

Transkriptomik Veri Yaklaşımı ile Kutanöz Leyşmanyazisteki Moleküler Sinyal Yolakların ve Regülatör Moleküllerin Tanımlanması

Defining the Molecular Signal Pathways and Upstream Regulators in Cutaneous Leishmaniasis with Transcriptomic Data Approach

Özlem ULUSAN BAĞCI¹ (ID), Ayşe CANER^{1,2,3,4} (ID)

¹ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹ Ege University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Izmir, Turkey.

² Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyoinformatik Anabilim Dalı, İzmir.

² Ege University, Institute of Health Sciences, Department of Bioinformatics, Izmir, Turkey.

³ Ege Üniversitesi, Kanserle Savaş Uygulama ve Araştırma Merkezi, İzmir.

³ Ege University, Cancer Research Center, Izmir, Turkey.

⁴ Teksas Üniversitesi, MD Anderson Kanser Merkezi, Deneysel Tedavi Bölümü, Houston, TX, ABD.

⁴ The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Departments of Experimental Therapeutics, Houston, TX, USA.

Makale Atfı: Ulusan Bağcı Ö, Caner A. Transkriptomik veri yaklaşımı ile kutanöz leishmanyazisteki moleküler sinyal yolakların ve regülatör moleküllerin tanımlanması. Mikrobiyol Bul 2021;55(1):67-80.

ÖZ

Leyşmanyazis, hücre içi bir parazit olan *Leishmania* türlerinin etken olduğu bir hastalıktır. Parazitin türlerine ve konakçı immün tepkisine bağlı olarak, hastalıkların üç temel klinik formu; kutanöz, mukokutanöz ve viseral leishmanyazis olarak adlandırılmaktadır. Kutanöz leishmanyazis kronik bir hastalık olup ülserleşmiş lezyonların varlığı ile karakterizedir. Hastalık sırasında oluşan cilt patolojisi, kısmen enfekte eden *Leishmania* türleriyle, aynı zamanda çeşitli klinik sonuçlara neden olan enflamatuvar ve anti-enflamatuvar konak immün yanıt faktörlerinin kombinasyonu ile belirlenmektedir. Bu çalışmada, *Leishmania major* ve *Leishmania braziliensis*'e karşı doğal dirençli ve duyarlı olan farelerde hastalığın patogenezi ile bağışıklık yanıtında rolü olan ve konak-parazit etkileşimlerini belirleyen genleri, moleküler sinyal mekanizmalarını ve moleküllerin biyolojik fonksiyonlarını belirlemek amaçlanmıştır. Bunun için, *L.major/L.braziliensis* ile enfekte ve sağlıklı farelerden elde edilmiş yirmi dört doku örneğinin ekspresyon profilini içeren GSE56029 kodlu transkriptomik veri seti "Gene Expression Omnibus" (GEO) veri tabanından elde edilmiştir. Daha sonra, R betiğinde limma paketi ile diferansiyel olarak eksprese edilmiş genler tanımlanmıştır. Analizlerde FDR $q < 0.05$ ve mutlak $\log_2FC > 2$ eşik değeri olarak kabul edilmiştir. Ardından diferansiyel olarak eksprese edilmiş genler için fonksiyonel ve yolak zenginleştirme analizleri "Ingenuity Pathway Analysis" (IPA) ile gerçekleştirilmiştir. Anlamlı derecede farklı seviyede eksprese edilen genlerin her biri için $p < 0.01$, FDR q değeri < 0.01 ve mutlak $\log_2FC > 1$ kullanılarak IPA 8.0 yazılım programı ile analiz edilmiştir. Bu analizler ile en yüksek oranda zenginleştirilmiş yolakların enflamasyon, dendritik hücre olgunlaşması ve TREM-1 "Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1" (TREM-1) sinyal mekanizmaları olduğu ve bağışıklık

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Ayşe Caner, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye. Tel (Phone): +90 505 485 59 94, E-posta (E-mail): ayse.caner@ege.edu.tr

sisteminin düzenlenmesiyle ilgili diferansiyel olarak eksprese edilmiş genlerin kutanöz leishmanyazis seyri ile yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. Akım-yukarı regülatör analizi ile dokularda biyolojik aktivitelere neden olan gen ekspresyon değişikliklerini açıklayan regülatörün TNF- α , IFNy, IL-1 β , IL-10RA ve "Signal Transducer and Activator of Transcription-1" (STAT-1) olduğu öngörülmüştür. Çalışmada ayrıca, anti-leishmanial etkiye sahip olabilecek kimyasal bileşikler de tanımlanmıştır. Bu çalışma ile direnç/duyarlılık fenotipini belirleyen parazit türlerine ve konağa ait mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmıştır. *L.major* ve *L.braziliensis* ile enfekte olan BALB/c ve C57BL/6 farelerinde farklılık gösteren gen ekspresyon paternleri, sitokin/kemokinler ve sinyal yolaklarının değerlendirilmesi, enfeksiyonun altında yatan potansiyel mekanizmaları genetik açıdan daha iyi anlamamızı sağlayacaktır. Bu sonuçların kutanöz leishmanyazisin tanı ve prognoz tahmini için potansiyel biyobelirteçlerin geliştirilmesi ve yeni tedavi hedefleri hakkında bilgi sağlaması açısından gelecek çalışmalar için yol gösterici nitelikte olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Leishmania spp.*; gen ekspresyonu; moleküler sinyal yolağı; yukarı-akım regülatörleri; kutanöz leishmanyazis.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by the genus *Leishmania* spp., which are intracellular parasites. Depending on parasite species and host immune response, there are three basic clinical forms of the disease: cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis. Cutaneous leishmaniasis is a chronic disease and characterized by the presence of ulcerated skin lesions. The type of skin pathology seen during disease is determined in part by the infecting *Leishmania* spp., but also by a combination of inflammatory and anti-inflammatory host immune response factors resulting in diverse clinical outcomes. In this study, it was aimed to determine the genes, molecular signaling mechanisms and biological functions of the molecules that play a role in the pathogenesis of the disease and immune response and determine host-parasite interactions in mice that are naturally resistant and susceptible to *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. For this, transcriptomic series GSE56029 was downloaded from "Gene Expression Omnibus" (GEO) data base, including expression profiling of twenty-four tissue samples that were recovered from both naive mice and mice (BALB/c, C57BL/6) infected with *L.major* and *L.braziliensis*. Then, "Differentially Expressed Genes" (DEGs) were identified by limma package in R script. FDR $q < 0.05$ and absolute $\log_2FC > 2$ as threshold values were accepted in the analysis. Subsequently, functional and pathway enrichment analyses were performed for the DEGs by "Ingenuity Pathway Analysis" (IPA). For each of DEGs, $p < 0.01$, FDR $q < 0.01$, and absolute $\log_2FC > 1$ were used and analyzed with the software program IPA 8.0. Ingenuity Pathway Analysis revealed the most enrichment pathways to be the inflammation, dendritic cell maturation and "Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1" (TREM-1) signal mechanisms and that the DEGs related to the regulation of immune system process were closely associated with the progress of cutaneous leishmaniasis. The upstream regulator analysis predicted that TNF- α , IFNy, IL-1 β , IL-10RA and "Signal Transducer and Activator of Transcription-1" (STAT-1) are the regulators that explained gene expression changes causing biological activities in the tissues. Chemical compounds that may have anti-leishmanial effects were also identified in the study. In this study, the mechanisms belonging to the parasite species and host that determine the resistance/susceptibility phenotype were attempted to elucidate. Assessment of gene expression patterns, cytokine/chemokines, and signaling pathways in BALB/c and C57BL/6 mice infected with *L.major* and *L.braziliensis* will provide a better understanding of the potential mechanisms underlying infection from a genetic perspective. These results may guide for the future studies in terms of developing potential biomarkers for the diagnosis and prognosis prediction of cutaneous leishmaniasis and providing information about new treatment targets.

