Jundishapur
Scientific Medical Journal

Review Article

Protective Role of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in Controlling Cutaneous Leishmaniasis

Sara Azizizadeh Haghighi[1], Fariborz Bahrami[2,*]

1. M.Sc. in Microbiology, Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran.
2. Ph.D.; Assistant Professor, Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Azizzadeh Haghighi S, Bahrami F. [Protective Role of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in Controlling Cutaneous Leishmaniasis (Persian)]. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2024; 23(3):189-199. 10.32592/JSMJ.23.3.189

https://doi.org/10.32592/JSMJ.23.3.189

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a neglected public health problem in developing countries including Iran. CL is caused by different species of Leishmania parasites and results in morbidity and complications in patients with active lesions. Since protozoa are intracellular parasites, cellular immunity plays an essential role in controlling the infection. Cellular immunity is induced immediately after the infection and persists for many years after recovery. Studies over the past decades have identified the important role of CD4+ T cells and their T-helper subtypes in the immune response to CL. Finding antigens capable of producing Th1-dominant immune responses can play an effective role in preventing CL. This study examines the protective role of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), a critical enzyme for protozoan survival and reproduction. The potential of targeting PEPCK for the development of novel prevention strategies against Chagas disease is explored. Detailed findings presented herein underscore the critical role of PEPCK as an immunogenic antigen in parasite metabolism, gluconeogenesis, and energy homeostasis. Notably, the elimination of PEPCK alters parasite metabolic activity and attenuates Leishmania pathogenicity. These results position PEPCK as a promising vaccine candidate and therapeutic target for CL, pending further validation.

Keywords Cutaneous leishmaniasis, Glycosomal, Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK

Received: 02 Mar 2024
Accepted: 17 Apr 2024
Available Online: 30 Apr 2024

*** *Corresponding Author:***
Fariborz Bahrami
Address: Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, 69 Pasteur Ave., Tehran 1316943551, Iran
Tel: 0098216411213
E-Mail: f_bahrami@pasteur.ac.ir

Extended Abstract

Introduction

Leishmaniasis is a group of diseases caused by a protozoan parasite of Leishmania genera. Skin infections due to the parasite are known as Cutaneous Leishmaniasis (CL) which are found in many parts of the world, especially in Asia, North Africa, and Central and South America. While these diseases come in various forms and are classified based on taxonomy or geography, they are clinically categorized into three main groups, namely, cutaneous infection and skin ulcers, visceral infection, and mucocutaneous infection. The parasite can exist in two forms: amastigote, mostly inside mammalian macrophages, or flagellated (promastigote) inside its sandfly vectors. The clinical outcome of CL may vary due to multifactorial nature of the disease. CL in the Old World (in Asia, Europe, and Africa) is caused by four species of the Leishmania, including L. infantum, L. aethiopica, L. major, and L. tropica. In Old World CL, lesions improve spontaneously within about a year with the help of the immune system. CL due to L. major is painless as long as the lesions are in the early stages. These lesions are severely inflamed and ulcer-like and improve between two to eight months. They usually heal slowly and may leave behind large, disfiguring scars.

The immune system plays a crucial role in combating CL. Given the intracellular nature of the Leishmania parasite, cellular immunity is the predominant defense mechanism against infection, with humoral immunity playing a supporting role. Researchers have found that antibody titers in CL are significantly higher in cases with disseminated and multiple lesions. Although most researchers believe that the presence of antibodies in CL is not directly related to immunity against the parasite, it is important to consider that antibodies may prevent reinfection by blocking antigens of the parasite from interacting with macrophage receptors. Cellular immunity is established shortly after the infection and persists for years following the resolution. Promastigotes that survive outside the cell or amastigotes within tissues are the main targets for macrophages. In order to survive and establish an infection, the parasite must tolerate various antimicrobial factors of macrophages such as oxygen-dependent metabolic substances like hydrogen peroxide and free radicals.

Since the late 1970s, studies on the immune response to CL have identified a significant role for CD4+ T cells and their T-helper subsets. Subsequent studies on CL in experimental models of infection with L. major on sensitive BALB/c and resistant C57BL/6 mice as well as human subjects have revealed that contact with specific antigens and cytokines affects the development of CD4+ T cells or T-helper cells. Based on the cytokines they secrete, Th cells are divided into three subgroups: Th0 cells secrete a combination of IL2, IL6, IL5, IL4, IFN-γ, and IL10 upon antigenic stimulation. Th1 cells secrete IL-2, IFN-γ, and TNF-β, while Th2 cells secrete IL-10, IL-6, IL-4, and IL-13. Interferon-gamma inhibits the proliferation of Th2 cells and the function of IL-4, while IL-4 and IL-10 suppress Th1 responses. In the early 21st century, a regulatory T cell subset was introduced, suggesting its role in long-term host resistance against reinfection. Further studies, primarily focusing on visceral leishmaniasis, highlighted the role of IL-17 produced by Th17 subset CD4+ T cells, which play important yet ambiguous roles in protection or exacerbation of infection alongside neutrophils. Overall, the literature indicates that these four subsets can regulate host immune, regulatory, and inflammatory responses to various forms of leishmaniases. New technologies capable of high-throughput data collection along with recent Systems Biology approaches have increased scientists' hopes of unraveling the complexity of leishmaniasis. These new technologies can even differentiate the expression of immune-related genes in the blood compared to tissues of individuals infected in endemic areas. Moreover, identifying and investigating new antigens as biomarkers for cutaneous leishmaniasis infection or inducers of acquired immunity against lesions can lead to the development of more precise diagnostic tools and better therapeutic or preventive strategies for controlling CL. One of these antigens which has recently gained scholarly attention is an enzyme called pyruvate carboxykinase (or PEPCK in short) which will be further described below.

Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK) is a crucial enzyme in the gluconeogenesis metabolic pathway, converting oxaloacetate into Phosphoenolpyruvate (PEP) and carbon dioxide. It exists in two isoforms (i.e., cytosolic and mitochondrial) and plays a significant role in maintaining metabolic homeostasis and energy production in Leishmania species. PEPCK is highly conserved among different Leishmania species, and is involved in the anaplerotic pathway, where it facilitates the use of amino acids as an alternative carbon source in glucose-limited environments. Studies have shown that PEPCK is vital for Leishmania's survival and proliferation within macrophages under glucose deprivation. The enzyme supports the parasite's survival by increasing the expression of PEPCK to enhance gluconeogenesis. Furthermore, deletion of the PEPCK gene results in a significant reduction of Leishmania's metabolic activity and disease severity. This suggests that PEPCK could be a potential therapeutic target for treating CL.

