	LinJ.10.0160	0,2	0,12	0,28
Oxidoreductase	OR		LmjF.36.4170	LinJ.36.4380	0	-0,05	0,08

yüksek bulunmuştur (16). Benzer olarak, miltefosine dirençli *L. donovani* suşlarının mikrodizi analizinde ACS geninin ekspresyonu anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (17). Karbonhidrat metabolizmasında rol oynayan genlerin ve kodladıkları proteinlerin hem insanlarda hem de parazitlerde bulunmasının ilaç hedefi olarak kullanılmasını engelleyebileceği düşünülebilir. Ancak, *L. donovani*'ye ait ACS geninin insanlarda bulunan gen ile sadece %49,3 oranında benzerlik göstermesi, bu proteinin ilaç hedefi olarak aday olabileceğini göstermektedir (18). İlaç çalışmaları yanında ACS enziminin parazit virülansı veya enfektivitesi üzerindeki etkileri de araştırılmış, genin bir alelinde oluşturulan delesyonun parazitlerin virülansında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (18). Benzer olarak memelilerde akciğer enfeksiyonuna neden olan *Cryptococcus neoformans*'ta ACS gen delesyonunun enfektiviteyi belirgin ölçüde azalttığı gösterilmiştir (19).

Çalışmamızda, karbonhidrat metabolizmasında rol alan bu üç genden ACS'nin *L. major*'de anlamlı derece yüksek oranda eksprese olması, bu enzimin özellikle *L. major* için yeni bir ilaç hedefi olabileceğini desteklemektedir. Benzer olarak, Rochette ve ark.'nın (11) yaptığı bir çalışmada bu enzimin *L. major*'de *L. infantum*'a göre 2,3 kat daha fazla miktarda eksprese olduğu gösterilmiştir.

Son yıllarda hücre içi yaşama potansiyeli olan parazitlerde lipitlerin rolünü ve önemini araştıran çalışmaların sayısında artış olmuştur (20,21). Bu çalışmalarda fosfolipit ve sfingolipitlerin parazitlerin hayatta kalmasında ve virülansında oldukça önemli olduğu belirtilmektedir. Leishmaniasis tedavisinde lipit metabolizmasını hedefleyen miltefosinin başarılı olması bu düşüncüyü kuvvetle desteklemektedir. Ayrıca membran lipitleri ve kolesterolü konak parazit etkileşimlerinde oldukça önemlidir.



Şekil 1. A-B) Her iki *Leishmania* türünün promastigot formlarında ortak olan genlerin ekspresyon seviyelerindeki kat değişim oranları (*Leishmania major*'un *L. infantum*'a göre)

Ghosh ve ark. (22) tarafından 2014 yılında yürütülen bir çalışmada kültüre edilen makrofajlarda membran kolesterollerini "methyl β -cyclodextrin" aracılığıyla uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kültür ortamına *Leishmania* promastigotları eklenince promastigotların makrofajların yüzeyine bağlanma ve enfekte etme oranlarında belirgin azalma olduğu gösterilmiştir (22).

Çalışmamızda lipit metabolizmasında rol oynayan "phosphoglycan beta 1,3 galactosyltransferase-like (PPGT)", "fatty acid elongase (FAE)", "LOL" ve "3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase (OSD)" genlerinin *L. major*'de daha yüksek oranda eksprese edildiği tespit edilmiştir. Bunlardan PPGT, lipofosfoglikan sentezinde rol oynayan genlerden bir tanesidir. Lipofosfoglikan, *Leishmania* türlerinin membranında bulunan ve parazitin vektör phlebotomların bağırsaklarındaki lektin yapısına tutunmasını sağlayan, fagozomların lizozomlarla füzyonunu ve NADPH oksidaz aktivitesini önleyerek parazitin bağışıklık mekanizmalarından korunmasına katkıda bulunan bir virülans faktörüdür. Promastigotlarda yapısal olarak sentezlenmektedir. Yapılan çalışmalar bu molekülün sentezini sağlayan genlerin *Leishmania* ve *Trypanosoma* cinsi parazitler arasında oldukça korunmuş olduğunu ve bu genlerin bazılarının potansiyel aşı adayı olabileceğini belirtmiştir (23).