Keywords: *Leishmania spp.*; gene expression; molecular signal pathway; up-stream regulators; cutaneous leishmaniasis.

GİRİŞ

Leishmanyazis, protozoa grubunda yer alan *Leishmania* parazitinin farklı türlerinin neden olduğu kompleks bir hastalık grubudur. *Leishmania* türüne göre enfeksiyon kutanöz, mukokutanöz veya viseral hastalıkla sonuçlanmaktadır¹. Hastalığın kutanöz formu genel-

likle kendiliğinden sınırlanmakla birlikte, bazen skar dokusuna bazen de ilerleyerek daha invaziv olan mukokutanöz formlara dönüşebilmektedir. Mukokutanöz leşmanyaziste mukozaların tutulma ve sekonder bakterilerle enfekte olma eğilimi daha fazla olmaktadır. Kutanöz forma en sık *L.tropica* ve *L.major* (eski dünya) ile *L.braziliensis*'in (yeni dünya) neden olduğu bilinmektedir. Hastalığın ortaya çıkış şekli etken parazit türüne ve konağın bağışıklık yanıtına bağlıdır². Son 30 yılda *L.tropica*'nın farelerde deneysel kutanöz leşmanyazis (KL) üzerine çok sayıda araştırma yapılmış ve bağışıklık yanıtta rol alan hücre tipleri, sinyal yolakları ve tedavide kullanılabilecek ilaç hedefleri gibi çok sayıda veri elde edilmiştir^{3,4}.

Leishmania spp. zorunlu hücre içi parazitler olup, enfeksiyonun kontrol altına alınabilmesi için etkin bir T hücre bağışıklık yanıtı gerektirmektedir. Th1 bağışıklık yanıtı baskın olanlarda enfeksiyona karşı direnç görülürken, Th2 bağışıklık yanıtı etkin olanlar enfeksiyona karşı duyarlıdır. Bununla beraber, Th1 bağışık mekanizmasında rol alan sitokinlerin veya sinyal yolaklarının *Leishmania* türleri arasında farklılık gösterdiği saptanmıştır. BALB/c fareleri *L.major* enfeksiyonunu kontrol etmede yetersiz kaldıkları için ilerleyici lezyonlar ve sistemik hastalık gelişmesine neden olmaktadır. BALB/c farelerde *L.major*'e karşı baskın olarak gelişen yanıt Th2 olup enfeksiyonda duyarlılığa neden olan IL-4 ve IL-10 fazla miktarda sentezlenmektedir⁵. C57BL/6,8,10 ve CBA gibi bazı farelerin *L.major*'e kromozomal olarak dirençli olduğu gösterilmiştir³. IL-4, IL-5 ve IL-13 aracılı Th2 bağışık yanıtı enfeksiyonlara duyarlılığa neden olurken; IL-12 aracılı, IFN γ ve TNF- α 'nın baskın olarak rol aldığı Th1 bağışık yanıtının enfeksiyonlara karşı dirençten sorumlu olduğu bildirilmiştir^{6,7}. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda durumun bu kadar basit ifade edilemeyeceği ve sitokinlerin düzenlenmesinde, duyarlılıkta veya kazanılmış dirençte başka mekanizmaların rol oynayabileceği gösterilmiştir³. *L.braziliensis*, *L.major*'un aksine BALB/c farelerinde geçici, belli belirsiz bir cilt enfeksiyonuna neden olmaktadır⁸. Ayrıca C57BL/6 farelerinin *L.braziliensis* parazitine karşı doğal olarak dirençli olduğu belirtilmiştir⁹. Fakat *L.braziliensis* immünolojisi üzerine yapılmış çalışmaların sayısı oldukça azdır.

Bazı konaklar *Leishmania* türleri ile enfekte olduğunda semptomlar görülmemekte, ancak yine de parazite karşı bağışıklık meydana gelmektedir. Hastalığın bu şekilde sessiz geçirilmesinde özellikle CD4+ hücrelerinin etkinliğini azaltan regülatör T (Treg) hücrelerinin (CD4+-CD25+) rolü bulunmaktadır¹⁰. Treg hücrelerinin IL-10 düzeyini artırması sonucunda konak hücre arjinaz seviyesinde artış olmaktadır. Arjinaz seviyesindeki artış klasik yoldan makrofajları aktive eden NO seviyesinde azalmaya neden olmakta ve parazitin büyümesi ve proliferasyonunu sağlayan poliaminlerin miktarını artırmaktadır. Bu durumun tersi olarak Treg hücre ve IL-10 düzeylerinin azalması durumunda, efektör T hücre fonksiyonlarının artışına bağlı olarak lezyon gelişmediği, ancak enfeksiyona karşı gelişen bağışıklığın da kısa süreli olduğu belirtilmektedir¹⁰⁻¹². Bununla beraber, *Leishmania*'ya karşı gelişen bağışık yanıt mekanizmalarının aydınlatılması için *Leishmania* türlerine duyarlı ve dirençli deneysel modellere ve bunların karşılaştırmalarına dair çalışmalara hala gereksinim duyulmaktadır.

Bu çalışmada, *L.major*'e doğal dirençli C57BL/6 ile duyarlı olan BALB/c ve *L.braziliensis*'e dirençli olan BALB/c ile C57BL/6 farelerinde hastalığın patogenezinde ve bağışık yanıtta