The utilization of PEPCK in controlling Leishmaniasis has already been investigated. A study on a naturally processed peptide derived from PEPCK, known as PEPCK335–351, has demonstrated its function as an immunogenic antigen capable of inducing robust and long-lasting immunity mediated by T cells in both mice and humans infected with Leishmania major. Notably, PEPCK is expressed in the glycosomes of both the promastigote (inside the sandfly vector) and the amastigote (inside the mammalian host) stages of the parasite's life cycle. Vaccination experiments involving intradermal administration of this peptide have shown enhanced protection of resident skin T cells against challenges posed by Leishmania parasites,

Jundishapur
Scientific Medical Journal

underscoring the significance of targeting tissue-resident memory T cells for effective vaccine development against CL.

In another animal study, the ability to generate skin-resident T cells was compared after intramuscular and intradermal injection of a synthetic DNA vaccine encoding PEPCK. The intradermal vaccination generated durable antigen-specific cellular responses in the skin, offering superior protection against a Leishmania major challenge, compared to intramuscular vaccination. This suggests that Leishmania PEPCK is an immunodominant antigen with the potential for vaccine development since PEPCK-specific T cells demonstrated protective immune responses in mice and humans. Intradermal vaccination induced skin resident T cells, leading to enhanced protection against Leishmania parasites, highlighting the importance of targeting tissue resident memory T cells for an effective leishmanial vaccine. Moreover, intradermal vaccination was found to induce systemic immune responses and maintain immune responses in the skin, resulting in reduced inflammation and parasite burden post Leishmania major challenge.

In a recent animal study conducted in 2021 using a murine model, the role of PEPCK in metabolism and immunity against Leishmania major infection was investigated. Targeted removal of PEPCK by CRISPR-Cas9 technology led to reduced parasite proliferation, attenuated pathology, and decreased cytokine production in infected mice. Furthermore, PEPCK-deficient parasites exhibited significantly reduced virulence in vivo. BALB/c mice infected with PEPCK-deficient parasites failed to develop cutaneous lesions despite harboring parasites at the site of infection. This protective effect observed in intradermally vaccinated mice not only highlights the efficacy of this platform for generating skin-resident T cells but also suggests its potential in enhancing durable immune responses within relevant tissues.

Methods

A literature search was conducted on NCBI PubMed to identify articles related to Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK) and Leishmaniasis. Specific search terms, including "PEPCK" and "Leishmaniasis," were utilized and combined. Relevant articles were filtered by publication date, article type, and text availability. Each selected article was reviewed for relevance, and key findings were summarized for analysis. For the Farsi section, the analyzed data were translated.

Results

Since this is a literature review, no experiments were conducted to obtain results.

Conclusion

Leishmaniases, particularly CL, are complex diseases that pose significant global health challenges, primarily due to the interplay between the *Leishmania* parasite and the host's immune response. Understanding the disease's multifaceted nature has unveiled the critical role of cellular immunity in combating the infection, while highlighting the potential contributions of specific immune cell subsets and cytokines. Recent advancements in molecular biology have shed light on promising therapeutic targets, such as the enzyme PEPCK, which plays a fundamental role in the parasite's survival and pathogenicity. The development of vaccines utilizing PEPCK as an immunogenic antigen has demonstrated the potential for inducing robust immune responses, particularly in generating protective skin-resident T cells. These findings not only pave the way for innovative treatment strategies but also enhance our understanding of the immune mechanisms at play in leishmaniasis. Altogether, the results of utilizing PEPCK, either as an immunogen component of a preventive vaccine or a drug target for attenuation of the parasite and cure of the infection is a promising approach which upon further evaluations may offer a solution for controlling CL.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

Since this is a literature review and does not involve the use of human or animal samples or any experiment, ethical approval was not necessary.

Funding

This research did not receive support from any specific grants provided by funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Authors contributions

Sara Azizizadeh Haghighi: Data collection through NCBI PubMed searches, writing the first draft.

Fariborz Bahrami: Overall concept, structural design, supervising the data collection, complementary searches, data analysis and interpretation, final writing, and editing of the article.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

مقاله مروری

نقش محافظتی فسفو اینول پایرویت کربوکسی کیناز در کنترل عفونت پوستی لیشمانیا

سارا عزیزی زاده حقیقی[۱]، فریبرز بهرامی[۲،*]

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، بخش ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران.
۲. استادیار بخش ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Azizzadeh Haghighi S, Bahrami F. [Protective Role of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in Controlling Cutaneous Leishmaniasis (Persian)]. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2024; 23(3):189-199. 10.32592/JSMJ.23.3.189

https://doi.org/10.32592/JSMJ.23.3.189

CC BY NC

چکیده

عفونت پوستی *لیشمانیا* یک مشکل بهداشت عمومی نادیده گرفته شده در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران است که ناشی از جنس‌های مختلف انگل گونه *لیشمانیا* بوده و باعث ناتوانی و عوارض در بیماران مبتلا به ضایعات فعال می شود. با توجه به اینکه انگل تک یاختهای *لیشمانیا* یک انگل درون سلولی است، ایمنی سلولی نقشی اساسی در کنترل عفونت دارد، ایمنی سلولی بلافاصله پس از عفونت ایجاد گردیده و سال‌ها پس از بهبودی باقی می‌ماند. مطالعات دهه‌های گذشته نقش مهم سلول‌های T CD4+ و زیرگروه‌های T-helper آن‌ها را در پاسخ ایمنی به عفونت *لیشمانیا* شناسایی کرده‌اند. یافتن آنتی ژنهایی که قادر به تولید پاسخ‌های ایمنی غالب Th1 شوند، نقش موثری در پیشگیری از عفونت درون سلولی لیشمانیوز می توانند داشته باشند. در این مقاله مروری، نقش محافظتی آنتی‌ژن فسفو اینول پایرویت کاربوکسی کیناز یا به اختصار PEPCK، که در ادامه زندگی و تکثیر انگل لازم بوده و می‌تواند در توسعه راه های برتر پیشگیری و کنترل عفونت *لیشمانیا* استفاده شود، مورد بررسی قرار گرفته است. برآیند مطالعات اخیر که جزئیات آن شرح داده خواهد شد نشانگر اهمیت PEPCK به عنوان یک آنتی ژن ایمنی زا است که نقشی حیاتی در متابولیسم، گلوکونئوژنز و حفظ تولید انرژی *لیشمانیا* دارد. همچنین حذف این آنزیم منجر به تغییر فعالیت متابولیکی و کاهش حدت بیمارزایی انگل *لیشمانیا* می‌شود. در صورت تائید آزمایش‌های تکمیلی، PEPCK را می توان به عنوان یک کاندید واکسن و همچنین یک هدف دارویی در درمان عفونت *لیشمانیا* در نظر گرفت.

