

## *Proteomic-based Studies on Leishmania*

Nasrin Amiri-Dashatan<sup>1</sup>,  
Mehdi Koushki<sup>2</sup>,  
Mostafa Rezaei Tavirani<sup>3</sup>,  
Nayebali Ahmadi<sup>4</sup>

<sup>1</sup> PhD Student in Applied Proteomics, Proteomics Research Center, School of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Tehran, Iran

<sup>2</sup> PhD Student in Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Professor, Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Tehran, Iran

<sup>4</sup> Professor, Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Tehran, Iran

(Received October 3, 2017 ; Accepted February 5, 2018)

### **Abstract**

*Leishmania* is a protozoan parasite responsible for significant morbidity and mortality worldwide. Protozoan parasites of the genus *leishmania* are found as promastigotes in the sandfly vector and as amastigotes in mammalian macrophages. Mechanisms controlling stage-regulated gene expression in these organisms are poorly understood. Gene regulation in *leishmania*, like other trypanosomatids, performs in posttranscriptional and posttranslational levels. However, the correlation between mRNA content and protein contents is poor in these parasites. The completion of the genome sequence of several species of *Leishmania* has had a significant effect on the pathogenesis researches of Leishmaniasis. The prevalence of parasites becoming resistant to anti- leishmania drugs is increasing in several parts of the world including Iran. As protein is the most important target for drugs in response to a variety of signals including drugs, so, it seems protein profiles in both of the sensitive and resistant leishmania parasites could greatly promise about the mechanisms of responses to antileishmanial drugs. Also, many studies have been carried out to determine the factors associated with *leishmania* infection as well as their molecular mechanisms. In such studies, the new proteomics technology has been of great value. In fact one of the main objectives of proteomics is to identify and discover the disease-related pathologies and novel drug targets. In the current review article, proteomics -based studies investigating *leishmania* spp. are introduced.

**Keywords:** *Leishmania*, Leishmaniasis, proteomics

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (163):173- 190 (Persian).

\* **Corresponding Author:** Nayebali Ahmadi - Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Tehran, Iran (E-mail: nayebalia@sbm.ac.ir)

## مروری بر مطالعات مبتنی بر تکنولوژی پروتئومیکس در زمینه تحقیقاتی لیشمانیا

نسرین امیری داش آتان<sup>۱</sup>

مهدی کوشکی<sup>۲</sup>

مصطفی رضایی طاویرانی<sup>۳</sup>

نایبعلی احمدی<sup>۴</sup>

### چکیده

لیشمانیا تک یاخته‌ای از خانواده تریپانوزوماتیده می‌باشد و طیف وسیعی از بیماری‌ها با علائم کلینیکی گسترده در انسان را ایجاد می‌نماید. انگل لیشمانیا دارای دو فرم پروماستیگوت در ناقل و فرم آماستیگوت در میزبان پستاندار می‌باشد. مکانیسم‌های کنترل و تنظیم بیان ژن در مراحل مختلف چرخه زندگی انگل به طور کامل شناخته نشده است. انگل لیشمانیا دارای تنظیم بیان ژن در مراحل پس از رونویسی و پس از ترجمه می‌باشد و ارتباط ضعیفی ما بین محتوای ترانسکریپتوم و پروتئوم در این ارگانسیم وجود دارد. تکمیل توالی ژنومیکی چندین گونه از لیشمانیا، در روند مطالعات پاتوژنز لیشمانیا تاثیر به‌سزایی داشته است. از طرفی ظهور موارد مقاوم به دارو در سطح جهان، منجمله کشور ایران رو به افزایش است. ترکیبی از منابع ژنومیکی در دسترس این انگل‌ها و تکنولوژی نوظهور پروتئومیکس توانسته است موجب روشن شدن جنبه‌های متعدد از بیولوژی لیشمانیا و هم‌چنین مکانیسم‌های درگیر در پاتولوژنز این بیماری گردد. رویکردهای پروتئومیکی متعددی برای توصیف و طبقه‌بندی پروفایل پروتئینی گونه‌های لیشمانیا مورد استفاده قرار گرفته است و با مشخص شدن تغییرات بیان پروتئین در طول تکامل انگل، ارزیابی برهم‌کنش انگل-میزبان و مکانیسم‌های مقاومت دارویی موجود در انگل را هموار ساخته است. در مطالعات مرتبط با جوانب مختلف بیماری لیشمانیوزیس، تکنولوژی پروتئومیکس از ارزش بسیار بالایی برخوردار می‌باشد که در واقع یکی از اهداف اصلی مطالعات پروتئومیکی، شناسایی و کشف پاتوژنز مربوط به بیماری و معرفی اهداف جدید دارویی است. در این مطالعه مروری، به بررسی مطالعات پروتئومیکی به کار رفته جهت مطالعه انگل لیشمانیا پرداخته شد.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیا، لیشمانیوز، پروتئومیکس

### مقدمه

اخیر در زمینه بیوانفورماتیک باعث رشد سریع در تجزیه و تحلیل، و جمع‌آوری بسیاری از داده‌های بیولوژیکی شده است. استفاده از ابزار پروتئومیکس در زمینه‌های گوناگون پزشکی انقلابی به پا کرده است و در زمینه

یکی از اهداف اساسی در تحقیقات پروتئومیک، فراهم آوردن اطلاعاتی جهت تشخیص زود هنگام و درمان موثر بیماری‌ها با درک بهتر از فیزیولوژی و پاتولوژی آن‌ها است. در کنار این تحقیقات، پیشرفت‌های

مؤلف مسئول: نایبعلی احمدی - تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس E-mail: nayebalia@sbmu.ac.ir

۱. دانشجوی دکتری پروتئومیکس کاربردی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. دانشجوی دکتری بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳. استاد، گروه علوم پایه، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴. استاد، گروه علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۷/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۱/۱۶

## پروتئومیکس

پیشرفت‌های اخیر در تکنولوژی‌های اومیکس<sup>۳</sup> همانند پروتئومیکس، امکان شناسایی و توصیف مسیرهای بیولوژیکی جدید را در انگل لیشمانیا و هم‌چنین در میزان انسانی مهیا نموده است که بسیار کارآمدتر از مطالعات مولکولی می‌باشد. پروتئوم به عنوان تمام پروتئین‌های بیان شده توسط ژنوم، یک ارگانسم یا یک نوع سلول تعریف می‌شود و پروتئومیکس در واقع مطالعه پروتئوم یک رده سلولی، بافت یا یک ارگانسم با هدف بررسی و جستجوی یکپارچه فرایندهای بیولوژیکی می‌باشد. در واقع واژه پروتئومیکس اشاره به قلمرو وسیعی از مطالعات شامل جداسازی پروتئین‌های یک نمونه پیچیده و مقایسه پروفایل بیان پروتئین در نمونه‌های مختلف (برای مثال نمونه نرمال در مقابل سلول ترانسفورم شده) و حتی مطالعه تغییرات پس از ترجمه در اثر داروهای مختلف و یا دیگر محرک‌ها دارد. استفاده از ابزارهای پروتئومیکس در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی از جمله شناسایی بیومارکرهای بیماری‌های مختلف جهت تشخیص زود هنگام بیماری‌ها، انقلاب بزرگی ایجاد کرده است (۶-۴). هم‌چنین تکنیک‌هایی با توان بالا که توانایی پردازش و آنالیز مقادیر زیادی از مولکول‌های متنوع را دارد، محققان را در شناسایی مولکول‌های درگیر در فرایندهای بیماری‌های ایجاد شده با انگل لیشمانیا، مطالعه مقاومت انگل و هم‌چنین توصیف اهداف شیمی درمانی جدید، توانمند ساخته است و اطلاعات بیولوژیکی گسترده وسیعی از ژنوم تا بیان پروتئین را در بردارد (۷). اگر چه داده‌های ژنومیک با اتمام پروژه ژنوم انسانی بسیار ارزشمند می‌باشند ولی به دلیل این که توالی ژنوم تصویر ایستایی از عملکرد سلول می‌باشد، از پاسخگویی به تمام سوالات بیولوژیکی ناتوان است. از طرفی بسیاری از مطالعات بر این نکته دلالت دارند که همه ژن‌ها بیان

شناسایی بیومارکرهای تشخیص بیماری‌ها به‌طور غیر تهاجمی در مایعات بیولوژیک، مشارکت بسیار پررنگی دارد. لیشمانیا انگل پروتوزوئی است که بیماری لیشمانیازیس با طیف گسترده‌ای از علائم بالینی را ایجاد می‌نماید. این بیماری مشکل بهداشتی و اقتصادی-اجتماعی در بسیاری از مناطق دنیا بوده به‌طوری که در ۹۸ کشور جهان به صورت اندمیک دیده می‌شود (۱). بیش از ۳۵۰ میلیون نفر، در مناطق با خطر ابتلا به این بیماری می‌باشند. تعداد موارد لیشمانیازیس در سراسر جهان ۱۲ میلیون برآورد شده است و حدود ۱/۶ میلیون مورد جدید از این بیماری سالانه گزارش می‌شود (۲). به دلیل اهمیت این بیماری، همواره سازمان بهداشت جهانی به این بیماری توجه ویژه‌ای داشته است. لیشمانیوز انسانی شامل گستره‌ای از بیماری‌ها شامل لیشمانیوز پوستی<sup>۱</sup> (CL) بدون علائم و یا خود به خود محدود شونده تا فرم لیشمانیوز احشایی<sup>۲</sup> (VL) با علائم ناتوان کننده با مرگ و میر بالا، می‌باشد (۳). تکنولوژی نو ظهور پروتئومیکس در زمینه مطالعه جوانب مختلف انگل لیشمانیا در ابتدای راه است و می‌تواند با استفاده از آنالیز هم‌زمان مقادیر زیادی از مولکول‌های متنوع در زمینه لیشمانیازیس، پروفایل بیان پروتئین در انگل لیشمانیا، پروفایل پروتئینی در تعامل مابین انگل - میزبان و الگوی بیان پروتئین در نمونه‌های بیمار، به شناسایی و معرفی اهداف بالقوه درمانی جدید و مطالعه تاثیرات دارویی بر مسیرهای متابولیک انگل منجر گردد. تحقیقات پروتئومیکس در این زمینه با مطالعه پروفایل پروتئینی گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا شروع شده است و تفاوت‌های آشکاری بین پروفایل بیان پروتئین در گونه‌های مختلف شناسایی شده‌اند. هدف هدف از این مطالعه مروری، معرفی تکنولوژی پروتئومیکس و چشم انداز آن، در مطالعه جنبه‌های گوناگون انگل لیشمانیا و بیماری‌های لیشمانیازیس است.