rolü olan ve konak-parazit etkileşimlerini belirleyen genlerin, moleküler mekanizmaları ve genlerin/moleküllerin biyolojik fonksiyonlarının saptanması amaçlanmıştır. Böylece enfeksiyonun tanısında veya prognozda yol gösterici olabilecek ve ilaç hedefi olarak kullanılabilir belirtiçlerin saptanması hedeflenmektedir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, 2 Nisan-25 Mayıs 2020 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Gen ekspresyon profili içeren GSE56029 matris dosyası Gene Expression Omnibus (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) veri tabanından elde edildi. Fonksiyonel genomik veriler içeren bu mRNA ekspresyon matrisine "GLP6885-Illumina Mouse (Ref-8 v2.0) ekspresyon beadchip" platformu ile mikrodizin yöntemi uygulandı. Bu platformdaki veri seti dört farklı leşmanyazis fare modeli ve kontrol gruplarını içeren transkriptomik veriler şeklinde sunuldu. GEO veri bankasında, bu verilerin elde edilmesinde gerçekleştirilen deney protokolü şu şekildedir; a) *L.major* ile enfekte olan BALB/c fare grubu (n= 5), b) *L.major* ile enfekte C57BL/6 fare grubu (n= 4), c) *L.braziliensis* ile enfekte olan BALB/c fare grubu (n= 4), d) *L.braziliensis* ile enfekte olan C57BL/6 fare grubu (n= 5), e) kontrol BALB/c fare grubu (n= 3), f) kontrol C57BL/6 fare grubu (n= 3) olmak üzere 24 fare kullanıldı. *Leishmania* enfeksiyonu, farelerin sağ kulaklarına 1×10^5 *L.major* veya *L.braziliensis* promastigotu enjekte edilerek oluşturuldu ve sonrasında lezyonların gelişimi açısından izlendi. Enfeksiyonun dördüncü haftasında kulak dokularından ve lezyonlardan alınan örneklerde RNA izolasyonu gerçekleştirildi, daha sonra tüm genom ekspresyon profil analizi uygulandı. Bu platforma ait ham veriler R programı (www.r-project.org, versiyon 3.6.2) kullanılarak ön işlem analizine tabi tutuldu ve normalize edildi. *Leishmania* ile enfekte ve kontrol grubu farelerin doku örnekleri arasındaki diferansiyel olarak eksprese edilmiş gen (DEG)'leri tanımlamak için limma paketi (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html>, versiyon 3.42.2) kullanıldı¹³. Analizlerde yanlış pozitif oranı [False Discovery Rate (FDR)] $q < 0.05$ ve mutlak \log_2 kat değişimi (FC) > 2 eşik değeri olarak kabul edildi. DEG'lerin potansiyel biyolojik süreçlerini, hücresel bileşenlerini, fonksiyonlarını ve moleküler sinyal yollarını analiz etmek için Ingenuity Pathway Analizi (IPA) (www.ingenuity.com) kullanıldı. Anlamlı derecede farklı seviyede eksprese edilen genlerin her biri için $p < 0.01$, FDR $q < 0.01$ ve mutlak \log_2 FC > 1 kullanılarak IPA 8.0 yazılım programı ile analiz edildi. IPA sonuçları için elde edilen p değeri "Fischer Exact" testi ile değerlendirildi ve çoklu hipotez testi düzeltmesi için "Benjamini-Hochberg Correction" testi kullanıldı. Kontrol ve *Leishmania* ile enfekte fareler arasındaki gen ekspresyonlarının fonksiyonel ve biyolojik ağ analizini yapmak için "IPA-Core" analizi kullanıldı. DEG'lerin ilişkili oldukları moleküler sinyal yolları kanonik yolak analiz verileri ile regülatörler yukarı akım regülasyon (Up-stream Regulation) analizi ile tanımlandı. Daha sonra enfekte fare gruplarından elde edilen veriler için karşılaştırma analizi uygulandı ve sonuçlar 'heat-map' ile gösterildi. Grafiklerdeki aktivasyon/inhibisyon durumu Z skorlaması ile (turuncu renk skalası, aktivasyon; lacivert renk skalası, inhibisyon) belirlendi. Rengin koyuluğu aktivasyon veya inhibisyonun derecesini belirtmektedir. Genler arasındaki moleküler ilişkileri gösteren şekillerde; genler "düğüm" olarak sembolize edildi ve iki düğüm arasındaki biyolojik ilişki

çizgisel olarak temsil edildi. Düşüm renginin yoğunluğu ekspresyon derecesini (kırmızı renk skalası, artmış ekspresyon; yeşil renk skalası, azalmış ekspresyon) göstermektedir. Kenarlar, literatürdeki veya IPA veri tabanında depolanan bilgilerden en az bir referansla desteklendi.

BULGULAR

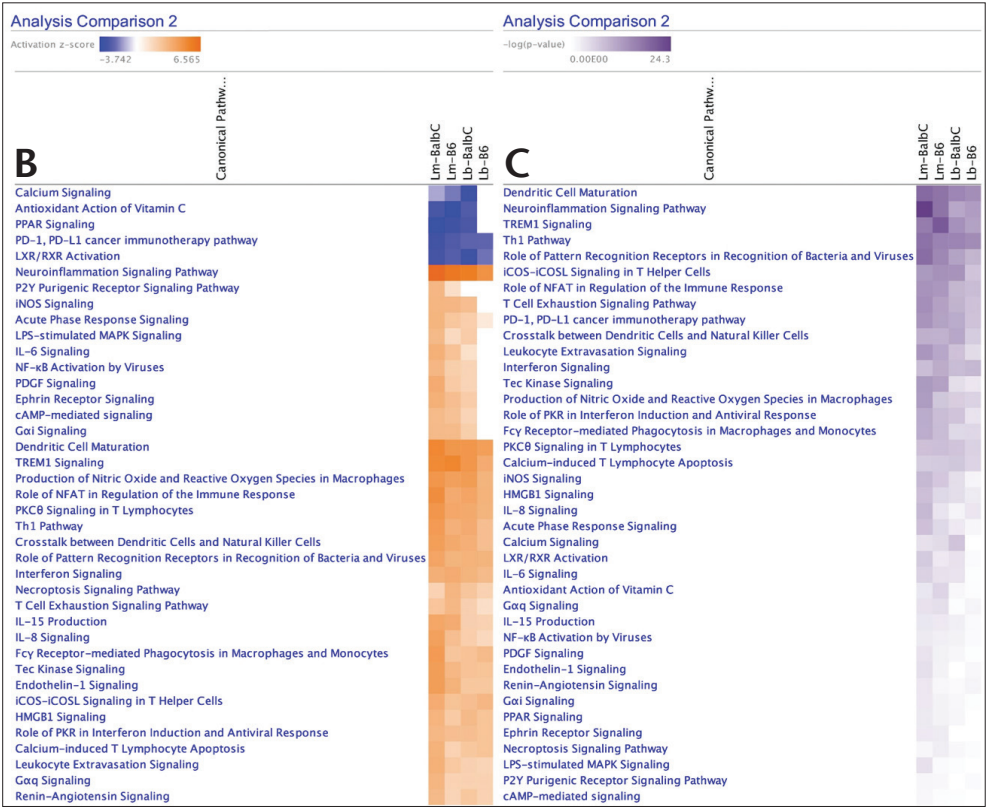
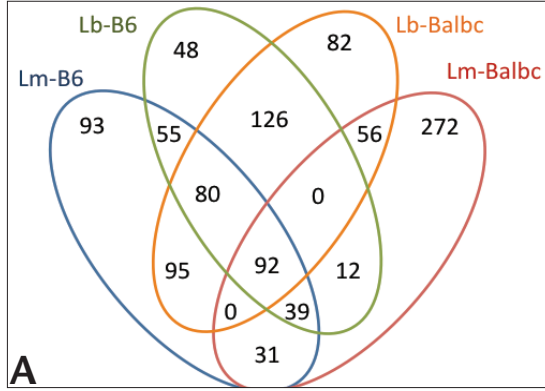
Bu çalışmada, *Leishmania* ile enfekte ve kontrol grubu farelerin doku örnekleri arasındaki DEG'ler tanımlanmış, daha sonra bu veriler fonksiyonel zenginleştirme analizi ile değerlendirilmiş, enfeksiyonda rol oynayan moleküler sinyal yolları ve regülatörler birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Verilerin ön işlem analizi ile total 25697 probtan, genlere karşılık gelen 25284 veri elde edilmiştir. Bu genlerin \log_2FC ve FDR değerleri ile örneklerindeki DEG'ler belirlenmiştir; kontrol grupları ile karşılaştırılma sonrası, 502 DEG (*L.major*-BALB/c), 484 DEG (*L.major*-C57BL/6), 531 DEG (*L.braziliensis*-BALB/c) ve 452 DEG (*L.braziliensis*-C57BL/6) *Leishmania* ile enfekte farelerde tanımlanmış ve venn şeması ile gösterilmiştir (Şekil 1a). Fonksiyonel zenginleştirme analizi sonuçları Şekil 1'de detaylı olarak verilmiştir.

