

ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LEISHMANIA TÜRLERİNDE GENOM ÇAPINDA FOSFOLİPAZ GEN
AİLESİNİN TANIMLANMASI VE GEN EKSPRESYON ANALİZİ**

Samatar Samaleh OSMAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Samatar Samaleh OSMAN tarafından hazırlanan “***Leishmania* Türlerinde Genom Çapında Fosfolipaz Gen Ailesinin Tanımlanması ve Gen Ekspresyon Analizi**” adlı tez çalışması 17/07/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Serhat SİREKBASAN

Eş Danışman : Doç. Dr. Tuğba GÜRKÖK TAN

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Serhat SİREKBASAN
Eldivan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Mehmet DEMİRCİ
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Kırklareli Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN
Eldivan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hamit ALYAR

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “***Leishmania* Türlerinde Genom Çapında Fosfolipaz Gen Ailesinin Tanımlanması ve Gen Ekspresyon Analizi**” konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (17/07/2023).

Samatar Samaleh OSMAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LEISHMANIA TÜRLERİNDE GENOM ÇAPINDA FOSFOLİPAZ GEN AİLESİNİN TANIMLANMASI VE GEN EKSPRESYON ANALİZİ

Samatar Samaleh OSMAN

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Serhat SİREKBASAN
Eş Danışman: Doç. Dr. Tuğba GÜRKÖK TAN

Leishmania paraziti ile enfekte olan bir kum sineğinin ısırmasıyla insanlara bulaşan Leishmaniasis, dünyadaki en önemli yedi tropikal hastalıktan biridir. Fosfolipazların *Leishmania*'daki rolünün anlaşılması, leishmaniasis için yeni tedavilerin geliştirilmesinde potansiyel etkilere sahip olabilir. Bu çalışmada, *Leishmania infantum* ve *Leishmania major*'da fosfolipaz C (PI-PLC) gen ailesinin genom çapında analizini ve bu genlerin ifade seviyelerini belirlemeyi amaçladık. *Leishmania* genomu, PI-PLC geninin üyelerini ortaya çıkarmak için *in silico* olarak analiz edildi. Bu iki türün genomunda PI-PLC gen ailesinin domainlerini içeren diziler bulundu ve teyit edildi. MEGA 6.0 yazılımı kullanılarak çoklu dizi hizalaması ve filogenetik analizler yapıldı. PI-PLC genlerinin kromozom lokasyonları ve motif analizleri gerçekleştirildi. *L. infantum* ve *L. major* için PI-PLC-X, PI-PLC-Y ve C2 domainlerini içeren toplam 29 gen belirlendi. İki türde de PI-PLC-X (6), PI-PLC-Y (4) ve C2 (19) domainlerini içeren gen sayıları aynı olarak bulundu. *L. infantum*'da bulunan proteinlerin amino asit sayıları 245 ile 2342 arasında değişirken, *L. major*'da en kısa protein 267 amino asit, en uzun protein ise 2241 amino asit içeriyordu. Filogenetik analizde, *L. infantum*'da bulunan PI-PLC gen ailesinin beş alt gruba ayrıldığı ve *L. major*'da bulunan PI-PLC gen ailesinin ise altı alt gruba ayrıldığı tespit edildi. *L. infantum*'da antimon bileşiklerine duyarlı ve dirençli kökenler arasındaki gen ifade değişimleri analiz edildiğinde, dört gende anlamlı ifade değişimleri belirlendi. Fosfolipazların küçük molekül inhibitörleri veya diğer terapötik ajanlarla hedeflenmesi, potansiyel olarak parazitin işlevini bozabilir ve onu öldürmeye yardımcı olabilir. Bununla birlikte, fosfolipazların *Leishmania*'daki rolünü tam olarak anlamak ve bu yaklaşımın bir tedavi seçeneği olarak uygulanabilirliğini belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

2023, 55 sayfa

ANAHTAR KELİMELE: Fosfolipaz, Gen ekspresyonu, *Leishmania*, Patojenite

ABSTRACT

Master of Science Thesis

GENOME-WIDE IDENTIFICATION OF PHOSPHOLIPASE GENE FAMILY IN *LEISHMANIA* SPP. AND THEIR GENE EXPRESSION ANALYSIS

Samatar Samaleh OSMAN

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Serhat SİREKBASAN
Co-Advisor: Assoc. Prof. Dr. Tuğba GÜRKÖK TAN

Leishmaniasis, which is transmitted to humans by the bite of a sand fly infected with the *Leishmania* parasite, is one of the seven most important tropical diseases in the world. Understanding the role of phospholipases in *Leishmania* may have potential effects for the development of new treatments for leishmaniasis. In this study, we aimed to determine the genome-wide analysis of the phospholipase C (PI-PLC) gene family and the expression levels of these genes in *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *Leishmania* genome was analyzed *in silico* to reveal the members of the PI-PLC gene. Sequences containing domains of the PI-PLC gene family were found and confirmed in the genome of these two species. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis were performed using MEGA 6.0 software. Chromosome locations and motif analysis of PI-PLC genes were performed. A total of 29 genes including PI-PLC-X, PI-PLC-Y, and C2 domains were identified for *L. infantum* and *L. major*. The number of genes containing PI-PLC-X (6), PI-PLC-Y (4), and C2 (19) domains were found to be the same in both species. The number of amino acids in the proteins found in *L. infantum* ranged from 245 to 2342, while in *L. major*, the shortest protein contained 267 amino acids, and the longest protein contained 2241 amino acids. Phylogenetic analysis revealed that the PI-PLC gene family in *L. infantum* was divided into five subgroups, while the PI-PLC gene family in *L. major* was divided into six subgroups. When gene expression changes between antimony-sensitive and antimony-resistant strains in *L. infantum* were analyzed, significant expression changes were determined in four genes. Targeting phospholipases with small molecule inhibitors or other therapeutic agents could potentially disrupt the function of the parasite and help to kill it. However, more research is needed to fully understand the role of phospholipases in *Leishmania* and to determine the viability of this approach as a treatment option.

2023, 55 pages

Keywords: Phospholipase, Gene expression, *Leishmania*, Pathogenicity

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez yolculuğuna başladığım günden itibaren değerli vaktini ve desteğini sunan; rehberliği, anlayışı ve sabrıyla yol gösteren tez danışmanım Doç. Dr. Serhat SİREKBASAN'a ve eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım eş danışmanım Doç. Dr. Tuğba GÜRKÖK TAN'a, sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Samatar Samaleh OSMAN

Çankırı, Temmuz 2023



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 <i>Leishmania</i> Paraziti	4
2.2 <i>Leishmania</i> 'nın Yaşam Döngüsü	6
2.3 <i>Leishmania</i> Epidemiyolojisi	7
2.4 <i>Leishmania</i> 'nın Genomu	8
2.5 <i>Leishmania</i> Parazitinin Neden Olduğu Klinik Tablolar	9
2.5.1 Kutanöz leishmaniasis	9
2.5.2 Mukokutanöz leishmaniasis.....	11
2.5.3 Visseral leishmaniasis.....	11
2.6 <i>Leishmania</i> Tanısı	12
2.6.1 Mikroskopik	13
2.6.2 Kültür	13
2.6.3 İmmünolojik yöntemler.....	14
2.7 <i>Leishmania</i> Tedavisi.....	15
2.8 <i>Leishmania</i> 'nın Kontrolü	17
2.9 Fosfolipaz Enzimleri ve İşlevleri.....	18
2.10 Fosfolipaz Gen Ailesinin <i>Leishmania</i> 'daki Önemi	19
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1 <i>L. infantum</i> ve <i>L. major</i> genomlarında PI-PLC proteinlerinin belirlenmesi....	21
3.2 PI-PLC genlerinin yapısı ve kromozom lokasyonunun belirlenmesi	22
3.3 PI-PLC genlerinin korunmuş motiflerin belirlenmesi	23

3.4 Filogenetik analizler ve dizi hizalama.....	23
3.5 İn siliko gen ifade anailizi	23
4. BULGULAR.....	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	38
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ.....	56



SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
±	Artı eksi
≤	Küçük veya eşit
≥	Büyük veya eşit
°C	Santigrat derece
μL	Mikrolitre
kg	Kilogram
mg	Miligram
mL	Mililitre



KISALTMALAR DİZİNİ

DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GC	Guanin-Sitozin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IFAT	Indirect Fluorescent Antibody Test
LysoPLA1/2	Lizofosfolipaz A1/2
Mb	Megabaz
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PLA1	Fosfolipaz A1
PLA2	Fosfolipaz A2
PLB	Fosfolipaz B
PLC	Fosfolipaz C
PLD	Fosfolipaz D
PtdIns(4,5)P2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1 <i>Leishmania</i> 'nın yaşam döngüsü (Banuls <i>et al.</i> 2007).....	6
Şekil 2. 2 Kutanöz leishmaniasis lezyonları (orijinal)	10
Şekil 3. 1 NCBI NIH veritabanı ara yüzü	21
Şekil 3. 2 MapGene2Chrom çevrimiçi aracı ara yüzü	22
Şekil 4. 1 PI-PLC genlerinin <i>L. infantum</i> kromozomlarındaki lokasyonları	30
Şekil 4. 2 PI-PLC genlerinin <i>L. major</i> kromozomlarındaki lokasyonları	31
Şekil 4. 3 PI-PLC genlerinin <i>L. infantum</i> kromozomlarında tahmin edilen motif dağılımı	32
Şekil 4. 4 PI-PLC genlerinin <i>L. major</i> kromozomlarında tahmin edilen motif dağılımı	33
Şekil 4. 5 <i>L. infantum</i> 'dan tanımlanan PI-PLC genlerinin filogenetik ağacı.....	35
Şekil 4. 6 <i>L. major</i> 'den tanımlanan PI-PLC genlerinin filogenetik ağacı	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1 <i>Leishmania</i> cinsinin taksonomik sınıflandırması.....	5
Çizelge 3. 1 <i>L. infantum</i> 'a ait transkriptom kütüphaneleri.....	23
Çizelge 4. 1 <i>L. infantum</i> genomunda belirlenen PI-PLC genleri	25
Çizelge 4. 2 <i>L. major</i> genomunda belirlenen PI-PLC genleri.....	26
Çizelge 4. 3 <i>L. infantum</i> genomunda belirlenen proteinlerin karakteristik özellikleri.....	27
Çizelge 4. 4 <i>L. major</i> genomunda belirlenen proteinlerin karakteristik özellikleri	28
Çizelge 4. 5 <i>L. infantum</i> genomunda belirlenen proteinlerin karakteristik özellikleri.....	37



1. GİRİŞ

Leishmaniasis, zorunlu hücre içi parazit olan *Leishmania* protozoan mikroorganizmalarının sebep olduğu, vektörü olan dişi kum sineğinin (flebotom, tatarcık) ısırması ile bulaşan enfeksiyöz bir hastalıktır. Leishmaniasis, dünya çapında geniş bir coğrafyada dağılım gösterir ve yaklaşık 89 ülkede endemik olarak görülmektedir (Torres-Guerrero *et al.* 2017).

Dünyada yaklaşık 12 milyon insanı etkileyen *Leishmania*'nın neden olduğu hastalığa, 350 milyon kişinin yakalanma riski taşıdığı bildirilmektedir. Yaygın olarak kırsal alanlarda bulunur ve genellikle yoksulluk ve kötü yaşam koşulları ile ilişkilendirilir. İklim ve diğer çevresel değişiklikler, kum sineği vektörlerinin coğrafi aralığını ve hastalığın dünyada bulunduğu alanları genişletme potansiyeline sahiptir. Leishmaniasis, Avustralya ve Antarktika hariç her kıtadaki insanlarda bulunur (Harman 2015).

Leishmania türüne ve konağın immün yanıtına göre enfeksiyon farklı şekilde tezahür eder. Dalak ve karaciğer gibi iç organları etkileyen visseral leishmaniasis ve deriyi etkileyen kutanöz leishmaniasis olmak üzere temelde iki klinik formu vardır. Leishmaniasis semptomları enfeksiyonun tipine ve şiddetine bağlı olarak değişebilir. Genelde görülen semptomlar cilt lezyonları, ateş, kilo kaybı ve yorgunluk olmakla birlikte kala azar olarak da bilinen visseral leishmaniasisin, tedavi edilmediği takdirde mortalitesi çok yüksektir (McGwire and Satoskar 2014).

Leishmania parazitlerinin, vektörü olan kum sineğinin sindirim sisteminde yer alan hücre dışı promastigot ve memeli konakçının makrofajlarında bulunan hücre içi amastigot olmak üzere iki farklı yaşam formu bulunmaktadır. Bulunduğu ortam şartlarına uygun olacak şekilde bir takım morfolojik, fizyolojik ve moleküler adaptasyonlar gösterirler. Bu adaptasyon mekanizmaları sayesinde de çoğalma, konağın bağışıklık tepkisinden kaçma, tedavide kullanılan ilaçlara karşı direnç kazanma gibi stratejiler geliştirirler (Demir 2019).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), leishmaniasisi yeni tedavilerin geliştirilmesinin öncelikli olduğu, ihmal edilen tropikal hastalıklardan biri olarak tanımlıyor. Hastalığın önlenmesi ve etkin tedavisi üzerine birçok araştırma yapılmasına rağmen leishmaniasisin kesin olarak kontrol edilebilmesi için yeni araçlara ihtiyaç vardır (Burza *et al.* 2018).

Leishmaniasis tedavisi, hastalığın şekline ve hastanın genel sağlığına bağlıdır. Kutanöz leishmaniasis genellikle beş değerlikli antimon bileşikler, amfoterisin B veya miltefosin gibi topikal veya sistemik ilaçlarla tedavi edilir. Visseral leishmaniasis ise amfoterisin B, pentavalan antimoniyal bileşikler veya miltefosin gibi sistemik ilaçlarla tedavi edilir. *Leishmania* parazitinin var olan karmaşık yaşam döngüsü ve gelişimsel evrelerinden biri olan amastigot formunun memeli konakçının immün sistem hücrelerinde yaşaması tedaviyi zorlaştırır. Buna ek olarak, gelişen ilaç direnci tedavi başarısızlığına sebep olur ve hastalığı kontrol etme çabalarımıza meydan okuyarak karşımıza bir zorluk olarak çıkar (Croft and Olliaro 2011, Ponte-Sucre *et al.* 2017).

Fosfolipazlar, tüm canlı hücrelerin hücre zarını oluşturan bir tür yağ molekülü olan fosfolipitleri hidrolize eden enzimlerdir. Fosfolipaz A, fosfolipaz B, fosfolipaz C ve fosfolipaz D dahil olmak üzere farklı fosfolipaz türleri mevcuttur. Bu enzimler, sinyal iletimi, bağışıklık tepkisi, hücre büyümesi ve bölünmesi gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlarda önemli roller üstlenirler (Aloulou *et al.* 2018).

Fosfolipazların, patojenlerin çoğalması ve yayılması sırasında lipid döngüsü için önemi yıllardır kabul edilmiş olsa da bu enzimlerin paraziter hastalıklardaki fonksiyonlarını ele alan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bazı parazitler, konakçının hücresel süreçlerini bozma, hayatta kalma ve çoğalmayı desteklemenin bir yolu olarak fosfolipazlar üretir. Örneğin sıtma etkeni *Plasmodium*, hastalığın gelişiminde ve eritrositik enfeksiyon döngülerinde önemli bir adım olan eritrositleri işgal etmede yardımcı olan fosfolipazlar üretir. Fosfolipaz üreten diğer bir parazit ise *Leishmania*'dır. Bu bağlamda, fosfolipaz aktivitesi gösteren *Leishmania* parazitlerinin hücre içi hayatta kalmalarının yanı sıra fagositoz sürecinde de avantajlı olduğu tanımlanmıştır (Bordon *et al.* 2018, Bott *et al.* 2020, Flammersfeld *et al.* 2018).

Çalışmamızda, *L. infantum* ve *L. major* türlerinde genom çapında fosfolipaz gen ailesinin biyoinformatik olarak tanımlanmasını, analizini ve karşılaştırılmasını amaçladık. Buna ek olarak, ekspresyon düzeylerini karakterize ederek türler arasındaki ilişki ortaya konulmaya çalışıldı.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Leishmania* Paraziti

Leishmania, zorunlu hücre içi protozoan bir parazit olup, dişi kum sineklerinin (*Phlebotomus* spp. ve *Lutzomyia* spp.) kan emmesi esnasında insanlara ve hayvanlara bulaşarak enfeksiyona neden olur. Birçok ülkede endemik olarak bulunmaktadır ve yılda yaklaşık 1 milyon insanı enfekte etmektedir (Alvar *et al.* 2012).

Bu parazit, Leishmaniasis olarak bilinen çeşitli klinik tablolara sebep olur. Visseral leishmaniasis olarak da adlandırılan kala azar, parazitin dalak, karaciğer ve kemik iliği gibi iç organları enfekte etmesi sonucu ortaya çıkar ve ciddi bir ölüm riski taşır (Burza *et al.* 2018). Kutanöz leishmaniasis ise parazitin cilt dokularını enfekte etmesi sonucu oluşur ve yaygın bir klinik tablodur (Herwaldt 1999). Mukokutanöz leishmaniasis ise, burun ve ağız gibi mukoza zarlarının yanı sıra cilt dokularını da enfekte eden bir klinik tablodur (Okwor and Uzonna 2016).

Leishmania, hücre içi yaşayan bir organizma olarak konak hücreleriyle etkileşime girerek enfeksiyonu sürdürür. Tek hücreli bu organizmalar, flagella adı verilen kamçı benzeri uzantılar sayesinde hareket ederler. Bu parazitin ana vektörleri olan kum sinekleri, kan emerken paraziti enfekte konaklara bulaştırırlar (Bates 2007). Leishmaniasis, insan sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturmaktadır ancak parazitin biyolojisi ve moleküler mekanizmaları hakkındaki araştırmalar sayesinde daha etkili tedavi yöntemleri ve koruyucu önlemler geliştirilmesi mümkün olabilir (Alvar *et al.* 2012, Bates 2007).

Leishmania cinsi, Kinetoplastida sınıfında ve Trypanosomatidae familyasında yer alan çeşitli türlerden oluşan bir gruptur. Bu türler; oluşturdukları enfeksiyonun şiddeti, klinik belirtiler, tedavi yanıtı ve epidemiyolojik özellikler açısından farklılıklar gösterir. Bundan dolayıdır ki, türlerin tanınması ve ayrımı, uygun tedavi stratejileri ve önlemlerin belirlenmesinde önemlidir (Okwor and Uzonna 2016).