کلیدواژه‌ها لیشمانیوز پوستی،گلیکوزومال، فسفو اینول پایرویت کاربوکسی کیناز، PEPCK

تاریخ دریافت: ۱۲ اسفند ۱۴۰۲
تاریخ پذیرش: ۲۹ فروردین ۱۴۰۳
تاریخ انتشار: ۱۱ اردیبهشت ۱۴۰۳

نویسنده مسئول:
فریبرز بهرامی
نشانی: بخش ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران، شماره ۶۹ خیابان پاستور ، تهران، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۲۱۶۴۱۱۲۱۱۳
رایانامه: f_bahrami@pasteur.ac.ir

مقدمه

عفونت ناشی از انگل تک یاخته *لیشمانیا* که لیشمانیوز نیز نامیده می‌شود، گروهی از بیماری‌های مشترک انسان و حیوان هستند که در بسیاری از نقاط جهان به ویژه در آسیا، شمال افریقا و آمریکای مرکزی و جنوبی وجود دارند. گرچه این بیماری‌ها به اشکال مختلفی یافت می‌شوند و به روش‌های گوناگون، مثلا براساس تاکسونومی یا جغرافیا طبقه بندی می‌شوند، اما از نظر بالینی آنها در سه گروه اصلی طبقه بندی می گردند، که شامل عفونت و زخم پوستی که در فارسی به سالک معروف است، عفونت احشایی و عفونت مخاطی – پوستی می باشند. انگل تک یاخته لیشمانیا از راسته کینتو پلاست داران است که برحسب سیر تکاملی و محیط زیست خود به دو شکل بی تاژک (یا آماستیگوت) و یا تاژکدار (پروماستیگوت یا جسم لیشمان) در درون سلولهای مهره داران مانند ماکروفاژها و همچنین بدن پشه خاکی ناقل عفونت و یا در محیط کشت‌های مصنوعی قادر به زیست است [۱].

در متون علمی قدیمی ایران به این بیماری اشاره شده است. در کتاب قانون ابوعلی سینا، در مورد زخمی به نام جیرونیه یا خیرونیه که درمان مشکلی دارد و در برابر داروهای گوناگون مقاومت می‌کند، بحث شده است. در کتاب شرح الاسباب و العلامات ابن عوض کرمانی از بیماری ای به نام شلیم نام برده شده که تظاهرات آن با زخم سالک مشابه است. در اوایل قرن بیستم، مطالعات کاملی درباره لیشمانیوز پوستی در تهران توسط "دکتر پولاک" که یکی از اساتید پزشکی مدرسه دارالفنون بود، انجام گرفت. وی شرح جامعی درباره بیماری سالک نوشت. در سال ۱۹۱۶، "دکتر گاشه" از دیگر اساتید پزشکی دارالفنون، ۲۱ سگ را در تهران مورد مطالعه قرار داد که ۱۵ سگ به سالک مبتلا بودند. از سال ۱۳۲۰شمسی به بعد، محققان ایرانی نظیر دکتر انصاری، دکتر مفید و دکتر ندیم در مورد اپیدمیولوژی، خصوصیات آزمایشگاهی انگل، گونه‌های پشه خاکی مناطق آلوده و درمان انواع سالک در نقاط مختلف ایران مطالعات و آزمایشاتی را انجام دادند [۲]. در یک مطالعه سیستماتیک در سال ۲۰۲۱، بالاترین میزان شیوع لیشمانیوز پوستی در ایران به ترتیب در استانهای اصفهان، گلستان و فارس برآورد شده است. همچنین، در سرتاسر ایران، دو انگل لیشمانیا ماژور و سپس لیشمانیا تروپیکا عامل بروز بیماری گزارش شده‌اند [۳].

ویژگی‌های لیشمانیوز پوستی در داخل و بین مناطق مختلف متفاوت است. این تفاوت ممکن است به دلیل وجود گونه‌های مختلف این انگل یا نوع چرخه زندگی انگل در حیوان و انسان و یا وضعیت ایمنی فرد بیمار و شاید ژنتیک و مدل پاسخ ایمنی فرد بیمار باشد. یک زخم کلاسیک با برآمدگی، جوش یا کورک‌هایی در محل نیش پشه شروع می‌شود که به آرامی رشد می‌کند و حداقل یک هفته طول می‌کشد تا به اندازه نهایی خود برسد. پوسته زخم از مرکز شروع به خشک شدن وتکه تکه شدن می‌کند که ممکن است منجر به ایجاد زخم تازه (ثانویه) گردد. بروز برآمدگی‌های انگلی در لبه زخم نیز محتمل است. لیشمانیوز پوستی دنیای قدیم (در قاره های آسیا، اروپا و آفریقا) در اثر چهار گونه از انگل لیشمانیا ایجاد می‌شود که عبارتند از *لیشمانیا اینفنتوم*، *لیشمانیا اتیوپیکا*، *لیشمانیا ماژور* و *لیشمانیا تروپیکا*. در لیشمانیوز پوستی دنیای قدیم، زخم‌ها خود به خود در مدت حدود یکسال به کمک سیستم ایمنی بهبود می یابند. لیشمانیوز پوستی ایجاد شده در اثر انگل *لیشمانیا ماژور*، همانند سایر گونه‌های لیشمانیوز پوستی، تا زمانی که ضایعات در مراحل ابتدایی هستند بدون درد است. این ضایعات به شدت ملتهب و زخم مانند هستند و در مدت بین دو تا هشت ماه، بهبود می‌یابند [۴]. این زخم‌ها اغلب متعدد هستند و به ویژه در افراد با نقص سیستم ایمنی به هم متصل می‌گردند و به این ترتیب موجب عفونت ثانویه می‌شوند. این ضایعات اغلب به آهستگی التیام می یابند و ممکن است جای زخم‌های بزرگ، بد شکل و ناتوان کننده از خود به جای بگذارند. دوره کمون این بیماری کمتر از ۴ ماه می باشد [۵].