1. Cutaneous leishmaniasis  
2. Visceral leishmaniasis

3. Omics

نمی‌شوند و بین میزان mRNA<sup>۱</sup> و بیان پروتئین ارتباط ضعیفی وجود دارد. همچنین تغییرات پس از ترجمه نیز تنها با مطالعات ژنومیکی قابل تفسیر نیستند و همین امر، باعث تقویت این عقیده شده است که پروتئومیکس ابزاری با توان بالا جهت توصیف مولکول‌ها و مسیرهای بیان شده در انگل و همچنین بی مهرگان و میزبان انگل می‌باشد (۸). البته لازم به ذکر است که چالش‌هایی مانند تنوع بالای پروتئین‌ها در مقایسه با ژن‌ها، عدم توصیف کامل عملکردهای پروتئین فقط از روی توالی اسیدهای آمینه و ساختار سه بعدی آن‌ها، پیش روی مطالعات پروتئومیکسی قرار دارند. لیشمانیازیس یک مشکل بهداشتی در سطح جهان بوده و با توجه به آمار بالای مبتلایان به این بیماری، تحقیقات پروتئومیکسی در این حیطه امری ضروری می‌باشد و در بسیاری از زمینه‌ها از جمله مطالعات مقاومت دارویی و شناسایی اهداف درمانی جدید می‌تواند راهگشا باشد. مراحل انجام تحقیقات پروتئومیکس در مورد انگل لیشمانیا به طور شماتیک در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است.

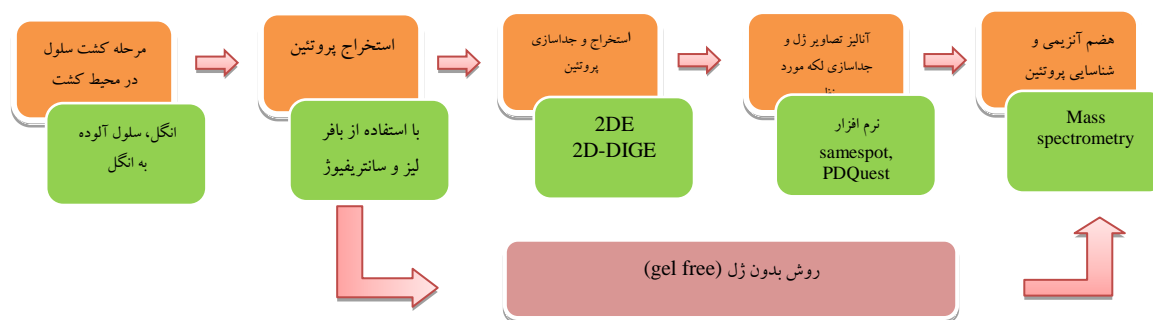
#### تکنیک‌های پروتئومیکس

در طی سال‌های گذشته روش‌های زیادی برای آنالیزهای پروتئومیکسی ارائه شده‌اند. یکی از اهداف عمده در مطالعات پروتئومیکس شناسایی پروتئین‌های مورد نظر به وسیله توالی آمینو اسیدی شان می‌باشد. از پرکاربردترین این روش‌ها می‌توان ژل الکتروفورز دو بعدی (2DE)<sup>۲</sup>، یونیزاسیون/واجذب لیزری به کمک سطح (SELDI)<sup>۳</sup>، کروماتوگرافی مایع/طیف سنجی جرمی (LC-MS)<sup>۴</sup>، ردیابی واکنش انتخاب شده (SRM)<sup>۵</sup>، ردیابی چندین واکنش (MRM)<sup>۶</sup> و آرایه‌های پروتئینی<sup>۷</sup> نام برد. مرحله نخست در آنالیز پروتئوم، جداسازی پروتئین‌های موجود در نمونه‌ها است.

الکتروفورز دو بعدی به عنوان یکی از رایج‌ترین روش‌های جداسازی در این زمینه مطرح است (۹). الکتروفورز دو بعدی ترکیب ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF)<sup>۸</sup> در بعد اول و SDS-PAGE<sup>۹</sup> در بعد دوم است که امکان جداسازی پروتئین‌ها را براساس بار و اندازه فراهم می‌کند. در دهه‌های گذشته برای انجام بعد اول، از آمفولیت‌های حامل سنتزی استفاده می‌شد که به دلیل عدم تکرار پذیری در ترکیب اجزای سنتز شده و ایجاد اثر الکترو اندوسمز، امروزه ژل‌های گرادپان pH تثبیت شده (IPG)<sup>۱۰</sup> مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۰). پس از انجام الکتروفورز دو بعدی در اغلب موارد، به چند صد پروتئین روی ژل تفکیک می‌شوند و به دلیل بی رنگ بودن پروتئین‌ها لازم است آن‌ها را رنگ آمیزی و آشکار نمود که پس از رنگ آمیزی هر پروتئین به صورت یک لکه روی ژل دیده شود. از عمده روش‌های موجود برای رنگ آمیزی پروتئین‌ها در روش الکتروفورز دو بعدی، رنگ آمیزی کوماسی بلو، رنگ آمیزی نقره و رنگ آمیزی با رنگ‌های فلورسنت (sypro orange, sypro Red, sypro Ruby) می‌باشد (۱۱، ۱۲). در روش الکتروفورز دو بعدی، تفاوت فلورسانس<sup>۱۱</sup> پروتئین‌های موجود در نمونه زیستی (سالم و بیمار) با برچسب‌های فلورسنت متفاوتی نشان دار می‌شوند و پس از انجام الکتروفورز دو بعدی، از روی ترکیب رنگ لکه‌ها می‌توان به میزان بیان پروتئین‌ها در هر یک از نمونه‌ها پی برد (۱۳). از دیگر روش‌های جداسازی پروتئین‌ها که همان اهداف را تامین می‌کنند می‌توان به روش‌های کروماتوگرافی هم‌چون کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و کروماتوگرافی تمایلی اشاره کرد که روش‌های سریعی برای جداسازی می‌باشند. این تکنیک‌ها ابزارهای متناوبی را جهت مطالعه پروتئین‌ها فراهم آورده‌اند و

1. Messenger RNA
2. Two dimensional electrophoresis
3. SELDI [Surface- enhanced laser desorption/ionization]
4. liquid chromatography-mass spectrometry
5. selected reaction monitoring
6. multiple reaction monitoring
7. Protein arrays

8. isoelectric focusing
9. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
10. immobilized pH gradient
11. 2D-DIGE [2D- Fluorescence difference gel electrophoresis]



تصویر شماره ۱: خلاصه روند کار آنالیز پروتئومیکی انگل و سلول آلوده به لیشرمانیا

تجزیه‌ای که از روی میزان انطباق جرم پپتیدهای موجود در طیف اسپکترومتری جرمی و جرم پپتیدهای پروتئین‌های موجود در بانک اطلاعاتی تمام این پروتئین‌ها را نمره‌دهی کرده، پروتئین‌ها را براساس نمره لیست می‌کند و به عنوان انگشت نگاری جرمی پپتید (PMF)<sup>۲</sup> شناخته می‌شود. روش کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی را می‌توان به صورت چند بعدی نیز انجام داد. اگرچه روش‌های نقشه برداری پپتیدی سنتی قابلیت فراوانی در شناسایی پروتئین دارند ولی در استفاده از بانک‌های اطلاعاتی و همچنین به دلیل وجود پیچیدگی مخلوط پروتئینی، دارای محدودیت می‌باشند. روش طیف‌سنجی جرمی متوالی که اخیراً گسترش پیدا کرده است، راه حلی را برای این کاستی‌ها فراهم آورده است. در این روش تفکیک‌کننده‌ها ابتدا یک یون پپتیدی خاصی را براساس جرم به بار (m/z) آن انتخاب و سپس در تفکیک‌کننده‌های بعدی، این یون خاص بر اثر برخورد با مولکول‌های یک گاز بی‌اثر مثل آرگون به ذرات خنثی و یونی کوچک قطعه قطعه می‌شود. این تکنیک‌ها شامل یونیزاسیون MALDI و ESI جفت شده با روش‌های قطعه‌سازی مختلف مانند آنالیزورهای زمان پرواز و دام یونی می‌باشند (۱۸). گذشته از این پیشرفت‌ها، آنالیزهای کمی بیان پروتئین در طیف‌سنجی بدون استفاده از ژل پس از معرفی روش‌های برچسب‌های تمایلی نشان‌دار شده با ایزوتوپ<sup>۳</sup> ICAT و برچسب‌های