Dört grup fare enfeksiyon modellerine ait gen ekspresyon verileri kanonik yolak analiz ile değerlendirilmiştir. Elde edilen moleküler sinyal mekanizmalarının karşılaştırmalı analizi sonrası; dört grup farede 39 moleküler sinyal mekanizması tanımlanmıştır (absolut $\log p$ değeri > 1.3 z skoru > 3) (Şekil 1b,c). En yüksek oranda aktivasyonlar; enflamasyon sinyal yolağı, dendritik hücre (DH) olgunlaşması ve "Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1" (TREM-1) sinyal yolağında saptanmıştır. Enflamasyon sinyal yolağındaki en yüksek aktivasyon skoru *L.major* ile enfekte olan BALB/c farelerinde elde edilmiştir.

DH olgunlaşma yolağının *L.major* ile enfekte BALB/c'de en aktifken, diğer üç fare modelinde aynı düzeyde aktivasyona sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, TREM-1 sinyal yolağı *L.major* ile enfekte fare gruplarında daha yüksek aktivasyon gösterdiği belirlenmiştir. Aktivasyon gösteren moleküler sinyal yollarının aksine, inhibisyon gösteren yolların sayısı daha az olarak tespit edilmiştir: Kalsiyum sinyal yolağı, "Peroxisome Proliferator Activated Receptor" (PPAR) sinyal yolağı, "Programmed Death-1" (PD-1)/ "PD-Ligand 1" (PD-L1) sinyal yolağı, "Liver X Receptors-Retinoid X Receptors" (LXR-RXR) sinyal yolağı. Bu yollardan kalsiyum sinyal yolağı ve LXR/RXR sinyal yolağı *L.braziliensis* ile enfekte olan BALB/c farelerde; PPAR ve PD-1/PDL-1 sinyal yolağı *L.major* ile enfekte olan BALB/c farelerde daha yüksek oranda inhibe olmuştur. Sinyal yollarına ait absolut $\log p$ değerleri Şekil 1c'de gösterilmiş ve en anlamlı değişikliğin DH olgunlaşması, enflamasyon ve TREM-1 sinyal yollarında olduğu belirlenmiştir.

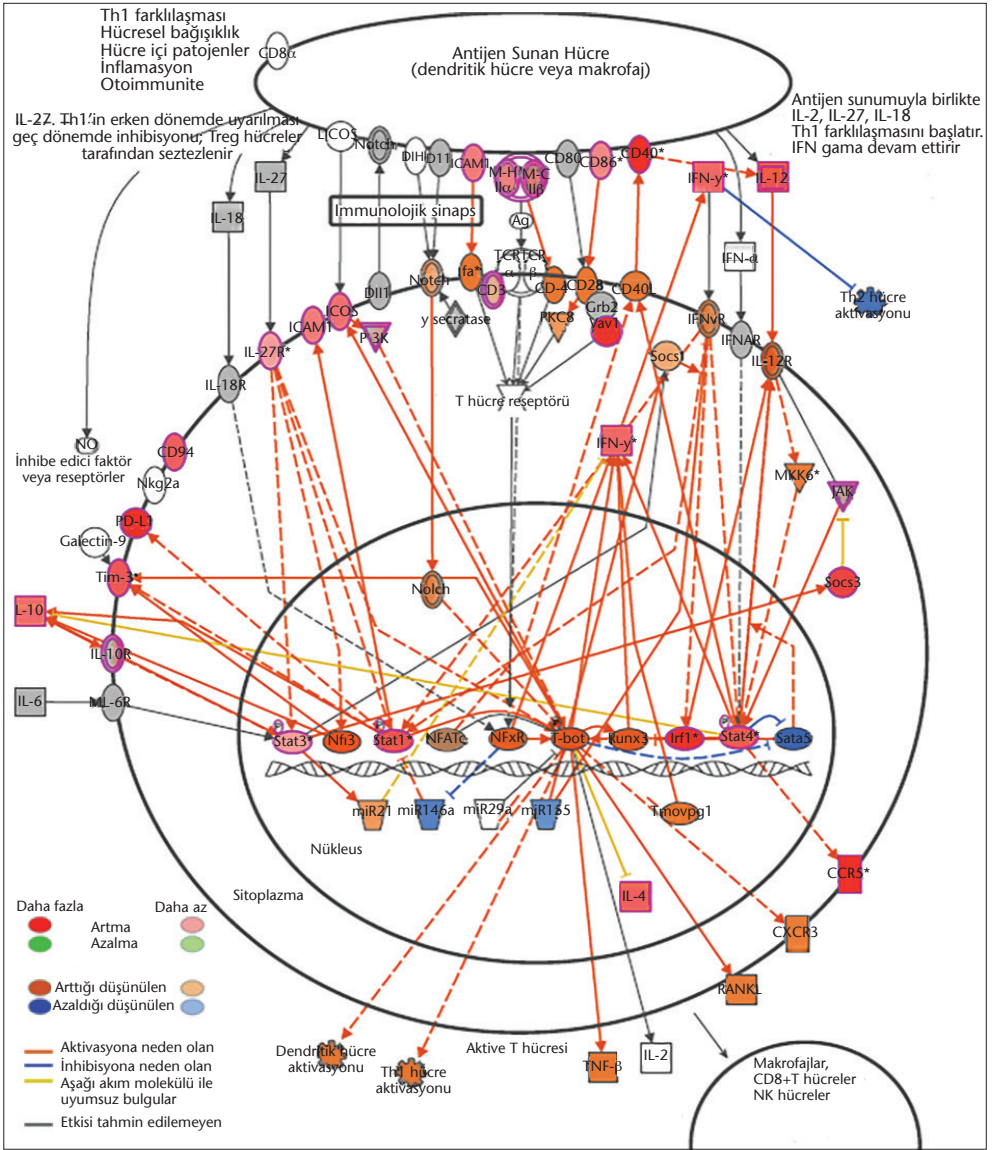
Leishmania enfeksiyonuna karşı dirençte T hücre yanıtı önemli rol oynamaktadır. Kanonik yolak analizinde Th1 yolağının yüksek seviyede aktivasyon skoru ve anlamlı istatistiksel değere sahip olarak bulunmuştur. Th1 hücre yanıtında etkili olan DEG'leri içeren yolak şeması Şekil 2'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Yukarı akım transkripsiyon regülatörleri, veri kümesinde gözlenen gen ekspresyon değişikliklerinin açıklamasını ve incelenen dokularda meydana gelen biyolojik aktiviteleri