گونه‌هایی از پشه خاکی متعلق به جنسهای فلبوتوموس (دنیای قدیم) یا لوتزومیا (دنیای جدید؛ قاره‌های آمریکا) نقش میزبان ناقل را به عهده دارند. در میزبان پستاندار، انگل لیشمانیا به شکل آماستیگوت درون ماکروفاژها زندگی وتکثیر می‌یابد. پشه خاکی به هنگام تغذیه از زخم میزبان یا پوست به ظاهر سالم او، آماستیگوتها را توسط خرطوم خود می بلعد. پشه خاکی ماکروفاژهای حاوی آماستیگوتها را هضم کرده و آنها به داخل معده میانی حشره رها می‌شوند. آماستیگوتها به سرعت به شکل متحرک، طویل و تاژکدار پروماستیگوت تبدیل می‌شوند. سپس پروماستیگوتها بسوی مری، حلق و ضمائم دهانی پشه مهاجرت کرده و در آنجا به شکل متاسیکلیک و عفونت زا در می آیند و سپس به هنگام خون خواری، از میزبان مهره دار بعدی وارد پوست آن می‌شود [۶]. در ایران، مطالعه پشه خاکیها از سال ۱۳۰۹شمسی آغاز شد. برای این بررسی از نواحی شمال غرب ایران، کرمانشاه و همدان پشه خاکی گردآوری شد، بعد از آن در سالهای ۱۳۲۷، ۱۳۳۶ و ۱۳۴۰ شمسی در مناطق محدودی بررسی پشه خاکی‌های ایران را دکتر مثقالی بنیان گذاشت و تا سال ۱۳۴۱ مناطق بیشتری مورد بررسی قرار و گزارش شدند [۷]. جالب توجه است که بزاق پشه خاکی متشکل از مولکول های فعال بیولوژیکی با خواص ضد انعقاد، ضد التهابی و تعدیل کننده سیستم ایمنی است. چنین خواصی به انگل کمک می کند تا پاسخ های ایمنی میزبان را مهار کند و بقا و تکثیر انگل و در نتیجه پیشرفت بیماری را تسهیل کند[۸]. در ادامه، پس از شرح مختصری از نقش سیستم ایمنی در مقابله با لیشمانیوز پوستی، به نقش اخیرا متمایز شده یک آنزیم

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

لیشمانیا بنام فسفو اینول پایرویت کاربوکسی کیناز (Phospho-enolpyruvate carboxykinase) (یا به اختصار PEPCK) از دیدگاه های متابولیسمی و نتایج مطالعات استفاده از آن در کنترل لیشمانیوز، مرور خواهند شد.

سیستم ایمنی دربرابر لیشمانیوز

چون انگل لیشمانیا درون سلولی است، لذا ایمنی هومورال در پایان دادن به عفونت نقش فرعی داشته و نقش اصلی بعهده ایمنی سلولی می باشد. پژوهشگران با استفاده از تکنیکهای حساس مانند ایمونوفلوروسانس و الایزا جهت تعیین مقدار آنتی بادی در لیشمانیوز جلدی دریافته اند که که تیترآنتی بادی در لیشمانیوز جلدی در موارد وجود زخم‌های منتشر و متعدد بطور معنی داری بیشتر است. گرچه بیشتر محققان معتقدند که وجود آنتی بادی در لیشمانیوز جلدی ربطی به مقاومت و ایمنی در برابر انگل ندارد، ولی این امر را باید در نظر داشت که پادتن ممکن است از تماس آنتی ژنهای انگل مانند LPG وGP63 با گیرنده‌های سلول ماکروفاژ جلوگیری کند و مانع از عفونت مجدد شود. ایمنی سلولی مدت زمان کوتاهی پس از ابتلاء به لیشمانیوز جلدی بوجود می آید و سالها پس از بهبود عفونت باقی می‌ماند [۹]. پروماستیگوتی که در محیط خارج از سلول زنده می ماند و یا آماستیگوت بافتها در حقیقت هدفی برای ماکروفاژها خواهند بود .ظاهراً انگل باید فاکتورهای مختلف ضد میکروبی ماکروفاژها را مانند مواد متابولیکی وابسته به اکسیژن از قبیل آب اکسیژنه (H_2O_2) و رادیکالهای آزاد هیدروکسیل، سوپراکسیدآنیون، آنزیمهای لیزوزیمها، pH اسیدی محیط و پروتئینهای کاتیونیک را تحمل کند و زنده بماند تا بتواند عفونت ایجاد کند.

از اواخر دهه ۱۹۷۰ میلادی، مطالعات مربوط به پاسخی ایمنی در برابر لیشمانیوز منجر به شناسایی نقش مهم سلولهایT CD4+ و زیر مجموعه‌های T-helper آنها گردید.. مطالعات بعدی بر روی لیشمانیوز پوستی در مدل‌های تجربی عفونت با *لیشمانیا ماژور* با استفاده از موش‌های حساس BALB/c و C57BL/6 مقاوم انجام شد. مطالعات بعدی در موش و انسان ثابت کرد که تماس با آنتی ژنها و سایتوکاینهای معینی بر تکامل سلولهای T CD4 + یا T-helper (Th) اثر می‌گذارد [۱۰].

سلول‌های T-helper با تمایز به زیرمجموعه های مختلف، نقش مهمی در تنظیم پاسخ ایمنی ایفا می کنند. سلول های Th1 با ایمنی سلولی و دفاع در برابر پاتوژن های درون سلولی مرتبط هستند که با تولید اینترفرون گاما متمایز می گردند. در مقابل، سلول‌های Th2 در ایمنی هومورال نقش دارند و باعث تولید آنتی‌بادی و دفاع در برابر پاتوژنهای خارج سلولی می‌شوند. سلول‌های Th9 برای نقش موثر شان در ایمنی ضد تومور شناخته شده‌اند. سلول های Th17 به عنوان واسطه های مهم خودایمنی و التهاب شناسایی شده‌اند که اینترلوکین-۱۷ را تولید می‌کنند. سلول‌های کمک کننده فولیکولی T یا Tfh به گسترش سلول های B در مراکز ژرمینال کمک می‌کنند و تعویض کلاس ایمونوگلوبولین ها را تسهیل می‌کنند. علاوه بر این، سلول های T تنظیمی (Treg) نقش مهمی در در تحمل آنتی ژنهای خودی و پیشگیری از بیماری‌های خودایمنی گوناگون دارند به طور کلی، تنوع زیرمجموعه‌های سلول T-helper عامل ایجاد پاسخ‌های ایمنی مناسب برای مبارزه با طیف گسترده ای از پاتوژن ها و بیماری‌ها شناخته شده است[۱۱].