مشکلات کم‌تری نسبت به روش‌های بر پایه ژل دارا می‌باشند (۱۴). روش‌های یونیزه کردن و آزاد سازی لیزری به کمک ماتریس- زمان پرواز (MALDI-TOF-MS) Matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry و یونیزاسیون با الکترواسپری (ESI) که در سال ۱۹۹۸ معرفی شدند، امکان یونیزاسیون و شناسایی سریع پروتئین‌ها و پپتیدها را فراهم کرده‌اند. اساس طیف‌سنجی جرمی اندازه‌گیری نسبت جرم به بار (m/z) یون‌ها یا آنالیت‌ها در فاز گازی است. در روش MALDI، آنالیت با یک ماتریکس شیمیایی حاوی یک مولکول آلی کوچک دارای کروموفور، مخلوط می‌شود و سپس فوتون‌های لیزر نیتروژن (به طور معمول ۳۳۷ nm) تابانده می‌شوند. با تابش فوتون‌های لیزر، آنالیت تبخیر شده و به یون‌های فاز گازی تبدیل می‌گردد. یون‌های گازی توسط تفکیک‌کننده زمان پرواز از یکدیگر جدا شده، به وسیله آشکارساز تشخیص داده می‌شود و به صورت طیف اسپکترومتری جرمی ثبت می‌گردد (۱۵). بر خلاف یونیزاسیون MALDI-TOF که روی یک ماتریکس جامد انجام می‌شود، در روش یونیزاسیون الکترواسپری (ESI)<sup>۱</sup> آنالیت به‌طور مستقیم در محلول پروتئینی با اسپری شدن و حذف حلال یونیزه می‌شود (۱۶). پس از به دست آوردن طیف مربوطه، داده‌ها با بانک اطلاعاتی پروتئین‌ها به منظور تطبیق وزن‌های مولکولی بر اساس الگوریتم‌های نمره‌دهی مقایسه می‌شوند (۱۷). این روش

2. Peptide mass fingerprinting  
3. Isotope Coded Affinity Tag

1. Electrospray ionization

هم بار برای کمی سازی مطلق و نسبی<sup>۱</sup> iTRAQ امکان پذیر شده است (۲۰۱۹).

روش یونیزاسیون و آزادسازی لیزری تقویت شده به کمک سطح (SELDI)، روشی دیگر بر پایه طیف سنجی جرمی بوده و کاربردهای متعددی در آزمایش های کلینیکی پروتئومیکسی دارد. اساس کار یونیزاسیون و آزاد سازی لیزری تقویت شده به کمک سطح، بر پایه واکنش انتخابی پلی پپتیدها با سطوح مختلف آرایه، به منظور جداسازی نمونه های زیستی و کاهش پیچیدگی آن ها قبل از آنالیز MALDI-MS می باشد (۲۱).

ردیابی واکنش انتخاب شده نیز روشی بر اساس طیف سنجی جرمی برای آنالیز کمی پروتئین های خاص می باشد. روش های SRM و MRM امکان شناسایی پروتئین هایی با مقدار کم در یک مخلوط پیچیده را فراهم می کنند. ردیابی واکنش انتخاب شده هم چنین به عنوان روشی جایگزین رویکردهایی بر پایه آنتی بادی برای تأیید بیومارکرها معرفی شده است. در مقایسه با روش های صحبت شده، ریز آرایه های پروتئینی امکان شناسایی پروتئین های خاص را بدون استفاده از طیف سنجی جرمی در رویکرد پروتئومیکس هدف دار (targeted proteomics) فراهم می کنند. در این روش، آنتی بادی ها یا آنتی ژن های خاص روی یک سطح قرار گرفته تا امکان شناسایی چندین پروتئین را فراهم کنند. نمونه روی سطح آرایه قرار می گیرد و آنتی ژن ها یا آنتی بادی های خاص به سطح متصل می شوند. از جمله محدودیت های این روش، نیاز به وجود پروب های اختصاصی برای هر مولکول هدف و دانسته پایین است که تنها امکان شناسایی دسته کوچکی از مواد را فراهم می کند. هم چنین، تغییرات پس از ترجمه با این روش مشخص نمی گردد (۲۱).

#### پروتئومیکس و لیشمانیا

مطالعات پروتئومیکسی در زمینه لیشمانیا، دیدگاه های ارزشمندی را در شناسایی مولکول ها و مسیرهای درگیر

در تمایز سلولی، اینتراکشن میزبان- انگل، و پاسخ سلول میزبان به عفونت را فراهم کرده است. در حالت کلی تحقیقات پروتئومیکس در زمینه لیشمانیا را می توان به مطالعات پروفایل بیان پروتئین در روند تمایز پروماستیگوت ها به آماستیگوت در آزمایشگاه، مطالعات مقایسه ای پروفایل پروتئینی گونه های مختلف لیشمانیا در جهت شناخت هر چه بهتر بیولوژی و دوری گونه ها از یکدیگر، مقایسه پروفایل پروتئینی بیان شده در سلول های ماکروفاژی میزبان در اثر عفونت با لیشمانیا (گونه های مختلف) و هم چنین مطالعات پروتئومیکس مقایسه ای پوست مبتلا به CL و پروتئین های سرم مبتلا به VL با افراد سالم دسته بندی کرد که به طور جداگانه و به تفصیل در مورد آن ها بحث می شود.

#### پروفایل بیان پروتئین در مراحل پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا با تکنولوژی پروتئومیکس

در طول چرخه زندگی انگل لیشمانیا، تمایز فرم پروماستیگوت به فرم آماستیگوت در اثر تغییرات محیطی از جمله افزایش دما، کاهش pH درون فاگولیزوزوم، افزایش گونه های فعال اکسیژن و نیترژن و کمبود غذا، اتفاق می افتد (۲۲). سازگاری انگل به محیط میزبان (شامل دما و pH) و هم چنین محیط سیتوتوکسیک میزبان، برای بقا درون سلولی انگل مهم می باشد. این دو فرم انگل از لحاظ سطح mRNA ژن های مرتبط با ترجمه پروتئین ها، انتقال پیام و متابولیسم کربوهیدرات ها نیز دارای اختلاف می باشند (۲۳). تاکنون، درک کاملی از مکانیسم های سلولی- مولکولی درگیر در تمایز انگل لیشمانیا وجود ندارد. بنابراین، پروفایل پروتئوم انگل به طور گسترده برای مطالعات مقایسه ای میان مراحل مختلف لیشمانیا و شناسایی پروتئین های مختص هر مرحله که می تواند منجر به شناخت بهتر بیولوژی انگل شود، استفاده شده است. اکثر مطالعات پروتئومیکسی بر روی گونه لیشمانیا دونووایی و لیشمانیا اینفانتوم به دلیل اهمیت پزشکی آن ها انجام شده است. اولین آنالیز

1. Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification

پروتئومیک برای مقایسه پروتئین‌های افتراقی لیشمانیا اینفانتوم به وسیله تکنیک الکتروفورز دو بعدی (2DE) انجام شده است و بیش از ۶۲ (۳ تا ۵ درصد لکه‌ها) پروتئین افتراقی در آماسیگوت‌های آکزینک در میان حدود ۲۰۰۰ لکه پروتئینی تفکیک شده، تشخیص داده شد. دو پروتئین شناسایی شده به وسیله اسپکترومتری جرمی (MS)، شامل ایزوسیترات دهیدروژناز (IDH) موجود در چرخه کربس و تریوز فسفات ایزومراز (TIM) در مسیر گلیکولیتیک بودند. در مطالعه مذکور، فعالیت سه برابری آنزیم ایزوسیترات دهیدروژناز در فرم آماسیگوت نسبت به فرم پروماسیگوت مشاهده شد. از آنجایی که آنزیم مورد نظر، تشکیل آلفا کتوگلو تارات را همراه با تولید NADPH کاتالیز می‌کند، فعالیت افزایش یافته آن با افزایش تقاضا برای آلفا کتوگلو تارات در دمای ۳۷ درجه درون سلولی قابل توجه می‌باشد. آنزیم تریوز فسفات ایزومراز، آنزیم کلیدی در گلیکولیز می‌باشد که در آماسیگوت‌های لیشمانیا اینفانتوم فعالیت دو برابری نسبت به پروماسیگوت‌ها نشان داده است که می‌تواند به این دلیل باشد که آماسیگوت‌ها به منظور تولید ATP از طریق گلیکولیز درون سلول‌های میزبان، به سطح بالایی از فعالیت این آنزیم نیاز دارند. البته در زمان انجام مطالعه اشاره شد که ژنوم لیشمانیا ماژور در دسترس نبوده و شناسایی توالی آمینو اسیدی به وسیله الگوریتم بلاست بر اساس همولوژی انجام شده است (۲۴). بعد از تکمیل و در دسترس قرار گرفتن ژنوم لیشمانیا ماژور، در مطالعه Nugent و همکاران، از ۱۴۷ لکه ی متمایز بیان شده در دو مرحله پروماسیگوت و آماسیگوت گونه لیشمانیا مکزیکانا، حدود ۴۷ پروتئین شناسایی شدند و نوع پروتئین‌های شناسایی شده نشان‌دهنده این مطلب بوده است که مسیر گلیکولیتیک در مرحله پروماسیگوت فعال‌تر است و این در حالی است که در مرحله آماسیگوت، این مسیر غیر فعال بوده و انگل از مسیر اکسیداسیون اسیدهای چرب و گلوکونوژنز برای تامین انرژی استفاده می‌کند. همچنین، پروتئین‌هایی با تنظیم متفاوت از جمله پروتئین‌های مربوط به اعضای اسکلت سلولی،