Leishmania cinsinin taksonomik sınıflandırması şu şekildedir:

Çizelge 2. 1 *Leishmania* cinsinin taksonomik sınıflandırması

Kingdom	Protista
Superkingdom	Eukaryota
Phylum	Euglenozoa
Class	Kinetoplastea
Subclass	Metakinetoplastina
Order	Trypanosomatida
Family	Trypanosomatidae
Subfamily	Leishmaniinae
Genus	<i>Leishmania</i>
Species	<i>L. donovani</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. major</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. aethiopica</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. peruviana</i>

Leishmania cinsi 20'den fazla tür içerir ve tatarcığı (kum sineği) parazitin gelişme yerine göre 3 alt türe ayrılır:

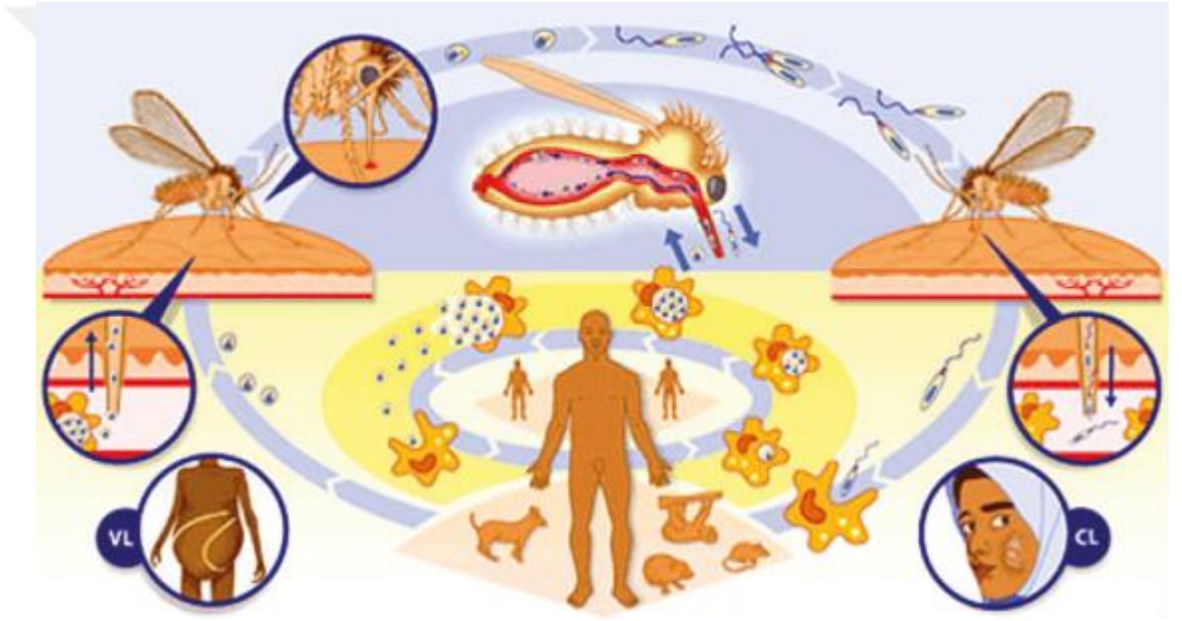
- *Leishmania* (*Leishmania*)
- *Leishmania* (*Viannia*)
- *Leishmania* (*Sauroleishmania*)

Leishmania'nın sınıflandırılmasına yönelik ilk girişimler sadece hastalık etkeni parazitin etiyolojik ajan olarak klinik temelli ayırımına dayanıyordu. Buradaki en büyük sorun aynı klinik semptomları iki farklı *Leishmania* türünün de gösterebiliyor olmasıdır.

İnsanlarda hastalığa neden olan en yaygın *Leishmania* türleri şunlardır: Visseral leishmaniasise neden olan türler *L. donovani* ve *L. infantum*'dur. Kutanöz türler arasında *L. tropica*, *L. major*, *L. braziliensis*, *L. peruana*, *L. guyanensis* ve *L. mexicana* yer alır. *L. braziliensis* aynı zamanda mukokutanöz leishmaniasise de neden olur (Garnham 1971, Alvar *et al.* 2012, Ramírez *et al.* 2016).

2.2 *Leishmania*'nın Yaşam Döngüsü

Leishmania türleri, karmaşık bir yaşam döngüsü içeren iki farklı konakçıya sahiptir. Yaşam döngüleri boyunca çeşitli çevresel uyaranlara maruz kalan parazitin omurgasız konakta yer alan promastigot ve omurgalı konakta yer alan amastigot olmak üzere iki farklı evrimsel formu bulunmaktadır (Şekil 2.1). Promastigot form, biyolojik vektörü olan *Phlebotomus* vücudunda ve kültür ekimlerinde bulunurken, amastigot form ise konak hücrelerinde yaşayarak parazitin yaşam döngüsü içinde önemli bir rol oynar (Chang and Fong 1983, Bates 2007).



Şekil 2. 1 *Leishmania*'nın yaşam döngüsü (Banuls *et al.* 2007)

Enfekte olmuş ergin dişi kum sinekleri kan emmek için uygun bir konakçı bulduklarında, bünyesinde barındırdığı promastigot formları memeli konakçının derisine enjekte ederler. Promastigotlar, dişi tatarcık sineğinin orta bağırsağında bulunan kamçılı ve bulaşıcı parazitik formlardır. Bu promastigotlar, konak makrofaj hücreleri tarafından fagosit edilir ve sonrasında amastigot formuna farklılaşırlar. Makrofajlar içerisinde bölünüp çoğalan amastigotlar, bir süre sonra hücreyi parçalayarak serbest hale geçerler ve bu yolla bir bakıma diğer makrofajları da enfekte

ederler. Başka bir kum sineği kan emmek için infekte konağı ısırıldığında amastigotları alır ve döngü bu şekliyle devam eder (Chang and Fong 1983).

2.3 *Leishmania* Epidemiyolojisi

Leishmaniasis Afrika, Asya, Orta Doğu, Güney ve Orta Amerika'da yaygın olarak görülmektedir ve dünya genelinde yaklaşık 12 milyon insanı etkilemektedir. Yaklaşık 98 ülkede endemik olan bu hastalık, özellikle tropikal ve subtropikal bölgelerde yaygındır (Alvar *et al.* 2012).

Hastalığın yayılmasına etki eden birçok faktör vardır. Bunlar arasında iklim, çevresel koşullar, insan davranışları, hastalığın taşınması için gereken vektörlerin yaygınlığı, sağlık altyapısı, uygulanan tedavi yöntemleri ve etkinliği, hatta uygun tanı yöntemleri gibi faktörler sayılabilir. Bunlara dışında hastalığın prevalansı toplumun yaşam koşulları, yerel iklim koşulları ve ekonomik faktörler gibi birçok faktöre bağlı olarak değişebilir. Leishmaniasis, genellikle yoksul ve gelişmekte olan toplumlarda daha yaygındır. İnsanların yaşam koşullarındaki eksiklik ve vektör kontrollerinin yetersizliği gibi faktörler, hastalığın yayılmasını kolaylaştırabilir. Bu nedenle leishmaniasis, genellikle gelişmekte olan ülkelerde daha yaygın olarak görülen bir hastalıktır (Bern *et al.* 2008, Pace 2014).

Son yıllarda, bazı ülkelerde leishmaniasis insidansında artış bildirilmiştir. Bu artış etkili ve uygun tedaviye erişim sorunları, vektör kontrol programlarına yeterli yatırım yapılmaması ve insan etkisi nedeniyle artan vektör yoğunluğu gibi faktörlere bağlanmaktadır. Mevcut bu durum klinik teşhis, hastalığın takibi ve tedavi yöntemleri konusunda daha fazla çalışma yapılmasını gerektirmektedir (Pace 2014, Mannan *et al.* 2021, Pasquier *et al.* 2022). Bu yönde yapılan araştırmalar, hastalığın yayılmasını azaltmak ve hastalıkla mücadele etmek için önemli bir bilgi kaynağıdır. Önümüzdeki süreçte geliştirilecek aşılardan ve daha etkili tedavi yöntemlerinin kullanılması, hastalığın kontrol edilmesinde önemli bir rol oynayabilir.

2.4 *Leishmania*'nın Genomu

Tek hücreli bir organizma olan *Leishmania* parazitinin genomu oldukça kompleks yapıya sahiptir. *Leishmania*'nın genomu, diğer ökaryot organizmaların genomlarına benzer şekilde kromozomlar, genler ve eksonlar gibi temel yapı taşlarından oluşur. Ancak bazı özellikleri, özellikle de kromozomların sayısı ve organizasyonu diğer organizmaların genomlarından farklıdır (Kazemi 2011, Cantacessi *et al.* 2015).

Leishmania'nın genomu, 29–33 Mb arasında değişen bir boyuta sahiptir ve genellikle 36 kromozomdan oluşur. Ancak, *L. amazonensis* ve *L. mexicana* gibi bazı türlerde kromozom sayısı daha azdır ve 34 kromozoma sahiptir. *Leishmania*'nın haploid genomu, %60 GC baz çifti oranına sahiptir ve protein kodlayan genlerin sayısı 8023 ile 8412 arasında değişir (Ivens *et al.* 2005, Silveira *et al.* 2021).

Leishmania genomunun karmaşık yapısı, gen düzenlemesi üzerinde de etkilidir. *Leishmania*, transkripsiyonel düzenleme için sadece sınırlı sayıda transkripsiyon faktörü kullanır ve gen ekspresyonunu düzenleyen post-transkripsiyonel mekanizmaların yanı sıra epigenetik mekanizmalar da kullanır (Ivens *et al.* 2005, Peacock *et al.* 2005).

Leishmania'nın genomu, parazitin biyolojisi ve evrimsel geçmişi hakkında da ipuçları sağlar. Örneğin, *Leishmania* türlerinin genomlarındaki değişiklikler, parazitin konak hücrelerindeki metabolik aktivitelerinin çeşitliliğini yansıtır. Ayrıca *Leishmania* türlerinin genomlarındaki farklılıklar, bu organizmaların evrimsel geçmişi hakkında da bilgi sağlar. Böylelikle bir türün genomunda bulunmayan genler, bu türün diğerlerinden farklı bir evrimsel yoldan geçtiğine işaret edebilir. Buna ek olarak *Leishmania*'nın genetiği, aynı zamanda bu organizmalarla mücadele için geliştirilen yeni tedavi ve aşılarda tasarımı için de önemlidir. Sonuçta *Leishmania*'da bulunan bazı genler, parazitin metabolizmasını veya konak bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını etkileyebilir ve bu genler hedef alınarak yeni ilaçlar veya aşılarda geliştirilebilir (Samarasinghe *et al.* 2018, Zheng *et al.* 2020).

2.5 *Leishmania* Parazitinin Neden Olduğu Klinik Tablolar

Leishmania, insanlar ve hayvanlarda çeşitli klinik tablolara neden olan bir parazit türüdür. Leishmaniasis olarak adlandırılan hastalık, enfekte dişi kum sineklerinin ısırmasıyla insanlara bulaşarak; cilt, mukoza zarları ve iç organlar dahil olmak üzere çeşitli vücut bölgelerinde enfeksiyona neden olabilir (Banuls *et al.* 2007).

Leishmania türlerine bağlı olarak ortaya çıkan klinik tablolar temel olarak incelendiğinde 3 ana gruba ayrılabilir:

1. Kutanöz leishmaniasis
2. Mukokutanöz leishmaniasis
3. Visseral leishmaniasis

2.5.1 Kutanöz leishmaniasis

Kutanöz leishmaniasis, uzun süren yaraların bulunduğu ülseratif nodüllerle karakterize bir deri hastalığıdır. Bu hastalığın en yaygın nedenleri arasında *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* ve *L. mexicana* türleri bulunsu da herhangi bir *Leishmania* enfeksiyonu insanlarda kutanöz leishmaniasis'e neden olabilir (Murray *et al.* 2005).

Hastalık, yüzyıllardır bilinmektedir ve çeşitli endemik bölgelerde farklı isimlerle anılmaktadır. Bölgesel isimlendirmeler arasında Halep Çıbanı, Şark Çıbanı, Bağdat Çıbanı, Delhi Çıbanı, Nil Çıbanı ve Urfa Çıbanı yer almaktadır. Ayrıca, hastalık Güzellik Çıbanı ve özellikle kendiliğinden yaklaşık bir yıl içinde iyileşebilmesi nedeniyle Yıl Çıbanı olarak da anılmaktadır (Memişoğlu 1997, Bilgic-Temel *et al.* 2019).

DSÖ'ye 2013 yılında bildirilen vakaların %95'i Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, Honduras, İran, Fas, Nikaragua, Pakistan, Peru, Suudi Arabistan, Suriye, Tunus, Türkiye ve Yemen gibi 15 ülkede kaydedilmiştir (Alvar *et al.* 2012).

Kutanöz leishmaniasis, enfeksiyonun ciltte ve bazen mukozalarda olduğu en yaygın formdur. Deride yaralar ve nodüller oluşur, bu lezyonlar ise genellikle ağrısızdır. Yaralar kendiliğinden iyileşebilir, ancak iyileşme süreci aylar hatta yıllar sürebilir (Reithinger *et al.* 2007).

Kutanöz leishmaniasis, genellikle yaralar ve cilt lezyonlarına neden olur ve tedavi edilmezse kalıcı hasar bırakabilir (Şekil 2.2). Bu nedenle, hastalığın önlenmesi ve kontrol altına alınması son derece önemlidir. Ancak, hastalığın ihmal edilmesi ve yeterince ilgi görmemesi bu amaçlara ulaşmayı zorlaştırmaktadır. Araştırma çalışmaları yetersiz kalırken, hastalığın yayılmasını önleyici stratejiler de yeterince uygulanmamaktadır.



Şekil 2. 2 Kutanöz leishmaniasis lezyonları (orijinal)

2.5.2 Mukokutanöz leishmaniasis

Mukokutanöz leishmaniasis, cilt ve mukozal zarları etkileyen bir leishmaniasis şekli olup mukozal tutulum ile birlikte hayatı tehdit edici tablolara yol açabilir. Vakaların çoğundan *L. braziliensis* sorumludur ancak *L. panamensis*, *L. guyanensis* ve *L. amazonensis* türleri de hastalık yapabilir (Handler *et al.* 2015).

Mukokutanöz leishmaniasisin klinik tablosu, enfeksiyonun ilk aşamasından aylar hatta yıllar sonra ortaya çıkabilen cilt lezyonlarını içerir. Bu lezyonlar genellikle yüz, burun, ağız veya boğazda nodüller veya ülserler şeklinde görülür. Nadir durumlarda, lezyonlar mukozal yüzeylere yayılır ve dokularda harabiyet ve ciddi şekil bozukluklarına neden olabilir (Daneshbod *et al.* 2011).

Hastalarda cilt lezyonlarının yanı sıra ateş, halsizlik, kilo kaybı ve lenfadenopati de görülebilir. Semptomlar, enfekte olan kişinin bağışıklık tepkisine ve enfekte eden *Leishmania* parazitin türüne bağlı olarak değişebilir. Erken teşhis ve hızlı tedavi, şekil bozukluğu ve hastalıkla ilişkili diğer komplikasyonların önlenmesi için önemlidir (David and Craft 2009).

2.5.3 Visseral leishmaniasis

Kala-azar olarak da bilinen visseral leishmaniasis, *L. donovani* kompleksine ait *L. donovani*, *L. infantum* ve *L. chagasi* parazitlerinin neden olduğu potansiyel olarak ölümcül bir hastalıktır. Sıklıkla dalağı, kemik iliğini ve diğer iç organları etkiler. Vakaların çoğu Hindistan Yarımadası, Doğu Afrika, Güney Amerika ve Akdeniz havzası gibi endemik bölgelerde görülür (Pacheco-Fernandez *et al.* 2021, Scarpini *et al.* 2022).

Visseral leishmaniasisin klinik belirtileri, birkaç haftadan birkaç aya kadar sürebilen bir inkübasyon dönemi ile başlar ve ardından ani olarak ateş, kilo kaybı, yorgunluk ve karın ağrısı gibi belirtiler görülür. Bu semptomlar daha sonra şiddetli halsizliğe, anemiye,

hepatosplenomegaliye ve pansitopeniye yol açabilir (van Griensven and Diro 2012). Hastalığın ilerleyen evrelerinde, immün yetmezlik nedeniyle kaşeksi, ödem ve sekonder enfeksiyonlar da ortaya çıkabilir (Gelanew *et al.* 2011, Libório *et al.* 2012).

Visseral leishmaniasis tedavisi sonrası cilt lezyonları olarak ortaya çıkabilen post-kala-azar dermal leishmaniasis olarak adlandırılan kutanöz bir tablo da meydana gelebilir (Zijlstra *et al.* 2003). Hastalığın endemik olduğu yerlerde HIV enfeksiyonu olan hastaları veya diğer immün yetmezliklere sahip kişileri etkileyerek ciddi semptomlara neden olabilir (Ritmeijer *et al.* 2001, Diro *et al.* 2014). Bu nedenle, bağışıklığı baskılanmış hastaların yakından takip edilmesi önemlidir. Erken tanı ve hızlı tedavi, mortaliteyi önlemek ve hastalıkla ilişkili morbiditeyi azaltmak için son derece önemlidir.

2.6 *Leishmania* Tanısı

Leishmania tanısı, klinik semptomların ve laboratuvar testlerinin bir kombinasyonunu gerektirir. Bu testler arasında cilt lezyonlarından alınan örneklerin mikroskopik incelemesi, *Leishmania* parazitinin kültürü ve PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) gibi moleküler yöntemler yer alır. Ayrıca *Leishmania*'ya karşı oluşan antikor varlığının saptanmasına yönelik serolojik testler de kullanılabilir. Bu testler arasında Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) gibi yöntemler bulunmaktadır. Ancak daha çok seroepidemiolojik araştırmalarda kullanılan bu serolojik testlerin düşük özgüllüğüne dikkat edilmeli, tanı klinik semptomlar ve diğer testlerle birleştirilerek yapılmalıdır (Palma and Gutierrez 1991, Elmahallawy *et al.* 2014, Galluzzi *et al.* 2018, Sirekbasan and Polat 2021).

Leishmaniasis vakalarında, günde iki defa yükselen ve her seferinde terlemeyle düşen ateşe ek olarak splenomegali, hepatomegali, zayıflama, kansızlık, lökopeni gibi semptomlar, visseral tabloyu akla getirmelidir (Unat *et al.* 1995).