خوشبختانه فن‌آوری‌های جدید با قابلیت جمع‌آوری داده با توان بالا همراه با رویکردهای زیست‌شناسی سیستمی که اخیراً بدست آمده‌اند امیدواری دانشمندان را برای رمزگشایی از پیچیدگی لیشمانیوز افزایش داده‌اند [۱۲]. فن آوری‌های جدید حتی قادرند که تفاوت بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی را علاوه بر بافت در خون افراد آلوده به عفونت در مناطق اندمیک بیماری را میتواند افتراق دهد [۱۳]. در این میان، شناسایی بررسی آنتی ژن‌های جدید به عنوان زیست-نشانگرهای عفونت لیشمانیوز پوستی و یا محرک‌های ایجاد ایمنی اکتسابی در برابر عفونت‌های منجر به ضایعات می‌تواند به توسعه ابزارهای تشخیصی دقیق‌تر و همچنین استراتژی های‌درمانی یا پیشگیرانه بهتری برای کنترل لیشمانیوز به کار آیند[۱۴]. یکی از این آنتی ژنها که اخیراً مورد توجه قرار گرفته است آنزیمی به نام PEPCK است که با جزئیات بیشتری در زیر شرح داده خواهد شد.

فسفو اینول پایرویت کربوکسی کیناز (PEPCK)

از جمله آنزیم‌های خانواده ترانسفراز PEPCK است که در مسیر متابولیکی گلوکونئوژنز نقش دارد و اگزالواستات را به فسفوئینول پیرووات (Phosphoenolpyruvate: PEP) و دی‌اکسیدکربن تبدیل کرده و به دو شکل سیتوزولی و میتوکندریایی وجود دارد. در انسان، دو ایزوفرم سیتوزولی (SwissProt P35558) و میتوکندریایی (SwissProt Q16822) این آنزیم وجود دارد که ۶۳٫۴٪ توالی مشابه دارند و فرم سیتوزولی در گلوکونئوژنز حائز اهمیت است [۱۵، ۱۶]. PEPCK در حد فاصل بین گلیکولیز و چرخه کربس عمل می‌کند و با کربوکسیل‌زدایی یک مولکول C4 یک مولکول C3 می‌سازد. در اولین مرحله، این آنزیم در حضور GTP اگزالواستات OAA را کربوکسیل‌زدایی و فسفرگیری می‌کند تا به PEP تبدیل شود. انجام این واکنش سبب انتقال یک فسفات و به وجود آمدن یک مولکول GDP می‌شود [۱۷، ۱۸].

مطالعات قبلی تائید کرده اند که PEPCK آنزیمی است که نقش تعیین کننده ای بر سرعت فرآیند گلوکونئوژنزداشته [۱۹] و همچنین در تنظیم متابولیک و حالات بیماری تاثیر دارد. به عنوان مثال نشان داده شده است

که بیان بیش از حد PEPCK باعث ایجاد مقاومت به انسولین در موش‌های تراریخته می شود که نشان دهنده نقش آن در تعدیل سیگنال‌دهی انسولین و حساسیت به انسولین کبدی است[۲۰]. علاوه بر این، PEPCK با رشد سلول‌های سرطانی مرتبط است و باعث تنظیم متابولیسم کربن در جهت حمایت از تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود [۲۱].

به صورت کلی، PEPCK به عنوان یک آنزیم کلیدی در گلوکونئوژنز، نه تنها بر مسیرهای متابولیک تأثیر می گذارد، بلکه نقش اساسی در پاسخ های ایمنی و وضعیت‌های بیماری ایفا می کند. عملکردهای متنوع این آنزیم بر اهمیت آن در فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف تأکید کرده و آن را به یک هدف ارزشمند پژوهشی برای بررسی تأثیر آن بر پاسخ های T-helper و زمینه های بیولوژیکی گسترده تر تبدیل می کند.

PEPCK در متابولیسم لیشمانیا

در *لیشمانیا* نیز آنزیم PEPCK تبدیل اگزالواستات و ATP/GTP را به PEP و CO_2 به صورت برگشت پذیر کاتالیز می‌کند. PEPCK به روش‌های مختلف به متابولیسم کربن کمک می‌کند و برای مسیر گلوکونئوژنیک تقریباً همه موجودات ضروری است. در *لیشمانیا*، PEPCK در گلیکوزوم وجود داشته و عملکرد خود را با تشکیل PEP تشدید می‌کند. یافته‌های آزمایشگاهی بر این دلالت دارد که PEPCK از بقا و تکثیر انگل‌های *لیشمانیا* در شرایط کمبود یا نبود گلوکز، از طریق استفاده جایگزین از اسیدهای آمینه برای سنتز جدید هگزوزها پشتیبانی می‌کند [۲۲].

علاوه بر این، PEPCK در ترکیب با آنزیم مالیک، مخزن آسپارتات گلیکوزومی را برای گلوکونئوژنز حفظ می‌کند. در میان تمام آنزیم‌های گلوکونئوژنیک، PEPCK با افزایش بیان تحت کمبود گلوکز، بالاترین فعالیت را نشان می‌دهد [۲۳]. PEPCK به‌عنوان اولین آنزیم در تخمیر سوکسینات گلیکوزومی نقش مهمی در حفظ ATP گلیکوزومی ایفا می‌کند [۲۴]. به همین ترتیب، PEPCK هموستاز NADPH/NADP+ را از طریق فعال سازی شانت پنتوز فسفات حفظ می‌کند [۲۵]. شواهد نشانگر این است که PEPCK برای بقا و تکثیر انگل‌های *لیشمانیا* در داخل ماکروفاژها ضروری است. در این راستا، گزارش شده است که PEPCK تولید گونه‌های اکسیژن فعال داخل سلولی را در شرایط اکسیژن محدود، تعدیل می‌کند.

در سال ۲۰۱۶، Saini و همکاران در مطالعه خود گزارش کردند که کاهش گلوکز ناشی از تنظیم مثبت PEPCK بیماری ناشی از عفونت با *لیشمانیا دونووانی* را تعدیل می‌کند. آنها گزارش کردند که استرس اکسیداتیو ناشی از قحطی گلوکز، منجر به افزایش عفونت و بار انگلی بیشتر در ماکروفاژهای اولیه می شود. جالب توجه آنکه، PEPCK *لیشمانیا دونووانی* بالاترین فعالیت را تحت قحطی گلوکز برای تنظیم رشد انگل با استفاده از اسیدهای آمینه به نمایش گذاشته است. حذف PEPCK *لیشمانیا دونووانی* (Δpepck)، خواص بیماریزایی و بار انگلی را در ماکروفاژهای اولیه کاهش داده، اما تشکیل اتوفاگوزوم را در انگل‌های تغییر یافته افزایش می دهد. علاوه بر این، انگل‌های Δpepck نتوانستند مسیر پنتوز فسفات را فعال کرده و هموستاز NADPH/NADP+ را متوقف کنند و به دنبال قحطی گلوکز حساسیت بیشتری نسبت به اکسیدان‌ها ایجاد کنند. در نتیجه، این مطالعه نشان داد که *لیشمانیا دونووانی* از طریق گلوکونئوژنز تحت قحطی گلوکز برای کسب حدت و بقا در محیط متخاصم، بازآرایی‌های متابولیکی انجام می‌دهد [۲۳].