پاسخ به استرس، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و آمینو اسیدها و پروتئین‌های در ارتباط با سم‌زدایی، دلالت بر این نکته دارند که انگل‌های جنس لیشمانیا در طول تمایز، متحمل تغییرات متابولیکی مختلفی می‌شوند (۲۵). در مطالعه‌ای دیگر بر روی انگل لیشمانیا دونوانی، ۲۰۰۰ لکه پروتئینی بر روی ژل تفکیک شدند که حدود ۳۱ پروتئین منحصر در مرحله پروماسیگوت حضور داشتند. در این مطالعه از تکنیک MALDI-TOF/MS استفاده شد و اکثر پروتئین‌های مورد شناسایی در فرم‌های پروماسیگوت و آماسیگوت متعلق به ۵ گروه پروتئینی با عملکردهای مشابه بوده‌اند که شامل، پاسخ به استرس سلولی، متابولیسم انرژی و فسفریلاسیون، چرخه سلولی و تکثیر سلول، متابولیسم آمینو اسیدها، غشای سلولی و اسکلت سلولی، می‌باشند. همچنین آنزیم‌های متابولیکی در آماسیگوت‌های آکزینک در مقایسه با پروماسیگوت‌ها، دارای بیان بالاتری بوده‌اند (۲۶). در مطالعات مختلف نشان داده شده است که گروه عمده پروتئین‌ها که به طور انحصاری و یا به طور افزایشی در مرحله آماسیگوت بیان شده‌اند، در گیر در پروسه‌های پاسخ به استرس و فولدینگ پروتئینی بوده‌اند (۲۷، ۲۵). در اولین مطالعه پروتئومیک انجام شده برای ارزیابی تمایز آزمایشگاهی لیشمانیا پانامنزیس، ۷۵ پروتئین با بیان افتراقی تشخیص داده شد که از این تعداد، ۲۴ لکه پروتئینی منحصر در آماسیگوت‌ها بیان شده بودند و ۵۱ لکه پروتئینی با حدود ۵-۱ برابر بیان بیش‌تر در مرحله آماسیگوت در مقایسه با پروماسیگوت بودند. از این میان، چند لکه پروتئینی دارای افزایش بیان در آماسیگوت‌ها با استفاده از اسپکترومتری جرمی شناسایی شدند که متعلق به خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) بودند (۲۸). در تعدادی از مطالعات، پروفایل پروتئومیک این دو مرحله مورد آنالیز قرار گرفته است و برخی پروتئین‌ها همانند سیستمین پروتیناز b و SHERP در مرحله متاسیکلیک افزایش بیان نشان داده‌اند (۲۹). در مطالعه‌ای دیگر توسط Mojtahedi و همکاران در این زمینه، تفکیک پروتئین‌ها با روش الکتروفورز دو بعدی،

منجر به جداسازی ۱۲۰۰ لکه پروتئینی مربوط به هر کدام از مراحل متاسیکلیک و پروسیکلیک لیشمانیا مائورگریدید. از این میان ۱۹ ایزوفرم پروتئینی با بیان متمایز مورد بررسی بیش تر قرار گرفتند و پروتئین‌های دارای فعالیت سنتتیک (مثل RNA هلیکاز)، در مرحله متاسیکلیک دارای کاهش بیان بودند که در توافق و تایید کاهش عمومی بیان و سنتز پروتئین‌ها در طول تمایز این مرحله می‌باشد. از طرف دیگر پروتئین‌های درگیر در حرکت و جنبش انگل همانند پروتئین میله‌ای پارافلاژلار ID و آلفا و بتا توبولین در مرحله متاسیکلیک دارای افزایش بیان بوده اند که در توافق با حرکت بالای این فرم از انگل‌ها در مرحله عفونت‌زایی می‌باشند (۳۱،۳۰). اکثر مطالعات در زمینه تمایز مراحل مختلف چرخه زندگی گونه لیشمانیا، محدود به استفاده از روش الکتروفورز دو بعدی می‌باشند و Rosenzweig و همکاران در مطالعه‌ی خود با استفاده از روش iTRAQ به مطالعه و آنالیز تغییرات بیان پروتئین در طول تمایز لیشمانیا دونووانی در مدل آکزینیک پرداخته‌اند (۳۲). در بسیاری از مطالعات پروتئومیک مقایسه‌ای جهت شناخت پروفایل پروتئومیک مراحل مختلف تمایز لیشمانیا، محققان از فرم اماستیگوت آکزینیک در محیط کشت با pH و دمای مشابه محیط درون سلولی استفاده کرده‌اند. اگر چه اماستیگوت‌های آکزینیک می‌توانند برخی مارکرهای بیوشیمیایی فرم درون سلولی را ارائه دهند ولی دارای محدودیت‌هایی هم چون عدم دستیابی به فرم آکزینیک از همه گونه‌های لیشمانیا وجود دارد (۳۳). در سال‌های اخیر، پروفایل پروتئومیک فرم اماستیگوت درون سلولی و پروماستیگوت برون سلولی گونه لیشمانیا مکزیکانا توسط Paape و همکاران با استفاده از الکتروفورز دو بعدی و MALDI-MS/MS مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه مشخص گردید که لیشمانیا مکزیکانا در فرم اماستیگوت مقادیر زیادی پروتئین‌های بازی را بیان می‌کند که می‌توانند به عنوان عامل خنثی‌کننده محیط اسیدی درون فاگولیزوزوم و بار کلی محیط عمل کنند (۳۴). اخیرا در یک مطالعه، اماستیگوت‌های درون

سلولی از ۳ کلون لیشمانیا دونووانی مختلف با استفاده از رویکرد iTRAQ برای آنالیز تغییرات بیانی پروتئین‌ها در طول تمایزشان، استفاده شده است. بسیاری از نتایج به دست آمده در این مطالعه با آنچه که توسط Rosenzweig و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه اماستیگوت‌های آکزینیک لیشمانیا دونووانی ارائه شده بود، مشابه بودند. برای مثال آنزیم‌های درگیر در گلوکونئوزتریز، تنفس میتوکندریایی و پاسخ به استرس، دارای افزایش بیان در هر دو فرم اماستیگوت آکزینیک و اماستیگوت درون سلولی بودند و افزایش بیان پروتئین‌های مرتبط با ترافیک و زیکول‌ها در اماستیگوت‌ها مثل پروتئین‌های putative Rab7 و GTP binding protein، یافته جدیدی در این مطالعه بوده است. نتیجه‌گیری به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که به‌طور احتمالی، افزایش در میزان حمل و نقل و زیکولی برای بقای انگل درون فاگولیزوزوم به منظور کسب غذا و آزاد کردن متابولیت‌ها و فاکتورهای ویرولانس ضروری باشد (۳۵). پروماستیگوت‌های پروسیکلیک لیشمانیا به عنوان مدل در اکثر مطالعات استفاده شده‌اند که می‌تواند به دلیل کشت آسان آن‌ها در آزمایشگاه باشد. پروماستیگوت‌های متاسیکلیک، فرم عفونت‌زا برای میزبان مهره‌دار می‌باشند. در حالی که اماستیگوت‌ها مسئول پاتوژنز بیماری هستند. نتایج ارائه شده در مطالعات مختلف نشان می‌دهد، بسیاری از مسیرهای متابولیک به‌طور متمایز و متفاوت در هر کدام از مراحل تکاملی انگل مورد نظر، تنظیم می‌شوند و در نتیجه پروتئین‌های مختلفی می‌توانند به عنوان اهداف درمانی در هر مرحله، مطرح شوند، اگر چه همچنان مجهولات زیادی در این زمینه وجود دارد. در نهایت می‌توان اشاره کرد که رویکردهای کمی پروتئومیک، همچون iTRAQ برای آنالیز پروفایل پروتئینی مراحل متاسیکلیک و اماستیگوت‌های درون سلولی، می‌تواند زمینه امید بخشی برای کشف مارکرهای ویرولانس جدید به شمار روند. تعدادی از مطالعات پروتئومیک انجام شده در زمینه تمایز انگل در طول چرخه زندگی شان در جدول شماره ۱ به اختصار آورده شده است.

## جدول شماره ۱: مطالعات پروتئومیکی پیشین انجام شده در زمینه آنالیز پروفایل پروتئومیکی مراحل مختلف چرخه زندگی گونه های مختلف انگل لیشمانیا