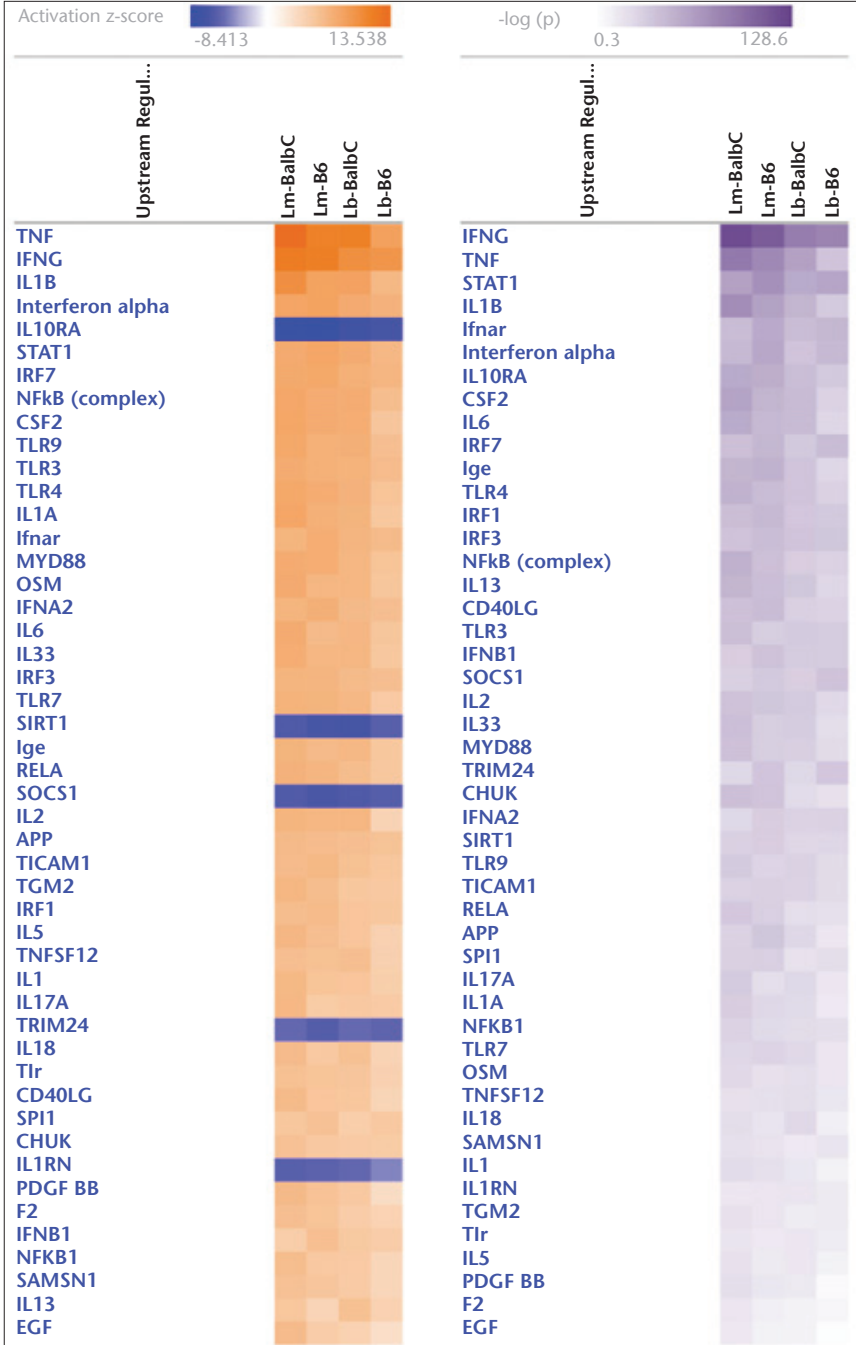


Şekil 1. *Leishmania* enfeksiyonunda rol oynayan DEG'ler ve sinyal yolakları. **A.** *Leishmania* ile enfekte farelerde DEG'leri gösteren venn şeması. **B.** Aktivasyon skorlarını (absolut z skoru > 3), **C.** P değerlerini gösteren heat-map grafiği (absolut log p değeri > 1.3).

aydınlatmaya yardımcı olabilecek transkripsiyonel regülatörlerin kaskadını tanımlamaktır. *Leishmania* enfeksiyonunda yukarı regüle edilmiş DEG'ler için, 47 aktif potansiyel gösteren yukarı akım regülatörü tanımlanmıştır (Şekil 3). Fare modellerinde TNF- α , IFN γ , IL-1 β , IL-



Şekil 2. Leishmania'ya karşı aktif rol oynayan Th1 hücre yanıt yolağı ve bu yolda yer alan genlerin ekspresyonları (*L. major* ile enfekte olan BALB/c fare verilerinden elde edilmiştir). Her düğüm farklı bir yolu veya fonksiyonu temsil etmektedir. Kırmızı renkli düğümler, veriler içinde yukarı regüle olan DEG'leri; gri renkli düğümler, regülasyonunda değişikliklik olmayan genleri; renksiz düğümler, veri içinde olmayan genleri; mavi olan renkli düğümler, DEG'lere göre tahmin edilen inhibe olmuş genleri/fonksiyonları; turuncu olan renkli düğümler, DEG'lere göre tahmin edilen aktive olmuş düğümleri göstermektedir. Renk yoğunlukları DEG'deki aktivasyon ve regülasyon skorunu temsil etmektedir. Kenarlar, IPA tarafından onaylanmış olanlar turuncu (pozitif) ve mavi (negatif) renkler ile aktivasyon etkisi kesin olmayanlar gri renk ve aşağı akım molekülü ile uyumlu olmayanlar sarı renk ile ifade edilmiştir.



Şekil 3. Yukarı-akım transkripsiyon regülatörleri. A. Aktivasyon skorlarını (absolut z skoru > 5.5), B. P değerlerini gösteren heat-map grafiği (absolut log p > 1.5).

Tablo 1. Fagositozda Rol Oynayan Düzenleyiciler

Enfeksiyon	Regülatör	Fagositozda görev alan moleküller
<i>L.major</i> _BALB/c	FN1	ITGAN, IL1 β , IFN γ , MMP9, CCL5, TGF β , CXCL2, NFKBIA, TNF, CCL2, CXCL3, CCL4, SPP1, TLR2
<i>L.major</i> _C57BL/6	FN1	IL1B, IFN γ , CCL5, TGF β 1, TNF, CCL2, CXCL3, CXCL2, CCL4, NFKBIA, SPP1, TLR2
<i>L.braziliensis</i> _BALB/c	EGR1	CCL2, HBEGF, CCL7, FASLG, IL1 β , ALOX5AP, MMP9, TGF β 1, IL4, CCL3L3, CXCL2, CD44, VCAM1, LYZ, CAV1, TNF, CCL2
<i>L.braziliensis</i> _C57BL/6	IL1	CCL2, IL1 β , IFN γ , CCL5, CXCL10, SEL1, GASP1, CD40, CXCL2, VCAM1, LYZ, CHI3L1, CCL2, GTSC, CCL4, ICAM1, TLR2

ITGAN: Integrin subunit alfa M, MMP9: Mmatrix metalloprotease 9, NFKBIA: Nuclear factor-kappa-B, SPP1: Secreted phosphoprotein 1, HBEGF: Heparin binding epidermal growth factor, ALOX5AP: Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein, LYZ: Lysozyme, CAV1: Caveoline 1, SEL1: Selenoprotein 1, GASP1: G-protein coupled receptor associated sorting protein, CHI3L1: Chitinase-3-like protein 1.