پروماستیگوت‌ها و آماستیگوت‌های *لیشمانیا* به شدت با محیط طبیعی خود سازگار شده اند. با وجود دانش فراوان در مورد بیان ژنها و پروتئینهای مراحل خاص چرخه زندگی *لیشمانیا*، اطلاعات کمی در مورد مشخصات متابولیکی در مراحل متمایز زندگی انگل و یا ساختار بیوشیمیایی فاگولیزوزوم وجود دارد. با این وجود، چندین مطالعه نشان داده‌اند که در حالی که پروماستیگوت‌ها عمدتاً به گلیکولیز متکی هستند، گلوکونئوژنز مسیر فعال و ضروری در آماستیگوت‌ها است [۲۲]. به عنوان مثال، نشان داده شده است که به هنگام نبود یا کمبود گلوکز (همانگونه که در شرایط نامناسب ماکروفاژ برای ادامه زیست آماستیگوت‌ها اتفاق می‌افتد)، *لیشمانیا دونوانی* تحت بازآرایی متابولیکی قرار می‌گیرد و با افزایش بیان آنزیم PEPCK به گلوکونئوژنز می‌پردازد [۲۳]. در یک مطالعه مرتبط دیگر نشان داده شده است که *لیشمانیا مکزیکانا* فاقد آنزیم‌های گلوکونئوژنیک کلیدی گلیسرول کیناز، PEPCK و پیروات فسفات دکیناز، قادر به القای ضایعات پوستی و تکثیر در میزبان موشی نبوده است [۲۶]. در مطالعه دیگری با استفاده از روش‌های زیست‌شناسی مولکولی نظیر فناوری ویرایش ژن به کمک تکنیک کریسپر نقش PEPCK در متابولیسم و ایمنی‌زایی *لیشمانیا ماژور* نشان داده شده است که نتایج آنها موید این بود که از دست دادن ژن کد کننده PEPCK منجر به تغییر مسیرهای متابولیک مرکزی در *لیشمانیا ماژور* و کاهش حدت بیماری زایی انگل در شرایط *in vitro* و *in vivo* می‌شود [۲۲].

نقش محافظتی PEPCK در کنترل لیشمانیوز

بررسی‌ها بر روی یک پپتید فرآوری شده طبیعی PEPCK بنام $PEPCK_{335-351}$عملکرد آنرا به عنوان یک آنتی ژن ایمنی زا نشان داده است که که قادر به ایجاد ایمنی قوی و بادوام با واسطه سلول‌های T در موش‌ها و انسان آلوده به *لیشمانیا ماژور* بوده و در گلیکوزوم‌های هر دو مرحله زندگی *لیشمانیا* بیان می‌شود. در آزمایشها با مدل حیوانی نشان داده شده است که پس از واکسیناسیون داخل جلدی با این پپتید، محافظت سلول‌های T ساکن پوست در برابر چالش با انگل‌های *لیشمانیا* افزایش

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

می‌یابد که نشانگر اهمیت هدف‌گیری سلول‌های T حافظه ساکن بافت را برای تولید یک واکسن موثر بر علیه لیشمانیوز می باشد [۲۷].

در مطالعه صورت گرفته توسط Louisو همکاران در سال ۲۰۱۹ ، توانایی تولید سلول‌های T ساکن پوست پس از تزریق عضلانی و داخل پوستی واکسن DNA سنتتیک کدکننده PEPCK *لیشمانیا*، مقایسه شد. آنها در مطالعه خود واکسن DNA را توسط الکتروپوریشن وارد بدن موش کردند و دریافتند که مسیر داخل پوستی برای تولید سلول‌های T اختصاصی PEPCK مقیم پوست، برتر از مسیر داخل عضلانی است. طبق مشاهده آنها، پس از چالش با انگل *لیشمانیا ماژور*، موش‌هایی که به صورت داخل جلدی واکسینه شده بودند محافظت بخشی قابل‌توجهی از خود نشان دادند، در حالی که موش‌هایی که به صورت عضلانی واکسینه شده بودند، محافظت نشدند. محافظتی که در موش‌های واکسینه‌شده داخل جلدی دیده می‌شود، از کارایی این پلت‌فرم نه تنها برای تولید سلول‌های T ساکن پوست، بلکه برای ارتقای پاسخ‌های ایمنی محافظتی بادوام در بافت‌های مربوطه حکایت می کند [۲۸].

در مطالعه اخیر صورت گرفته با مدل حیوانی موشی در سال ۲۰۲۱، نقش PEPCK در متابولیسم و ایمنی‌زایی علیه عفونت با*لیشمانیا ماژور* مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه نشان داد که حذف ژن کد کننده PEPCK منجر به اختلال در تکثیر *لیشمانیا ماژور* در کشت آکسنیک و و درون ماکروفاژهای مشتق از مغز استخوان می‌شود. علاوه بر این، حذف ژن کد کننده PEPCK منجر به بیماری زایی بسیار ضعیف انگل *لیشمانیا* در داخل بدن موش می‌شود. موش‌های BALB/c آلوده به انگل‌هایی که ژن کد کننده PEPCK در آنها حذف شده بود، با وجود حضور انگل‌ها در محل عفونت در پوست نتوانستند ضایعات پوستی ایجاد کنند. این امر با کاهش چشمگیر فراوانی سلول‌های CD4+ T تولید کننده سایتوکاین های IFN-γ، IL-4 و IL-10 در طحال و غدد لنفاوی منجر به محل عفونت، همراه بود. سلول‌های موش‌های آلوده به انگل‌های فاقد ژن PEPCK نیز سطوح پایینی از این سایتوکاین ها را در مایع رویی کشت به دنبال تحریک مجدد با آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* تولید کردند. انگل‌های فاقد ژن PEPCK به طور قابل توجهی اسیدی شدن خارج سلولی بیشتری را نشان دادندکه ناشی از افزایش در نشت پروتون بوده و همچنین و راندمان اتصال ATP و نرخ مصرف اکسیژن در مقایسه با همتایان نوع وحشی خود را کاهش دادند. در مجموع، این نتایج نشان داد که PEPCK یک آنزیم متابولیک حیاتی برای *لیشمانیا* است و حذف آن منجر به تغییر فعالیت متابولیکی و کاهش حدت لیشمانیوز می‌شود و در نتیجه هدف دارویی مناسبی برای درمان عفونت می‌تواند باشد. [۲۹].