منبع	پروتئین های شناسایی شده	تکنیک مورد استفاده	مراحل مورد مطالعه	گونه مورد مطالعه
Fakhry et al., (2002) (24)	از حدود ۲۰۰۰ پروتئین تکنیک شده، ۶۲ پروتئین در مرحله آماسیگوت دارای بیان متمایز بودند	2DE LC-MS/MS	آماسیگوت	لیشمانیا اینفانتم
Gongora et al., (2003) (36)	۱۵۰۰ و ۸۰۰ لکه پروتئینی به ترتیب در گونه گویاتریس و پانامزیرس تکنیک شد	2DE LC-MS/MS	پروماسیگوت	لیشمانیا گویاتریس (وبایا) لیشمانیا پانامزیرس (وبایا)
McNicoll et al., (2006) (27)	۲۲۰۰ لکه پروتئینی مشاهده شد که ۹/۱ درصد در پروماسیگوت و ۱۲/۴ درصد در مرحله آماسیگوت دارای افزایش بیان بودند	2DE-LC-MS/MS	پروماسیگوت و آماسیگوت	لیشمانیا اینفانتم
Walker et al., (2006) (28)	۷۵ پروتئین (درگیر در مسیر های متابولیسم کربوهیدرات ها، چرخه سلولی، پروتئین شوک حرارتی، پاسخ به استرس، متابولیسم اسید های آمینه، پروتئین های اسکلت سلولی)	2DE LC-MS/MS	پروماسیگوت و آکزیتریک آماسیگوت	لیشمانیا پانامزیرس
Brobey et al., (2006) (37)	۱۶۵۰ و ۱۵۲۰ لکه پروتئینی به ترتیب در لیشمانیا آمازوتزیرس و لیشمانیا مازور تکنیک شد	2DE (pH= 3-10)	پروماسیگوت	لیشمانیا آمازوتزیرس لیشمانیا مازور
Leifso et al., (2007) (23)	بیش از ۹۴ درصد پروفایل بیان در لیشمانیا مازور در دو مرحله یکسان بودند ۹۱ پروتئین در دو مرحله لیشمانیا اینفانتم متفاوت بیان شده بودند	DNA microarray ICAT-2DLC-ESI-MS/MS ICAT-2DLC-MALDI-TOF/TOF-MS/MS	- پروفایل بیان زن مراحل پروماسیگوت و آماسیگوت - آنالیز پروتئومیک کمی ما بین مراحل پروماسیگوت و آماسیگوت	لیشمانیا مازور استرین فرلین (MHOM/IL/80/Friedlin) لیشمانیا اینفانتم (MHOM/MA/67/ITMAP263)
Mojtahedi et al., (2008) (30)	تولین آلفا و بتا، پروتئین پارافلازلاز میله ای، ID، RNA، هلیکاز، زیرواحد تا سوکسینیل کربآ استاز، زیرواحد ۴ سیتوکروم اکسیداز	2D-PAGE MALDI-TOF/MS	پروسیکلک و مناسیکلیک (متا سیکلوژنریس)	لیشمانیا مازور
Morales et al., (2008) (38)	فسفو پروتئوم در هر یک از مراحل شناسایی شد	IMAC 2-DE	پروماسیگوت و آماسیگوت	لیشمانیا دونوتوانی
Yao (2010) (39)	آزیم های متابولیکی، GP63، GP46، انتقال دهنده پروتون	MALDI-MS/MS 2DE, LC-MS/MS	پروسیکلک و مناسیکلیک (متا سیکلوژنریس)	لیشمانیا اینفانتم
Brotherton et al., (2010) (40)	۲۴۶۹ لکه پروتئین مشاهده شد پروتئین های افزایش بیان یافته در مرحله پروماسیگوت شامل: آزیم های گلیکولیتیک و پروتئین های فلازلاز و مرحله آماسیگوت شامل: آزیم های گلوکوتوزنریس و بتا اکسیداسون اسید های چرب ۱۱ لکه پروتئینی در دو مرحله تکنیک شد. باند های ۲۸، ۲۲ و ۴۶ کیلو دالتون در مرحله پروماسیگوت و باند های ۱۲ و ۳۲ کیلو دالتون در مرحله آماسیگوت حضور داشتند	FFE, Alkaline- 2DE	پروتئین های بازی پروماسیگوت و آماسیگوت	لیشمانیا اینفانتم
Soleimanifard et al., (2013) (41)	۷۰۰ لکه پروتئینی تکرارپذیر در ژل ها تکنیک شد ۱۳۵ لکه پروتئینی دارای بیان متمایز در دو بافت مورد مطالعه بودند ۷۰۰ لکه پروتئینی تکرارپذیر در سه نمونه مورد مطالعه تکنیک شد ۲۶۴ لکه پروتئینی دارای بیان متمایز بودند	SDS-PAGE	پروماسیگوت و آماسیگوت	لیشمانیا مازور
Hajjaran et al., (2015) (42)	۷۰۰ لکه پروتئینی تکرارپذیر در ژل ها تکنیک شد	2DE LC-ESI-MS	مقایسه پروتئوم لیشمانیا تروییکا در دو بافت پوستی و احشایی	لیشمانیا تروییکا
Hajjaran et al., (2015) (43)	۷۰۰ لکه پروتئینی تکرارپذیر در سه نمونه مورد مطالعه تکنیک شد	2DE LC-ESI-MS	مرحله پروماسیگوت سه گونه لیشمانیای مورد مطالعه	لیشمانیا تروییکا لیشمانیا مازور لیشمانیا اینفانتم
Kumar et al., (2015) (44)	۷۲ لکه پروتئینی مورد شناسایی شد	2DE-MALDI-TOF/TOF-MS	ساب- پروتئوم غنی شده غشا (MEPs)	لیشمانیا دونوتوانی

## مطالعه مقاومت دارویی در لیشمانیا با استفاده از روش پروتئومیکس

در بیش از ۶۰ سال گذشته، پنتی والانت آنتی مونیالها<sup>۱</sup> (sbv) به عنوان خط اول درمان دارویی لیشمانیازیس محسوب می شوند. از حدود ۱۵ سال پیش، بیماران غیر پاسخ دهنده به این درمان و همچنین استرین های مقاوم انگل گزارش شده است (۴۵). در حال حاضر، مقاومت دارویی یک مسئله مهم در کشورهای هند و نپال به شمار می رود و این در حالی است که بیش از ۶۰ درصد بیماران به درمان با sbv پاسخ نمی دهند. این دارو برای عملکرد علیه لیشمانیا، ابتدا توسط انگل یا ماکروفاز به فرم تری- والانت (sbIII) احیا می شود و sbv و فرم فعال تری- والانت آن می تواند با اهداف مورد نظر در انگل شامل تریپانوتیون ردوکتاز، گلوکاتیون سنتاز و آنزیم های زنجیره بتا اکسیدانت اسید چرب و مسیر

1. antimonials

گلیکولیتیک وارد واکنش شود (۴۶). آنتی مونیال می تواند منجر به فعال کردن مرگ برنامه ریزی شده در سلول (Apoptosis) شود که از طریق قطعه قطعه کردن ژنوم ارگانسیم، اتفاق می افتد (۴۷). با افزایش شیوع مقاومت به این خط درمانی، خط دوم دارویی شامل آمفوتریسین B، پتامیدین، پاراموایسین و داروی خوراکی Miltefosine برای درمان لیشمانیازیس در مناطق مختلف مورد استفاده قرار گرفت. در این میان، آنالیز پروتئومیکی استرین های مقاوم و مستعد می تواند در شناسایی اهداف درمانی جدید و سیر تکامل درمانی بسیار مفید واقع گردد (۴۸). آنالیز مقایسه ای با روش الکتروفورز دو بعدی گونه لیشمانیا دونوتوانی مقاوم به sbIII و بیماران کالآ آزار مستعد در هند، نشان داد که پروتئین های مرتبط با تحریک مرگ سلولی در هر یک از استرین های حساس و مقاوم دارای تفاوت بیان می باشند (۴۹). در سال ۲۰۱۲، دو مطالعه در زمینه مقاومت دارویی در انگل لیشمانیا،

انجام شده است. در یکی از این مطالعات Walker و همکاران، پروتئوم لیشمانیا پانامنزیس (ویانیا) مقاوم به sb<sup>III</sup> در مرحله پروماستیگوت را با روش 2DE-LC-ES-MS/SMS مورد مطالعه قرار دادند و در نهایت ۹ فاکتور پروتئینی مقاوم به دارو که متعلق به دو گروه از پروتئین‌های پاسخ به استرس و آنزیم‌های متابولیسمی بودند، را شناسایی کرده‌اند (۵۰). در مطالعه‌ای دیگر، استرین مقاوم و حساس لیشمانیا تروپیکا به داروی گلوکانتیم، توسط Hajjarian و همکارانش، از نظر پروتئین‌های مقاوم مقایسه قرار گرفتند که پروتئین‌های LACK, PDI, alpha tubulin, PGf2-alpha synthase, vesicular transport protein, hypothetical protein به طور افتراقی بین دو استرین بیان شده بودند که هر یک از این پروتئین‌ها می‌توانند به عنوان اهداف بالقوه درمانی در مطالعات بعدی، بیش‌تر مورد آنالیز قرار گیرند (۵۱). در سال ۲۰۱۳، Brotherton و همکاران، لیشمانیا اینفانتوم مقاوم را با روش نوین پروتئومیک کمی<sup>۱</sup> (SILAC)، مورد مطالعه قرار دادند که برای اولین بار با این روش، پروتئین ABC Transporter MRPA به عنوان مارکر مقاومت دارویی معرفی گردید (۵۲). در سال‌های اخیر نیز، Zarean و همکاران، پروتئوم ایزوله‌های مقاوم و حساس گونه لیشمانیا مائورر به داروی گلوکانتیم را با استفاده از روش الکتروفورز دو بعدی مورد آنالیز قرار دادند و از ۲۹۶۷ لکه پروتئینی تفکیک شده بر روی ژل با استفاده از آنالیز تصاویر ژل توسط نرم‌افزار Image Master 2D Melanie-6، ۸۹ لکه پروتئینی در ایزوله‌های مورد مطالعه، دارای بیان متفاوت بودند (۵۳). با توجه به مطالب ذکر شده در این مبحث، با شناسایی پروتئین‌های بیان شده در گونه‌های مقاوم و مقایسه آن‌ها با گونه‌های حساس، می‌توان تا حدودی در مورد مکانیسم ایجاد مقاومت نیز اظهار نظر کرد و معرفی اهداف درمانی جدید نیز امکانپذیر می‌گردد.