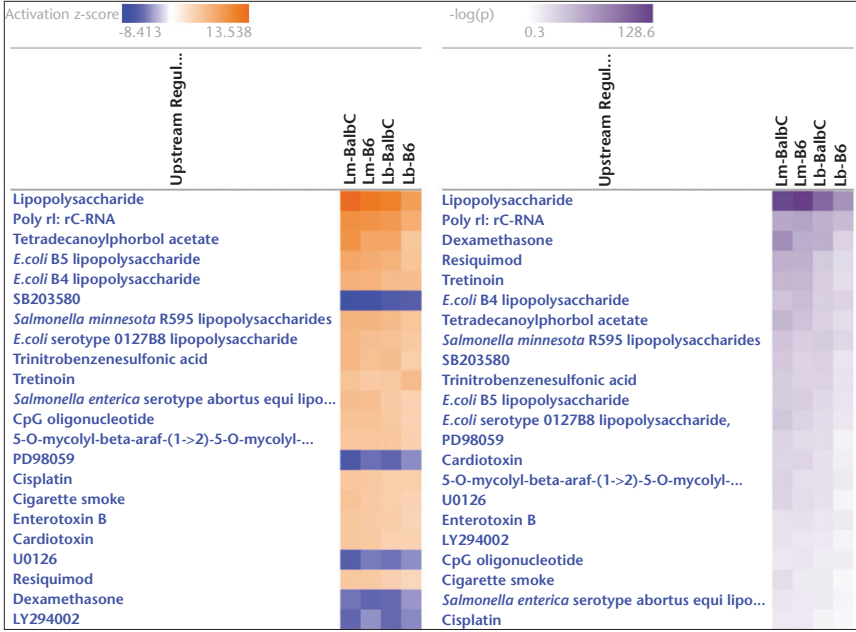
10RA, ve "Signal Transducer and Activator of Transcription-1" (STAT-1) yukarı-akım regülasyonunun önemli regülatörleri olarak belirlenen DEG'lerdir. Veri kümesinde, bu regülatörlerden IL-10RA'nın ekspresyon seviyesi belirgin olarak azalma gösterirken, diğerlerinde artış bulunmaktadır.

Leyşmanyazis enfeksiyonlarında fagositoz oldukça etkin bir mekanizmadır. Fagositozda, enfekte eden parazit türü ve konağa göre farklı sitokin ve kemokinler rol oynamaktadır. Tüm fare modellerinde fagositozda etkin rol üstlenen regülatörler Tablo 1'de gösterilmiştir. *L.major* ile enfekte hücrelerde fagositoz süreci *Leishmania* amastigotlarının ekstrasellüler matris elemanı olan fibronektine (FN) bağlanmasıyla başlamaktadır. *L.braziliensis* ile enfekte olan BALB/c farelerinde fagositoz sürecinin temelindeki faktör "Early Growth Response 1" (EGR1) iken, C57BL/6 farelerinde IL-1 rol oynamaktadır.

IPA bilgi veri tabanı kullanılarak, dört verinin karşılaştırmalı yukarı akış analizinde ilaç ve kimyasal bileşikler filtre edilmiştir. Bunun sonucunda, *Leishmania* enfeksiyon mekanizmasında bazı kimyasal bileşiklerin etkili rol oynadığı bulunmuştur. Bu bileşikler enfeksiyonun mekanizmasında regülatör olarak etki göstererek bazı fonksiyonları inhibe veya aktive edebilmektedir. Bu moleküllerden; imidazol türevi olan SB203580 ve flavonoid türevi olan PD98059, "Mitogen Activated Protein" (MAP) kinazı inhibe etmektedir. Alken türevi olan UO126 "Extracellular Signal-Regulated Kinases" (ERK) aktivasyonunun ve LY294002 "Phosphoinositide 3-Kinases" (PI3K)'nin inhibitörleri olarak etki göstermektedir. Bu moleküllerin ve deksametazonun tüm fare modellerinde parazit yükü üzerinde inhibitör etkili olabileceği gösterilmiştir (Şekil 4).

TARTIŞMA

Dünyada 12-15 milyon kişi *Leishmania* spp. ile enfekte olup, her yıl 1.5 milyon yeni kutanöz leyşmanyazis olgusu görülmektedir¹⁴. *L.major* genellikle KL'ne yol açarken, *L.braziliensis* mukokutanöz leyşmanyazis tablosuna neden olmaktadır. Şimdiye kadar fare



Şekil 4. Leishmania enfeksiyonunda rol onayan kimyasal bileşikler A. Aktivasyon skorlarını (absolut z skor > 5), B. P değerlerini gösteren heat-map grafiği (absolut log p değeri > 1.5).

modelleri üzerinde *L.major* immünolojisini araştıran çalışmalar yapılmış olmasına rağmen *L.braziliensis* ile ilgili az sayıda araştırma bulunmaktadır^{3,6,8}. Bu çalışma ile farelerde duyarlılık/direnç fenotiplerine yol açan gen ekspresyon profillerini, moleküler sinyal yolaklarını ve bağışıklık mekanizmalarının tanımlanması amaçlanmıştır.

Leishmania enfeksiyonunda T hücre yanıtı oldukça önemlidir. IL-12 ve IFN- γ 'nın aktif olarak rol aldığı Th1 hücre yanıtında enfeksiyon ya hiç görülmemekte ya da çok hafif seyretmektedir. Enfeksiyona karşı dirençte oldukça önemli rol oynayan Th1 hücre yanıtı Şekil 2'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. IL-4 aracılı Th2 hücre yanıtı baskın olduğu zaman hastalık şiddetli seyretmekte ve progresyon göstererek sistemik hastalığa yol açabilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda durumun bu kadar basit olmadığı ve duyarlılık ve direnç fenotipinde farklı sitokin ve kemokinlerin ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerinin rol oynadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, parazite karşı gelişen yanıta hem parazite ait yapıların hem de konak hücre yanıtının önemli olduğu ve bunların hastalığın prognozunu etkilediği bildirilmiştir. Bu nedenle, çalışmada iki farklı *Leishmania* türünün iki farklı konakta neden olduğu bağışık yanıtta rol oynayan sinyal yolakları ve gen ekspresyonları araştırılmıştır.