LOL, memelilerde, bitkilerde, mantarlarda ve protozoonlarda bulunan ve ergosterol sentezinden sorumlu olan bir enzimdir. Steroller ökaryotlarda bulunan esansiyel membran bileşenleri olup, ergosterol sentez inhibitörü olan amfoterisin B leishmaniasis enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. LOL geninde mutasyon oluşturulmuş *L. major* promastigotlarının amfoterisin B'ye direnç kazandığı gösterilmiştir. Ancak aynı çalışmada LOL mutant promastigotların erken durağan fazda morfolojisi ve replikasyon hızı normal iken, geç dönemde morfolojilerinin bozulduğu ve vahşi tip promastigotlara göre ölüm oranlarının daha yüksek olduğu da belirtilmiştir (24). Bunun yanında, çalışmamızda *L. major* promastigotlarında ekspresyonları daha yüksek bulunan diğer genlerden, FAE, *Leishmania* türlerinde bulunan ve dört karbonlu bütiril koA'ya karbon ekleyerek uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin sentezlenmesini sağlayan enzim iken, OSD geni ise isoprenoid ve sterol sentezinde kullanılmaktadır. Literatürde FAE inhibitörlerinin farklı alanlarda kullanımına dair çalışmalar (meme kanseri, vs.) bulunmaktadır (25). Bu ajanların

leishmaniasis tedavisinde de başarılı bir şekilde kullanılabileceği düşünülmekte olup, bu alanda yapılacak çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Literatür bazlı incelemeler göz önüne alındığında, çalışmamızda parazit için esansiyel olan, karbonhidrat veya lipit metabolizmasında rol oynayan genlerin *L. major*'de daha yüksek oranda eksprese olmalarının *L. major* promastigotlarının kültür ortamında daha kolay hayatta kalmasının ve çoğalmasının nedenlerinden biri olabileceği düşünülmektedir.

Protein metabolizmasında rol alan genlerden sadece "calpain like cystein peptidase'nin (CLCP)" *L. major*'de anlamlı derecede yüksek oranda eksprese olduğu görülmüş, diğer genler açısından bir farklılık saptanmamıştır. Calpainler parazitlerin hücre yüzeyinde bulunan ve kalsiyum tarafından regüle edilen sitozolik sistein peptidazlar olup, patojenitede oldukça önemli görevleri bulunmaktadır (26). Hücre iskelet proteinlerinin düzenlenmesi, reseptörlerin ve enzim öncüllerin aktifleşmesi gibi rollere sahiptir. Calpainler ayrıca memelilerde alzheimer, kas distrofi, travmatik beyin hasarı ve spinal kord hasarı gibi durumların gelişmesinden sorumlu tutulmakta olup, calpain inhibitörlerinin alzheimer tedavisinde kullanımının nöronal hasarı azaltacağı düşünülmektedir (27). Ayrıca calpain inhibitörlerinin parazitlerin morfolojisini değiştirerek leishmaniasis tedavisinde kullanılabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır (28).

"3'nükleotidase/nuclease (NUC)" ve prekürsörü (NP) pürin kurtarma yolunda rol oynayan enzimler olup, parazitin yaşam döngüsünde önemli rolleri bulunmaktadır. Özellikle promastigot formunda yüksek miktarda eksprese olan genler, parazitin phlebotomlarda yaşam döngüsünün tamamlanması için gereklidir. Ayrıca bu enzim parazitin bağışıklık mekanizmalarından kaçmasına yardımcı olmaktadır. NUC, önemli bir adenozin kaynağı olup, parazite karşı gelişen pro-enflamatuvar sinyalleri inhibe ederken, anti-enflamatuvar sinyalleri artırmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda visceral leishmaniasiste NUC ürünü olan adenozinin hastalığın ilk zamanlarında yüksek saptandığı, ilerleyen zamanlarda normale döndüğü belirtilmiştir. Bu enzim aynı zamanda parazitin nötrofilin apoptozundan kaçmasına yardımcı olmakta ve enfeksiyon bölgesine makrofajlar gelene kadar hayatta kalmasını sağlamaktadır (29,30).

Çalışmamızda, protein metabolizmasına ve nükleik asit sentezine katılan genlerin iki *Leishmania* türünde benzer oranlarda eksprese edilmesi (iki gen haricinde), bu genlerin *Leishmania* yaşam döngüsünün temel yapı taşlarına ait genler olabileceğini desteklemektedir. Aynı düzeyde eksprese edilen bu genlere yönelik inhibitörler veya aşı çalışmalarının iki türe de etki edebilme ihtimalini ortaya koymaktadır. İleri çalışmalar ile bu genlerin amastigot formunda konaktaki sekans ve ekspresyon düzeyleri de karşılaştırıldıktan sonra ilaç ve aşı çalışmaları için önemli adaylar olabilecekleri düşünülmektedir.