Vücudun açık kısımlarında en az bir aydır iyileşmeyen, krutlu bir kabukla kaplı, ikincil bir bakteriyel enfeksiyon olmadığı sürece ağrısız yaralar da kutanöz leishmaniasis açısından değerlendirilmelidir. Özellikle endemik bölgelerde yaşayan veya bu bölgelere seyahat geçmiş olan hastaların daha yüksek risk altında olduğu unutulmamalıdır (Özbel *et al.* 2007).

2.6.1 Mikroskopik

Leishmania parazitinin mikroskopik tanısı için kutanöz olguların lezyonundan alınan seröz örnekler kullanılır. Visseral vakalarda ise sıklıkla kemik iliği alınır. Örnekler bir lam üzerine yayılarak Wright veya Giemsa boyaları ile boyanır. Boyama işleminden sonra parazitlerin karakteristik şekilleri ve özellikleri görülebilir. Bu özellikler arasında promastigot ve amastigot formlarının varlığı, kinetoplast ve nukleusun konumu sayılabilir. Hazırlanan preparatlar immersiyon objektifi altında 100X büyütmede incelenir (Ramírez *et al.* 2000, Elmahallawy *et al.* 2014).

Mikroskopik incelemenin tanısal duyarlılığı farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda değişmekle birlikte, genellikle %90'ın üzerinde olduğu gözlemlenmiştir (Ramírez *et al.* 2000, Ertabaklar *et al.* 2015 , Rasti *et al.* 2016). Doğru sonucu elde etmek için önemli olan tedavi başlamadan önce uygun örneğin alınması ve amastigotu görmeye alışık tecrübeli gözler tarafından incelenmesidir. Preparatların doğru bir şekilde hazırlanması ve boyanması da oldukça önemlidir.

2.6.2 Kültür

Kültür yöntemleri, özellikle mikroskopik inceleme veya diğer tanı yöntemlerinin kesin tanı koyamadığı durumlarda leishmaniasis tanısında önemli bir yere sahiptir. Bununla birlikte besiyeri hazırlama, ekim işlemi ve inkübasyon süreci, kültür yönteminin doğru bir şekilde uygulanması açısından oldukça önemlidir. Ancak, kültür yönteminin uygulanması biraz zaman alıcı olabilir ve örneklerin büyük bir kısmında başarısızlıkla sonuçlanabilir (Srividya *et al.* 2012, Kumari *et al.* 2021).

Leishmania parazitlerinin in vitro kültürü, Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) besiyeri, Schneider's insect besiyeri, Tobie's besiyeri ve RPMI 1640 besiyeri dahil olmak üzere çeşitli kültür ortamlarının ve yetiştirme tekniklerinin kullanımına dayanmaktadır. Tavşan kanı içeren NNN besiyeri, *Leishmania* parazitlerinin izolasyonu ve kültivasyonu için en yaygın kullanılan besiyerlerinden biridir (Singh 2006, Goto and Lindoso 2010, Maurya *et al.* 2010).

Ekimden sonra kültürler 24-28°C'de inkübe edilir ve kültürden hazırlanan preparatların mikroskopik incelemesi ile parazit tanısı konur. Kültür yöntemlerinin duyarlılığı diğer tanı yöntemlerine kıyasla görece olarak düşüktür ve hastalığın evresi, örneğin kalitesi, laboratuvar çalışanlarının uzmanlığı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Reithinger and Dujardin 2007, Saygı 2009, Thakur *et al.* 2020). Sınırlılıklarına rağmen kültür, özellikle diğer tanı yöntemlerinin sonuçsuz kaldığı durumlarda leishmaniasis tanısı için değerli bir araç olmaya devam etmektedir.

Leishmania tanısı için kullanılan kültür yöntemi, duyarlılık ve özgüllük açısından sınırlamaları olmasına rağmen leishmaniasis tanısının doğrulanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Besiyeri seçimi, üretme teknikleri ve inkübasyon koşulları dahil olmak üzere kültür yöntemlerinin doğru kullanımı tanının doğruluğunu ve güvenilirliğini arttırabilir.

2.6.3 İmmünolojik yöntemler

Leishmania'nın immünolojik tanı yöntemleri, parazitin enfeksiyon sırasında oluşturduğu immünolojik yanıtı dayanmaktadır. Bu yöntemler, hastanın serumunda antikorlar veya deri testi reaksiyonunda olduğu gibi antijenlere karşı oluşan reaksiyonlar gibi çeşitli immünolojik belirteçleri kullanır (Krolewiecki *et al.* 2017).

Montenegro reaksiyonu bir cilt testidir ve *Leishmania* antijenleri ile deri altına yapılan enjeksiyon sonrası deri reaksiyonunun değerlendirilmesi ile yapılır. Hücresel bağışıklık tepkisinin bir göstergesidir. Testin özgüllüğü, hastalığın yaygınlığı ve tedavi sonrası

oluşan antikor düzeyleri gibi faktörlere bağlı olarak yanıtta değişkenlik göstermektedir. Antijen uygulandıktan 48 saat sonra çapı en az 5 mm olan bir eritem tipik olarak pozitif bir sonuç olarak kabul edilir (Montenegro 1926, Skraba *et al.* 2015).

Formol-Jel (Aldehit testi) yöntemi, visseral leishmaniasis hastalarında kullanılan basit ve ucuz bir yöntemdir. Hasta serumuna eklenen bir damla formol, aşırı globulin artışına bağlı serumu katılaştırır (Chowdhury *et al.* 1992).

Chopra'nın antimon testi, leishmaniasis tanısında kullanılan immünolojik yöntemlerden biridir. Bu testte antimon bileşikleri, enfekte kişilerde oluşan antikorları tespit etmek için kullanılır. Hazırlanan antimon bileşiği 1:10 oranında sulandırılmış hasta serumu ile karıştırıldığında oluşan bulanıklık ve çökelti yorumlanır. Diğer immünolojik yöntemler gibi bazı sınırlamaları söz konusudur. Bu testin özgüllüğü düşük olduğundan yanıltıcı sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca, bazı hastalarda reaksiyonun geç oluşması veya hiç oluşmaması da mümkündür (Gharpuré 1930).

Bu yöntemlerin kullanımı klinik belirtilere, hastanın yaşına ve hastalığın klinik tablosuna bağlı olarak farklı sonuçlar verebilir ve diğer tanı yöntemleri ile birlikte kullanıldığında daha doğru sonuçlar elde edilir. Ayrıca, bu yöntemlerin kullanımı bazı durumlarda sınırlıdır ve diğer tanı yöntemleri ile birlikte kullanılması daha güvenilir sonuçlar elde edilmesine yardımcı olabilir.

2.7 Leishmania Tedavisi

Leishmania enfeksiyonlarının tedavisi için mevcut seçenekler arasında beş değerlikli antimon bileşikleri, amfoterisin B, pentamidin, miltefosin ve paromomisin gibi ilaçlar bulunmaktadır. Bunların dışında kriyoterapi, termoterapi ve immünoterapi gibi yöntemler de uygulanmaktadır. Ancak, bu ilaçlar ve yöntemler sıklıkla yan etkilere neden olabilir ve bazı durumlarda etkisiz kalabilir. Tedavi başarısızlığı giderek artan bir sorun olduğundan, daha etkili ve güvenli tedavilerin geliştirilmesi için araştırmalar devam etmektedir (McGwire and Satoskar 2014).

Beş değerlikli antimon bileşikler, leishmaniasis tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaç sınıfıdır. Bu bileşikler, *Leishmania* parazitlerinin DNA sentezini inhibe ederek parazitlerin ölümüne neden olurlar. Ayrıca glukoz metabolizmasını ve ATP oluşumunu da büyük ölçüde etkilerler. Beş değerlikli antimon bileşikler arasında meglumin antimonat (Glucantime®) ve sodyum stiboglukonat (Pentostam®) gibi ilaçlar bulunmaktadır. Ancak, beş değerlikli antimon bileşikler kullanımı sırasında bazı yan etkiler görülebilir. Örneğin gastrointestinal semptomlar, kardiyotoksisite, pankreatik enzimlerin yükselmesi, pansitopeni, elektrolit anormallikleri ve böbrek yetmezliği gibi yan etkiler bildirilmiştir. Bununla birlikte, beş değerlikli antimon bileşikler hala leishmaniasis tedavisinde etkili bir seçenek olarak kabul edilmekte ve özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki enfeksiyonların tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır (Serenio *et al.* 1998, McGwire and Satoskar 2014, Özbilgin *et al.* 2020).

Amfoterisin B (AmBisome®), leishmaniasis tedavisinde kullanılan diğer bir ilaçtır. Bu ilaç, *Leishmania* parazitlerinin hücre zarını etkileyerek parazitlerin ölümüne neden olur. Amfoterisin B, yaygın olarak intravenöz yoldan verilir ve birçok yan etkiye sahiptir. Sık görülen yan etkileri arasında nefrotoksisite, hipokalemi, hipomagnezemi ve anemi gibi durumlar yer alır. Bununla birlikte, amfoterisin B hala leishmaniasis tedavisinde etkili bir seçenek olarak kabul edilmekte ve özellikle diğer ilaçlara dirençli enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (Barratt and Legrand 2005, Solomon *et al.* 2011, Kumari *et al.* 2022).

Pentamidin, miltefosin ve paromomisin, leishmaniasis tedavisinde kullanılan diğer üç ilaçtır. Pentamidin (Pentacrinat®), *L. guyanensis* ve *L. panamensis* gibi bazı türlerin tedavisinde etkilidir ve intravenöz veya intramüsküler yolla verilir. Ancak, pentamidin kullanımı sırasında birçok yan etki bildirilmiştir. Bunlar arasında karaciğer enzim anormallikleri, lökopeni, anemi, miyokardit, hipotansiyon ve hipoglisemi gibi durumlar yer almaktadır. Bu ilacı alan hastalar dikkatli bir gözlem gerektirir (Hellier *et al.* 2000, Blum *et al.* 2004).

Miltefosin (Impavido® ve Miltex®), *L. mexicana*, *L. guyanensis* ve *L. panamensis* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan oral bir ilaçtır. Miltefosin tedavisi sırasında

bulantı, ishal ve kreatinin yüksekliği dışında ciddi yan etkiler görülmemesi büyük bir avantajdır fakat bu ajan teratojeniktir ve gebelikte kontrendikedir (Soto *et al.* 2004).

Paromomisin, özellikle dermal leishmaniasis tedavisinde kullanılan bir diğer ilaçtır ve intramüsküler olarak uygulanır. Ayrıca merhem halinde topikal olarak kullanımı da mevcuttur. Bu ajan 16S ribozomal RNA'ya bağlanarak protein sentezini bloke eden bir aminoglikozid antibiyotiktir. Paromomisin tedavisi sırasında yan etkiler arasında ağrı, ateş, kaşıntı ve böbrek hasarı yer alabilir (Maarouf *et al.* 1995, Arana *et al.* 2001, Moradzadeh *et al.* 2019).

Tüm bu ilaçlar, leishmaniasis tedavisinde farklı seçenekler sunar, ancak her biri farklı yan etki profillerine sahiptir ve hastaların bireysel durumlarına göre yan etkileri göz önüne alınarak takipli kullanılmalıdır.

Son yıllarda, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi amacıyla *Leishmania*'nın farklı moleküler hedefleri ve biyokimyasal yolları incelenmiştir. Örneğin, bazı araştırmalar *Leishmania*'nın protein fosfataz inhibitörlerinin enfeksiyonun tedavisinde potansiyel bir seçenek olduğunu göstermektedir (Nascimento *et al.* 2006). Ayrıca, bazı çalışmalar *Leishmania*'nın hücre duvarının sentezi için önemli olan enzimleri hedef alan yeni bileşiklerin geliştirildiğini ve bu bileşiklerin *Leishmania* enfeksiyonları üzerindeki etkilerinin incelendiğini bildirmiştir (Singh *et al.* 2012).

Leishmania'nın tedavisi hakkında yapılan araştırmalar, bu organizmalarla mücadele için yeni stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olabilir. Ancak, bu alanda hala daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

2.8 *Leishmania*'nın Kontrolü

Leishmania enfeksiyonlarının kontrolü için çeşitli önlemler alınmaktadır. Bunlar arasında temel olarak; vektörle mücadele, kişisel koruyucu önlemler ve aşı geliştirme çalışmaları yer almaktadır.

Vektör kontrolü, enfekte sinek popülasyonlarının azaltılmasına yönelik faaliyetler içermektedir. Bu faaliyetler arasında insektisit kullanımı, barınakların temizlenmesi ve sineklerin barınaklardan uzaklaştırılması yer almaktadır. Ayrıca, vektörlerin habitatları ve davranışları hakkındaki bilgi de kontrol programlarının planlanmasında önemlidir. Özellikle zoonotik leishmaniasis'in kontrolünde, köpeklerde var olan enfeksiyonunun kontrolü de önemlidir. Köpeklerde enfeksiyonun erken teşhisi ve tedavisi, vektörlerin enfekte köpeklerden kan emmesini azaltabilir ve dolayısıyla enfeksiyonun yayılmasını önleyebilir. Ayrıca, köpeklerde vektörlerin üreme ve yaşama alanlarının kontrolü de enfeksiyonun yayılmasını önlemede etkili olabilir (Dantas-Torres *et al.* 2019)..

Kişisel koruyucu önlemler arasında, insanların leishmaniasisin endemik olduğu bölgelere seyahat ederken koruyucu giysi giymeleri, böcek kovucu kullanmaları ve uygun barınma olanakları önerilmektedir. Çok sayıda bilimsel kanıt, topikal kovucu insektisitlerin düzenli kullanımının kum sineği ısırıklarını ve dolayısıyla *Leishmania* bulaşmasını önlemede oldukça etkili olduğunu göstermektedir (Miró *et al.* 2017, Gálvez *et al.* 2018, Travi *et al.* 2018).

Aşı geliştirme çalışmaları, leishmaniasis enfeksiyonlarına karşı koruyucu aşılarda geliştirilmesini amaçlamaktadır. Bu çalışmalar arasında DNA aşısı, canlı atenüe aşı, protein aşısı ve nanopartikül aşı gibi çeşitli aşı geliştirme stratejileri yer almaktadır (Volpedo *et al.* 2022).

2.9 Fosfolipaz Enzimleri ve İşlevleri

Fosfolipazlar, hücre zarı lipidlerinin önemli bir bileşeni olan fosfolipitlerin hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bu enzimler, membranların yapısal bütünlüğünü sağlamakla kalmaz, aynı zamanda sinyal iletimi, hücre içi protein taşınması, hücrelerin farklılaşması ve inflamasyon gibi birçok biyolojik sürecin düzenlenmesinde de önemli roller oynarlar (Aloulou *et al.* 2018).

Tüm fosfolipazlar, substrat olarak fosfolipitleri hedeflemesine rağmen, her enzim spesifik bir ester bağı parçalama yeteneğine sahiptir. Bu nedenle, fosfolipazlar arasında ayırım yapmak ve fosfolipid molekülünde hedeflenen spesifik bağı belirtmek için A, B, C ve D gibi niteleyici harfler kullanılır (Ansell and Hawthorne 1964).

Fosfolipazlar, yapı ve işlev bakımından önemli ölçüde farklılık gösterirler ve ester bağının hidrolizine göre sınıflandırılır. Fosfolipaz A1 (PLA1), fosfolipaz A2 (PLA2), fosfolipaz B (PLB) ve lizofosfolipaz A1/2 (LysoPLA1/2) asil hidrolazlarını oluştururken, fosfolipaz C (PLC) ve fosfolipaz D (PLD) ise fosfodiesterazlar olarak adlandırılır (Richmond and Smith 2011).

2.10 Fosfolipaz Gen Ailesinin *Leishmania*'daki Önemi

Mikrobiyal patojenler, konakçıyı istila etmek ve enfeksiyona neden olmak için bir dizi genetik strateji kullanır. Bu mikrobiyal hücreler, konak dokularına yerleşmek için özelleşmiş hidrolitik enzimler üretebilirler. Bu enzimler, konak hücre zarlarının bileşenlerini yıkarak membranda fiziksel bozulmalara yol açarlar. Böylelikle mikroorganizmaların konak hücrelere kolayca girmelerine olanak sağlar (Salyers and Witt 1994).

Son yıllarda, fosfolipaz genlerinin *Leishmania* dahil birçok parazitin patojenitesinde ve virülansında da çok önemli olduğu gösterilmiştir (Titball 1993, Songer 1997, Ghannoum 2000, Blum *et al.* 2001). Çalışmalar, *Leishmania* parazitlerinin konak hücre içinde hayatta kalmalarını ve büyümelerini sağlamak için fosfolipaz genlerini kullandıklarını ortaya koymuştur. Fosfolipaz genleri, *Leishmania* enfeksiyonunun vücutta yayılmasında da rol oynamaktadır. Ayrıca *Leishmania*'daki fosfolipaz genlerinin araştırılmasının, leishmaniasise karşı yeni ilaç ve aşıların geliştirilmesinde faydalı olabileceği öne sürülmüştür (Passero *et al.* 2008, Pawlowic and Zhang 2012, Bordon *et al.* 2018, Bott *et al.* 2020, Chavoshian *et al.* 2020).

Fosfatidilinositole özgü fosfolipaz C (PI-PLC) enzimi ise birçok hücresel işlevde önemli bir rol oynamaktadır. *Leishmania* türleri de dahil olmak üzere birçok patojen, bu enzimin substratı olan fosfatidilinositolü (PI) kullanarak konak hücrenin içine giriş sürecinde PI-PLC'yi aktive etmektedirler. *Leishmania*'nın virülansında rol oynayan faktörlerden biri olan PI-PLC, enfeksiyon sırasında konak hücrenin sinyal iletimini ve apoptozu bozarak bağışıklık sisteminden kaçışı kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle PI-PLC'nin *Leishmania*'nın patogenezindeki rolü, bu enfeksiyonlara karşı yeni tedaviler geliştirmek için önemli bir hedef oluşturmaktadır (Fang *et al.* 2006, Zhang and Beverley 2010, Negrão *et al.* 2023).

Sonuç olarak, fosfolipaz enzimlerini kodlayan genlerin rolünü belirlemeye yönelik yapılan araştırmalar *Leishmania* patogenezi hakkındaki mevcut bilgilerimizi arttıracaktır. Bununla birlikte, yapılan araştırmalar fosfolipazların virülansa katkıda bulunduğu olası mekanizmaların aydınlatılması açısından da faydalı olacaktır.