روش بررسی

جستجوی اینترنتی مطالب در NCBI PubMed انجام شد تا مقالات مرتبط با فسفو اینول پایرویت کاربوکسی کیناز (PEPCK) و لیشمانیوز شناسایی شود. کلید واژه های خاصی به زبان انگلیسی، از جمله "PEPCK" و "Leishmaniasis"، مورد استفاده قرار گرفت. مقالات مرتبط بر اساس تاریخ انتشار، نوع مقاله و در دسترس‌بودن متن فیلتر شدند. هر مقاله منتخب برای بررسی ارتباط مورد بررسی قرار گرفت و یافته‌های کلیدی برای تحلیل خلاصه شده و برای بخش فارسی ترجمه شدند.

نتیجه گیری

PEPCK یک آنزیم حیاتی در متابولیسم گلوکونئوژنز است و نقش مهمی در حفظ هموستاز متابولیک و تولید انرژی *لیشمانیا* دارد. عملکرد PEPCK تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله سطوح ATP/GTP و نسبت NADPH+/NADP قرار دارد. ترادف آمینو اسیدی PEPCK در تمام *لیشمانیا*های بیماری زا ، بیش از ۸۰٪ شباهت در توالی آنها را نشان داده شده است که نشانگر حفاظت شده بودن این آنتی ژن در میان در میان گونه‌های مختلف *لیشمانیا* است. PEPCK نقش‌های فیزیولوژیکی متفاوتی در متابولیسم کربن موجودات مختلف دارد. به عنوان مثال، در در تریپانوزوماتیدها، PEPCK در مسیر آناپلروتیک درگیر است که در آن باعث تشکیل اگزالواستات از PEP می‌شود و به طور فعال از استفاده‌ی پـروماستیگوت‌های *لیشمانیا* از اسیدهای آمینه بـه عنوان منبع کـربـن جایگزین در محیط‌های محدودکننده گلوکز حمایت می‌کند. همچنین مطالعات مولکولی نشان داده اند که PEPCK یک آنزیم متابولیک حیاتی برای *لیشمانیا* است و حذف آن منجر به تغییر فعالیت متابولیکی و کاهش حدت لیشمانیوز پوستی می‌شود .در مجموع، این یافته‌ها نشان می‌دهند کـه PEPCK، به عنوان یک آنـزیم گلوکونئوژنیک چند عملکردی و آنتی‌ژن غالب ایمنی، ممکن است یک آنتی ژن کاندید واکسن موثر علیه لیشمانیوز باشد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

از آنجائیکه این یک مقاله مروری است و شامل استفاده از نمونه‌های انسانی ، حیوانی و یا انجام هیچگونه آزمایشی نمی‌باشد، درج ملاحضات اخلاقی ضروری نبود.

حامی مالی

نویسندگان این مقاله مروری از طرف هیچ منبع یا سازمان تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی، حمایت مالی دریافت نکرده اند

مشارکت نویسندگان

سارا عزیزی‌زاده حقیقی: جمع‌آوری داده‌ها از طریق جستجو در NCBI PubMed و نوشتن پیش‌نویس اولیه.

فریبرز بهرامی: مفهوم کلی، طراحی ساختاری، نظارت بر جمع‌آوری داده‌ها، جستجو های مکمل، تحلیل و تفسیر داده‌ها، نوشتن نهایی و ویرایش مقاله.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تضاد منافعی ندارند.

References

[1] Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. The Lancet. 2005 Oct 29;366(9496):1561-77. [10.1016/S0140-6736(05)67629-5] [PMID]

[2] Khan SJ, Muneeb S. Cutaneous leishmaniasis in Pakistan. Dermatology Online Journal. 2005;11(1). [PMID]

[3] Sabzevari S, Teshnizi SH, Shokri A, Bahrami F, Kouhestani F. Cutaneous leishmaniasis in Iran: a systematic review and meta-analysis. Microbial pathogenesis. 2021 Mar 1;152:104721. [10.1016/j.micpath.2020.104721] [PMID]

[4] Basano SD, Camargo LM. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. Revista brasileira de epidemiologia. 2004;7:328-37.

[5] Weigle K, Saravia NG. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. Clinics in dermatology. 1996 Sep 1;14(5):433-50. [10.1016/0738-081x(96)00036-3] [PMID]

[6] Spotin A, Rouhani S, Parvizi P. The associations of Leishmania major and Leishmania tropica aspects by focusing their morphological and molecular features on clinical appearances in Khuzestan province, Iran. BioMed research international. 2014;2014(1):913510. [10.1155/2014/913510] [PMID]

[7] Rassi Y, Sofizadeh A, Abai MR, Oshaghi MA, Rafizadeh S, Mohebail M, Mohtarami F, Salahi R. Molecular detection of Leishmania major in the vectors and reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis in Kalaleh District, Golestan Province, Iran. Journal of Arthropod-Borne Diseases. 2008;2(2):21-7.

[8] Fayaz S, Bahrami F, Parvizi P, Fard-Esfahani P, Ajdary S. An overview of the sand fly salivary proteins in vaccine development against leishmaniases. Iranian Journal of Microbiology. 2022 Dec;14(6):792. [10.18502/ijm.v14i6.11253] [PMID]

[9] Anversa L, Tiburcio MG, Richini-Pereira VB, Ramirez LE. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. Revista da Associação Médica Brasileira. 2018 Mar;64(3):281-9. [10.1590/1806-9282.64.03.281] [PMID]

[10] Alimohmmadian MH, Ajdary S, Bahrami F. A Historic Review of the Role of CD4+ T-Cell Subsets in Development of the Immune Responses against Cutaneous and Visceral Leishmaniases. Iranian Biomedical Journal. 2022 Mar;26(2):99. [10.52547/ibj.26.2.99] [PMID]

[11] Basu A, Ramamoorthi G, Albert G, Gallen C, Beyer A, Snyder C, Koski G, Disis ML, Czerniecki BJ, Kodumudi K. Differentiation and regulation of TH cells: A balancing act for cancer immunotherapy. Frontiers in immunology. 2021 May 3;12: 669474. [10.3389/fimmu.2021.669474] [PMID]