Son yıllarda leishmaniasisin önlenmesinde birinci jenerasyon olarak tanımlanan canlı veya ölü aşuların yerini artık ikinci jenerasyon olan rekombinant aşular almıştır. Rekombinant aşılarda parazite ait protein veya lipofosfoglikanlar kullanılmaktadır. *Leishmania* türlerinin genomik yapısını araştıran gen ekspresyon çalışmaları aşı hedefi olarak kullanılabilir moleküllerin tanımlanmasına yardımcı olmaktadır. Parazitin hayatta kalmasını sağlayan ve *Leishmania* türlerinde ortak olarak eksprese olan karbonhidrat, protein ve lipid metabolizması ile ilgili genlerle rekombinant aşuların hazırlanmasının başarılı olacağını düşünmekteyiz. Bu moleküllerin leishmaniasis tedavisinde yeni ilaç hedefleri olarak araştırılması ve konuda ileri çalışmaların yapılmasının leishmaniasis tedavisine destek sağlayabileceği kanaatindeyiz. *Leishmania major* ve *L. infantum* promastigotlarında farklı oranda eksprese edilen genlerin değerlendirilmesi iki türün bulaşma, tedavi ve hastalık mekanizmasındaki farklılıkların açıklanmasına ışık tutacaktır.

Bu çalışmada *L. major* ve *L. infantum* promastigotlarında ortak olarak eksprese edilen genlerin ekspresyonları değerlendirilmiş olup, dokuz tane genin ekspresyonu *L. major*'de anlamlı derece yüksek bulunmuştur. Genlerin ortak özellikleri incelendiğinde kodladıkları proteinlerin parazitin yaşamı için esansiyel olduğu, parazitin virülansı ve/veya patogeneze katkıda bulunduğu görülmüştür. Ayrıca standart tedavilere dirençli parazitler formlarda bu proteinlere daha fazla oranda rastlanmıştır. Parazitin standart tedavisinde kullanılan ajanların toksik ve yan etkilerinin fazla olması ve gelişen direnç sorunu nedeniyle acetyl-coA synthetase, calpain, fatty acid elongase, lathosterol oxidase gibi genlerin özellikle *L. major* için aşı veya ilaç hedefi olarak kullanılabilirliği düşünülmekte olup, bu konuda yapılacak ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

SONUÇ

Bu çalışmada *L. major* ile *L. infantum* promastigotlarında ortak olarak eksprese edilen gen profillerinin karşılaştırılması ve bu genlerin kodladıkları proteinlerin fonksiyonlarının belirlenmesi parazit türlerinin virülans, patogeneze ve ilaç dirençlerinin açıklanmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca gen profillerinin değerlendirilmesinin, parazite karşı aşı ve ilaç çalışmaları için türlere özgü spesifik veya ortak hedeflerin seçilmesinde temel veriler sunması açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

* Etik

Etik Kurul Onayı: Herhangi bir hayvan veya insan örneği kullanılmaması sebebiyle bu çalışma için etik kurul onayı gerekmemektedir.

Hasta Onayı: İnsanlar ve hayvanlar üzerinde deneysel veya bilimsel amaçlarla çalışma yürütülmemiş olup, insan veya hayvana ait örnekler de kullanılmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

** Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: A.S., Konsept: Ö.U.B., A.C., Dizayn: Ö.U.B., A.C., Veri Toplanma veya İşleme: Ö.U.B., A.S., Analiz veya Yorumlama: Ö.U.B., A.S., A.C., Literatür Arama: Ö.U.B., A.C., Yazan: Ö.U.B.