3. MATERYAL VE METOT

Biyoinformatik analiz yöntemleri kullanılarak *L. infantum* ve *L. major* genomlarında PF00388 (PI-PLC-X), PF00387 (PI-PLC-Y) ve PF00168 (C2) domaini içeren fosfatidilinositole özgü fosfolipaz C genlerinin varlığını tespit etmek için bir dizi *in silico* analiz gerçekleştirilmiştir.

3.1 *L. infantum* ve *L. major* genomlarında PI-PLC proteinlerinin belirlenmesi

L. infantum (*L. infantum* JPCM5 (assembly ASM287v2)) ve *L. major* (*L. major* strain Friedlin (assembly ASM272v2)) genomları ve protein dizileri GenBankası (NCBI; National Center for Biotechnology Information) veri tabanından (www.ncbi.nlm.nih.gov) indirilmiştir (Şekil 3.1).

The screenshot displays the NCBI NIH website interface. The search bar at the top contains the text "PI-PLC of Leishmania". Below the search bar, the results are categorized into "Gene sources" and "Search results". The "Search results" section shows 12 items, with the first four items listed in a table. The table has columns for Name/Gene ID, Description, Location, Aliases, and MI. The first item is LMJF_36_2790, described as a hypothetical protein [Leishmania major strain Friedlin], located on Chromosome 36, NC_007287.2 (1139047..1147140, complement). The second item is LINJ_36_2930, described as a conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5], located on Chromosome 36, NC_009420.2 (1133825..1141912, complement). The third item is LINJ_22_0750, described as a conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5], located on Chromosome 22, NC_009406.2 (330956..333610). The fourth item is LDBPK_220750, described as a hypothetical protein [Leishmania donovani], located on Chromosome 22, NC_018249.1 (340374..343028).

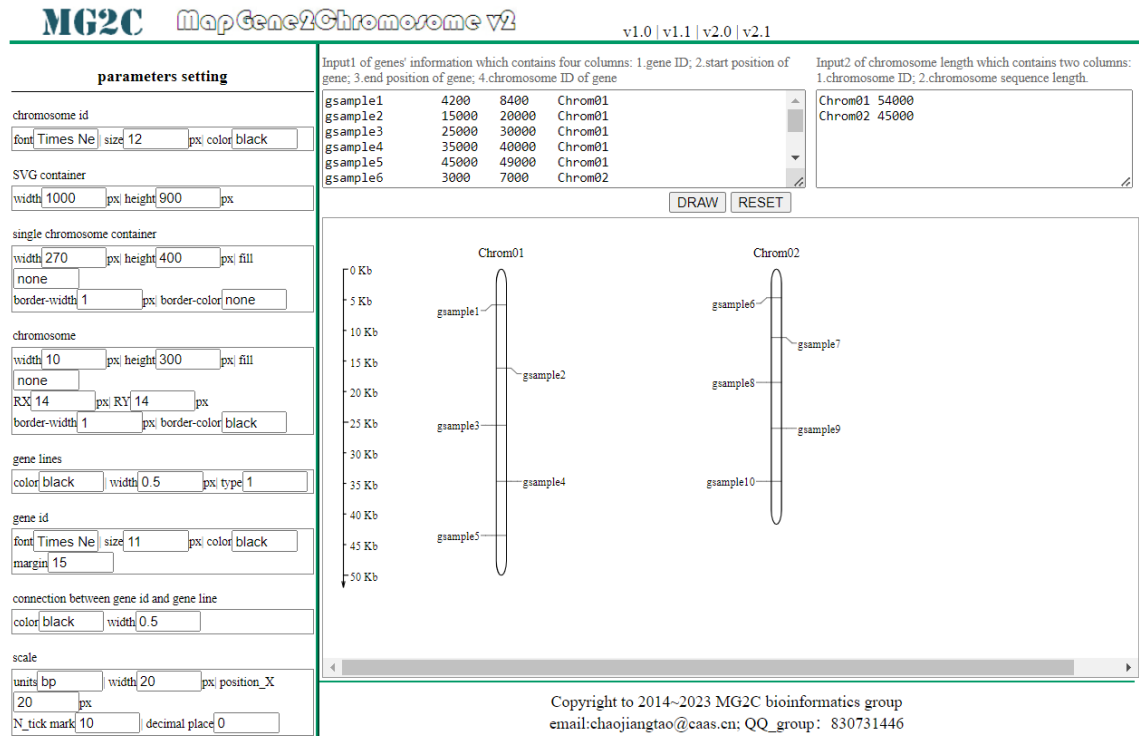
Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MI
LMJF_36_2790 ID: 5655568	hypothetical protein [Leishmania major strain Friedlin]	Chromosome 36, NC_007287.2 (1139047..1147140, complement)	LMJF_36_2790	
LINJ_36_2930 ID: 5073556	conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5]	Chromosome 36, NC_009420.2 (1133825..1141912, complement)	LINJ_36_2930	
LINJ_22_0750 ID: 5069027	conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5]	Chromosome 22, NC_009406.2 (330956..333610)	LINJ_22_0750	
LDBPK_220750 ID: 13389388	hypothetical protein [Leishmania donovani]	Chromosome 22, NC_018249.1 (340374..343028)	LDBPK_220750	

Şekil 3. 1 NCBI NIH veritabanı ara yüzü

L. infantum ve *L. major* genomlarındaki PI-PLC gen ailesi üyelerinin protein dizileri Pfam veritabanından (<http://pfam.xfam.org/>) PF00388, PF00387 ve PF00168 erişim numaraları ile elde edilmiştir. İlişkili dizilerdeki genler, Hidden Markov Model (HMM) (<http://www.ebi.ac.uk>) taramasıyla HMMER 3.0 veritabanı (<http://hmmer.janelia.org/>) kullanılarak araştırılmıştır. Tüm aday proteinleri teyit etmek için NCBI CDD (Conserved Domain Database) veritabanı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) kullanılmıştır. Elde edilen PI-PLC proteinlerinin amino asit uzunluğu, moleküler ağırlığı (mW, Da), izoelektrik noktası (pI) “ProtParam aracı” (<https://web.expasy.org/protparam/>) ile belirlenmiştir.

3.2 PI-PLC genlerinin yapısı ve kromozom lokasyonunun belirlenmesi

L. infantum ve *L. major*’un PI-PLC-X, PI-PLC-Y ve C2 domainleri içeren genlerinin kromozomlardaki konumunu gösteren haritayı oluşturmak için MapGene2Chrom (MG2C) (http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/) çevrimiçi aracı kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2 MapGene2Chrom çevrimiçi aracı ara yüzü

3.3 PI-PLC genlerinin korunmuş motiflerin belirlenmesi

PI-PLC proteinlerinin korunmuş motiflerini belirlemek için, Multiple Em for Motif Elicitation (MEME) (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) çevrimiçi aracı kullanılmıştır (Bailey *et al.* 2006). Motiflerin genişlik aralığı en az 2 ve en fazla 600, motiflerin maksimum sayısı ise 6 olarak ayarlanmıştır.

3.4 Filogenetik analizler ve dizi hizalama

PI-PLC protein dizileri ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) çevrimiçi aracı kullanılarak hizalanmıştır. Hizalanan veriler kullanılarak MEGA 6.0 (<https://www.megasoftware.net/>) programı yardımıyla neighbor-joining algoritmasına göre filogenetik ağaç şekillendirilmiştir.

3.5 İn siliko gen ifade analizi

Antimon bileşiklerine duyarlı ve dirençli *L. infantum* parazitlerinde ifade profillerini incelemek için Illumina RNAseq verileri NCBI veritabanındaki Sequence Read Archive (SRA) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) adlı veri arşivinden elde edilen transkriptom kütüphaneleri kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3. 1 *L. infantum*'a ait transkriptom kütüphaneleri

Antimon bileşiklerine duyarlı <i>Leishmania infantum</i> RNAseq verileri		
SRX2833329	SRR5575026	L-infantum-PP75_WTS_0.06_3
SRX2833328	SRR5575025	L-infantum-PP75_WTS_0.06_2
SRX2833325	SRR5575022	L-infantum-PP75_WTS_0.06_1
Antimon bileşiklerine dirençli <i>Leishmania infantum</i> RNAseq verileri		
SRX2833324	SRR5575021	L_infantum_PP75_SbR-0.06_2
SRX2833233	SRR5574933	L_infantum_PP75_SbR-0.06_1

Belirtilen kütüphaneler HISAT2 2.2.1 yazılımı kullanılarak *L. infantum* referans genomuna hizalandı (Kim *et al.* 2019). Hizalanan okumaların SAM dosyaları, SAMtools (sürüm 1.17) kullanarak BAM dosyalarına dönüştürüldü (Li *et al.* 2009). Kaç okumanın genomda genlere hizalandığı featureCounts Galaxy versiyon 1.6.4 kullanılarak belirlenmiştir (Liao *et al.* 2014). Kütüphaneler arasında farklı ifade olan genleri belirlemek için web tabanlı DEBrowser analiz platformu kullanıldı (Kucukural *et al.* 2019).

Transkriptom datamızdaki tüm transkriptlerin gen ifade değerlerini RPKM (reads per kilobase per million-kilobaz milyon başına okuma) okuma algoritmasına dayanarak normalize ettikten sonra RPKM değerleri log2'ye dönüştürüldü (Mortazavi *et al.* 2008). log2 kat değişimi ($\log_2FC \geq +1.5$ veya $\log_2FC \leq -1.5$ değerinde olan ve p değeri $\leq 0,05$ olan karşılaştırma sonuçları anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Leishmania türlerinde genom çapında PI-PLC gen ailelerini tanımladığımız çalışmamızda, hem *L. infantum* (Çizelge 4.1) hem de *L. major* (Çizelge 4.2) için PI-PLC-X, PI-PLC-Y ve C2 domainleri içeren 29 gen tanımlandı. Bununla birlikte her iki türde de PI-PLC-X (6), PI-PLC-Y (4) ve C2 (19) domainleri içeren genlerin sayıları aynı bulundu.

Çizelge 4. 1 *L. infantum* genomunda belirlenen PI-PLC genleri

No	Gene İsimleri	RefSeq_Protein ID	Protein Tanımı	Domain
1	LINJ_22_1530	XP_001465668.1	Fosfoinositid fosfolipaz C, EC 3.1.4.11	PI-PLC-X
2	LINJ_30_0680	XP_001466913.1	Karakterize edilmemiş protein	PI-PLC-X
3	LINJ_30_2970	XP_001467143.2	Fosfoinositid fosfolipaz C, EC 3.1.4.11	PI-PLC-X
4	LINJ_35_0040	XP_001468824.1	Fosfoinositid fosfolipaz C, EC 3.1.4.11	PI-PLC-X
5	LINJ_36_6220	XP_001469978.1	Putative gliserofosforil diester fosfodiesteraz, EC 3.1.4.46	PI-PLC-X
6	LINJ_28_2250	XP_001470251.1	Putative gliserofosforil diester fosfodiesteraz, EC 3.1.4.46	PI-PLC-X
7	LINJ_22_1530	XP_001465668.1	Fosfoinositid fosfolipaz C, EC 3.1.4.11	PI-PLC-Y
8	LINJ_30_0680	XP_001466913.1	Karakterize edilmemiş protein	PI-PLC-Y
9	LINJ_30_2970	XP_001467143.2	Fosfoinositid fosfolipaz C, EC 3.1.4.11	PI-PLC-Y
10	LINJ_35_0040	XP_001468824.1	Fosfoinositid fosfolipaz C, EC 3.1.4.11	PI-PLC-Y
11	LINJ_01_0750	XP_001462688.1	C2 domain içeren protein	C2
12	LINJ_06_0730	XP_001463153.1	Karakterize edilmemiş protein	C2
13	LINJ_13_0350	XP_001464066.1	Karakterize edilmemiş protein	C2
14	LINJ_13_0650	XP_001464095.2	Karakterize edilmemiş protein	C2
15	LINJ_14_1540	XP_001464332.1	Karakterize edilmemiş protein	C2
16	LINJ_22_1530	XP_001465668.1	Fosfoinositid fosfolipaz C, EC 3.1.4.11	C2
17	LINJ_29_2500	XP_001466772.1	Putative kinesin, EC 3.6.4.4	C2
18	LINJ_30_2970	XP_001467143.2	Fosfoinositid fosfolipaz C, EC 3.1.4.11	C2
19	LINJ_31_0710	XP_001467331.1	Karakterize edilmemiş protein	C2
20	LINJ_31_0810	XP_001467341.1	Putative c2 domain protein	C2
21	LINJ_31_0820	XP_001467342.1	Putative c2 domain protein	C2
22	LINJ_34_1540	XP_001468525.1	Karakterize edilmemiş protein	C2
23	LINJ_34_2370	XP_001468599.2	Karakterize edilmemiş protein	C2
24	LINJ_35_0040	XP_001468824.1	Fosfoinositid fosfolipaz C, EC 3.1.4.11	C2
25	LINJ_36_0890	XP_001469520.1	Karakterize edilmemiş protein	C2
26	LINJ_36_4540	XP_001470010.1	Karakterize edilmemiş protein	C2
27	LINJ_36_4530	XP_001470011.1	Karakterize edilmemiş protein	C2
28	LINJ_28_1300	XP_001470160.1	Copine i-like protein	C2
29	LINJ_28_2230	XP_001470249.1	Karakterize edilmemiş protein	C2

Çizelge 4. 2 *L. major* genomunda belirlenen PI-PLC genleri

No	Gene İsimleri	RefSeq_Protein ID	Protein Tanımı	Domain
1	LMJF_22_1680	XP_001683319.1	Fosfoinositid fosfolipaz C, EC 3.1.4.11	PI-PLC-X
2	LMJF_28_2100	XP_001684493.1	Putative gliserofosforil diester fosfodiesteraz, EC 3.1.4.46	PI-PLC-X
3	LMJF_30_0660	XP_001684656.1	PDZ domain-containing protein	PI-PLC-X
4	LMJF_30_2950	XP_001684901.2	Fosfoinositid fosfolipaz C, EC 3.1.4.11	PI-PLC-X
5	LMJF_36_5960	XP_001687184.1	Putative gliserofosforil diester fosfodiesteraz, EC 3.1.4.46	PI-PLC-X
6	LMJF_35_0040	XP_003722401.1	Fosfoinositid fosfolipaz C, EC 3.1.4.11	PI-PLC-X
7	LMJF_22_1680	XP_001683319.1	Fosfoinositid fosfolipaz C, EC 3.1.4.11	PI-PLC-Y
8	LMJF_30_0660	XP_001684656.1	PDZ domain içeren protein	PI-PLC-Y
9	LMJF_30_2950	XP_001684901.2	Fosfoinositid fosfolipaz C, EC 3.1.4.11	PI-PLC-Y
10	LMJF_35_0040	XP_003722401.1	Fosfoinositid fosfolipaz C, EC 3.1.4.11	PI-PLC-Y
11	LMJF_06_0700	XP_001680841.1	C2 domain içeren protein	C2
12	LMJF_13_0460	XP_001681790.1	C2 domain içeren protein	C2
13	LMJF_13_0760	XP_001681820.1	C2 domain içeren protein	C2
14	LMJF_28_1190	XP_001684401.1	Copine i-like protein	C2
15	LMJF_28_2090	XP_001684491.1	C2 domain içeren protein	C2
16	LMJF_30_2950	XP_001684901.2	Fosfoinositid fosfolipaz C, EC 3.1.4.11	C2
17	P883.13 LMJF_31_0680	XP_001685053.1	C2 domain protein	C2
18	P883.23 LMJF_31_0780	XP_001685063.1	C2 domain protein (Putative c2 domain protein)	C2
19	P883.22 LMJF_31_0790	XP_001685064.1	C2 domain protein (Putative c2 domain protein)	C2
20	LMJF_34_1440	XP_001686240.1	C2 domain içeren protein	C2
21	LMJF_34_2540	XP_001686357.1	C2 domain içeren protein	C2
22	LMJF_36_0830	XP_001686655.1	Cyclic nucleotide-binding domain içeren protein	C2
23	LMJF_36_0850	XP_001686657.1	Karakterize edilmemiş protein	C2
24	LMJF_36_4320	XP_001687016.1	Karakterize edilmemiş protein	C2
25	LMJF_36_4330	XP_001687017.1	C2 domain içeren protein	C2
26	LMJF_14_1440	XP_001687745.1	Karakterize edilmemiş protein	C2
27	LMJF_01_0730	XP_003721595.1	C2 domain içeren protein	C2
28	LMJF_29_2390	XP_003722322.1	Putative kinesin, EC 3.6.4.4	C2
29	LMJF_35_0040	XP_003722401.1	Fosfoinositid fosfolipaz C, EC 3.1.4.11	C2

Belirlenen genlerin protein dizileri, fiziksel ve kimyasal özellikleri açısından incelendi. *L. infantum* için saptanan proteinlerin amino asit sayıları 245 ile 2342 arasında değişmektedir. En kısa protein XP_001467341.1 iken en uzun proteinin XP_001462688.1 olduğu tespit edildi. Öte yandan *L. major* türünde en kısa proteinin (XP_001685053.1) 267 amino asit sayısına sahip olduğu, en uzun proteinin (XP_003721595.1) ise 2241 amino asit içerdiği saptandı.

L. infantum genomunda 3 protein (**XP_001462688.1**, **XP_001467143.2**, **XP_001468824.1**) tüm PI-PLC-X, PI-PLC-Y ve C2 domainlerini içerirken, bir proteinde (**XP_001466913.1**) PI-PLC-X ve PI-PLC-Y domainlerinin bir arada bulunduğu saptandı. İki proteinde (**XP_001469978.1**, **XP_001470251.1**) sadece PI-PLC-X domaini bulunurken, kalan 16 proteinde ise sadece C2 domaini tespit edildi. *L. infantum* genomunda belirlenen proteinlerin karakteristik özelliklerine bakıldığında izoelektrik odaklanma noktalarının 4,4 ile 9,46 arasında değiştiği saptandı (Çizelge 4.3).