پروفایل پروتئین در زخم‌های لیشمانیوز پوستی در سال‌های اخیر نتایج قابل توجهی در ارتباط با لیشمانیوز پوستی با استفاده از پروتئومیک 2-DE و آنالیز شبکه بیولوژیکی برای پروفایل پروتئین‌های زخم پوستی در مقایسه با پروفایل بیان پروتئین نمونه‌های سالم پوستی، گزارش شده است. به طوری که، پروتئین‌های استخراج شده از نمونه‌های زخم و سالم، با استفاده از 2-DE تفکیک شده و ۱۵۰ لکه پروتئینی با بیان افتراقی بین دو حالت مورد مقایسه، گزارش شد. از این تعداد، ۹۵ پروتئین شناسایی شدند که ۲۹ لکه پروتئینی فقط در نمونه زخم لیشمانیوز پوستی و ۱۷ پروتئین در پوست نرمال بیان شده است. پروتئین‌های شناسایی شده با آنالیز اسپکترومتری جرمی، بر طبق عملکرد بیولوژیکی شان سازمان‌دهی شده و مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج آنالیز نشان داد که پروتئین‌های دارای افزایش بیان در بیوپسی زخم لیشمانیوز پوستی، در پروسه آپوپتوزیس (CASP-9)، پاسخ ایمنی (TRB) و بیوسنتتیک (BRF1) مشارکت داشتند (۵۴). در مطالعات قبلی نشان داده شد که افزایش بیان TRB می‌تواند در فراخوانی سلول‌های T به محل عفونت، درگیر باشد لذا افزایش پروسه آپوپتوتیک و بیان CASPs می‌تواند نتیجه ایجاد پاسخ التهابی شدید باشد که به طور معمول در زخم‌های لیشمانیوز پوستی رخ می‌دهد (۵۵). همچنین برای درک بهتر تنظیم مسیرهای بیولوژیکی در افراد دارای عفونت لیشمانیایی، آنالیز شبکه بیولوژیکی اجرا شد. برای این منظور، شبکه‌ای از اینتراکشن‌های مابین پروتئین‌های شناسایی شده با استفاده از نرم‌افزار cytoscape ترسیم گردید و شبکه پیچیده‌ای از ۵۰۵ گره (node) به دست آمد که شامل بسیاری از پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز شامل IL-23، TNFR1، TGFBR1، CASP-3، CASP-8، و GZMB بوده است و با استفاده از آنالیز مسیرهای بیولوژیکی IPA<sup>۲</sup>، آپوپتوز با واسطه لئوسیت‌های T، به عنوان مسیر اولیه فعال شده در سلول‌های هدف معرفی گردید. علاوه

2. Ingenuity Pathway Analysis

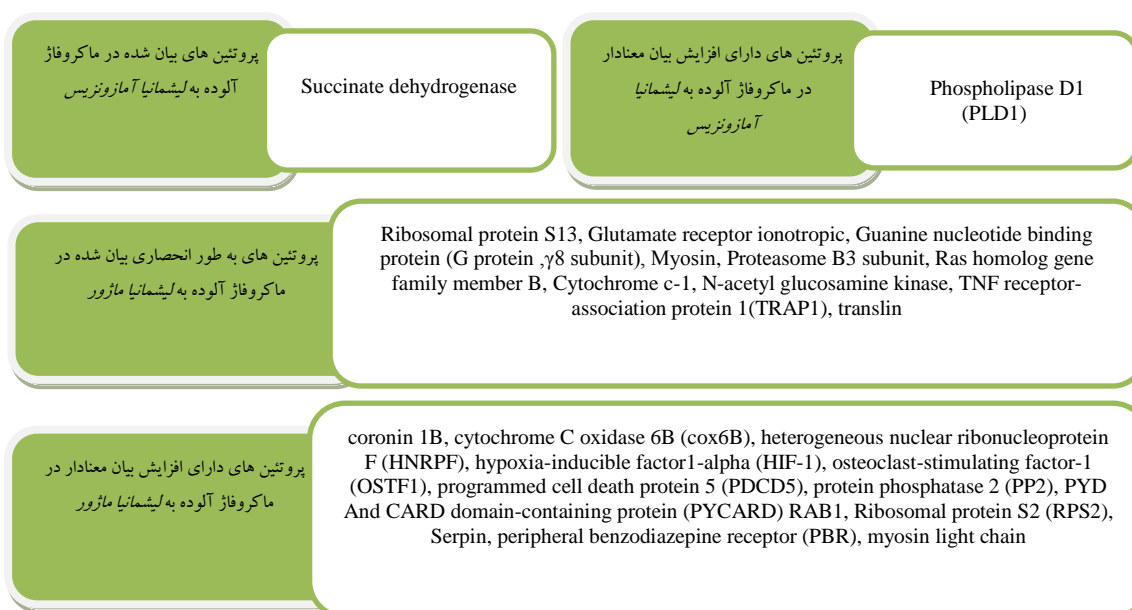
1. Stable isotope labeling with amino acids n cell culture

کرد که تنها ۱۰ پروتئین از تعداد ۶۲ پروتئین افتراقی، به طور انحصاری در ماکروفاژ آلوده به لیشمانیا مائورور بیان شده بودند. نتایج حاصل از این مطالعه در تصویر شماره ۲ به اختصار آورده شده است. از نتایج دیگر این مطالعه می توان اشاره کرد که پروتئین PLD1 دارای افزایش بیان قابل توجهی در ماکروفاژ CBA آلوده به لیشمانیا مائورور می باشد. این پروتئین بر روی فسفاتیدیل غشایی عمل می کند و پروتئین PLD1، باعث آزادسازی فسفاتیدیک اسید و ایجاد غشا جهت تشکیل فاگوزوم اولیه می گردد (۵۷). بنابراین محققان، افزایش بیان پروتئین PLD1 را در ماکروفاژ آلوده به لیشمانیا مائورور، به دلیل مشارکت در تشکیل و حفظ واکوئل های پارازیتوفروس بزرگ که در عفونت درون سلولی بالیشمانیا مائورور گزارش شده است، می دانند (۵۸). در مورد افزایش بیان پروتئین HIF-1 $\alpha$  در سلول های آلوده به لیشمانیا مائورور می توان گفت که این افزایش در ارتباط با تولید بالاتر NO و بیان TNF- $\alpha$  در شرایط عفونت بالیشمانیا می باشد. این افزایش بیان HIF-1 $\alpha$  در توافق با نتایج مطالعه دیگری می باشد که در آن افزایش دو برابری TNF- $\alpha$  در سلول آلوده به لیشمانیا مائورور نسبت به سلول آلوده به لیشمانیا مائورور گزارش شده بود (۵۹).

بر این، محققان با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی، بیان افزایشی پروتئین های CASP-9، CASP-3 و گرانزیم B را در بیوپسی زخم لیشمانیوز پوستی در مقایسه با نمونه سالم، تایید کردند. هم چنین نشان دادند که بیان بالای این سه پروتئین با اندازه زخم در بیماران لیشمانیوز پوستی، رابطه مستقیم دارد و آپوپتوز به احتمال بالاتری در مکانیسم های مرتبط با پیشرفت آسیب بافتی قابل مشاهده در زخم های لیشمانیوز پوستی، مشارکت دارد (۵۴).

پروفاایل بیان پروتئین در ماکروفاژ های انسانی آلوده به لیشمانیا با تکنولوژی پروتئومیکس

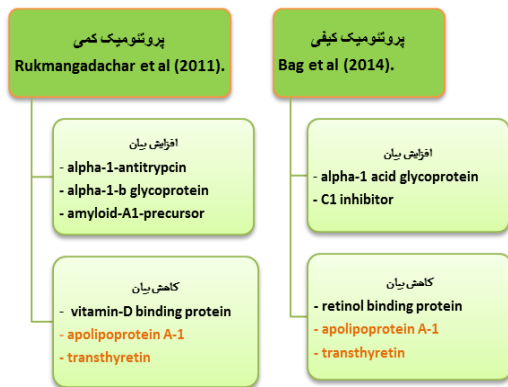
تاکنون با استفاده از روش پروتئومیکس به منظور پروفاایل کردن بیان پروتئین در سلول های میزبان (ماکروفاژ) در پاسخ به عفونت با انگل لیشمانیا، مطالعات اندکی منتشر شده است. سلول های ماکروفاژ موشی CBA برای مطالعه پروتئومیکسی لیشمانیا مائورور و لیشمانیا مائورور توسط Menezes و همکاران مورد استفاده قرار گرفت. در مطالعه آن ها، تعداد ۱۳۵۲ پروتئین در هر دو دسته ماکروفاژ های آلوده و غیر آلوده به لیشمانیا و تعداد ۶۲ پروتئین به طور افزایشی در ماکروفاژ های آلوده (عفونی) بیان شد (۵۶). در این مطالعه، می توان به این نکته اشاره



تصویر شماره ۲: نتایج حاصل از مطالعه سلول های ماکروفاژ موشی CBA در مطالعه پروتئومیکسی لیشمانیا مائورور و لیشمانیا مائورور (2013) (۴۹)

شش فرد کنترل استفاده گردید. در این مطالعه ۲۶ لکه پروتئین افتراقی شناسایی شد و از میان آن‌ها ۱۵ لکه با روش اسپکترومتری جرمی مورد آنالیز قرار گرفت که منجر به شناسایی پنج پروتئین مختلف شده است (۶۱).