L.major ve *L.braziliensis* ile enfekte farelerde en fazla aktivasyonu enflamasyon sinyal yolağı, DH olgunlaşması ve TREM-1 sinyal yolağı göstermiştir. TREM-1 nötrofil, monosit ve makrofajların yüzeyinde bulunan bir transmembran glikoproteindir. TREM-1'in

nötrofil granüllerinin degranülasyonunu ve dolayısıyla fagositozu artırdığı bilinmektedir. Ayrıca, makrofajlarda antijen sunumunu ve T hücre aktivasyonunu da artırmaktadır¹⁵. Bu çalışmada, enfekte farelerde TREM-1 sinyali enfekte olmayan farelere göre daha aktif olup, en fazla aktivasyon skoru *L.major* ile enfekte farelerde saptanmıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada benzer olarak, *L.major*'e duyarlı BALB/c farelerinde TREM-1 sinyalinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmış ve bu sinyalin immün sistemi modüle ettiği bildirilmiştir¹⁶. Cotter ve arkadaşları¹⁷ tarafından yapılan çalışmada iyileşmeyen lezyonlar ile karakterize *L.major* ile enfekte BALB/c farelerinde nötrofillerin ve yüzeylerinde eksprese olan TREM-1 proteinin arttığı ve yüksek düzeyde saptanan TREM-1'in kötü prognoz göstergesi olabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle, TREM-1 sinyal yolağını hedefleyen ilaçlar geliştirilmesinin KL tedavisine faydalı olabileceği düşünülmektedir. DH aktivasyonu *L.major* ile enfekte BALB/c fare dokularında en fazla oranda saptanmıştır. DH'ler profesyonel olarak antijen sunan hücreler olup, kazanılmış bağışıklığın merkezi olarak bilinmektedir. *Leishmania* ile karşılaşan DH'ler T hücrelerinin bulunduğu yerlere göç ederek, gelecekte bağışıklık yanıtın türünü belirlemektedir. Enfeksiyon ile DH'ler tarafından IL-12 sentezlenirse bağışıklık yanıt Th1 yönünde gelişmekte ve parazite karşı direnç meydana gelmektedir. Ancak antijen sunumundan sonra IL-4 sentezinde artış görülürse IL-12 sentezi baskılanmakta ve enfeksiyona karşı duyarlılık görülmektedir¹⁸.

Enfekte olan konak dokularında kalsiyum sinyal yolağının inhibe olduğu saptanmıştır. Kalsiyum; *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Plasmodium* gibi intrasellüler parazitlerin hayatta kalması için kritik bir molekül olarak belirtilmiştir¹⁹. İnhibe olan diğer bir düzenleyici sinyal mekanizmasının PPAR yolağı olduğu ve en fazla *L.major* ile enfekte olan BALB/c farelerinde inhibe olduğu gösterilmiştir. PPAR'ların α , β/δ , γ olmak üzere üç alt tipi bulunmakta olup, sitokinlerin salgılanmasını düzenleyen transkripsiyon faktörlerini inhibe etmekte ve anti-enflamatuvar özellikler göstermektedir. PPAR- α NF-kB'ye bağlandığı zaman IL-6'nın sentezlenmesini engellemektedir²⁰. Enfeksiyonun şiddetli seyrettiği *L.major* ile enfekte BALB/c'lerde antienflamatuvar patern gösteren PPAR sinyal yolağının daha yüksek bir skor ile inhibisyon göstermesi ve enflamasyon sinyal yolağının aktivasyon skorunun daha yüksek olması beklenen bir durumdur. Bağışıklıkta T hücre yanıtının uyarılabilmesi için kostimülasyon sinyalleri gerekli olup, bu sinyallerden en önemlisi B7-CD28 kompleksidir. Ancak vücudun kendi antijenlerine karşı yanıtın engellenmesi veya oluşan enflamatuvar yanıtın aşırıya kaçmaması için PD-1/PDL-1 gibi negatif düzenleyicilerin Th1 hücre yanıtını azalttığı ve Treg hücrelerin aktivitesini artırdığı gösterilmiştir²¹. LXR, RXR ile heterodimer oluşturan, yağ ve glikoz metabolizmasını düzenlemede etkin rolleri olan bir nükleer reseptör ailesidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, bu reseptörlerin metabolizma ve bağışıklığın kesişim noktasında bulunduğunu ve anti-enflamatuvar rolleri olduğunu göstermiştir. LXR agonistlerinin T lenfosit, makrofaj bağışıklık hücrelerini de kapsayacak şekilde anti-proliferatif özellikler göstermesi nedeniyle kanser ve otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır^{22,23}. *Leishmania* ile ilgili yapılan çalışmalarda ise LXR'nin deneysel olarak inhibe edilmiş farelerin *L.infantum*'a dirençli olduğunun saptanması LXR antagonistlerinin *Leishmania* profilaksisinde veya tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmektedir²⁴.

Leishmania enfeksiyonunda aktif potansiyel gösteren regülatörlerin TNF- α , IFN- γ , IL-1- β , IL-10RA ve STAT-1 olduğu saptanmıştır. Bu regülatörlerin *L.major* ile enfekte BALB/c farelerde, *L.braziliensis* ile enfekte BALB/c farelere göre daha yüksek düzeyde eksprese olduğu görülmektedir. Bu durum, özellikle IFN- γ açısından şaşırtıcı görünmekle birlikte, daha önce yapılan çalışmalarda alınan sonuçlar durumu açıklamaktadır. DeKrey ve arkadaşları⁸ tarafından yapılan çalışmada, *L.major* ve *L.braziliensis* ile enfekte edilmiş BALB/c farelerin lenf nodu aspirasyon örneklerinde IFN- γ ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bunun yanında, *L.braziliensis* ile enfekte farelerde IL-4'ün daha düşük seviyede sentezlendiği belirtilmiştir. Sonuçta iki tür arasındaki enfeksiyon seyrindeki farklılıkta IL-4'ün sitokin seviyesinin etkili olduğu belirtilmiştir. Veri setinin analizinde IL-4 gen ekspresyon seviyelerinde, enfekte BALB/c farelerde belirgin bir artış saptanırken enfekte C57BL/6 farelerde azalma saptanmıştır. IL-1 β 'nin kutanöz leişmanyazis enfeksiyonundaki rolü karışıktır. Bu sitokin Th1 hücre yanıtı ile birlikte konağı koruyucu etkiler gösterirken, aynı zamanda enfeksiyon bölgesine nötrofillerin toplanmasını artırarak doku hasarını şiddetlendirmekte ve lezyonun ilerlemesine neden olmaktadır²⁵. Bu nedenle, enfeksiyona duyarlı olan ve enflamasyonun daha şiddetli seyrettiği *L.major* ile enfekte BALB/c farelerde IL-1 β daha fazla eksprese olmaktadır. Paraziter enfeksiyonların kontrolünde IL-10 düzenleyici roller üstlenmekte olup, anti-enflamatuvar özellikler göstermektedir. T hücreleri üzerinde baskılayıcı fonksiyonları bulunmakta olup *Leishmania* enfeksiyonundaki lezyonların progresyonundan sorumludur²⁶. Çalışmamızda dört fare grubunda da IL-10 seviyesinde azalma görülmüştür.

Çalışmadaki analizler sonucunda *Leishmania* enfeksiyon mekanizmasında bazı kimyasal bileşiklerin inhibitör rol oynadığı bulunmuştur. Bunlardan SB203580 molekülü MAPK'ları hedeflemektedir. *Leishmania*'da şimdye kadar tanımlanmış 17 tane MAPK bulunmasına rağmen, üç tanesinin (LmaMPK4, LmaMPK7, LmaMPKa10) fosforile olduğu ve amastigotların makrofajlar içerisinde yaşamını devam ettirmesini sağladıkları bildirilmiştir. SB203580 molekülünün LmaMPK10'u inhibe ettiği belirtilmiştir²⁷. Buna ek olarak, MAPK ailesinden olan ERK'in aktivasyonu IL-10 seviyesinde artışa ve *Leishmania*'ya karşı duyarlılığa neden olmaktadır. Bu nedenle ERK inhibitörü olan UO126 ve ERK'in pozitif düzenleyicisi MEK'in inhibitörü olan PD98059 moleküllerin tedavide kullanılabilecek ajanlar olduğu bildirilmiştir²⁸. *Leishmania* parazitleri makrofajların fagositoz etkisine karşı koymak ve hücre içinde yaşamlarını sürdürebilmek amacıyla PI3K yolunu kullanmaktadır. LY294002 tarafından bu yolağın inhibe edilmesi parazitlerin fagosite edilmesini artırmaktadır²⁹. Ayrıca analizler ile dekzametazonun enfekte farelerde parazit yükünü inhibe edebileceği saptanmıştır. Nyamao ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada³⁰ *L.major* ile enfekte farelerden dekzametazon ve hidrokortizon uygulanan lezyonlarda belirgin gerileme olduğu, serumlarında IFN düzeylerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Şimdye kadar yapılan çalışmalarda, *Leishmania* spp.'ye duyarlı farelerde Th2, dirençli farelerde Th1 bağışıklık yanıt tipinin etkin olduğu söylenmiştir. Ancak son zamanlarda *Leishmania* enfeksiyonuna karşı oluşan bağışık yanıtın çok daha kompleks olduğu, direnç/duyarlılık fenotipini belirleyen parazit türlerine ve konağa ait çok sayıda mekanizmanın

olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma ile *L.major* ve *L.braziliensis* ile enfekte olan BALB/c ve C57BL/6 farelerinde farklılık gösteren gen ekspresyon paternleri, sitokin ve kemokinler ile sinyal yolları değerlendirilerek mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bağışıklık mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasıyla profilaksiste ve tedavide kullanılacak ilaçlar, prognoz göstergesi olabilecek belirteçler saptanabilecek, ihmal edilmiş tropikal hastalıklar listesinde olan KL'in prevalansında ve morbiditesinde azalma sağlanabilecektir. Bu çalışmada, yeni tedavi molekülleri için hedef olabilecek genleri içeren sinyal yolları ve inhibitör etki gösteren bileşikler tartışılarak, bunların gelecek çalışmalar için yol gösterici nitelikte olabileceği düşünülmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

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

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. de Vries HJ, Reedijk SH, Schallig HD. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 2015; 16: 99-109.
2. Andrade-Narváez FJ, Vargas-González A, Canto-Lara SB, Damián-Centeno AG. Clinical picture of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan peninsula, Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96(2): 163-7.
3. Nahidi S, Gholami E, Taslimi Y, Habibzadeh S, Seyed N, Daverpanah E, et al. The outcome of arginase activity inhibition in BALB/c mice hosting *Leishmania tropica*. *Parasite Immunol* 2020; 42: e12691.
4. Miramin-Mohammadi A, Javadi A, Eskandari SE, Mortazavi H, Rostami MN, Khamesipour A. Immune response in cutaneous leishmaniasis patients with healing vs. non-healing lesions. *Iran J Microbiol* 2020; 12(3): 249-55.
5. Reed SG, Scott P. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 524-31.
6. Bamorovat M, Sharifi I, Aflatoonian MR, Sadeghi B, Shafii A, Oliae RT, et al. Host's immune response in unresponsive and responsive patients with anthroponotic cutaneous leishmaniasis treated by meglumine antimoniate: A case-control study of Th1 and Th2 pathways. *Int Immunopharmacol* 2019; 69: 321-7.
7. Bogdan C, Gessner A, Sollbach W, Rollinghoff M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 517-25.
8. DeKrey GK, Lima HC, Titus RG. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun* 1998; 66: 827-9.
9. Samuelson J, Lerner E, Tesh R, Titus R. A mouse model of *Leishmania braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J Exp Med* 1991; 173: 49-54.
10. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002; 420(6915): 502-7.
11. Guimaraes ET, Santos LA, Ribeiro dos Santos R, Teixeira MM, dos Santos WLC, Soares MBP. Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. *Microbes Infect* 2006; 8: 1219-26.
12. DeFranco A, Locksley RM, Robertson M. Immunity. The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease. *Yale J Biol Med* 2007; 80(3): 137.

13. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(7): e47.
14. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano JB, et al. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012; 7: e35671.
15. Sharif O, Knapp S. From expression to signaling: roles of TREM-1 and TREM-2 in innate immunity and bacterial infection. *Immunobiology* 2008; 213: 701-13.
16. Ulsan Ö, Mert U, Sadiqova A, Öztürk S, Caner A. Identification of gene expression profiles in *Leishmania major* infection by integrated bioinformatics analyses. *Acta Tropica* 2020; 208: 105517.
17. Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, et al. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* 2000; 165: 2628-36.
18. von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med* 1998; 188(8): 1547-52.
19. Docampo R, Moreno SN, Plattner H. Intracellular calcium channels in protozoa. *Eur J Pharmacol* 2014; 739: 4-18.
20. Tanaka T, Narazaki M, Masuda K, Kishimoto T. Regulation of IL-6 in immunity and diseases. regulation of cytokine gene expression in immunity and diseases. *Adv Exp Med Biol* 2016; 79-88.
21. Habib S, El Andaloussi A, Elmasry K, Handoussa A, Azab M, Elsayey A, et al. PDL-1 blockade prevents T cell exhaustion, inhibits autophagy, and promotes clearance of *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 2018; 86(6).
22. Bensinger SJ, Bradley MN, Joseph SB, Zelcer N, Janssen EM, Hausneret MA, et al. LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell* 2008; 134: 97-111.
23. Vedin LL, Lewandowski SA, Parini P, Gustafsson JA, Steffensen KR. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2009; 30(4): 575-9.
24. Bruhn KW, Marathe C, Maretta-Mira AC, Nguyen H, Haskell J, Tran TA, et al. LXR deficiency confers increased protection against visceral *Leishmania* infection in mice. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(11): e866.
25. Kautz-Neu K, Kostka SL, Dinges S, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. IL1 signalling is dispensable for protective immunity in *Leishmania*-resistant mice. *Exp Dermatol* 2011; 20: 76-8.
26. Galdino H, Saar Gomes R, dos Santos JC, Pessonni LL, Maldaner AE, Marques SM, et al. *Leishmania* (Viannia) braziliensis amastigotes induces the expression of TNF- α and IL-10 by human peripheral blood mononuclear cells in vitro in a TLR4-dependent manner. *Cytokine* 2016; 88: 184-92.
27. Kumari S, Singh S, Saha B, Paliwal PK. *Leishmania major* MAP kinase 10 is protective against experimental *L. major* infection. *Vaccine* 2011; 29: 8783-7.
28. Yang Z, Mosser DM, Zhang X. Activation of the MAPK. ERK, following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages. *J Immunol* 2006; 178: 1077-85.
29. Ruhland A, Leal N, Kima PE. *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cell Microbiol* 2007; 9(1): 84-96.
30. Nyamao MR, Zipporah OL, Khayeka WC, Bernard NJ, Rebecca WW. Efficacy of glucocorticoids in controlling *Leishmania major* infecting Balb/c mice. *J Infect Dis Immun* 2014; 6(2): 10-8.