Çizelge 4. 3 *L. infantum* genomunda belirlenen proteinlerin karakteristik özellikleri

No	Domain	RefSeq_Protein ID	UniProtKB ID	Protein uzunluğu (aa)	Moleküler ağırlığı (kDa)	İzoelektrik noktaları (pI)
1	PI-PLC-X	XP_001465668.1	A4I027	784	87832,42444	6,67
2	PI-PLC-X	XP_001466913.1	A4I594	730	80020,92754	7,85
3	PI-PLC-X	XP_001467143.2	A4I5X4	737	82370,13674	8,06
4	PI-PLC-X	XP_001468824.1	A4IAQ5	729	82023,15544	7,31
5	PI-PLC-X	XP_001469978.1	A4IE09	316	35993,06494	5,60
6	PI-PLC-X	XP_001470251.1	A4I3T9	349	39361,76454	9,16
7	PI-PLC-Y	XP_001465668.1	A4I027	784	87832,42444	6,67
8	PI-PLC-Y	XP_001466913.1	A4I594	730	80020,92754	7,85
9	PI-PLC-Y	XP_001467143.2	A4I5X4	737	82370,13674	8,06
10	PI-PLC-Y	XP_001468824.1	A4IAQ5	729	82023,15544	7,31
11	C2	XP_001462688.1	A4HRJ6	2342	251464,5384	8,49
12	C2	XP_001463153.1	A4HSW2	739	75202,57454	6,97
13	C2	XP_001464066.1	A4HVV5	497	55638,43804	7,87
14	C2	XP_001464095.2	A4HVK4	2062	217924,4769	9,46
15	C2	XP_001464332.1	A4HW91	1006	111607,3368	4,40
16	C2	XP_001465668.1	A4I027	784	87832,42444	6,67
17	C2	XP_001466772.1	A4I4V3	589	66120,36534	8,44
18	C2	XP_001467143.2	A4I5X4	737	82370,13674	8,06
19	C2	XP_001467331.1	A4I6G2	282	32054,65644	8,45
20	C2	XP_001467341.1	A4I6H2	245	26660,35144	5,79
21	C2	XP_001467342.1	A4I6H3	288	31097,53124	8,35
22	C2	XP_001468525.1	A4I9V6	995	106760,9218	6,65
23	C2	XP_001468599.2	A4IA30	870	100047,8255	6,88
24	C2	XP_001468824.1	A4IAQ5	729	82023,15544	7,31
25	C2	XP_001469520.1	A4ICQ1	1827	198290,0899	6,53
26	C2	XP_001470010.1	A4IE41	1625	177451,8082	9,12
27	C2	XP_001470011.1	A4IE42	2193	241394,3246	7,15
28	C2	XP_001470160.1	A4I3J8	508	55893,65704	6,03
29	C2	XP_001470249.1	A4I3T7	627	69034,32304	5,79

L. major genomunda ise 2 protein (XP_003722401.1, XP_001684901.2) her üç PI-PLC-X, PI-PLC-Y ve C2 domainlerini içerdiği belirlendi. İki adet proteinde (XP_001683319.1, XP_001684656.1) PI-PLC-X ve PI-PLC-Y domain birlikteliği saptanırken, başka iki adet proteinde (XP_001684493.1, XP_001687184.1) sadece PI-PLC-X domaini, kalan 17 proteinde ise sadece C2 domaini olduğu belirlendi. Bu proteinlerin izoelektrik odaklanmaları ise 4,4 ile 9,41 arasında değişmektedir. Tüm proteinlerin amino asit boyutları, molekül ağırlıkları ve izoelektrik noktaları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4. 4 *L. major* genomunda belirlenen proteinlerin karakteristik özellikleri

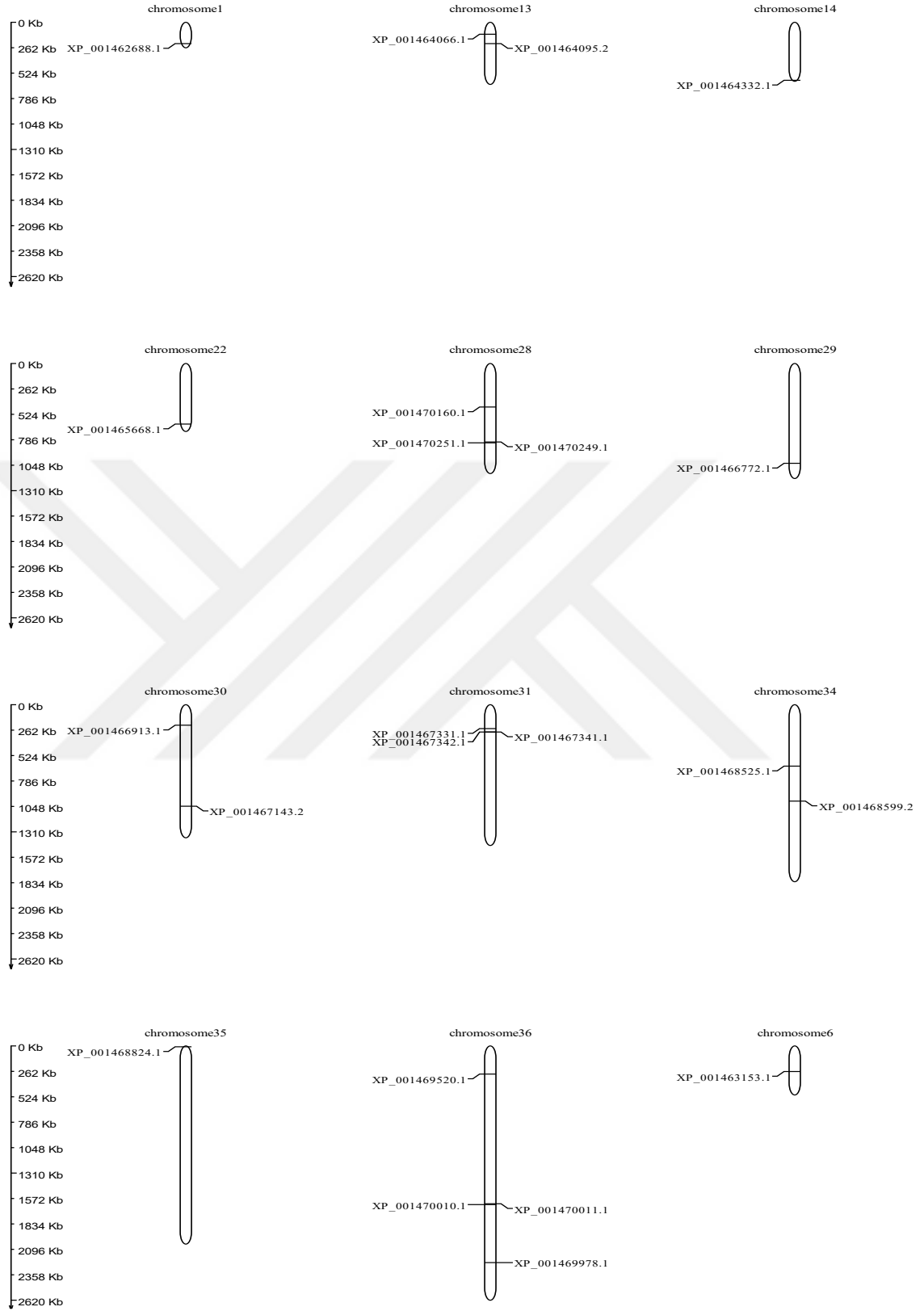
No	Domain	RefSeq_Protein ID	UniProtKB ID	Protein uzunluğu (aa)	Moleküler ağırlığı (kDa)	İzoelektrik noktaları (pI)
1	PI-PLC-X	XP_001683319.1	Q4QBH9	555	61904,41	5,95
2	PI-PLC-X	XP_001684493.1	Q4Q855	349	39225,58	8,98
3	PI-PLC-X	XP_001684656.1	Q4Q7P2	730	79914,80	7,52
4	PI-PLC-X	XP_001684901.2	Q4Q6Z7	737	82276,28	8,43
5	PI-PLC-X	XP_001687184.1	Q4Q0G4	316	35639,64	5,50
6	PI-PLC-X	XP_003722401.1	E9AEI1	729	82085,37	7,93
7	PI-PLC-Y	XP_001683319.1	Q4QBH9	555	61904,41	5,95
8	PI-PLC-Y	XP_001684656.1	Q4Q7P2	730	79914,80	7,52
9	PI-PLC-Y	XP_001684901.2	Q4Q6Z7	737	82276,28	8,43
10	PI-PLC-Y	XP_003722401.1	E9AEI1	729	82085,37	7,93
11	C2	XP_001680841.1	Q4QJ07	737	75123,6003	6,19
12	C2	XP_001681790.1	Q4QGA8	497	55616,409	8,28
13	C2	XP_001681820.1	Q4QG78	2063	218310,84	9,41
14	C2	XP_001684401.1	Q4Q8E7	508	55898,6118	5,79
15	C2	XP_001684491.1	Q4Q857	627	68996,3459	5,88
16	C2	XP_001684901.2	Q4Q6Z7	737	82276,2826	8,43
17	C2	XP_001685053.1	Q9BHF8	267	30426,9306	8,11
18	C2	XP_001685063.1	Q9BHE7	274	29920,4955	5,90
19	C2	XP_001685064.1	Q9BHE8	288	31370,8878	8,76
20	C2	XP_001686240.1	Q4Q358	995	106554,257	6,34
21	C2	XP_001686357.1	Q4Q2U1	870	100203,099	7,09
22	C2	XP_001686655.1	Q4Q1Z3	1827	197973,853	6,36
23	C2	XP_001686657.1	Q4Q1Z1	888	94912,4471	6,35
24	C2	XP_001687016.1	Q4Q0Y2	2193	241368,479	6,69
25	C2	XP_001687017.1	Q4Q0Y1	1625	177055,367	8,99
26	C2	XP_001687745.1	Q4QFI9	930	103970,895	4,40
27	C2	XP_003721595.1	E9AC64	2241	241670,751	8,47
28	C2	XP_003722322.1	E9AEA1	589	66097,3599	8,67
29	C2	XP_003722401.1	E9AEI1	729	82085,3706	7,93

Moleküler ağırlıkları analiz edildiğinde, *L. infantum*'daki proteinler arasında moleküler ağırlığı en düşük olanın 26660,35 kDa (**XP_001467341.1**), en yüksek olanın ise 251464,54 kDa (**XP_001462688.1**) olduğu tespit edildi. *L. major*'da ise protein ağırlıkları 29920,50 kDa (**XP_001685063.1**) ile 241670,75 kDa (**XP_003721595.1**) arasında değiştiği belirlendi.

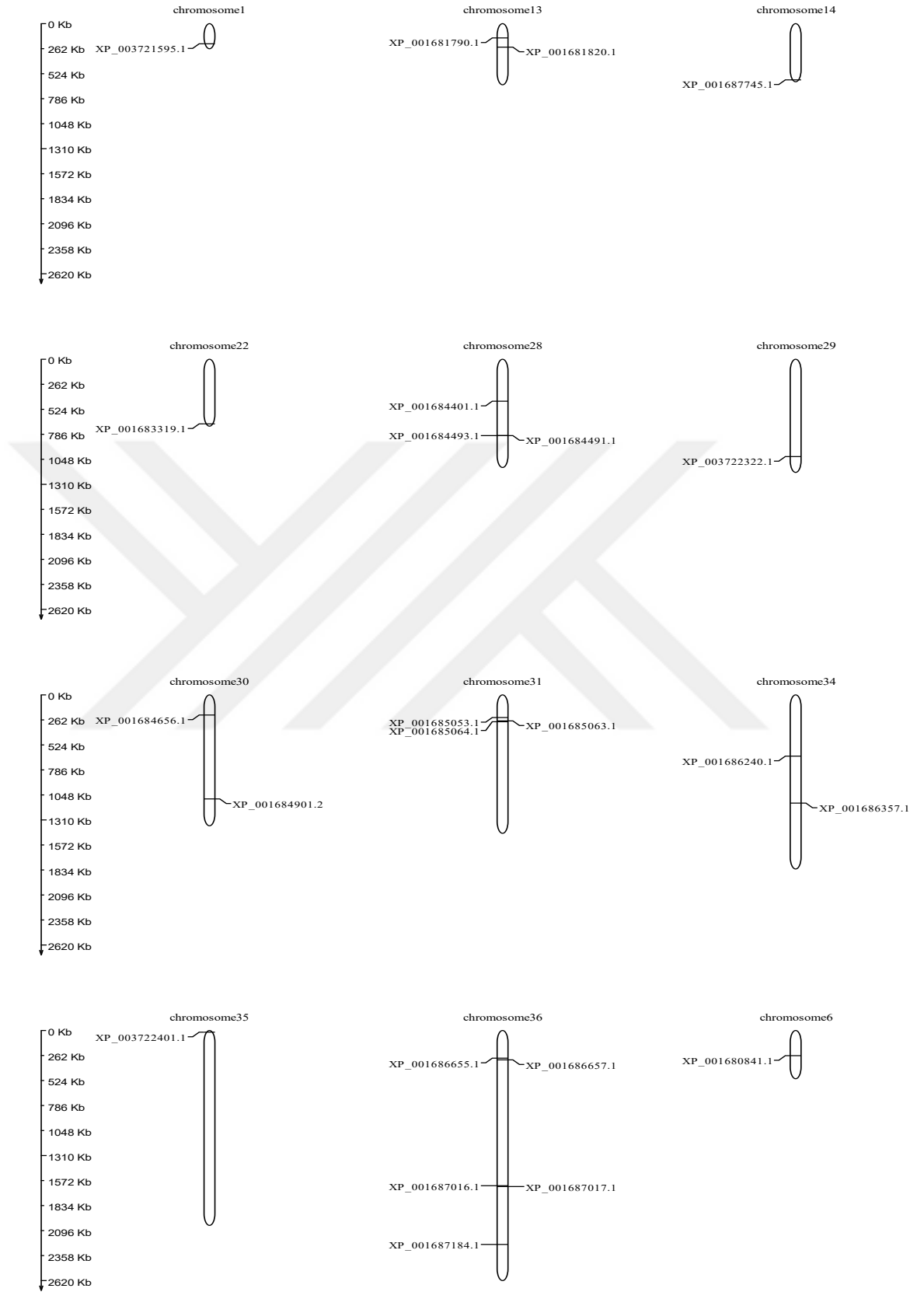
L. infantum ve *L. major* türlerinde PI-PLC genlerinin kromozomal lokalizasyonu, bu genlerin farklı kromozomlar üzerinde dağıldığını göstermiştir. En fazla gen ise her iki türde de 36. kromozom üzerinde yer almıştır. MapGene2Chrom (MG2C) programı kullanılarak PI-PLC genleri *L. infantum* ve *L. major*'ün 12 kromozomunda işaretlenerek Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

L. infantum ve *L. major* türlerinin PI-PLC genlerinde korunmuş motif bölgelerini tespit etmek için Multiple Em for Motif Elicitation (MEME) online programı kullanıldı. *L. infantum*'da belirlenen motiflerin varlığı veya yokluğuna göre C2 domainine sahip proteinler arasından 10 tanesi sadece tek bir motif (motif 2) içerirken, iki tanesi üç motif (motif 1, 2 ve 3) ve dört tanesi ise iki motif (motif 1, 3 veya 2, 4) içeriyordu. Ayrıca, PI-PLC-Y domaini içeren proteinlerinde ise belirlenen dört motifin hepsi bu proteinlerin %75'inde bulunurken sadece bir tanesi motif 4'ü içeriyordu. Benzer şekilde, PI-PLC-X domaini içeren proteinlerin motif analizi sonucunda belirlenen dört motifin hepsi bu proteinlerin %75'inde bulunurken sadece bir tanesinin iki motif (motif 4 ve 5) içerdiği saptanmıştır (Şekil 4.3).

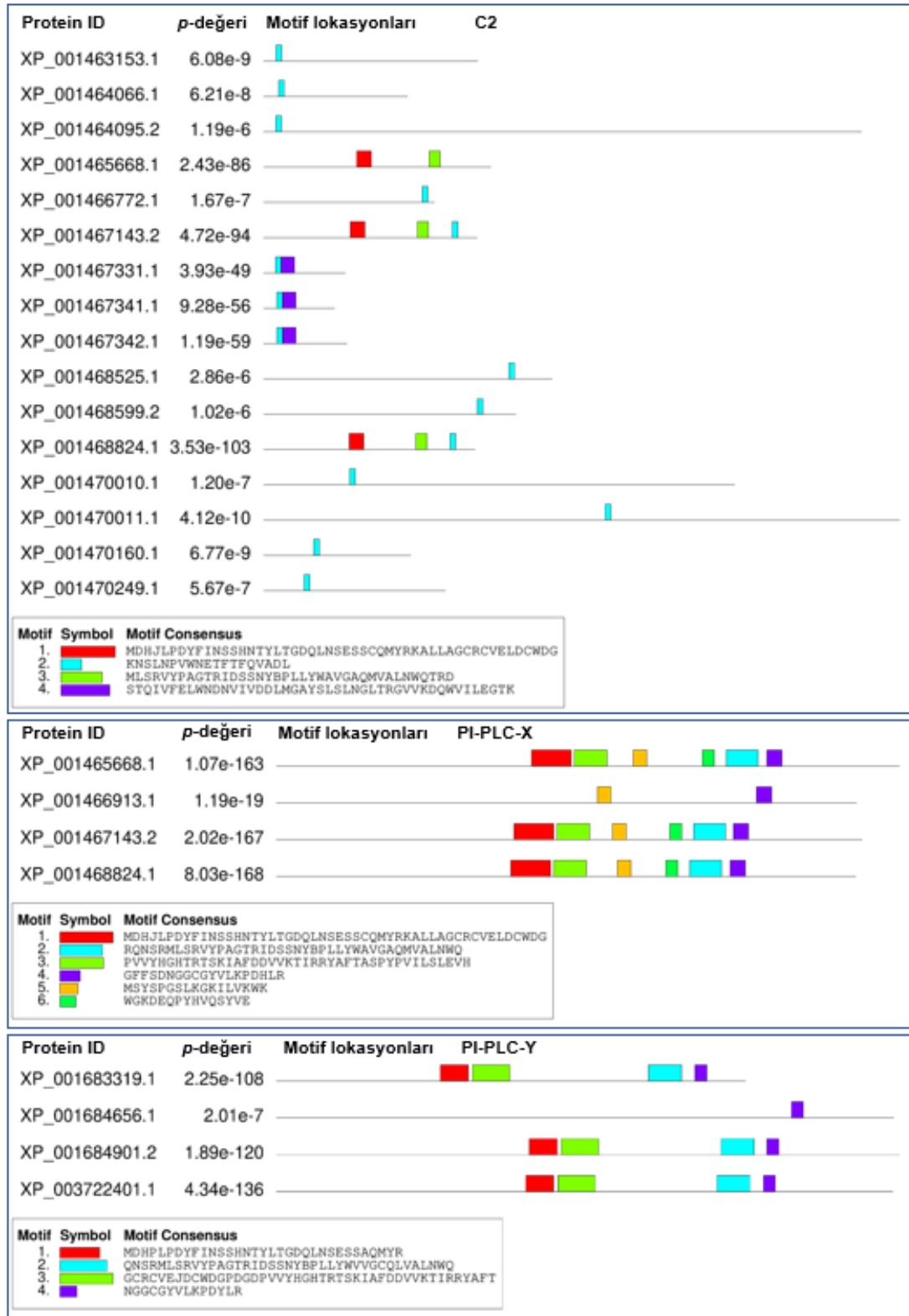
L. major için de PI-PLC proteinlerinin motif kompozisyonları belirlenmiştir. C2 domainine yer alan proteinler arasında sadece Motif 1'e sahip 12 adet protein tespit edilmişken, 2 proteinin Motif 1, 2 ve 3'e sahip olduğu ve 3 proteinin Motif 1 ile Motif 2'ye sahip olduğu belirlenmiştir. PI-PLC-Y ve PI-PLC-X domainlerini içeren proteinlerde ise belirlenen dört motifin tamamının bu proteinlerin %75'inde bulunduğu ve sadece bir tanesinin tek bir motif (Motif 4) içerdiği tespit edilmiştir.