در مطالعه دیگری، Bag و همکاران، گلیکوپروتئین‌های پلاسما را با به کارگیری ستون کروماتوگرافی تمایلی لکتینی و سپس آنالیز اسپکترومتری جرمی (LC-MS) مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها ۳۹ لکه پروتئین افتراقی را شناسایی و گزارش کردند (۶۲). در هر دوی مطالعات اشاره شده در بالا، پروتئین‌های فاز حاد در سرم نمونه‌های بیمار و کنترل به طور متمایز بیان شده بودند که دلیل بر حالت سیستمیک بودن بیماری لیشمانیوز احشایی می‌باشد (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۳: نتایج مطالعات پروتئومیک کمی و کیفی انجام شده در مقایسه سرم بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی با سرم نمونه‌های کنترل

در مطالعات پیشین، افزایش میزان پروتئین alpha-1-acid glycoprotein در سرم افراد دارای زخم بافتی منتشر و هم‌چنین در طول عفونت و التهاب نشان داده شده است. هم‌چنین پروتئین مذکور در فعالسازی نوتروفیل‌ها، کموتاکسی و متابولیسم اکسیداتیو نیز مشارکت دارد (۶۳). بنابراین، افزایش میزان این پروتئین در سرم بیماران با لیشمانیوز احشایی را در نتیجه ی مهار فعالیت عملکرد نوتروفیل، تسهیل عفونت تب‌زا در پوست و سایر بافت‌ها می‌دانند. پروتئین افزایش بیان یافته دیگر در سرم افراد بیمار، پروتئین c1 inhibitor

اخیرا در مطالعه، Singh و همکاران با استفاده از روش پروتئومیک کمی، پروفایل بیان پروتئین سلول THP-1 در پاسخ به عفونت با پروماستیگوت‌های لیشمانیا دونووایی، مورد آنالیز قرار گرفت و آنالیز پروتئومیکی، با روش iTRAQ-LC-MS/MS انجام شد. مقایسه پروفایل پروتئینی سلول THP-1 با سلول آلوده با لیشمانیا دونووایی، نشان‌دهنده افزایش بیان پروتئین‌های دخیل در مسیرهای متابولیک گلیکولیز و اکسیداسیون اسیدهای چرب، پروتئین‌های درگیر در رونویسی ژن، اسپلایسینگ RNA، هیستون‌ها، همانندسازی و ترمیم DNA، پروتئین‌های مسئول بقا سلولی و پیام‌رسانی سلولی در سلول آلوده به لیشمانیا دونووایی، بوده است. از نتایج قابل توجه این مطالعه می‌توان به افزایش پروتئین پیام‌رسان ضدویروسی میتو کندریایی (MAVS) در سلول آلوده به لیشمانیا اشاره کرد (۶۰). نتایج تمام مطالعات حاضر نشان می‌دهند که انگل لیشمانیا، پروتئوم سلول میزبان را در طول مراحل اولیه آلودگی تعدیل و تنظیم می‌کند که شواهدی مبنی بر ارتباط پیچیده مابین انگل و سلول میزبان در سطح مولکولی می‌باشد. هم‌چنین اهداف سلولی جدید بالقوه با توانایی تنظیم پاسخ سلولی را می‌توان مورد شناسایی قرار داد که می‌توانند در جهت کنترل عفونت لیشمانیا دارای کاربرد باشند.

پروفایل بیان پروتئین در سرم بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی با تکنولوژی پروتئومیکس

تا به امروز تعداد اندکی مطالعه جهت آنالیز پاسخ‌های التهابی ایمنی میزبان در برابر عفونت لیشمانیا انجام شده است. در سال‌های اخیر چندین مطالعه با روش‌های پروتئومیک برای شناسایی بیومارکرهای بالقوه درگیر در پاسخ ایمنی میزبان و هم‌چنین بیومارکرهای تشخیصی در سرم بیماران با لیشمانیوز احشایی گزارش شده است. در مطالعه Rukmangadachar و همکارانش، از روش پروتئومیک کمی برای مقایسه پروفایل پروتئینی شش بیمار مبتلا به لیشمانیوز احشایی و

مراحل مختلف تمایز انگل در طول چرخه زندگی اش می باشد که می تواند در زمینه آشکارسازی هر چه بیش تر مجهولات مربوط به بیولوژی انگل بسیار مفید و موثر باشد. لازم به ذکر است تاکنون هیچ کدام از اهداف مولکولی شناسایی شده با استفاده از روش های پروتئومیکی در جهت گسترش روش درمانی جدید و یا به عنوان مارک های پیش آگهی دهنده در بالین مورد استفاده قرار نگرفته اند. مقاله مروری حاضر می تواند در برنامه ریزی و هدایت مطالعات جدید برای درک بهتر پروتئین ها و مسیرهای درگیر در بقا درون سلولی انگل *لیشمانیا* مفید واقع شود. هم چنین تکنولوژی های جدید پروتئومیک به همراه ابزارهای بیوانفورماتیک و بانک های اطلاعاتی به منظور استخراج بهتر اطلاعات و تفسیر و بیان پروتئومیکی خصوصیات برجسته و منحصر، درون و بین گونه ای انگل ها ارزشمند می باشد. در نهایت می توان گفت که با توجه به گسترش روزافزون استفاده از تکنولوژی های اومیکی، استفاده از روش پروتئومیکس همزمان با روش هایی همانند ژنومیکس، متابولومیکس می تواند منجر به ایجاد داده های ارزشمند در مورد جنبه های مختلف بیماری و گشایش دیدگاه های جدید در جهت کنترل بیماری گردد.

## سپاسگزاری

این مطالعه مروری با حمایت مرکز تحقیقات پروتئومیکس انجام گرفته و نویسندگان مقاله از اعضاء مرکز مربوطه بابت همکاری در این رابطه تشکر و قدردانی می نمایند.

## References

- Ahmadi NA, Modiri M, Mamdohi S. First survey of cutaneous leishmaniasis in Borujerd county, western Islamic Republic of Iran. *East Mediter Health J* 2013; 19(10): 847-853.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its

می باشد. نتایج مطالعات فوق نشان دهنده کاهش میزان پروتئین transthyretin در سرم نمونه های بیمار می باشد که به عنوان حامل هورمون تیروئید است. هم چنین این پروتئین دارای فعالیت ضد التهابی بوده و موجب مهار تولید اینترلوکین-1 در سلول های منوسیت و اپیتلیالی می شود (۶۴). لازم به ذکر است در مطالعه Yan و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نیز کاهش میزان بیان پروتئین transthyretin در سرم بیماران لیشمانیوز احشایی گزارش شده بود که در توافق با نتایج مطالعه پروتئومیکی مذکور می باشد (۶۵). پروتئین کاهش یافته دیگر در سرم نمونه های بیمار، پروتئین retinol binding protein می باشد که در پلاسما با اتصال به پروتئین transthyretin، طی فیلتراسیون در بافت کلیه دفع نمی شود (۶۶). در نهایت می توان گفت که تعداد مطالعات پروتئومیکی انجام شده بر روی نمونه های سرم افراد مبتلا بسیار اندک می باشد و نیاز به مطالعات بیش تر در این زمینه احساس می شود.

## بحث

رویکردها و روش های پروتئومیکی، ابزاری بسیار مفید جهت شناسایی پروتئین ها و مکانیسم های درگیر در جنبه های گوناگون بیولوژی انگل *لیشمانیا* می باشند. مطالعات پروتئومیکی مقایسه ای نشان داده اند که ارتباط ما بین انگل های *لیشمانیا* و میزبان در سطح مولکولی بسیار پیچیده می باشند. اکثر مطالعات پروتئومیکی انجام شده در حوزه *لیشمانیا* مربوط به مقایسه پروفایل پروتئینی

incidence. *PloS One* 2012; 7(5): e35671.

- Mauel J. Vaccination against Leishmania infections. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2002; 2(3): 201-226.
- Zali H, Zamanian-Azodi M, Rezaei Tavirani MR, Baghban Akbar Zadeh A. Protein drug targets of *lavandula angustifolia* on treatment

- of rat Alzheimer's disease. *Iran J Pharm Res (IJPR)* 2015; 14(1): 291-302 (Persian).
5. Zamanian-Azodi M, Rezaei-Tavirani M, Mortazavian A, Vafae R, Rezaei-Tavirani M, Zali H, et al. Application of proteomics in cancer study. *Am J Cancer Sci* 2013; 2(2): 116-134.
  6. Kalantari S, Rutishauser D, Samavat S, Nafar M, Mahmudieh L, Rezaei-Tavirani M, et al. Urinary prognostic biomarkers and classification of IgA nephropathy by high resolution mass spectrometry coupled with liquid chromatography. *PLoS One* 2013; 8(12): e80830.
  7. Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mole Biochem Parasitol* 2007; 156(2): 93-101.
  8. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 2007; 39(7): 839-847.
  9. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000; 405(6788): 837-846.
  10. Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000; 21(6): 1037-1053.
  11. Lopez MF, Berggren K, Chernokalskaya E, Lazarev A, Robinson M, Patton WF. A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. *Electrophoresis* 2000; 21(17): 3673-3683.
  12. Lauber WM, Carroll JA, Dufield DR, Kiesel JR, Radabaugh MR, Malone JP. Mass spectrometry compatibility of two-dimensional gel protein stains. *Electrophoresis* 2001; 22(5): 906-918.
  13. Wu J, Lenchik NJ, Pabst MJ, Solomon SS, Shull J, Gerling IC. Functional characterization of two-dimensional gel-separated proteins using sequential staining. *Electrophoresis* 2005; 26(1): 225-237.
  14. Lee WC, Lee KH. Applications of affinity chromatography in proteomics. *Anal Biochem* 2004; 324(1):1-10.
  15. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989; 246(4926): 64-71.
  16. Veenstra TD. Electrospray ionization mass spectrometry: a promising new technique in the study of protein/DNA noncovalent complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257(1): 1-5.
  17. Wu CH, Yeh L-SL, Huang H, Arminski L, Castro-Alvear J, Chen Y, et al. The protein information resource. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(1): 345-347.
  18. Laiko VV, Moyer SC, Cotter RJ. Atmospheric pressure MALDI/ion trap mass spectrometry. *Analy Chem* 2000; 72(21): 5239-5243.
  19. Han DK, Eng J, Zhou H, Aebersold R. Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 2001; 19(10): 946-951.
  20. Shadforth IP, Dunkley TP, Lilley KS, Bessant C. i-Tracker: For quantitative proteomics using iTRAQ™. *BMC Genomics* 2005; 6(1): 145.
  21. Siwy J, Vlahou A, Zimmerli L, Züribig P, Schiffer E. Clinical proteomics: current techniques and potential applications in the elderly. *Maturitas* 2011; 68(3): 233-344.

22. Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 2007; 37(10): 1063-1075.
23. Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol* 2007; 152(1): 35-46.
24. El Fakhry Y, Ouellette M, Papadopoulou B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics* 2002; 2(8): 1007-10017.
25. Nugent PG, Karsani SA, Wait R, Tempero J, Smith DF. Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 136(1): 51-62.
26. Bente M, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, Krause E, et al. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* 2003; 3(9): 1811-1829.
27. McNicoll F, Drummelsmith J, Muller M, Madore E, Boilard N, Ouellette M, et al. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics* 2006; 6(12): 3567-3581.
28. Walker J, Vasques JJ, Gomez MA, Drummelsmith J, Burchmore R, Girard I, et al. Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 2006; 147(1): 64-73.
29. Knuepfer E, Stierhof YD, McKean PG, Smith DF. Characterization of a differentially expressed protein that shows an unusual localization to intracellular membranes in *Leishmania major*. *Biochem J* 2001; 356 (Pt 2): 335-344.
30. Mojtahedi, Z, Clos J, Kamali-Sarvestani E. *Leishmania major*: identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. *Exp Parasitol* 2008; 119(3): 422-429.
31. Sacks, DL, Perkins PV. Identification of an infective state of *Leishmania* promastigotes. *Science* 1984; 223(4643): 1417-1419.
32. Rosenzweig D, Smith D, Myler PG, Olafson RW, Ziberstein D. Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. *Proteomics* 2008; 8(9): 1843-1850.
33. Holzer TR, McMaster WR, Forney JD. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 2006; 146(2): 198-218.
34. Paape D, Lippuner C, Schmid M, Ackermann R, Barrios-Lierena ME, Zimny-Arndt U, et al. Transgenic, fluorescent *Leishmania mexicana* allow direct analysis of the proteome of intracellular amastigotes. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7(9): 1688-1701.
35. Biyani N, Madhubala R. Quantitative proteomic profiling of the promastigotes and the intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* isolates identifies novel proteins having a role in *Leishmania* differentiation and intracellular survival. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1824(12): 1342-1350.
36. Gongora R, Nathalie A, Manfredo Q, Nicolas F, Nancy GS, Walker J. Mapping the proteome of *Leishmania Viannia* parasites using two-dimensional polyacrylamide gel

- electrophoresis and associated technologies. *Revista Biomedica* 2003; 23(2): 153-160.
37. Brobey RK, Mei FC, Cheng X, Soong L. Comparative two-dimensional electrophoresis maps of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major*. *Braz J Infect Dis* 2006; 10(1): 1-6.
  38. Morales MA, Watanabe R, Laurent C, Lenormand P, Rousselle JC, Nomane A, et al. Phosphoproteomic analysis of *Leishmania donovani* pro- and amastigote stages. *Proteomics* 2008; 8(2): 350-363.
  39. Yao C. Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all? *Infect Immun* 2010; 78(1): 22-31.
  40. Brotherton MC, Racine G, Foucher AL, Drummel-Smith J, Papadopoulou B, Ouellette M. Analysis of stage-specific expression of basic proteins in *Leishmania infantum*. *J Proteome Res* 2010; 9(8): 3842-3853.
  41. Soleimanifard S, Arjmand R, Hejazi SH. Investigation and Comparison of *Leishmania major* Promastigote and Amastigote Protein Content by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Sci J Hamadan Univ Med Sci* 2013; 20(1): 1-8 (Persian).
  42. Hajjarian H, Mousavi P, Burchmore R, Mohebbali M, Bazargani MM, Salekdeh GH, et al. Comparative proteomic profiling of *Leishmania tropica*: Investigation of a case infected with simultaneous cutaneous and viscerotropic leishmaniasis by 2-Dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Iran J Parasitol* 2015; 10(3): 366-380 (Persian).
  43. Hajjarian H, Bazargani MM, Mohebbali M, Burchmore R, Salekdeh GH, Kazemi-Rad E, et al. Comparison of the Proteome Profiling of Iranian isolates of *Leishmania tropica*, *L. major* and *L. infantum* by Two-Dimensional Electrophoresis (2-DE) and Mass-spectrometry. *Iran J Parasitol* 2015; 10(4): 530-540 (Persian).
  44. Kumar A, Misra P, Sisodia B, Shasany AK, Sundar S, Dube A. Proteomic analyses of membrane enriched proteins of *Leishmania donovani* Indian clinical isolate by mass spectrometry. *Parasitol Int* 2015; 64(4): 36-42.
  45. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(1): 111-126.
  46. Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 2004; 279(38): 39925-39932.
  47. Sudhandrian G, Shaha C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Biol Chem* 2003; 278(27): 25120-25132.
  48. Cuervo P, Jesus JBD. Genetic expression and drug resistance, the role of proteomics, in Drug Resistance in *Leishmania* Parasites. Springer-Verlag Wien; 2013, 215-236.
  49. Vergnes B, Gourbal B, Girard I, Sundar S, Drummel-Smith J, Ouellette M. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6(1): 88-101.
  50. Walker J, Gngora R, Vasquez JJ, Drummel-Smith J, Burchmore R, Roy G, et al. Discovery of factors linked to antimony resistance in *Leishmania panamensis* through differential proteome analysis. *Mol Biochem Parasitol* 2012; 183(2): 166-176.

51. Hajjaran H, Azarian B, Mohebal M, Hadighi R, Assareh A, Vaziri b. Comparative proteomics study on meglumine antimoniate sensitive and resistant *Leishmania tropica* isolated from Iranian anthroponotic cutaneous leishmaniasis patients/Étude protéomique comparative de souches *Leishmania tropica* sensibles ou résistantes à l'antimoniate de méglumine chez des patient's iraniens atteints de leishmaniose cutanée anthroponotique. East Mediterr Health J 2012; 18(2): 165-171.
52. Brotherton MC, Barassa S, Philippe L, Danielle L, Guy GP, Arnaud D, et al. Proteomic and genomic analyses of antimony resistant *Leishmania infantum* mutant. PLoS One 2013; 8(11): e81899.
53. Zarean M, Maraghi S, Hajjaran H, Mohebal M, Feiz-Hdad MH, Assarehzadegan MA. Comparison of Proteome Profiling of Two Sensitive and Resistant Field Iranian Isolates of *Leishmania major* to Glucantime® by 2-Dimensional Electrophoresis. Iran J Parasitol 2015; 10(1): 19-29 (Persian).
54. Silva Santos Cd, Attarha S, Saini RK, Boaventura V, Costa J, Khouri R, et al. Proteome profiling of human cutaneous leishmaniasis lesion. J Invest Dermatol 2015; 135(2): 400-410.
55. Keesen TS, Antonelli LR, Faria DR, Guimaraes LH, Bacellar O, Carvalho EM, et al. CD4+ T cells defined by their V $\beta$  T cell receptor expression are associated with immunoregulatory profiles and lesion size in human leishmaniasis. Clin Exp Immunol 2011; 165(3): 338-351.
56. Menezes JP, Almeida TF, Petersen AL, Guedes CE, Mota MS, Lima JG, et al. Proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in macrophages infected with *Leishmania amazonensis* or *Leishmania major*. Microbes Infect 2013; 15(8): 579-591.
57. Wang L, Cummings R, Usatyuk P, Morris A, Irani K, Natarajan V. Involvement of phospholipases D1 and D2 in sphingosine 1-phosphate-induced ERK (extracellular-signal-regulated kinase) activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. Biochem J 2002; 367(3): 751-760.
58. Antoine JC, Prina E, Lang T, Courrent N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. Trends microbiol 1998; 6(10): 392-401.
59. Diefenbach A, Schindler H, Donhauser N, Lorenz E, Laskay T, MacMicking J, et al. Type 1 interferon (IFN $\alpha/\beta$ ) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. Immunity 1998; 8(1): 77-87.
60. Singh AK, Pandey RK, Siqueira-Neto JL, Kwon YJ, Freitas-Junior LH, Shaha C, et al. Proteomic-based approach to gain insight into reprogramming of THP-1 cells exposed to *Leishmania donovani* over an early temporal window. Infect Immune 2015; 83(5): 1853-1868.
61. Rukmangadachar LA, Kataria J, Hariprasad G, Samantaray JC, Srinivasan A. Two-dimensional difference gel electrophoresis (DIGE) analysis of sera from visceral leishmaniasis patients. Clin proteomics 2011; 8(1): 4.
62. Bag AK, Saha S, Sundar S, Saha B, Chakrabarti A, Mandal C. Comparative proteomics and glycoproteomics of plasma proteins in Indian visceral leishmaniasis. Proteome Sci 2014; 12(1): 48.
63. Pucadyil TJ, Tewary P, Madhubala R, Chattopadhyay. Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in

- leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 133(2): 145-152.
64. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G- 250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004; 25(9): 1327-1333.
65. Yan JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH, et al. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix- assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization- mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000; 21(17): 3666-3672.
66. Friedman DB, Wang SE, Whitwell CW, Caprioli RM, Arteaga CL. Multivariable Difference Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry A Case Study on Transforming Growth Factor- $\beta$  and ERBB2 Signaling. *Mol Cell Proteomics*, 2007; 6(1): 150-169.