[12] Taslimi Y, Masoudzadeh N, Bahrami F, Rafati S. Cutaneous leishmaniasis: multiomics approaches to unravel the role of immune cells checkpoints. Expert Review of Proteomics. 2022 Mar 4;19(3):213-25. [10.1080/14789450.2022.2131545] [PMID]

[13] Bahrami F, Masoudzadeh N, Van Veen S, Persson J, Lari A, Sarvnaz H, Taslimi Y, Östensson M, Andersson B, Sharifi I, Goyonlo VM. Blood transcriptional profiles distinguish different clinical stages of cutaneous leishmaniasis in humans. Molecular Immunology. 2022 Sep 1;149:165-73. [10.1016/j.molimm.2022.07.008] [PMID]

[14] Bahrami F, Harandi AM, Rafati S. Biomarkers of cutaneous leishmaniasis. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2018 Jun 26;8:222. [10.3389/fcimb.2018.00222] [PMID]

[15] Méndez-Lucas A, Hyroššová P, Novellasdemunt L, Viñals F, Perales JC. Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) is a pro-survival, endoplasmic reticulum (ER) stress response gene involved in tumor cell adaptation to nutrient availability. Journal of Biological Chemistry. 2014 Aug 8;289 (32):22090-102. [10.1074/jbc.M114.566927] [PMID]

[16] Méndez-Lucas A, Duarte JA, Sunny NE, Satapati S, He T, Fu X, Bermúdez J, Burgess SC, Perales JC. PEPCK-M expression in mouse liver potentiates, not replaces, PEPCK-C mediated gluconeogenesis. Journal of hepatology. 2013 Jul 1;59(1):105-13. [10.1016/j.jhep.2013.02.020] [PMID]

[17] Elnagar A, El-Dawy K, El-Belbasi HI, Rehan IF, Embark H, Al-Amgad Z, Shanab O, Mickdam E, Batiha GE, Alamery S, Fouad SS. Ameliorative effect of oxytocin on FBN1 and PEPCK gene expression, and behavioral patterns in rats' obesity-induced diabetes. Frontiers in Public Health. 2022 Apr 7;10:777129. [10.3389/fpubh.2022.777129] [PMID]

[18] Burgess SC, He T, Yan Z, Lindner J, Sherry AD, Malloy CR, Browning JD, Magnuson MA. Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase does not solely control the rate of hepatic gluconeogenesis in the intact mouse liver. Cell metabolism. 2007 Apr 4;5(4):313-20. [10.1016/j.cmet.2007.03.004] [PMID]

[19] Tang X, Yan L, Li H, Du L, Shi Y, Huang F, Tang H. Increased expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase cytoplasmic isoform by hepatitis B virus X protein affects hepatitis B virus replication. Journal of medical virology. 2019 Feb;91(2):258-64.. [10.1002/jmv.25300] [PMID]

[20] Lamont BJ, Andrikopoulos S, Funkat A, Favaloro J, Ye JM, Kraegen EW, Howlett KF, Zajac JD, Proietto J. Peripheral insulin resistance develops in transgenic rats overexpressing phospho-enolpyruvate carboxykinase in the kidney. Diabetologia. 2003 Oct;46:1338-47. [10.1007/s00125-003-1180-y] [PMID]

[21] Montal ED, Dewi R, Bhalla K, Ou L, Hwang BJ, Ropell AE, Gordon C, Liu WJ, DeBerardinis RJ, Sudderth J, Twaddel W. PEPCK coordinates the regulation of central carbon metabolism to promote cancer cell growth. Molecular cell. 2015 Nov 19;60(4):571-83. [10.1016/j.molcel.2015.09.025] [PMID]

[22] Barazandeh AF, Mou Z, Ikeogu N, Mejia EM, Edechi CA, Zhang WW, Alizadeh J, Hatch GM, Ghavami S, Matlashewski G, Marshall AJ. The phosphoenolpyruvate carboxykinase is a key metabolic enzyme and critical virulence factor of leishmania major. The Journal of Immunology. 2021 Mar 1;206(5):1013-26. [10.4049/jimmunol.2000517] [PMID]

[23] Saini S, Kumar Ghosh A, Singh R, Das S, Abhishek K, Kumar A, Verma S, Mandal A, Hasan Sardar A, Purkait B, Kumar A. Retracted: Glucose deprivation induced upregulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase modulates virulence in L eishmania donovani. Molecular Microbiology. 2016 Dec;102 (6):1020-42. [10.1111/mmi.13534] [PMID]

[24] Saunders EC, Ng WW, Chambers JM, Ng M, Naderer T, Krömer JO, Likić VA, McConville MJ. Isotopomer profiling of Leishmania mexicana promastigotes reveals important roles for succinate fermentation and aspartate uptake in tricarboxylic acid cycle (TCA) anaplerosis, glutamate synthesis, and growth. Journal of Biological Chemistry. 2011 Aug 5;286(31):27706-17. [10.1074/jbc.M110.213553] [PMID]

[25] Jin ES, Sherry AD, Malloy CR. Interaction between the pentose phosphate pathway and gluconeogenesis from glycerol in the liver. Journal of Biological Chemistry. 2014 Nov 21;289(47): 32593-603. [10.1074/jbc.M114.577692] [PMID]

[26] Rodriguez-Contreras D, Hamilton N. Gluconeogenesis in *Leishmania mexicana*: contribution of glycerol kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and pyruvate phosphate dikinase. Journal of Biological Chemistry. 2014;289(47):32989-3000. [10.1074/jbc.M114.569434] [PMID]

[27] Mou Z, Li J, Boussoffara T, Kishi H, Hamana H, Ezzati P, et al. Identification of broadly conserved cross-species protective *Leishmania* antigen and its responding CD4+ T cells. Science translational medicine. 2015;7(310):310ra167-310ra167. [10.1126/scitranslmed.aac5477] [PMID]

[28] Louis L, Clark M, Wise MC, Glennie N, Wong A, Broderick K, et al. Intradermal Synthetic DNA Vaccination Generates *Leishmania*-Specific T Cells in the Skin and Protection against *Leishmania major*. Infect Immun. 2019 Aug;87(8). PubMed PMID: 31182618. [10.1128/IAI.00227-19] [PMID]

[29] Barazandeh AF, Mou Z, Ikeogu N, Mejia EM, Edechi CA, Zhang WW, et al. The Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Is a Key Metabolic Enzyme and Critical Virulence Factor of *Leishmania major*. J Immunol. 2021 Mar 1;206(5):1013-26. [10.4049/jimmunol.2000517] [PMID]