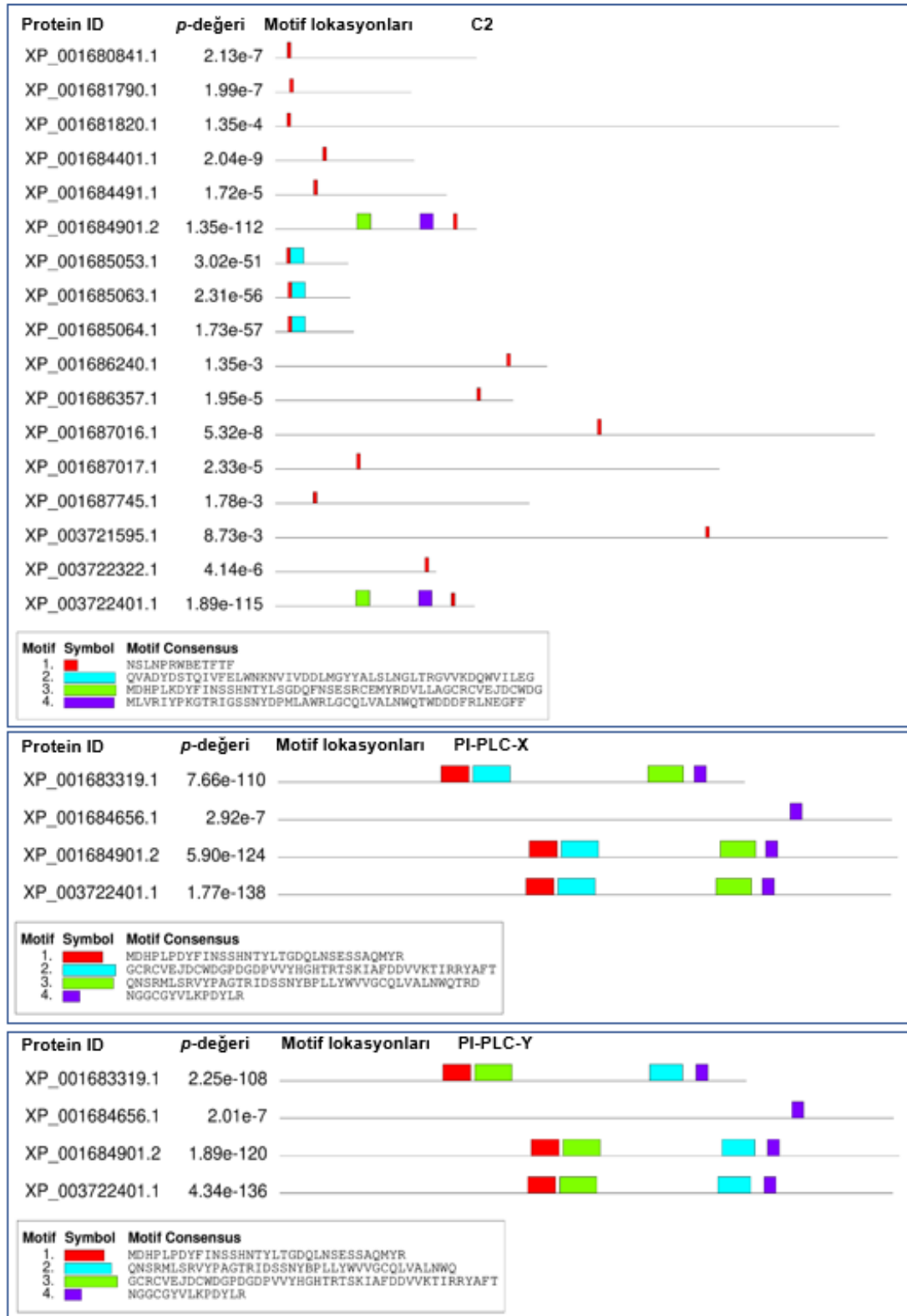
Şekil 4. 1 PI-PLC genlerinin *L. infantum* kromozomlarındaki lokasyonları



Şekil 4. 2 PI-PLC genlerinin *L. major* kromozomlarındaki lokasyonları



Şekil 4. 3 PI-PLC genlerinin *L. infantum* kromozomlarında tahmin edilen motif dağılımı



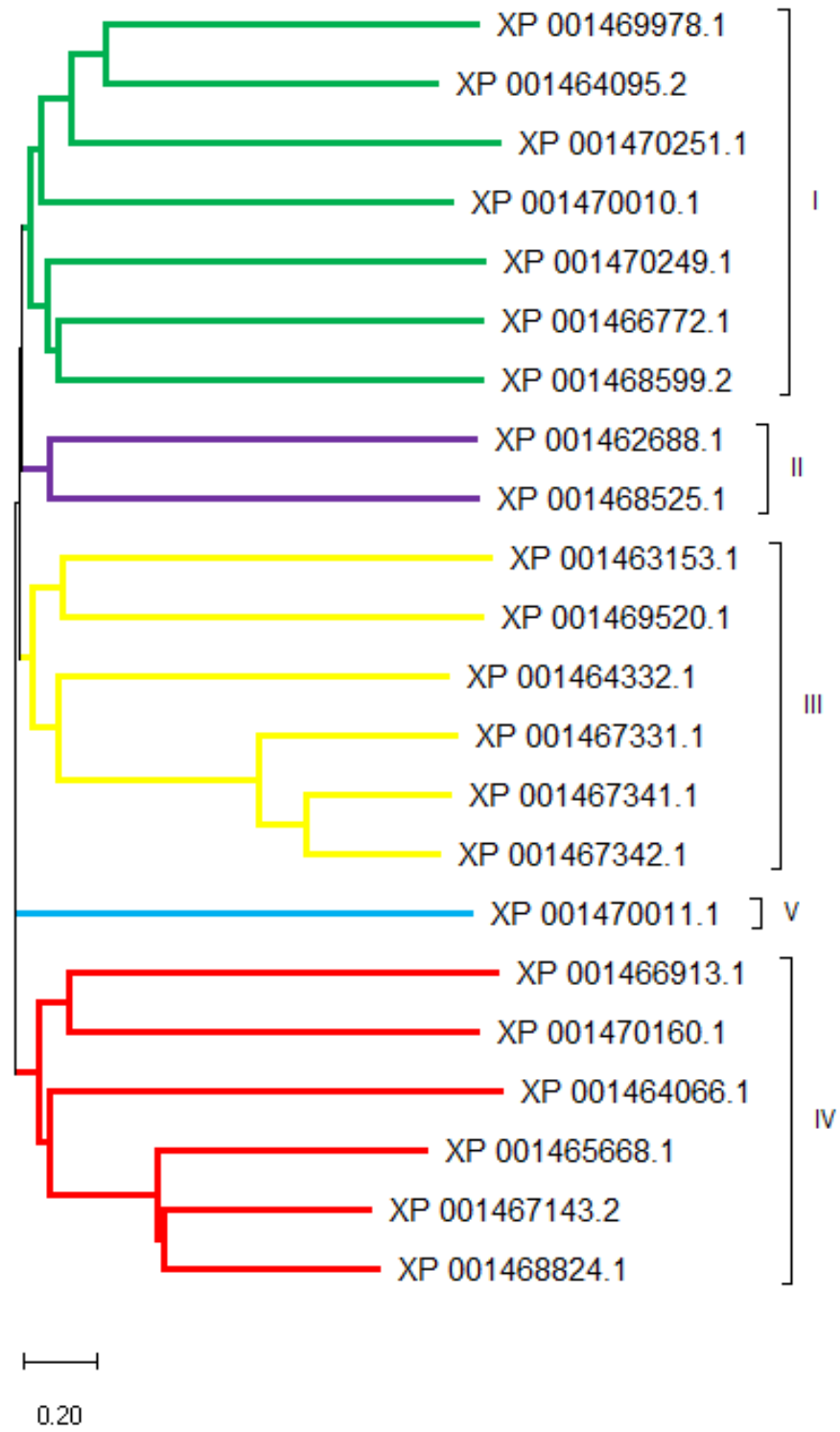
Şekil 4. 4 PI-PLC genlerinin *L. major* kromozomlarında tahmin edilen motif dağılımı

L. infantum ve *L. major* türlerinde bulunan PI-PLC gen ailelerinin evrimsel ilişkilerini analiz etmek için bu genlere ait filogenetik ağaçlar oluşturuldu. Filogenetik ağaç, 2000 bootstrap tekrarıyla Neighbor-joining yöntemi kullanılarak çizildi. Tanımlanan PI-PLC-X, PI-PLC-Y ve C2 domain içeren proteinlerin alt aileleri kırmızı, yeşil, mavi, mor ve sarı renklerle belirtildi.

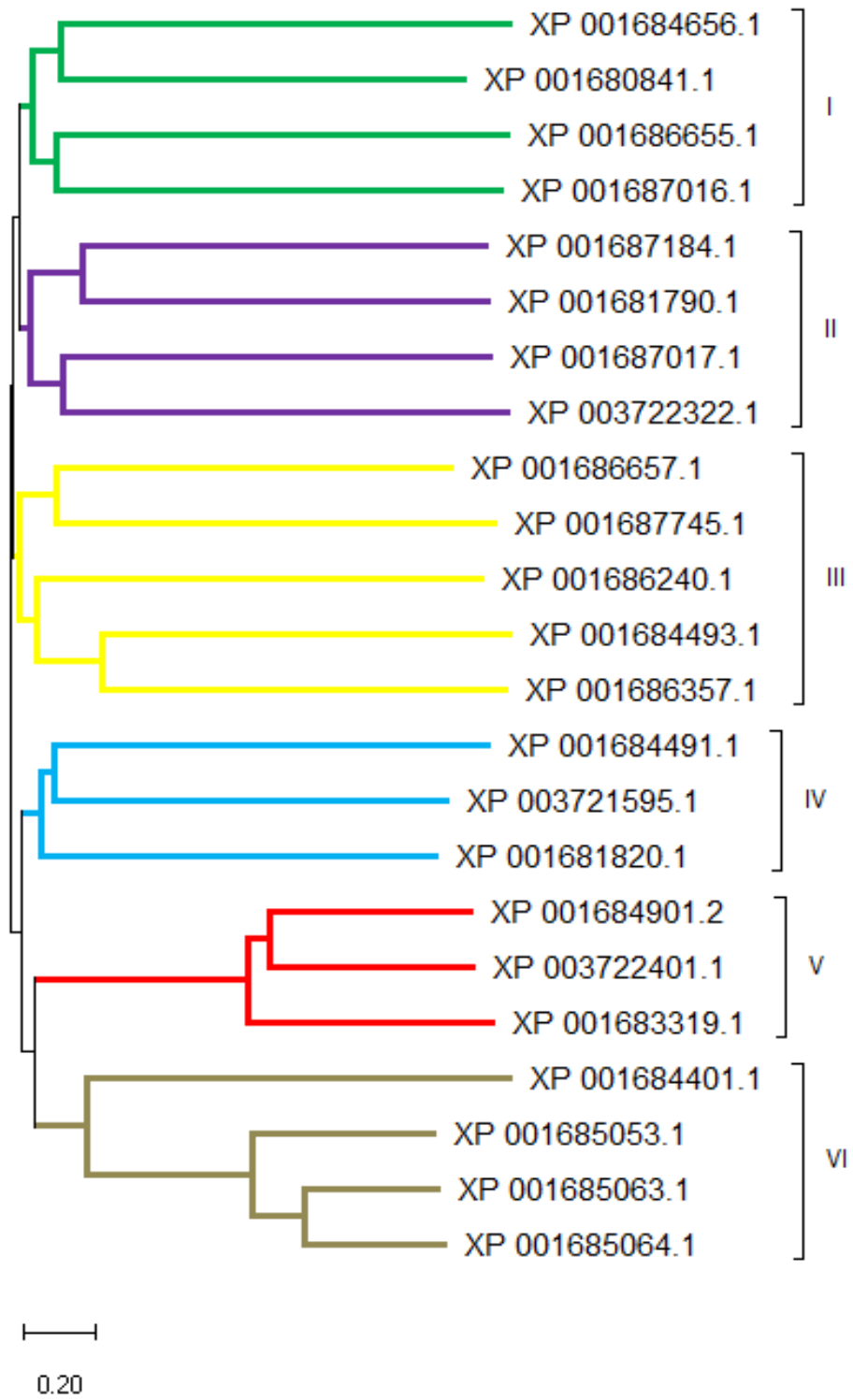
L. infantum'da bulunan PI-PLC gen ailelerinin evrimsel ilişkilerini incelemek için, bu genlere ait bir filogenetik ağaç oluşturuldu. Analiz sonucunda, PI-PLC gen ailelerinin beş alt gruba ayrıldığı tespit edildi. En geniş üyeye sahip olan Grup 1 yedi üyeden oluşurken, Grup 3 ve Grup 4 altı üyeye, Grup 2 iki üyeye, Grup 5 ise bir üyeye sahipti.

C2 domainleri, Grup 1'de yer alan yedi proteini içermektedir. Bu grupta **XP_001469978.1** ve **XP_001464095.2** proteinleri benzer yapıya sahiptir, aynı şekilde **XP_001470251.1** ve **XP_001470010.1** proteinleri de benzerdir. Bu nedenle, **XP_001470249.1**, **XP_001466772.1** ve **XP_001468599.2** proteinlerinin aynı ortak aileden geldiği ve benzer yapıya sahip olduğu düşünülmektedir. Grup 2 ise, birbirine çok benzeyen ve aynı atadan geldiği düşünülen iki proteini (**XP_001462688.1** ve **XP_001468525.1**) içermektedir. Grup 3'teki altı proteinin hepsi C2 domainine sahipken, **XP_001463153.1** ve **XP_001469520.1** proteinleri benzer yapıya sahiptir ve birbirlerine çok yakındırlar. **XP001467341.1** ve **XP001467342.1** proteinleri de yakın bir protein ailesi oluştururlar ve aynı kromozom üzerinde bulunurlar. Grup 4, birbirine yakın olan altı proteini içerir ve bu grupta dört protein (**XP_001465668.1**, **XP_001467143.2**, **XP_001468824.1** ve **XP_001466913.1**) PI-PLC-X ve PI-PLC-Y tüm domainlerini oluşturmaktadır. Grup 5'te sadece bir protein (**XP_001470011.1**) bulunmaktadır (Şekil 4.5).

Filogenetik ağaç incelendiğinde *L. major*'de bulunan PI-PLC gen aileleri altı alt gruba ayrılmıştır. En fazla üyeye sahip olan Grup 3, beş üyeyi içermektedir. Grup 1, Grup 2 ve Grup 6 dört üyeye sahipken, Grup 4 ve Grup 5 sadece üç üyeye sahiptir (Şekil 4.6). Elde edilen sonuçlar filogenetik olarak bu iki türün amino asit dizilimlerinin farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4. 5 *L. infantum*'dan tanımlanan PI-PLC genlerinin filogenetik ağacı



Şekil 4. 6 *L. major*'den tanımlanan PI-PLC genlerinin filogenetik ağacı

Grup 1, 4 protein tarafından oluşturulan C2 domainini içerir. **XP_001684656.1** ve **XP_001680841.1** proteinleri yapısal olarak birbirine çok benzemektedir. **XP_001686655.1** ve **XP_001687016.1** proteinleri ise neredeyse aynıdır ve aynı atadan geldiğini düşündürmektedir. Grup 2’de **XP_001687184.1** ve **XP_001681790.1** proteinleri benzer bir yapıya sahiptir. **XP_003722322.1** ve **XP_1687017.1** proteinleri ise birbirlerine oldukça yakındır. Grup 3, C2 domaini içeren 5 proteinden oluşur. **XP_001686657.1** ve **XP_001687745.1** proteinlerinin aynı atadan geldiği; **XP_001686240.1**, **XP_001684493.1** ve **XP_001686357.1** proteinlerinin ise birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. Grup 4, aynı atadan gelen 3 proteinden oluşur ve tümü C2 domainine sahiptir. **XP_001684491.1**, **XP_003721595.1** ve **XP_001681820.1** proteinleri yapısal olarak aynıdır. Grup 5, aynı atadan gelen 3 proteinden oluşur ve PI-PLC'nin tüm domainlerine sahiptir. **XP_001684901.2**, **XP_003722401.1** ve **XP_001683319.1** proteinleri yapısal olarak aynıdır. Grup 6 da 4 yakın ilişkili proteinden oluşur ve hepsi C2 domaini içerir. **XP_001685053.1**, **XP_001685063.1**, **XP_001684401.1** ve **XP_001685064.1** proteinleri yapısal olarak birbirine benzerdir.

L. infantum’da antimon bileşiklerine karşı duyarlı ve dirençli kökenler arasındaki gen ifade değişimleri, daha önce yapılmış RNA-dizileme kütüphaneleri kullanılarak belirlendi. Analizler sonucunda, dört gende anlamlı ifade değişimleri belirlendi (Çizelge 4.5). Anlamlı olarak tanımlanan tüm genler, dirençli kökende yüksek ifade edildi. Dört gen arasından üçü henüz tanımlanmamış ve anotasyonu yapılmamıştır. Sadece LINJ_36_6220 geninin anotasyonu yapılmıştır. Bu genin hidrolaz aktivitesi olduğu ve lipid metabolizmasında rol oynadığı Uniprot veritabanında belirlenmiştir (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A4IE09/entry>).