Çıkar Çatışması: Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. F1000Res 2017; 6: 750.
- World Health Organization. WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases & World Health Organization. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases; 2010 22-26 March; Geneva.
- de Menezes JP, Guedes CE, Petersen AL, Fraga DB, Veras PS. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. Biomed Res Int 2015; 2015: 815023.
- Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. PLoS Negl Trop Dis 2017; 11: 0006052.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet 2005; 366: 1561-77.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. Science 2005; 309: 436-42.
- Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. Mol Biochem Parasitol 2007; 156: 93-101.
- Real F, Vidal RO, Carazzolle MF, Mondego JM, Costa GG, Herai RH, et al. The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. DNA Res 2013; 20: 567-81.
- Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. Nat Genet 2007; 39: 839-47.
- Proteomes-*Leishmania major*, *Leishmania infantum*. Uniprot. <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000000542> (cited 30 January 2021). Available from: URL: <https://www.uniprot.org/proteomes/UP0000008153>.
- Rochette A, Raymond F, Ubeda JM, Smith M, Messier N, Boisvert S, et al. Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals substantial differences between the two species. BMC Genomics 2008; 9: 255.
- Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the 2⁻(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. Biostat Bioinforma Biomath 2013; 3: 71-85.
- Bee A, Culley FJ, Alkhalife IS, Bodman-Smith KB, Raynes JG, Bates PA. Transformation of *Leishmania mexicana* metacyclic promastigotes to amastigote-like forms mediated by binding of human C-reactive protein. Parasitology 2001; 122: 521-9.
- Avilán L, Gualdrón-López M, Quiñones W, González-González L, Hannaert V, Michels PA, et al. Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target. Enzyme Res 2011; 2011: 932549.
- Gupta R, Kumar V, Kushawaha PK, Tripathi CP, Joshi S, Sahasrabudhe AA, et al. Characterization of glycolytic enzymes-rAldolase and rEnolase of *Leishmania donovani*, identified as Th1 stimulatory proteins, for their immunogenicity and immunoprophylactic efficacies against experimental visceral leishmaniasis. PLoS One 2014; 9: 86073.

16. Biyani N, Singh AK, Mandal S, Chawla B, Madhubala R. Differential expression of proteins in antimony-susceptible and -resistant isolates of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 2011; 179: 91-9.
17. Kulshrestha A, Sharma V, Singh R, Salotra P. Comparative transcript expression analysis of miltefosine-sensitive and miltefosine-resistant *Leishmania donovani*. *Parasitol Res* 2014; 113: 1171-84.
18. Soumya N, Panara MN, Neerupudi KB, Singh S. Functional analysis of an AMP forming acetyl CoA synthetase from *Leishmania donovani* by gene overexpression and targeted gene disruption approaches. *Parasitol Int* 2017; 66: 992-1002.
19. Hu G, Cheng PY, Sham A, Perfect JR, Kronstad JW. Metabolic adaptation in *Cryptococcus neoformans* during early murine pulmonary infection. *Mol Microbiol* 2008; 69: 1456-75.
20. Pucadyil TJ, Chattopadhyay A. Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Prog Lipid Res* 2006; 45: 295-333.
21. Zhang K, Beverley SM. Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 2010; 170: 55-64.
22. Ghosh M, Roy K, Das Mukherjee D, Chakrabarti G, Roy Choudhury K, Roy S. *Leishmania donovani* infection enhances lateral mobility of macrophage membrane protein which is reversed by liposomal cholesterol. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: 3367.
23. Azevedo LG, de Queiroz ATL, Barral A, Santos LA, Ramos PIP. Proteins involved in the biosynthesis of lipophosphoglycan in *Leishmania*: a comparative genomic and evolutionary analysis. *Parasit Vectors* 2020; 13: 44.
24. Ning Y, Frankfater C, Hsu FF, Soares RP, Cardoso CA, Nogueira PM, et al. Lathosterol Oxidase (Sterol C-5 Desaturase) Deletion Confers Resistance to Amphotericin B and Sensitivity to Acidic Stress in *Leishmania major*. *mSphere* 2020; 5: e00380-20.
25. Zakharaova GS, Poloznikov AA, Astakhova LA, Raigorodskaya MP, Khesina ZB, Fomicheva KA, et al. The effect of ELOVL6 fatty acid elongase inhibition on the expression of genes associated with the metastasis of breast cancer. *Russ Chem Bull* 2018; 67: 2307-15.
26. Mehendale HM, Limaye PB. Calpain: a death protein that mediates progression of liver injury. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 232-6.
27. Battaglia F, Trinchese F, Liu S, Walter S, Nixon RA, Arancio O. Calpain inhibitors, a treatment for Alzheimer's disease: position paper. *J Mol Neurosci* 2003; 20: 357-62.
28. d'Avila-Levy CM, Marinho FA, Santos LO, Martins JL, Santos AL, Branquinho MH. Antileishmanial activity of MDL 28170, a potent calpain inhibitor. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28: 138-42.
29. Freitas-Mesquita AL, Meyer-Fernandes JR. Ecto-nucleotidases and Ecto-phosphatases from *Leishmania* and *Trypanosoma* parasites. *Subcell Biochem* 2014; 74: 217-52.
30. Freitas-Mesquita AL, Meyer-Fernandes JR. 3'nucleotidase/nuclease in protozoan parasites: Molecular and biochemical properties and physiological roles. *Exp Parasitol* 2017; 179: 1-6.