Çizelge 4. 5 *L. infantum* genomunda belirlenen proteinlerin karakteristik özellikleri

Gene ID	Protein Tanımı	İfade değişimi (log2)	p-değeri
LINJ_34_2370	Karakterize edilmemiş protein	1,7	2,19E-38
LINJ_36_6220	Putative gliserofosforil diester fosfodiesteraz, EC 3.1.4.46	2,0	1,67E-15
LINJ_36_0890	Karakterize edilmemiş protein	2,1	5,49E-48
LINJ_36_4530	Karakterize edilmemiş protein	2,4	2,33E-56

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Leishmania paraziti ile enfekte olan kum sineği tarafından insanlara bulaşan Leishmaniasis, dünyadaki en önemli yedi tropikal hastalıktan biridir. Bu hastalığın etiyolojisi ve patogeneğinde yer alan fosfolipazların rolünün tam olarak anlaşılması, yeni ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından potansiyel etkilere sahip olabilir.

Leishmaniasis, insanlarda çeşitli klinik formlara sahip olan bir hastalıktır. Hastalığa genel olarak 20'den fazla *Leishmania* türü sebep olur ve farklı türler belirli kum sinekleri tarafından taşınır. Hastalığın tanısında, moleküler ve serolojik yöntemler hızlı ve etkili olmakla birlikte tedaviyle ilgili çalışmalar hala yetersizdir.

L. infantum ve *L. major* birçok bilimsel araştırmada en çok çalışılan iki *Leishmania* türüdür. Yeni nesil dizileme tekniklerinin ve biyoinformatik araçların gelişimi, bitki ve hayvan gruplarıyla birlikte parazit gibi farklı yapıda genetik yapıya sahip canlıların genomlarındaki gen ailelerini tanımlamak ve işlevlerini araştırmak için yeni fırsatlar sunmuştur. Daha önce sınırlı sayıda parazitte PI-PLC gen ailesi üzerinde çalışmalar yapılmıştır ancak bu çalışmada *L. infantum* ve *L. major* genomlarında PI-PLC-X, PI-PLC-Y ve C2 domainleri içeren genler ilk kez tanımlanmış ve fizikokimyasal özellikleri ile filogenetik ilişkileri belirlenmiştir (Fang *et al.* 2006, Flammersfeld *et al.* 2018, Burda *et al.* 2021).

L. infantum ve *L. major*'da fosfolipaz gen ailesinin genom çapında analizini ve ekspresyonunu karakterize etmek amacıyla yapılan çalışmamızda, *Leishmania* genomu *in siliko* olarak analiz edilerek fosfolipaz genlerinin üyeleri belirlenmiştir. *L. infantum* ve *L. major* türleri için PI-PLC-X, PI-PLC-Y ve C2 domainlerini içeren toplam 29 gen belirlendi. Her iki türde de PI-PLC-X (6), PI-PLC-Y (4) ve C2 (19) domainlerini içeren gen sayıları aynıydı. Bu bulgular, bu iki tür arasında fosfolipaz enzimlerinin benzer bir yapıya ve fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bu genlerin korunmuş olması *Leishmania*'nın evrimsel süreçlerinde ve parazitolojik özelliklerinde önemli bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada, *L. infantum* ve *L. major* genomlarında biyoinformatik araçlar kullanılarak PI-PLC-X, PI-PLC-Y ve C2 domainlerini içeren farklı gen aileleri tanımlanmıştır. *L. infantum* ve *L. major* genomunda proteinlerin temel özellikleri, protein uzunluğu, moleküler ağırlık ve izoelektrik noktaları gibi faktörler açısından belirgin farklılıklar sergilemektedir. Filogenetik analiz incelendiğinde, *L. infantum*'da bulunan PI-PLC gen ailesinin beş alt gruba, *L. major*'da bulunan PI-PLC gen ailesinin ise altı alt gruba ayrıldığını tespit ettik. Bu sonuçlar, *L. infantum* ve *L. major* arasındaki fosfolipaz gen ailesinin evrimsel olarak farklılaştığını göstermektedir.

Sayılarının aynı olmasına karşın nükleotid ve amino asit dizilimlerinin farklılık göstermesi, *L. infantum* ve *L. major* türleri arasında evrimsel süreçte ayrıldıklarını düşündüren bir durumdur. Saptanan proteinlerin iki tür arasındaki benzerlikleri ve farklılıkları filogenetik bir ağaç kullanılarak incelenmiştir. Genlerin evrimi sırasında korunan dizilere ulaşabilmek için *L. infantum* ve *L. major*'daki genlerin motifleri de incelenmiştir. *L. infantum* proteinleri için oluşturulan filogenetik ağaç, yakın ilişkili proteinlerin aynı aile içinde geniş bir dağılım gösterdiğini ve yüksek homolojiye sahip olduklarını göstermektedir.

L. infantum ve *L. major* türlerinde kromozomlar üzerindeki gen dağılımı incelendiğinde, her iki türde de dağılımın aynı olduğu gözlemlenmektedir. Bu durum, evrimsel süreçte bu genlerin yerlerinin korunduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, genlerin motif analizleri her iki türde de motif dizilimlerinin farklı olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum, bir bakıma genlerdeki dizilimlerin evrimsel süreçte değiştiğini göstermesi açısından önemlidir.

Memeli hücrelerinde, on bir farklı PI-PLC tanımlanmış ve bu enzimler PI-PLC β , γ , δ ve ϵ olmak üzere dört alt ailede gruplandırılmıştır. Hayvan PI-PLC proteinlerinde N-terminalinde bir Pleckstrin Homology (PH) domaini, bir EF-Hand domaini, bir X domaini, X domaini ile birlikte enzimin katalitik domainini oluşturan bir Y domaini ve C-terminalinde bir C2 domaini olmak üzere korunmuş beş domain vardır (Wang 2001). Bu domainler, istisnasız olarak tüm organizmalarda ortaktır (Rupwate and Rajasekharan 2012). Sadece hayvan PI-PLC'lerinde bulunan diğer korunmuş domain, membranlardaki

PtdIns (4,5) P2'yi tanımak ve bağlamaktan sorumlu olan Pleckstrin homoloji (PH) domainidir (Kavran *et al.* 1998). Ancak, parazitik protozoonlarda PI-PLC'lerin işlevleri hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır.

Fosfolipazlar, enflamasyonu teşvik eden veya immün hücre fonksiyonunu inhibe eden lipid araçları üreterek konakçı immün yanıtlarını modüle edebilir. Örneğin, *Toxoplasma gondii*'deki fosfolipaz C geninin silinmesi, farelerde azalmış parazit replikasyonu ve virülansı ile sonuçlanmıştır (Wilson *et al.* 2020). Benzer şekilde *Plasmodium falciparum*'da fosfolipaz A2 aktivitesinin inhibisyonu, parazit büyümesini azaltmış ve antimalariyal ilaçlara duyarlılığı arttırmıştır (Zidovetzki *et al.* 1993). Bu bulgular, fosfolipaz genlerine karşı hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi için bir strateji olarak önemli bir potansiyeli vurgulamaktadır. Fosfolipaz genlerinin parazitlerin patogeneğinde kritik bir rol oynaması, bu genlerin hedef alınarak yeni tedavi yöntemleri geliştirme fırsatlarını ortaya çıkarmaktadır. Bu şekilde fosfolipaz genlerine odaklanan terapötik yaklaşımlar, parazitlerin kontrolünü sağlamada ve parazit kaynaklı hastalıkların tedavisinde umut verici bir strateji olabilir.

Fosfolipaz genlerinin, parazitlerin virülansı ve patogeneğinde önemli bir rol oynadığını gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar, fosfolipaz genlerinin parazitlerin konak hücreleri istila etmesi ve hücre içinde çoğalması için konakçı hücre zarlarının bütünlüğünü bozarak etkili olduğunu ve parazit-konakçı ilişkilerinde önemli bir rol oynadığını öne sürmektedir (Connelly and Kierszenbaum 1985, Thardin *et al.* 1993). Yapılan bir çalışmada, *Trypanosoma cruzi*'nin amastigot formuna dönüşümünde PI-PLC enziminin kritik bir rol oynayabileceği gösterilmiştir (Salto *et al.* 2002). Başka bir çalışmada ise PI-PLC'nin hem *Toxoplasma gondii*'nin konak hücreye invazyonunda hem de konak hücrelerden çıkışında rol oynadığı öne sürülmüştür. PI-PLC'nin bu süreçlerdeki rolü, parazitin konak hücreye girişindeki etkinliği ve enfeksiyonun yayılması açısından önemlidir (Carruthers *et al.* 1999, Moudy *et al.* 2001, Lovett *et al.* 2002). Bu çalışmaların tamamı çeşitli parazitlerde PI-PLC genleri üzerine odaklanmış olsa da bizim çalışmamız *L. infantum* ve *L. major* genomlarında PI-PLC genlerinin farklı domainlerini incelemektedir. Bu sayede, bu parazitlerin patogeneğinde ve

enfeksiyon süreçlerinde PI-PLC genlerinin rolü hakkında daha fazla bilgi edinmek mümkün olabilecektir.

L. infantum türünde antimon bileşiklerine duyarlı ve dirençli kökenler arasında gen ifade değişimlerini karşılaştırdığımızda, anlamlı olarak belirlenen genlerin tümünün dirençli kökenden daha yüksek ifade değerlerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu genlerin işlevlerinin açıklanması zor olmakla birlikte, sadece bir genin anotasyonunun belirlenmiş olması bu genlerin ilaca dirençlilikle ilişkili olabileceğini göstermektedir. Bu bağlamda, *L. infantum*'daki genlerin antimon direnci altında ekspresyonlarının değiştiği ve çevresel olarak olumsuz koşullara tepki vermede potansiyel rolleri olduğunu göstermektedir. İlaçlar, transkripsiyonel düzenlemeden sinyal transdüksiyonuna, özelleşmiş proteinlerin ekspresyonu ve aktivasyonuna kadar çeşitli tepkilere neden olabilir. Dolayısıyla, bu alanda yapılabilecek fonksiyonel çalışmalar ve genlerin karakterizasyonu hastalığın tedavisine yönelik ipuçları sunabilecek potansiyele sahip olabilir.

Araştırmacılar, *Leishmania*'daki fosfolipaz genlerinin ekspresyon seviyelerini analiz ederek bu enzimlerin parazitin biyolojisinde oynadığı rol hakkında bilgi edinebilirler. Fosfolipazların küçük molekül inhibitörleri veya diğer terapötik ajanlarla hedeflenmesi, potansiyel olarak parazitin işlevini bozabilir ve onu öldürmeye yardımcı olabilir. Ancak, fosfolipazların *Leishmania*'daki rolünü tam olarak anlamak ve bu yaklaşımın bir tedavi seçeneği olarak uygulanabilirliğini belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışma, *Leishmania* parazitlerinde fosfolipazların önemli bir role sahip olduğunu ve bu enzimlerin hedeflenmesinin potansiyel bir terapötik strateji olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, ileride yapılacak kapsamlı çalışmalar, bu enzimlerin etkisini daha ayrıntılı bir şekilde anlamamıza ve leishmaniasis tedavisinde yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

Leishmaniasis, özellikle tropikal bölgelerde önemli bir sağlık sorunu olup, mevcut tedavi yöntemlerinin çeşitli sınırlamaları bulunmaktadır. Bu nedenle, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi büyük bir ihtiyaçtır. Fosfolipazlar, hücre zar yapısının düzenlenmesi ve sinyal iletimi gibi önemli biyolojik süreçlerde rol oynarlar.

Çalışmamız, *Leishmania* parazitlerindeki fosfolipazların karakterizasyonunu ve gen ekspresyon düzeylerinin analizini sağlayarak, bu enzimlerin parazitin biyolojik süreçlerindeki fonksiyonları hakkında önemli bilgiler sunmaktadır.

Sonuç olarak, yaptığımız bu çalışma ile *L. infantum* ve *L. major*'daki fosfolipaz gen ailesini detaylı bir şekilde inceleyerek bu genlerin genom çapındaki analizini ve ekspresyonunu karakterize etme imkânı elde ettik.

Çalışma sonuçlarının, parazitin biyolojisi üzerinde fosfolipazların oynadığı rolü daha iyi anlamamızı sağlaması açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz. Elde edilen veriler ışığında bu enzimlerin hedeflenerek parazitin işlevinin bozulabileceği ve öldürülebileceği yeni terapötik yaklaşımların ilerlemesine değerli katkılar sunabilir. Bununla birlikte, fosfolipaz enzimlerine dayalı yeni tedavilerin geliştirilmesine yönelik gelecekteki araştırmalar için önemli bir temel sağlama potansiyeline sahip olduğu ve ileriye dönük yeni tedavi hedeflerine ışık tutabileceği kanaatindeyiz. Ayrıca bu çalışma, parazitoloji alanında yeni bir araştırma alanı açarak, gelecekteki çalışmalar için önemli bir temel oluşturabilir.

KAYNAKLAR

- Aloulou, A., Rahier, R., Arhab, Y., Noiriél, A. and Abousalham, A. 2018. Phospholipases: An Overview. *Methods in Molecular Biology*, 1835: 69-105.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M. and WHO Leishmaniasis Control Team. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One*, 7(5): e35671.
- Ansell, G. B. and Hawthorne, J. N. 1964. Catabolism, In: *Phospholipids*. Ansell, G. B. and Hawthorne, J. N. (eds), Elsevier Publishing Company, pp. 152–174, Amsterdam.
- Arana, B. A., Mendoza, C. E., Rizzo, N. R. and Kroeger, A. 2001. Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(5): 466–470.
- Bailey, T. L., Williams, N., Misleh, C. and Li, W. W. 2006. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Research*, 34: 369–373.
- Banuls, A. L., Hide, M. and Prugnolle, F. 2007. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, 64: 1-109.
- Barratt, G. and Legrand, P. 2005. Comparison of the efficacy and pharmacology of formulations of amphotericin B used in treatment of leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 18(6): 527–530.
- Bates, P. A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal of Parasitology*, 37(10): 1097-1106.
- Bern, C., Maguire, J. H. and Alvar, J. 2008. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(10): e313.
- Bilgic-Temel, A., Murrell, D. F. and Uzun, S. 2019. Cutaneous leishmaniasis: A neglected disfiguring disease for women. *International Journal of Women's Dermatology*, 5(3): 158–165.

- Blum, J., Desjeux, P., Schwartz, E., Beck, B. and Hatz, C. 2004. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2): 158–166.
- Blum, J. J., Lehman, J. A., Horn, J. M. and Gomez-Cambronero, J. 2001. Phospholipase D (PLD) is present in *Leishmania donovani* and its activity increases in response to acute osmotic stress. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(1): 102–110.
- Bordon, M. L. A. C., Laurenti, M. D., Ribeiro, S. P., Toyama, M. H., Toyama, D. O. and Passero, L. F. D. 2018. Effect of phospholipase A2 inhibitors during infection caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 24 (1): 1–8.
- Bott, E., López, M. G., Lammel, E. M., Carfagna, I. E., Durante de Isola, E. L., Ruybal, P., Taboga, O., Gimenez, G. and Belaunzarán, M. L. 2020. Cellular localization, cloning and expression of *Leishmania braziliensis* Phospholipase A₁. *Microbial Pathogenesis*, 141: 104010.
- Burda, P. C., Ramaprasad, A., Pietsch, E., Bielfeld, S., Söhnchen, C., Wilcke, L., Strauss, J., Schwudke, D., Sait, A., Collinson, L. M., Blackman, M. J., and Gilberger, T. W. 2021. Global analysis of putative phospholipases in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* reveals critical factors for parasite proliferation. *bioRxiv*, 450158:3–65.
- Burza, S., Croft, S. L. and Boelaert, M. 2018. Leishmaniasis. *Lancet*, 392(10151): 951–970.
- Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Nolan, M. J. and Otranto, D. 2015. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends in Parasitology*, 31(3): 100–108.
- Carruthers, V. B., Moreno, S. N. and Sibley, L. D. 1999. Ethanol and acetaldehyde elevate intracellular [Ca²⁺] and stimulate microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *The Biochemical Journal*, 342: 379–386.
- Chang, K. P. and Fong, D. 1983. Cell biology of host-parasite membrane interactions in leishmaniasis. *Ciba Foundation Symposium*, 99: 113–137.
- Chavoshian, O., Arabsalmani, M., Jaafari, M. R., Khamesipour, A., Abbasi, A., Saberi, Z. and Badiie, A. 2020. A Phospholipase-A Activity in Soluble *Leishmania*

- Antigens Causes Instability of Liposomes. *Current Drug Delivery*, 17(9): 806–814.
- Chowdhury, M. A., Rafiqueuddin, A. K. and Hussain, A. 1992. Aldehyde test (Formol-Gel test) in the diagnosis of kala-azar (visceral leishmaniasis). *Tropical Doctor*, 22(4): 185–186.
- Connelly, M. C. and Kierszenbaum, F. 1985. Increased host cell-Trypanosoma cruzi interaction following phospholipase D treatment of the parasite surface. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 17(2): 191–202.
- Croft, S. L. and Olliaro, P. 2011. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(10): 1478-1483.
- Daneshbod, Y., Oryan, A., Davarmanesh, M., Shirian, S., Negahban, S., Aledavood, A., Davarpanah, M. A., Soleimanpoor, H. and Daneshbod, K. 2011. Clinical, histopathologic, and cytologic diagnosis of mucosal leishmaniasis and literature review. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135(4): 478–482.
- Dantas-Torres, F., Miró, G., Baneth, G., Bourdeau, P., Breitschwerdt, E., Capelli, G., Cardoso, L., Day, M. J., Dobler, G., Ferrer, L., Irwin, P., Jongejan, F., Kempf, V. A. J., Kohn, B., Lappin, M., Little, S., Madder, M., Maggi, R., Maia, C., Marcondes, M., Naucke, T., Oliva, G., Pennisi, M. G., Penzhorn, B. L., Peregrine, A., Pfeffer, M., Roura, X., Sainz, A., Shin, S., Solano-Gallego, L., Straubinger, R. K., Tasker, S., Traub, R., Wright, I., Bowman, D. D., Gradoni, L. and Otranto, D. 2019. Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health. *Emerging Infectious Diseases*, 25(12): 1–4.
- David, C. V. and Craft, N. 2009. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*, 22(6): 491–502.
- Demir, S. 2019. Survival Strategies of Leishmania in Hosts. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 43(2): 83-88.
- Diro, E., Lynen, L., Ritmeijer, K., Boelaert, M., Hailu, A. and van Griensven, J. 2014. Visceral Leishmaniasis and HIV coinfection in East Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(6): e2869.
- Elmahallawy, E. K., Sampedro Martinez, A., Rodriguez-Granger, J., Hoyos-Mallecot, Y., Agil, A., Navarro Mari, J. M. and Gutierrez Fernandez, J. 2014. Diagnosis of leishmaniasis. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(8): 961–972.

- Ertabaklar, H., Özlem Çalışkan, S., Boduç, E. and Ertuğ, S. 2015. Kutanöz leşmanyazis tanısında direkt mikroskopi, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin karşılaştırılması [Comparison of direct microscopy, culture and polymerase chain reaction methods for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis]. Mikrobiyoloji Bulteni, 49(1): 77–84.
- Fang, J., Marchesini, N. and Moreno, S. N. 2006. A *Toxoplasma gondii* phosphoinositide phospholipase C (TgPI-PLC) with high affinity for phosphatidylinositol. The Biochemical Journal, 394: 417–425.
- Flammersfeld, A., Lang, C., Flieger, A. and Pradel, G. 2018. Phospholipases during membrane dynamics in malaria parasites. International Journal of Medical Microbiology, 308(1): 129-141.
- Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Menotta, M. and Magnani, M. 2018. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. Parasites & Vectors, 11(1): 273.
- Gálvez, R., Montoya, A., Fontal, F., Martínez De Murguía, L. and Miró, G. 2018. Controlling phlebotomine sand flies to prevent canine *Leishmania infantum* infection: A case of knowing your enemy. Research in Veterinary Science, 121: 94–103.
- Garnham, P. C. C. 1971. The genus *Leishmania*. Bulletin of the World Health Organization, 44 (4): 477-489.
- Gelanew, T., Hurissa, Z., Diro, E., Kassahun, A., Kuhls, K., Schönián, G. and Hailu, A. 2011. Disseminated cutaneous leishmaniasis resembling post-kala-azar dermal leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* in three patients co-infected with visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome in Ethiopia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 84(6): 906–912.
- Ghannoum, M. A. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clinical Microbiology Reviews, 13(1): 122–143.
- Gharpuré, P. V. 1930. Chopra's Antimony Test in a Non-Endemic Kala-Azar Area. The Indian Medical Gazette, 65(7): 389–390.

- Goto, H. and Lindoso, J. A. 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(4): 419–433.
- Handler, M. Z., Patel, P. A., Kapila, R., Al-Qubati, Y. and Schwartz, R. A. 2015. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(6): 897–910.
- Harman, M. 2015. Kutanöz Leishmaniasis. *Turkish Journal of Dermatology*, 9: 168-176.
- Hellier, I., Dereure, O., Tournillac, I., Pratlong, F., Guillot, B., Dedet, J. P. and Guilhou, J. J. 2000. Treatment of Old World cutaneous leishmaniasis by pentamidine isethionate. An open study of 11 patients. *Dermatology*, 200(2): 120–123.
- Herwaldt, B. L. 1999. Leishmaniasis. *Lancet*, 354(9185): 1191-1199.
- Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M. A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S. M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C. V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R. M., Cronin, A., Cruz, A. K., Davies, R. M., De Gaudenzi, J., Dobson, D. E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A. C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy D., Matthews K., Michaeli S., Mottram J. C., Müller-Auer S., Munden H., Nelson S., Norbertczak H., Oliver K., O'neil S., Pentony M., Pohl T. M., Price C., Purnelle B., Quail M. A., Rabbinowitsch E., Reinhardt R., Rieger M., Rinta J., Robben J., Robertson L., Ruiz J. C., Rutter S., Saunders D., Schäfer M., Schein J., Schwartz D. C., Seeger K., Seyler A., Sharp S., Shin H., Sivam D., Squares R., Squares S., Tosato V., Vogt C., Volckaert G., Wambutt R., Warren T., Wedler H., Woodward J., Zhou S., Zimmermann W., Smith D. F., Blackwell J. M., Stuart K. D., Barrell B. and Myler, P. J. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, 309(5733): 436–442.
- Kavran, J. M., Klein, D. E., Lee, A., Falasca, M., Isakoff, S. J., Skolnik, E. Y. and Lemmon, M. A. 1998. Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by

- pleckstrin homology domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(46): 30497–30508.
- Kazemi, B. 2011. Genomic organization of leishmania species. *Iranian Journal of Parasitology*, 6(3): 1–18.
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C. and Salzberg, S. L. 2019. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37(8): 907–915.
- Krolewiecki, A. J., Almazan, M. C., Quipildor, M., Juarez, M., Gil, J. F., Espinosa, M., Canabire, M. and Cajal, S. P. 2017. Reappraisal of Leishmanin Skin Test (LST) in the management of American Cutaneous Leishmaniasis: A retrospective analysis from a reference center in Argentina. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(10): e0005980.
- Kucukural, A., Yukselen, O., Ozata, D. M., Moore, M. J. and Garber, M. 2019. DEBrowser: interactive differential expression analysis and visualization tool for count data. *BMC Genomics*, 20(1): 6.
- Kumari, D., Perveen, S., Sharma, R. and Singh, K. 2021. Advancement in leishmaniasis diagnosis and therapeutics: An update. *European Journal of Pharmacology*, 910: 3–22.
- Kumari, S., Kumar, V., Tiwari, R. K., Ravidas, V., Pandey, K. and Kumar, A. 2022. Amphotericin B: A drug of choice for Visceral Leishmaniasis. *Acta Tropica*, 235: 1–13.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R. and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16): 2078–2079.
- Liao, Y., Smyth, G. K. and Shi, W. 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7): 923–930.
- Libório, A. B., Rocha, N. A., Oliveira, M. J., Franco, L. F., Aguiar, G. B., Pimentel, R. S., Abreu, K. L., Silva, G. B., Jr. and Daher, E. F. 2012. Acute kidney injury in children with visceral leishmaniasis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 31(5): 451–454.

- Lovett, J. L., Marchesini, N., Moreno, S. N. and Sibley, L. D. 2002. *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca^{2+} release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(29): 25870–25876.
- Mannan, S. B., Elhadad, H., Loc, T. T. H., Sadik, M., Mohamed, M. Y. F., Nam, N. H., Thuong, N. D., Hoang-Trong, B. L., Duc, N. T. M., Hoang, A. N., Elhusseiny, K. M., Minh, L. H. N., Quynh, T. T. H., Nghia, T. L. B., Mai Nhu, Y., Tieu, T. M., Hirayama, K., Huy, N. T. and Hamano, S. 2021. Prevalence and associated factors of asymptomatic leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. *Parasitology International*, 81: 102229.
- Maarouf, M., Lawrence, F., Croft, S. L. and Robert-Gero, M. 1995. Ribosomes of *Leishmania* are a target for the aminoglycosides. *Parasitology Research*, 81(5): 421–425.
- Maurya, R., Mehrotra, S., Prajapati, V. K., Nylén, S., Sacks, D. and Sundar, S. 2010. Evaluation of blood agar microtiter plates for culturing leishmania parasites to titrate parasite burden in spleen and peripheral blood of patients with visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5): 1932–1934.
- McGwire, B. S. and Satoskar, A. R. 2014. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM: An International Journal of Medicine*, 107(1): 7–14.
- Memişoğlu, H. R. 1997 Kutanöz Leishmaniasis. *ANKEM Dergisi*, 11(3): 319-329.
- Miró, G., Petersen, C., Cardoso, L., Bourdeau, P., Baneth, G., Solano-Gallego, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L. and Oliva, G. 2017. Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniosis. *Trends in Parasitology*, 33(9): 718–730.
- Montenegro, J. 1926. Cutaneous reaction in leishmaniasis. *Archives of Dermatology and Syphilology*, 13(2): 187–194.
- Moradzadeh, R., Golmohammadi, P., Ashraf, H., Nadrian, H. and Fakoorziba, M. R. 2019. Effectiveness of Paromomycin on Cutaneous Leishmaniasis in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 44(3): 185–195.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. and Wold, B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5(7): 621–628.

- Moudy, R., Manning, T. J. and Beckers, C. J. 2001. The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(44): 41492–41501.
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R. and Saravia, N. G. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 366(9496): 1561–1577.
- Nascimento, M., Zhang, W. W., Ghosh, A., Houston, D. R., Berghuis, A. M., Olivier, M. and Matlashewski, G. 2006. Identification and characterization of a protein-tyrosine phosphatase in *Leishmania*: Involvement in virulence. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(47): 36257–36268.
- Negrão, N. W., Crowe, L. P., Mantilla, B. S., Baptista, R. P., King-Keller, S., Huang, G. and Docampo, R. 2023. An X-Domain Phosphoinositide Phospholipase C (PI-PLC-like) of *Trypanosoma brucei* Has a Surface Localization and Is Essential for Proliferation. *Pathogens*, 12(3): 386.
- Okwor, I. and Uzonna, J. 2016. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(3): 489-493.
- Özbilgin, A., Çavuş, İ., Kaya, T., Yıldırım, A. and Harman, M. 2020. Comparison of in vitro Resistance of Wild *Leishmania* Isolates, Which are Resistant to Pentavalent Antimonial Compounds, Against Drugs Used in the Treatment of Leishmaniasis. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 44(1): 12–16.
- Pace, D. 2014. Leishmaniasis. *The Journal of Infection*, 69(1): 10–18.
- Pacheco-Fernandez, T., Volpedo, G., Gannavaram, S., Bhattacharya, P., Dey, R., Satoskar, A., Matlashewski, G. and Nakhasi, H. L. 2021. Revival of Leishmanization and Leishmanin. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11: 639801.
- Palma, G. and Gutierrez, Y. 1991. Laboratory diagnosis of *Leishmania*. *Clinics in Laboratory Medicine*, 11(4): 909–922.
- Pasquier, G., Demar, M., Lami, P., Zribi, A., Marty, P., Buffet, P., Desbois-Nogard, N., Gangneux, J. P., Simon, S., Blaizot, R., Couppié, P., Thiebaut, L., Pratlong, F., Dedet, J. P., Bastien, P., Sterkers, Y., Ravel, C., Lachaud, L. and Working Group for the Notification of Human Leishmanioses in France. 2022. Leishmaniasis epidemiology in endemic areas of metropolitan France and its overseas territories from 1998 to 2020. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 16(10): e0010745.

- Passero, L. F., Laurenti, M. D., Tomokane, T. Y., Corbett, C. E. and Toyama, M. H. 2008. The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Parasitology Research*, 102(5): 1025–1033.
- Pawlowic, M. C. and Zhang, K. 2012. *Leishmania* parasites possess a platelet-activating factor acetylhydrolase important for virulence. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 186(1): 11–20.
- Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M. A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M. A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Doug, O., Simon, R., Rob, S., Sally, W., Ester, R., Claire, A., Brian, W., Scott, T., Frédéric, B., Sandra, L. B., Adam, F., Daniel, J., Daniel, P. D., Samuel, O. O., James, D. H., Loislene, O. B., Luiz, R. O. T., Barclay, B., Angela, K. C., Jeremy, C. M., Deborah, F. S. and Berriman, M. 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics*, 39(7): 839–847.
- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J. C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., Pountain, A. W., Mwenechanya, R. and Papadopoulou, B. 2017. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(12): e0006052.
- Ramírez, J. R., Agudelo, S., Muskus, C., Alzate, J. F., Berberich, C., Barker, D. and Velez, I. D. 2000. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10): 3768–3773.
- Ramírez, J. D., Hernández, C., León, C. M., Ayala, M. S., Flórez, C. and González, C. 2016. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Scientific Reports*, 6: 28266.
- Rasti, S., Ghorbanzadeh, B., Kheirandish, F., Mousavi, S. G., Pirozmand, A., Hooshyar, H. and Abani, B. 2016. Comparison of Molecular, Microscopic, and Culture Methods for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 30(5): 610–615.

- Reithinger, R. and Dujardin, J. C. 2007. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1): 21–25.
- Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B. and Brooker, S. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet. Infectious Diseases*, 7(9): 581–596.
- Richmond, G. S. and Smith, T. K. 2011. Phospholipases A₁. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1): 588–612.
- Ritmeijer, K., Veeken, H., Melaku, Y., Leal, G., Amsalu, R., Seaman, J. and Davidson, R. N. 2001. Ethiopian visceral leishmaniasis: generic and proprietary sodium stibogluconate are equivalent; HIV co-infected patients have a poor outcome. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(6): 668–672.
- Rupwate, S. D. and Rajasekharan, R. 2012. Plant phosphoinositide-specific phospholipase C: an insight. *Plant Signaling & Behavior*, 7(10): 1281–1283.
- Salto, M. L., Furuya, T., Moreno, S. N., Docampo, R. and de Lederkremer, R. M. 2002. The phosphatidylinositol-phospholipase C from *Trypanosoma cruzi* is active on inositolphosphoceramide. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 119(1): 131–133.
- Salyers, A. A. and Whitt, D. D. 1994. Virulence factors that promote colonization. In: *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. Salyers, A. A. and Whitt, D. D. (eds), ASM Press, pp. 30–46, Washington, DC.
- Samarasinghe, S. R., Samaranayake, N., Kariyawasam, U. L., Siriwardana, Y. D., Imamura, H. and Karunaweera, N. D. 2018. Genomic insights into virulence mechanisms of *Leishmania donovani*: evidence from an atypical strain. *BMC Genomics*, 19(1): 843.
- Saygı, G. 2009. Leishmaniasis. In: *Parasitic Diseases and Parasites*. Es Form Offset, pp. 88–98, İzmir.
- Scarpini, S., Dondi, A., Totaro, C., Biagi, C., Melchionda, F., Zama, D., Pierantoni, L., Gennari, M., Campagna, C., Prete, A. and Lanari, M. 2022. Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics. *Microorganisms*, 10(10): 1887.
- Sereno, D., Cavaleyra, M., Zemzoumi, K., Maquaire, S., Ouassı, A. and Lemesre, J. L. 1998. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro

- model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(12): 3097–3102.
- Silveira, F. T., Sousa Junior, E. C., Silvestre, R. V., Costa-Martins, A. G., da Costa Pinheiro, K., Sosa Ochoa, W., Vasconcelos Dos Santos, T., Ramos, P. K., Casseb, S., da Silva, S. P., Valeriano, C. Z., Lima, L. V., Campos, M. B., da Matta, V. L., Gomes, C. M., Flores, G. V., Pacheco, C. M., Corbett, C. E., Nakaya, H. and Laurenti, M. D. 2021. Whole-Genome Sequencing of *Leishmania infantum* chagasi Isolates from Honduras and Brazil. *Microbiology Resource Announcements*, 10(48): e0047121.
- Singh, N., Kumar, M. and Singh, R. K. 2012. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(6): 485–497.
- Sirekbasan, S. and Polat, E. 2021. A Retrospective Study of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis in Istanbul, Turkey. *Journal of Infection in Developing Countries*, 15(4): 595–598.
- Skraba, C. M., de Mello, T. F., Pedroso, R. B., Ferreira, É. C., Demarchi, I. G., Aristides, S. M., Lonardoni, M. V. and Silveira, T. G. 2015. Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(4): 437–444.
- Solomon, M., Pavlotsky, F., Leshem, E., Ephros, M., Trau, H. and Schwartz, E. 2011. Liposomal amphotericin B treatment of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25(8): 973–977.
- Songer J. G. 1997. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends in Microbiology*, 5(4): 156–161.
- Soto, J., Arana, B. A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J. C., Diaz, A., Luz, M., Gutierrez, P., Arboleda, M., Berman, J. D., Junge, K., Engel, J. and Sindermann, H. 2004. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 38(9): 1266–1272.
- Srividya, G., Kulshrestha, A., Singh, R. and Salotra, P. 2012. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitology Research*, 110(3): 1065–1078.

- Thakur, S., Joshi, J. and Kaur, S. 2020. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *Journal of Parasitic Diseases*, 44(2): 253–272.
- Titball, R. W. 1993. Bacterial phospholipases C. *Microbiological Reviews*, 57(2): 347–366.
- Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J. and Arenas, R. 2017. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6: 750.
- Travi, B. L., Cordeiro-da-Silva, A., Dantas-Torres, F. and Miró, G. 2018. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(1): e0006082.
- Unat, E. K., Yücel, A., Altaş, K. and Samastı, M. 1995. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. 5. Baskı. İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı Yayınları, 15: 564–586.
- Van Griensven, J. and Diro, E. 2012. Visceral leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2): 309–322.
- Volpedo, G., Bhattacharya, P., Gannavaram, S., Pacheco-Fernandez, T., Oljuskın, T., Dey, R., Satoskar, A. R. and Nakhasi, H. L. 2022. The History of Live Attenuated Centrin Gene-Deleted *Leishmania* Vaccine Candidates. *Pathogens*, 11(4): 431.
- Wang X. 2001. Plant Phospholipases. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 211–231.
- Wilson, S. K., Heckendorn, J., Martorelli Di Genova, B., Koch, L. L., Rooney, P. J., Morrisette, N., Lebrun, M. and Knoll, L. J. 2020. A *Toxoplasma gondii* patatin-like phospholipase contributes to host cell invasion. *PLoS Pathogens*, 16(7): e1008650.
- Zhang, K. and Beverley, S. M. 2010. Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 170(2): 55–64.
- Zheng, Z., Chen, J., Ma, G., Satoskar, A. R. and Li, J. 2020. Integrative genomic, proteomic and phenotypic studies of *Leishmania donovani* strains revealed genetic features associated with virulence and antimony-resistance. *Parasites & Vectors*, 13(1): 510.
- Zidovetzki, R., Sherman, I. W. and O'Brien, L. 1993. Inhibition of *Plasmodium falciparum* phospholipase A2 by chloroquine, quinine, and arteether. *The Journal of Parasitology*, 79(4): 565–570.

Zijlstra, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. A., el-Hassan, I. M. and el-Hassan, A. M. 2003.
Post-kala-azar dermal leishmaniasis. The Lancet. Infectious Diseases, 3(2): 87–
98.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Samatar SAMALEH OSMAN

Eğitim

Yüksek Lisans Çankırı Karatekin Üniversitesi 2020-Halen
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Mühendisliği Anabilim Dalı

Lisans Cibuti Üniversitesi 2016-2019
Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü