

اتوفاژی، عفونت و پاسخ ایمنی

مترجمان:
سروش طاهرخانی
(دکتری تخصصی فیزیولوژی)
محمد اسماعیل امینی

(کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی)
یاسین خزاعی

(کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی)
رضنا اسدزادگان

(کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی)
ادریس مهماندوست دوگوری

(کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی)

نویسندهای:
ویلیام تی. جکسون
میشل اس. سانسون

عنوان و نام پدیدآور	: اتوفازی، عفونت و پاسخ ایمنی / نوشته واپلی بلکول [صحیح: ویراستاران ویلیام تی جکسون، میشل سوانسون]
مترجمین سروش طاهرخانی...[و دیگران].	
مشخصات نشر	: تهران: موسسه آموزشی تالیفی ارشدان، ۱۴۰۰.
مشخصات ظاهری	: ۹۷۸-۶۲۲-۰-۲۱۶۷-۰
شابک	: ۳۹۲ ص.
وضعیت فهرست نویسی	: فیبا
پادداشت	: عنوان اصلی: Autophagy, infection, and the immune response, 2015
پادداشت	: مترجمین سروش طاهرخانی، محمد اسماعیل امینی، یاسین خزاعی، رضا اسدزادگان، ادريس مهماندوست دوگوری
موضوع	: کریچه‌های اتوفازیک Autophagic vacuoles
ایمنی‌شناسی	: Immunology
ایمنی‌شناسی بالینی	: Clinical immunology
بیماری‌های ویروسی	: Virus diseases
بیماری‌های ویروسی — جنبه‌های ایمنی	: Virus diseases -- Immunological aspects
شناسه افزوده	: جکسون، ویلیام تی، ۱۹۷۱-م، ویراستار
شناسه افزوده	: Jackson, William T., 1971
شناسه افزوده	: سوانسون، میشل، ۱۹۶۰-م، ویراستار
شناسه افزوده	: Swanson, Michele, 1960
شناسه افزوده	: طاهرخانی، سروش، ۱۳۷۴-، مترجم
ردی بندی کنگره	: ۶۰۳QH
ردی بندی دیوبی	: ۶۵۵/۵۷۱
شماره کتابشناسی ملی	: ۸۷۰۱۰۵۵
اطلاعات رکورد کتابشناسی	: فیبا

ارشدان

مؤسسه آموزشی تالیفی ارشدان

اتوفازی، عفونت و پاسخ ایمنی
سروش طاهرخانی - محمد اسماعیل امینی
یاسین خزاعی - رضا اسدزادگان
ادريس مهماندوست دوگوری
آموزشی تالیفی ارشدان
اول
اول ۱۴۰۰

www.irantypist.com
www.irantypist.com
۹۷۸-۶۲۲-۰-۲۱۶۷-۰
۱۴۰۰

soroushtaherkhani95@gmail.com
www.arshadan.com
www.arshadan.net
۰۹۱۳۷۹۲۸۸۰۰
۷۰۰۰ نومان

■ نام کتاب:
■ ترجمه:

■ ناشر:
■ ویرایش:
■ نوبت چاپ:

■ جزویتی و صفحه آرایی:
■ طراح و گرافیست:

■ شابک:

■ شماره کتاب:

■ ارتباط با مترجمین:

■ مرکز خرید اینترنتی:

■ هر کوچک یافش و بوزیر:

■ قیمت:

بسمه تعالیٰ

اتوفاژی، عفونت و پاسخ ایمنی

مترجمین:

سروش طاهرخانی

محمد اسماعیل امینی

یاسین خزاعی

رضا اسدزادگان

ادریس مهماندوست دوگوری

پیشگفتار ناشر:

به نام ایزد دانا که آغاز و انجام از آن اوست

هرگز دل من زعلم محروم نشد
کم ماند زاسرار که مفهوم نشد
اکنون که به چشم عقل در می نگرم
معلوم شد که هیچ معلوم نشد

ای دانای بی همتا، ای بخشنده ایی که ناخواسته عطا فرمایی و هر نیازمندی را به عدالت بی نیاز گردانی، مگر اینکه نالایق باشد و آن عنایت را به بازگونه از دست دهد. در عرصه پیشرفت تکنولوژی در هزاره سوم، هنوز نیاز بر مطالعه کتاب در کنار استفاده از منابع کامپیوتری و اینترنت احساس می شود. از این بابت خوشحالیم که می توانیم در جهت اعتلای علم، دانش و فرهنگ کشور قدمی هر چند کوچک برداریم.

و من الله التوفيق
دکتر شمس الدین یوسفیان
مدیر مسئول انتشارات ارشدان

پیشگفتار مترجمان

کتاب حاضر، ترجمه کامل از ویرایش اول "اتوفاژی، عفونت و پاسخ ایمنی" نوشته «ویلیام تی. جکسون و میشل اس. سانسون» می‌باشد. کتاب طی ۱۸ فصل، طبق فهرست پیش رو نگارش شده و در آن به توضیح و بررسی «اتوفاژی و مکانیسم‌های مرتبط با بیماری زایی و درگیری سیستم ایمنی بدن انسان» می‌پردازد. کتاب پیش رو، شامل تصاویر و جداولی نیز می‌باشد که در ضمن توضیح مطالع، به تفهیم بهتر و ارتباط بین مفاهیم کمک می‌کند. فصول کتاب حاصل تحقیقات و نتایج محققان سراسر دنیا در حوزه‌های باکتری شناسی، فیزیولوژی و ایمنی شناسی می‌باشد که منابع مربوط به هر بخش مطرح شده، در انتهای هر بخش از مباحث آورده شده است. رابطه عفونت و ایمنی و اتوفاژی (خود خوری) به حوزه‌ای تبدیل شده است که مطالعات در آن در طول دهه گذشته به سرعت رشد یافته است و صدھا مقاله و کتاب جدید در این زمینه نوشته شده است. در حالی که برخی فرایندهای سلولی ضد عفونت هستند، اما ثابت شده است که اتوفاژی بخشی از پاسخ ایمنی ذاتی در برابر برخی از میکروبها است. از نقاط قوت این کتاب می‌توان به همکاری بیش از ۵۰ استاد دانشگاه و پژوهشگر در نگارش فصول مختلف کتاب، و جدید بودن آن اشاره کرد. در این کتاب به مباحثی همچون موارد زیر پرداخته شده است: اتوفاژی و ایمنی؛ تکنیک‌ها و روش‌های بررسی و پژوهش در زمینه اتوفاژی؛ اتوفاژی و عفونت ویروسی پیکورناویروس؛ فلاوی ویروس و اتوفاژی؛ نقش اتوفاژی در پاسخ ایمنی به ویروس‌ها؛ و نقش اتوفاژی در افزایش اثر واکسن BCG (ب.ث.ژ.).

امید است که ترجمه این کتاب توانسته باشد برای خوانندگان مفید واقع شده و برای دستیابی بهتر آنها، به درک از دنیای میکروبی و همه گیری‌های مرتبط با آن، به ویژه در دنیای امروزی که شاهد حضور بیماری‌های نوپدید می‌باشیم، کمک کرده باشد. مسلماً ترجمه این کتاب نیز همانند سایر کتب ترجمه شده این حوزه بدون اشکال و ایراد نبوده و خوانندگان در صورت برخورد با هرگونه مطلب که از زعم آنها مورد پذیرش نمی‌باشد به مترجمین کتاب از طریق راههای ارتباطی در دسترس اطلاع دهند. همچنین هرگونه نظر، ایده و ... که باعث بهتر شدن کتاب می‌گردد را نیز اعلام دارند تا در چاپ‌ها و ترجمه‌های بعد، برطرف و اعمال گردیده تا بهترین نسخه از کتاب برای خوانندگان در آینده ارائه گردد.

با تشکر فراوان (مترجمان کتاب)

فهرست مطالب

فصل ۱: اتوفازی و ایمنی	۱۷
۱۷.....	مقدمه
۱۸.....	اتوفازی
۱۸.....	انواع اتوفازی
۱۹.....	مورفولوژی
۲۰.....	ماشین مولکولی
۲۳.....	نقش‌های فیزیولوژیک
۲۴.....	اتوفازی و ایمنی
۲۴.....	زنوفازی (بیگانه خواری): پاکسازی اتوفازیک میکرووارگانیسم‌های درون سلولی
۲۹.....	اتوفازی و کرپتیدها
۳۰.....	اتوفازی و گیرندهای تشخیص الگو (PRR)
۳۱.....	اتوفازی و ارائه آنتی ژن MHC
۳۲.....	تنظیم اتوفازی توسط مولکول‌های پیام رسان ایمنی
۳۳.....	اتوفازی، التهاب، و خودایمنی
۳۴.....	نتیجه گیری
فصل ۲: تکنیک‌هایی برای مطالعه اتوفازی	۳۷
۳۷.....	مقدمه
۳۹.....	معرفها و ابزارهایی برای مطالعه اتوفازی
۳۹.....	معرف هایی برای نظارت بر شار لیزوژومی LC3-II
۴۰.....	معرف هایی که اتوفازی را القاء می‌کنند
۴۱.....	معرفها و ابزارهای نوترکیبی که اتوفازی را مهار می‌کنند
۴۲.....	تشخیص LC3-I و LC3-II با Immunoblotting
۴۳.....	آنالیزهای ایمونوفلورسانس LC3 درون زا
۴۳.....	نظارت بر اتوفازی با استفاده از LC3 دارای پروتئین فلورسنت
۴۵.....	آنالیز مورفولوژیکی اتوفاگوزوم‌ها و اتلیزوزوم‌ها توسط TEM

۴۷.....	مواد یا محلول‌های استوک.....
۴۸.....	جاسازی رزین پلت‌های سلولی یا میکروبها.....
۵۰.....	جاسازی مسطح رزین از سلول‌های رشد یافته روی لامل‌های شیشه‌ای یا پلاستیکی.....
۵۲.....	تکنیک‌هایی برای میکروسکوپ ایمنوالکترونی.....
۵۳.....	فصل ۳: نقش اتوفازی در عفونت ویروس‌های <i>DNA</i> دار در <i>in vivo</i>
۵۳.....	مقدمه
۵۵.....	تداخل درون تنی بین اتوفازی و ویروس‌های <i>DNA</i> دار در گیاهان و بی مهرگان
۵۵.....	تداخل درون تنی بین اتوفازی و ویروس‌های <i>DNA</i> دار در مهره داران
۵۵.....	اتوفازی یک مکانیسم ضد ویروسی ضروری است که در برابر HSV-1 در حالت درون تنی محافظت می‌کند
۵۷.....	اتوفازی یک مکانیسم دفاعی مهم میزبان در برابر عفونت 1 HSV در سیستم عصبی مرکزی و سیستم عصبی محیطی است.....
۶۱.....	اتوفازی نقش اساسی در ایمنی ضد 1 HSV ایفا می‌کند.....
۶۳.....	تعامل اتوفازی-HBV در <i>in vivo</i> : تعادل بین ویروسی.....
۶۳.....	استثمار و سرکوب تومور.....
۶۳.....	BV از اتوفازی برای تکثیر ویروسی استفاده می‌کند
۶۶.....	اتوفازی ممکن است انکوژن مرتبط با HBV را سرکوب کند
۶۶.....	اتوفازی ممکن است عفونت پایدار ویروس هرپس را سرکوب کند
۶۷.....	نتیجه گیری
۶۹.....	فصل ۴: مطالعه ویروس‌های <i>RNA</i> دار و اتوفازی <i>in vivo</i>
۶۹.....	مقدمه
۷۱.....	برهمکنش‌های <i>in vivo</i> بین اتوفازی و ویروس‌های <i>RNA</i> دار در گیاهان و بی مهرگان
۷۱.....	گیاهان
۷۱.....	بی مهرگان
۷۲.....	تعاملات درون تنی بین اتوفازی و ویروس‌های <i>RNA</i> در مهره داران
۷۲.....	Togaviridae
۷۳.....	Caliciviridae

آلودگی با ویروس RNA دار می‌تواند اتوفاژی را به طور غیرمستقیم تغییر دهد، بدون اینکه سلول‌های آسیب دیده را آلوده کند	73
75.....Orthomyxoviridae	
76.....Flaviviridae	
78.....Picornaviridae	
78.....مطالعات آزمایشگاهی پیکورناویروس‌ها و اتوفاژی	
79.....پیکورناویروس‌ها اتوفاژی را در داخل بدن فعال می‌کنند.....	
CVB3 با اتوفاژی سلول آسینار در داخل بدن تعامل دارد و به طور چشمگیری آن را تغییر می‌دهد	80
82.....عفونت CVB3 سلول‌های آسینار باعث ایجاد شبکه‌های پاراکریستالی می‌شود	
85.....حذف ژن Atg5، به طور خاص در سلول‌های آسینار، به طور قابل ملاحظه‌ای تکثیر CVB را تغییر می‌دهد	
86.....هیچ مرحله‌ای از چرخه زندگی ویروسی را نمی‌توان به عنوان مسئول تفاوت‌های بزرگ در <i>in vivo</i> در تیترها، شناسایی کرد	
88.....یک مسیر اتوفاژی سالم به طور قابل توجهی آسیب ناشی از ویروس را افزایش می‌دهد	
89.....عفونت CVB3 سلول‌های آسینار منجر به فعالیت تریپسین درون سلولی وابسته به اتوفاژی می‌شود	
91.....نتیجه گیری	

فصل ۵: اتوفاژی و عفونت پیکورناویروس.....	93.....
مقدمه	93.....
اتوفاژی انتخابی، گیرندگان اتوفاژی را با حوزه‌های فعل و انفعالات LC3 در بر می‌گیرد.....	95.....
فعال سازی اتوفاژی طی عفونت ویروسی	96.....
پیکورناویروس و اتوفاژی	97.....
پلی ویروس	98.....
ویروس کوکساکی	101.....
انتروویروس انسانی	102..... 71
ویروس انسفالومیوکاردیت	103.....
ویروس بیماری دهان و دندان	104.....
راینوویروس های انسانی	107.....

احتیاط در تفسیر القای نقطه LC3 و وزیکول‌های دو غشایی در زمنیه اتوفازی ۱۰۷	۱۰۷
نقطاً LC3 ۱۰۷	۱۰۷
نتیجه گیری و تحقیقات آتی ۱۱۱	۱۱۱

فصل ۶: فلاوی ویروس‌ها و اتوفازی ۱۱۳	۱۱۳
مقدمه ۱۱۳	۱۱۳
اتوفازی ۱۱۳	۱۱۳
فلاوی ویروس‌ها ۱۱۶	۱۱۶
ویروس دنگی ۱۱۸	۱۱۸
اتوفاگوزوم‌ها به عنوان بستری برای همانندسازی؟ ۱۲۰	۱۲۰
مدولاسیون متابولیسم لیپید ۱۲۱	۱۲۱
نقش بالقوه برای پروتئین‌های مرتبط به اتوفازی USP10 و USP13 در بلوغ ویریون ویروس دنگی ۱۲۴	۱۲۴
اتوفازی محافظ سلولی ۱۲۵	۱۲۵
نقش اتوفازی در یک مدل ADE از عفونت مونوسیت ۱۲۶	۱۲۶
اتوفازی در عفونت‌های ویروس دنگی در موش‌ها ۱۲۷	۱۲۷
فلاوی ویروس‌های دیگر ۱۲۸	۱۲۸
ویروس آنسفالیت ژاپنی ۱۲۸	۱۲۸
ویروس موداک ۱۳۰	۱۳۰
ویروس نیل غربی ۱۳۰	۱۳۰
بازنمود نتیجه ۱۳۲	۱۳۲
قدردانی ۱۳۴	۱۳۴

فصل ۷: اتوفازی: یک بازسازی کننده خانگی برای ویروس هپاتیت C ۱۳۵	۱۳۵
مقدمه ۱۳۵	۱۳۵
اتوفازی ۱۳۵	۱۳۵
بیماری ویروسی هپاتیت (HCP)، ژنوم و تکثیر ۱۳۸	۱۳۸
ویروس هپاتیت C یک اتوفازی پرورویروسی را القا می‌کند ۱۴۷	۱۴۷
چگونه ویروس هپاتیت C باعث تجمع وزیکول اتوفازی می‌شود؟ ۱۴۸	۱۴۸
بازسازی غشای پویا توسط اتوفازی ۱۵۰	۱۵۰

ارتباط متقابل اتوفازی با پاسخ ایمنی ذاتی ۱۵۳	
اتوفازی و مرگ سلولی ۱۵۶	
حذف رسوبات و اندامک‌های غیرعادی با اتوفازی: پیامدهایی برای آسیب کبدی مرتبط با هپاتیت C مزمن ۱۵۷	
اتوفازی و متاپولیسم لیپید ۱۵۷	
میتوفازی و پایداری ویروس هپاتیت C ۱۶۰	
نتیجه گیری و جهت گیری‌های آینده ۱۶۰	
قدرتانی ۱۶۳	
فصل ۸: تنظیم اتوفازی برای درمان نوع ۱ ویروس نقص ایمنی انسانی ۱۶۵	
مقدمه ۱۶۵	
HIV باعث تخریب اتوفازی جهت حفظ تکثیر خود می‌شود ۱۶۸	
HIV اتوفازی را در طول عفونت اولیه غیر فعال می‌کند در حالی که اتوفازی باعث غیر فعال شدن HIV می‌شود ۱۶۹	
اتوفازی ناشی از HIV در سلول‌های CD4+ T BYSTANDER منجر به مرگ سلولی می‌شود ۱۷۱	
تعدیل اتوفازی به عنوان مکانیزمی برای اختلالات عصبی مرتبط با HIV ۱۷۲	
چگونه می‌توان از اتوفازی برای کنترل و ریشه کن HIV استفاده کرد؟ ۱۷۴	
فصل ۹: اتوفازی در سلول عفونی: بینش‌هایی از باکتری‌های بیماری زا ۱۷۹	
مقدمه ۱۷۹	
اتوفازی – تعاملات باکتریایی ۱۷۹	
سالمونولا تیفی موریوم ۱۸۰	
مايكوباكتریوم توبرکلوزیس ۱۸۳	
لژیونلا نوموفیلا ۱۸۵	
لیستریا مونوسيتوژنز ۱۸۶	
شيگلا فلکسنری ۱۸۹	
مايكوباكتریوم مارینوم ۱۹۱	
نتیجه گیری ۱۹۲	

فصل ۱۰: پروتئین‌های Rab در اتوفازی: مدل استرپتوکوکوس	۱۹۵
مقدمه	۱۹۵
Rab GTPase	۱۹۵
نقش Rab GTPase در اتوفازی ناشی از گرسنگی سلولی	۱۹۶
لکولاژه شدن Rab در اتوفازی ناشی از عفونت استرپتوکوکی	۱۹۸
دخالت Rab7 در شکل گیری اولیه GcAv	۲۰۰
نیاز به Rab23 برای تشکیل GcAV	۲۰۱
تسهیل رشد GcAV و همچوشی لیزوژومی توسط Rab9A	۲۰۳
نتیجه گیری و دیدگاه	۲۰۴
فصل ۱۱: کنترل عفونت هلیکوباکترپیلوری با اتوفازی	۲۰۹
هلیکوباکترپیلوری	۲۰۹
هلیکوباکتر پیلوری و فرار از پاسخ‌های ایمنی میزبان	۲۱۶
اتوفازی	۲۱۹
عفونت حاد هلیکوباکتر پیلوری: القای اتوفازی در سلول‌های اپیتلیال معده	۲۲۲
عفونت مزمن هلیکوباکتر پیلوری: سرکوب اتوفازی در سلول‌های اپیتلیال معده	۲۲۷
هلیکوباکتر پیلوری و القای اتوفازی در سلول‌های ایمنی	۲۲۸
ژنتیک میزبان موثر بر پاکسازی اتوفازیک هلیکوباکتر پیلوری	۲۲۹
هلیکوباکتر پیلوری در اتوفازی مختل و سرطان معده	۲۳۰
درمان هلیکوباکتر پیلوری: آیا اتوفازی یک مدعی است؟	۲۳۱
اظهارات پایانی	۲۳۴
فصل ۱۲: برهمنکنش‌های بین سالمونلا و سیستم اتوفازی	۲۳۷
مقدمه	۲۳۷
زندگی سالمونلا درون میزبان	۲۳۷
بقای سالمونلا در زیستگاه داخل سلولی سخت	۲۳۸
مدل‌هایی برای مطالعه عفونت سالمونلا	۲۴۱
مکانیسم‌های اتوفازی سالمونلا	۲۴۲
سالمونلا هدف اتوفازی ضد باکتری است	۲۴۲
القای اتوفازی ضد باکتری	۲۴۳

سیگنال‌های مرا بخورید برای اتوفازی ضد باکتری ۲۴۶	
گیرنده‌های اتوفازی خصوصیتِ محموله را ارائه می‌دهد ۲۴۹	
اتوفازی سالمونلا درون تنی ۲۵۱	
اقدامات ضد باکتریایی ۲۵۲	
آیا سالمونلا می‌تواند با اتوفازی مقابله کند؟ ۲۵۲	
مکانیسم‌های اجتناب اتوفازی بالقوه ۲۵۲	
SseL توده‌های پروتئینی مورد هدف اتوفازی را از بین می‌برد ۲۵۳	
آیا سالمونلا، اتوفازی ضد باکتری انتخابی را مهار می‌کند؟ ۲۵۴	
چشم اندازها ۲۵۵	
فصل ۱۳: عوامل میزبان که اتوفازی را بعنوان دفاع در برابر توکسوپلاسمای گوندی بکار می‌گیرند..... ۲۵۷	
مقدمه ۲۵۷	
CD40، تخریب لیزوژومی و اتوفازی توکسوپلاسمای گوندی ۲۵۸	
واقع پایین دست CD40 در گیر در تحریک اتوفازی ۲۶۳	
ارتباط اتوفازی طی عفونت توکسوپلاسمای گوندی در داخل بدن ۲۶۵	
IFN-γ و ATG5 در عفونت توکسوپلاسمای گوندی ۲۶۶	
توکسوپلاسمای گوندی، علامت دهی سلول میزبان را برای مهار اتوفازی بوسیله ساختارهای LC3 ⁺ دستکاری و ماهیت غیر همچو شی واکوئل پارازیتوفور را حفظ می‌کند ۲۷۲	
دستگاه اتوفازی در توکسوپلاسمای گوندی ۲۷۳	
نتیجه گیری ۲۷۵	
تشکر و قدردانی ۲۷۵	
فصل ۱۴: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مسیر اتوفازیک ۲۷۷	
مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، یک پاتوژن که در یک محفظه ای برای جلوگیری از کشتن توسط سلول میزبان در یک محفظه مناسب خود قرار می‌گیرد ۲۷۷	
سیستم ترشح ESX-1 ۲۸۰	
مایکوباکتریوم مارینوم، یک هم خانواده نزدیک که فرار می‌کند و دُم‌های اکتین را در سیتوپلاسم می‌سازد ۲۸۱	
مایکوباکتریوم به طور فعال، اتوفازی را تعديل می‌کند ۲۸۲	

۲۸۷	مايكوباكتريوم توبركلوزيس، پاتوژني که قادر به فرار به سمت سيتوپلاسم نيز است
۲۹۰	نتایج اظهار شده
۲۹۱	فصل ۱۵: اتوفاژی، کاراچی و اکسن BCG را افزایش می دهد
۲۹۱	مقدمه
۲۹۴	القای اتوفاژی از طریق افزایشات mTOR
۲۹۵	اتوفاژی ناشی از راپامایسین، نمود آنتی ژن را در APCها افزایش می دهد
۲۹۶	راپامایسین و اتوفاژی ناشی از تورین-۱، نمود آنتی ژن و نیز ترشح IL-1 β از ب.ث.ژ. آلوده شده با APCها را افزایش می دهد
۲۹۸	مکانیسم‌های داخل سلولی مسیریابی اتوفاژیک واکسن ب.ث.ژ ذره ای و ترشح AG85B در اتوفاگوزوم‌ها و نمود آنتی ژن با واسطه MHC-II
۲۹۹	بيان بیش از حد Ag85B ترشح شده در واکسن ب.ث.ژ منجر به ساخت اگرزووم (توده پروتئین‌های بدتاخورده) در سیتوزول APCها می‌شود
۳۰۲	Ag85B بیش از حد بیان شده از واکسن ب.ث.ژ. اگرزووم‌ها را ایجاد می‌کند که نمود آنتی ژن را از طریق اتوفاژی افزایش می‌یابد
۳۰۳	بحث: مطالعات آزمایشگاهی بر روی اتوفاژی و نمود آنتی ژن
۳۰۷	فعال کردن سلول‌های دندریتیک توسط راپامایسین اثربخشی واکسن DC-BCG را افزایش می‌دهد
۳۰۹	بحث و گفتگو
CD4	تجویز همزمان راپامایسین با واکسن BCG در موش‌ها حفاظت میانجیگری شده سلول‌های T و CD8 بر علیه توبرکلوزیس را تقویت می‌نماید
۳۱۰	بحث و گفتگو
۳۱۶	نتایج
۳۱۷	قدرتانی و تشکر
۳۱۷	قدرتانی و تشکر

فصل ۱۶: مشارکت اتوفاژی جهت ایمنی ذاتی و تطبیقی: یک بررسی اجمالی... ۳۱۹

۳۱۹	آتوفاژی: مسیرهای مختلف به سوی هدف یکسان؟
۳۲۱	زینوفاژی: این دنیای، سگ سگ را می‌خورد است
۳۲۲	آتوفاژی و گیرنده‌های Toll-like: یک تحریک دو طرفه
۳۲۴	آتوفاژی و ارائه آنتیزن: فریادی برای کمک جهت زدودن مهاجمین بیماری زا

آتوفاژی و اینفلامازوم ها: تنظیم دوسویه برای یک پاسخ ایمنی اثربخش ۳۲۸	
مکالمه متقابل بین آتوفاژی و سایتوکاین ها ۳۲۹	
تشکر و قدردانی ۳۳۲	
فصل ۱۷: آتوفاژی در پاسخ های ایمنی به ویروس ها ۳۳۳	
ایمنی ذاتی در برابر ویروس ها ۳۳۳	
آتوفاژی در ایمنی ذاتی ضدویروسی ۳۳۷	
حس کردن ویروس جهت القای آتوفاژی ۳۳۷	
نقش آتوفاژی در زینوفاژی ویروس ها ۳۳۹	
نقش آتوفاژی در سیگنانل فرستادن ایمنی ذاتی ضدویروسی ۳۴۰	
دستکاری آتوفاژی بوسیله ویروس ها برای مقاومت در برابر ایمنی ذاتی ۳۴۳	
دستکاری آتوفاژی بوسیله ویروس ها جهت پیشگیری از سنتز IFN-I ۳۴۳	
ویروس ها آتوفاژی بر می اندازند تا مانع پاسخ های التهابی شوند ۳۴۵	
آتوفاژی و مرگ سلولی طی عفونت ویروسی ۳۴۶	
آتوفاژی در ایمنی تطبیقی ضدویروسی ۳۴۸	
ارتفاع پاسخ های ایمنی تطبیقی به عفونت ویروسی بوسیله آتوفاژی ۳۴۸	
ارائه اپیتوپ های ویروسی محدود شده توسط کلاس ۲ MHC ۳۴۹	
ارائه اپیتوپ های ویروسی محدود شده توسط کلاس ۱ MHC ۳۵۲	
آتوفاژی و ارائه متقاطع ۳۵۵	
دستکاری آتوفاژی توسط ویروس ها جهت فرار از ایمنی تطبیقی ۳۵۹	
مسیر ارائه آنتیژن کلاس ۲ MHC ۳۶۰	
مسیر ارائه آنتیژن کلاس ۱ MHC ۳۶۱	
آتوفاژی و عملکرد ارائه آنتیژن سلول ۳۶۱	
بیانات پایانی ۳۶۳	
تقدیر و تشکر ۳۶۴	
فصل ۱۸: فرآوری و ارائه آنتیژن ها توسط MHC بعد از اندوسیتوز، اگزوسیتوز و تجزیه سیتوپلاسم با کمک آتوفاژی ۳۶۵	
مقدمه ۳۶۵	
شناسایی زیر لایه توسط ماکروآتوفاژی ۳۶۸	

فرآوری آنتیژن برای ارائه کلاس ۲ MHC بوسیله ماکرواتوفاژی ۳۷۰
یک نقش ماکرواتوفاژی در ارائه آنتیژن کلاس ۱ MHC ۳۷۴
رهاسازی آنتیژن توسط اگزوسیتوز با کمک اتوفاژی ۳۷۵
فاغوسیتوز با کمک اتوفاژی ۳۷۷
نتیجه‌گیری‌ها و چشم انداز ۳۷۹
تقدیر و تشکر ۳۸۰
ضمیمه: مرور تصاویر مهم ۳۸۱

فصل ۱

اتوفاژی و ایمنی

مقدمه

اتوفاژی یک فرآیند بسیار کنترل شده است که در آن اجزای سلولی به طور خود به خود تخریب شده و سپس بازیافت می‌شوند. این مسیر تا حدی نقش "نظافتِ خانه" را در سلول ایفا می‌کند و محموله‌های متعددی را برای تجزیه به لیزوژوم (یا واکوئل موجود در مخمر و گیاهان) هدایت می‌کند. بسته به شرایط خاص، محموله‌ها شامل قسمت‌هایی تصادفی از سیتوپلاسم، پروتئین‌های تجمع یافته و اندام‌های آسیب دیده یا اضافی مانند میتوکندری و پراکسیزوم‌ها می‌شوند. اختلال در اتوفاژی با بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان، دیابت، میوپاتی، بیماری‌های قلبی، کبدی و ریوی و انواع خاصی از بیماری‌های عصبی مرتبط است.

مطالعات جدید نشان داده است که اتوفاژی نقش مهمی در ایمنی دارد. در سال ۲۰۰۴، مطالعات مستقلی برای اولین بار نشان دادند که پاتوتوزن‌های مهاجم می‌توانند محموله‌هایی برای اتوفاژی باشند. امروزه به خوبی پذیرفته شده است که اتوفاژی می‌تواند به طور مستقیم عوامل بیماری زای داخل سلولی، از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها را از بین ببرد. اتوفاژی همچنین می‌تواند آبشارهای سیگنال دهنده ایمنی ذاتی مانند مسیر گیرنده شبیه ناقوسی^۱ (TLR) را برای حمله به عوامل بیماری زا فعال کند. با این حال، میکروب‌ها دائمًا تحت فشار انتخابی قوی برای توسعه استراتژی‌هایی برای جلوگیری از مکانیسم‌های دفاعی میزبان قرار دارند. به علاوه،

^۱ Toll-like receptor

مطالعات نشان می‌دهند که برخی از سازگاری‌هایی که باعث بیماری زایی می‌شود شامل غیرفعال شدن میکروبی یا متوقف کردن اتوفاژی از طریق مکانیسم‌هایی متمایز است.

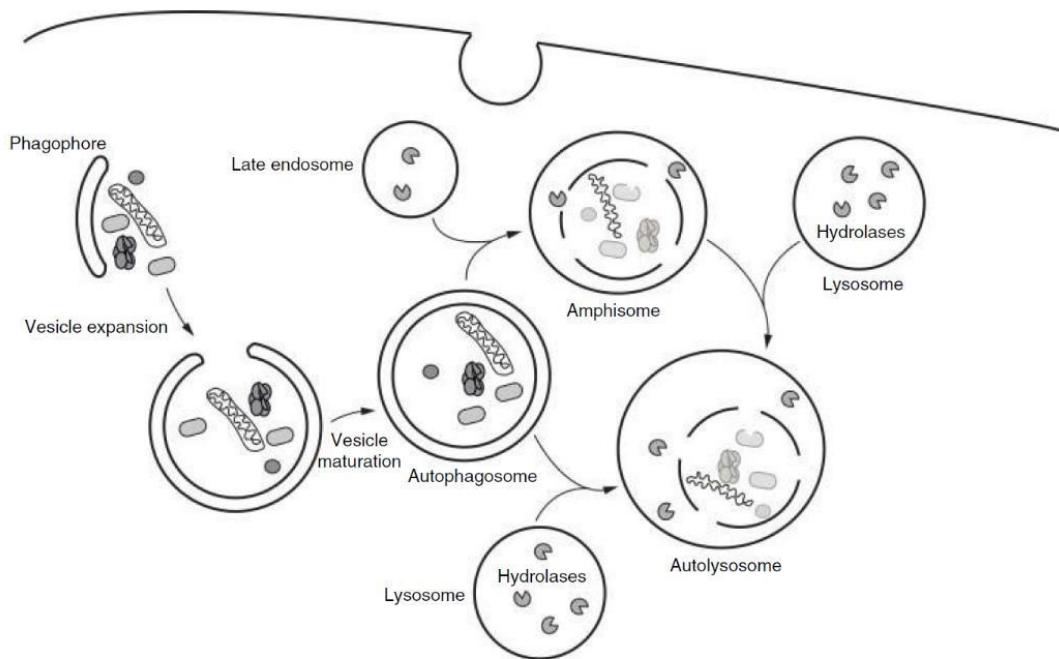
نقش اتوفاژی در ایمنی محدود به کنترل عفونت با حذف مستقیم عوامل بیماری زا نیست. به عنوان مثال، اتوفاژی ارائه آنتیزن MHC (مجتمع اصلی سازگاری بافتی) را تسهیل می‌کند و نشان می‌دهد که اتوفاژی در ایمنی تطبیقی همانند ایمنی ذاتی نقش دارد. علاوه بر این، نقش در اتوفاژی با بیماری‌های خود ایمنی مانند بیماری کرون نیز همراه است. بنابراین، اتوفاژی بخشی جدایی ناپذیر از واکنش ما به عفونت است و نقش مهمی در ایمنی بدن ایفا می‌کند. درک جامع از اتوفاژی در ارتباط با عفونت میکروبی و مکانیسم‌های مولکولی که بر تعامل بین اتوفاژی و مسیرهای پیام‌رسانی سیستم ایمنی تأثیر می‌گذارند، ممکن است ما را قادر سازد تا پاتوژن‌ز بسیاری از بیماری‌های عفونی و ایمنی را کشف کرده و استراتژی‌های درمانی موثرتری برای درمان آنها ایجاد کنیم.

اتوفاژی

أنواع اتوفاژي

سه نوع اصلی اتوفاژی وجود دارد: اتوفاژی با واسطه چپرون (CMA)، میکرو اتوفاژی و ماکرو اتوفاژی (شکل ۱.۱). CMA فرآیندی است که در آن پروتئین چپرون سیتوزولی، HSPA8/HSC70، پروتئین‌های بار خود را از طریق موتیف KFERQ-like منتقال می‌دهد و میکرو اتوفاژی شامل جذب بخش‌هایی از سیتوپلاسم با تو رفتگی مستقیم یا بیرون زدگی غشای لیزوژومی یا واکوئولی است. سومین فرآیند، ماکرو اتوفاژی، که ازین به بعد به عنوان اتوفاژی نامیده می‌شود، به خوبی شناخته شده است و تمرکز این فصل خواهد بود.

فصل ۱: اتوفاژی و آیمنی ۱۹



شکل ۱,۱ مدل شماتیک اتوفاژی پستانداران. بارهایی از جمله پروتئین‌های سیتوزولی، پروتئین‌های تجمع یافته و اندام‌های آسیب دیده توسط یک فاگوفور به دام افتاده می‌شوند، که منبسط و بالغ شده و یک اتوفاگوزوم کامل را تشکیل می‌دهد. غشای خارجی اتوفاگوزوم یا با اندوزوم دیررس (که آمفیزوم را تشکیل می‌دهد، سپس با لیزوژوم ترکیب می‌شود) و یا لیزوژوم، ترکیب شده (همجوشی) و اتوالیزوژوم را تشکیل می‌دهد. در نهایت، بارها به همراه غشای داخلی تخریب شده و محصولات تجزیه شده مجدد برای استفاده مجدد در سیتوزول آزاد می‌شوند.

مورفولوژی

مشخصه ریخت‌شناسی اتوفاژی شامل تشکیل یک اندامک دو غشایی به نام اتوفاگوزوم است؛ با این حال، این ساختار اساساً محصول نهایی فرایند تجزیه است و در واقع واحد اصلی عملکردی اتوفاژی نیست. در عوض پیش ساز اتوفاگوزوم، فاگوفور، ساختار غشایی پویائی است که مسئول تخریب بارها مانند اندامک‌های آسیب دیده و عوامل بیماری زا است (شکل ۱,۱). فاگوفور با افزوده شدن غشا بزرگ می‌شود که منبع آن تقریباً همه اندام‌های داخل سلولی را شامل می‌شود. پس از اتمام، فاگوفور محکم و مهر و موم شده و تبدیل به اتوفاگوزوم کامل می‌شود. اتوفاگوزوم ممکن است مستقیماً با لیزوژوم یا ابتدا با اندوزوم دیررس ترکیب شده و آمفیزوم میانی را ایجاد کند. ادغام بعدی غشای خارجی اتوفاگوزوم یا غشای محدود کننده آمفیزوم با لیزوژوم باعث ایجاد اتوالیزوژوم شده و بارها را در معرض آنزیم‌های تجزیه کننده لیزوژومی قرار می‌دهد.

محصولات حاصل از تجزیه، به ویژه اسیدهای آمینه، پس از آن دوباره به سیتوزول آزاد می‌شوند و در تولید انرژی یا به عنوان بسترها مسیرهای بیوسنتزی استفاده می‌شوند.

ماشین مولکولی

اگرچه اتوفاغوزوم‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی در دهه ۱۹۵۰ مشاهده شده‌اند، اما مکانیسم‌های مولکولی اتوفازی تا دو دهه گذشته ضعیف مطالعه شده بود. ماشین مولکولی ابتدا از طریق مطالعات روی مخمر جوانه زننده، *Saccharomyces cerevisiae* شناسایی شد و تا به امروز بیش از ۳۰ ژن مرتبط با اتوفازی (ATG) که در این فرآیند دخیل‌اند، شناسایی شده است. کارهای بعدی با سلول‌های پستانداران، همولوگ‌های اصلی ماشین اتوفازی را آشکار کرده است، و از این ایده حمایت می‌کند که اتوفازی از لحاظ تکاملی حفظ شده است. در عین حال، تعداد فرآینده‌ای از پروتئین‌های ATG در پستانداران و سایر سیستم‌های مدل مانند *Caenorhabditis elegans* که قادر همولوگ در مخمر هستند، شناسایی شده است که نشان دهنده افزایش پیچیدگی و تنوع عملکرد در یوکاریوت‌های پیشرفت‌تر است. برای سهولت در بحث، ماشین پروتئینی اتوفازی به چهار کمپلکس اصلی در بخش‌های زیر تقسیم می‌شود و ما بر روی ماشین اتوفازی پستانداران تمرکز می‌کنیم.

کمپلکس ULK1/ULK2. اتوفازی در شرایط عادی در سطوح پایه در سلول‌ها رخ می‌دهد. در اثر استرس یا سایر محرک‌ها، اتوفازی می‌تواند ایجاد شود و نقص در تنظیماتی که از القای مناسب آن جلوگیری می‌کنند می‌تواند منجر به فیزیولوژی ناهنجار سلول شوند؛ با این حال، فعالیت بیش از حد اتوفازی نیز می‌تواند برای سلول مضر باشد. بنابراین، سطوح اتوفازی باید به شدت کنترل شود. بر این اساس، عوامل مختلفی برای تنظیم القای اتوفازی وجود دارد و مطالعات نشان داده است که کمپلکس ULK1/ULK2 (کیناز ۲/۱ فعال کننده اتوفازی شبه unc-51) تا حدی در مراحل اولیه تنظیم اتوفازی عمل می‌کند.

RB1CC1/FIP200 کیناز هستند و سایر اجزای کمپلکس عبارتند از ATG13، ULK1 و ULK2 (مارپیچ^۱ القایی ۱ - RB1) و ATG101. ATG13 به طور مستقیم با ULK1/ULK2 و RB1CC1 بدون توجه به در دسترس بودن مواد مغذی تعامل دارد؛ با این حال، وضعیت

^۱ coiled-coil

فسفوریلاسیون این پروتئین‌ها تحت شرایط مختلف تغییر می‌کند. در شرایط غنی از مواد مغذی، یک تنظیم‌کننده منفی بالادستی اتوفاژی، هدف مکانیکی کمپلکس ۱ راپامایسین (MTORC1)، با کمپلکس تعامل کرده و ULK1/ULK2 و ATG13 را فسفریله می‌کند و فعالیت کیناز ULK1/ULK2 را مهار می‌کند. در زمان گرسنگی، از کمپلکس آزاد می‌شود. سپس ULK1/ULK2 و ATG13 تا حدی دفسفوریله شده و منجر به فعال شدن فعالیت ULK1/ULK2 کیناز می‌شوند که به نوبه خود منجر به فسفوریلاسیون ATG13 (احتمالاً در مکان‌هایی متمایز از مواردی که توسط MTORC1 استفاده می‌شود) و RB1CC1 برای ایجاد اتوفاژی می‌شود. همچنین AMPK (پروتئین کیناز فعال شده با AMP) به ULK1/ULK2 متصل شده و اتوفاژی را از طریق فسفوریلاسیون بر اثر کمبود گلوکز، به طور مثبت، تنظیم می‌کند؛ همانطور که انتظار می‌رفت، AMPK و ULK1، MTORC1 را در سایت‌های مختلف فسفریله می‌کند.

کمپلکس‌های فسفاتیدیلینوزیتول ۳-کیناز کلاس III. فسفاتیدیلینوزیتول ۳-کیناز کلاس III (PtdIns3K) عموماً تصور می‌شود که در پایین دست کمپلکس ۲ ULK1/ULK2 عمل می‌کند و واسطه تشکیل فسفاتیدیلینوزیتول-۳-فسفات (PtdIns3P) بر غشای فاگوفور است، رویدادی که برای اتوفاژی ضروری است. PtdIns3P برای جذب عوامل پایین دستی مانند WIPI1 (دومین تکرار شونده WD، برهمنکنش کننده با فسفواینوزیتید ۱) و WIPI2 که در جایجایی ATG9 دخیل هستند و بلوغ اتوفاگوزومی را آغاز می‌کند، عمل می‌کند. در پستانداران، کمپلکس‌های PtdIns3K کلاس III متعددی وجود دارد که اجزای اصلی آن PIK3C3/VPS34 (فسفاتیدیل‌نوزیتول ۳-کیناز، زیر واحد کاتالیزوری نوع ۳)، ۱ BECN1/Beclin (بکلین ۱، مربوط به اتوفاژی)، و ۰/0150/PIK3R4/VPS15 (فسفوئینوزیتید-۳-کیناز، زیر واحد تنظیمی ۴) هستند. BECN1 می‌تواند برای چندین کمپلکس متمایز، با چندین پروتئین از جمله AMBRA1 (تنظیم کننده اتوفاژی/بکلین-۱)، UVRAG، ATG14/ATG14L/Barkor (مربوط به مقاومت در برابر اشعه ماوراء بنفش)، KIAA0226/Rubicon و BCL2 (سلول CLL/لنفوما ۲) تعامل داشته باشد. BECN1 برای اولین بار به عنوان یک پروتئین اتصال شونده به BCL2 شناسایی شد. برهمنکنش بین BECN1 و BCL2 از اتصال اولیه با PIK3C3 جلوگیری کرده و بنابراین اتوفاژی را مهار می‌کند. کمپلکس AMBRA1-PIK3R4-PIK3C3-BECN1-ATG14 مخصوص اتوفاژی است؛ ATG14 ممکن است این کمپلکس را برای شروع بیوژنز اتوفاگوزوم به فاگوفور

- هدایت کند، در حالی که کمپلکس SH3GLB1 (دومین SH3 اندوفیلین B1 شبه GRB2) در مراحل بعدی برای شروع بلوغ اتوفاگوزوم عمل می‌کند. در مقابل، کمپلکس PIK3R4-PIK3C3-BECN1-UVRAG-PIK3R4-PIK3C3-BECN1-UVRAG-KIAA0226 درون اندوزوم‌های دیررس قرار گرفته و بلوغ اتوفاگوزوم را به طور منفی تنظیم می‌کند.

سیستم انتقالی ATG9. سیستم انتقالی ATG9 به بهترین شکل در مخمرها مشخص شده است، اگرچه حتی در این ارگانیسم مدل نیز سوالات زیادی وجود دارد که باید به آنها پاسخ داده شود. مدل فعلی این است که پروتئین بین غشائی ATG9 بین محل مونتاژ فاگوفور (PAS) و مکان‌های محیطی (به عنوان مثال، غیر PAS) رفت و آمد کرده و این فرآیند برای تحویل مناسب غشاء از اندامک‌های دهنده مختلف به فاگوفور در حال گسترش، مورد نیاز است. ATG23 و ATG27 با ATG9 تعامل دارند و حرکت جلوبرنده آن را از سایت‌های محیطی به PAS تسهیل می‌کنند، در حالی که کمپلکس ATG13-ATG1 و ATG18-ATG2 (همولوگ مخمر کمپلکس ULK1/ULK2) برای انتقال رو به عقب آن از PAS به سایت‌های محیطی مورد نیاز هستند.

در پستانداران، در شرایط غنی مواد مغذی، ATG9 در شبکه ترانس گلژی و اندوزومها قرار می‌گیرد. مجموعه ای از ATG9 ها، پس از گرسنگی، به محفظه‌های MAP1LC3 (زنجیره سبک ۳ پروتئین مرتبط با میکروتوبول ۱/LC3/ LC3/1) مثبت، منتقل می‌شوند. این انتقال به فعالیت کینازی ULK1 و PIK3C3 وابسته است. حرکت پویا بین ATG9 و غشای فاگوفور در طول اتوفاژی نشان دهنده نقش حفظ شده ATG9 در حرکت غشاء در طول گسترش فاگوفور است. مشابه مخمر، بازیابی ATG9 از غشای فاگوفور وابسته به WIPI2، همولوگ مخمر ATG18، بوده اما حرکت در این جهت مستقل از ULK1 کیناز است.

سیستم‌های کونژوگاسیون شبه یوبیکوئیتین¹. دو سیستم کونژوگاسیون شبه یوبیکوئیتین (UBL) وجود دارد که شامل پروتئین‌های ATG12 و LC3 می‌شوند. این سیستم‌ها کاملاً به خوبی مطالعه شده‌اند و نقش مهمی در گسترش و بلوغ فاگوفور ایفا می‌کنند. ATG12 با ATG5 به روشی شبیه به یوبیکوئیتیناسیون معمول، کونژوگه شده است. آنزیم E1-مانند ATG12، ATG7 را از طریق پیوند تیواستری فعال می‌کند. سپس ATG12 قبل از اینکه در نهایت به لیزین داخلی ATG5 کونژوگه شود به یک آنزیم E2-مانند به نام ATG10 منتقل

¹ Ubiquitin-like

می‌شود. سپس ATG5 به صورت غیرکوالانسی به ATG16L1 متصل شده و متعاقباً دایمر می‌شود. در طی اتوفاژی، ATG5 کمپلکس ATG16L1-ATG5-ATG12 را به فاگوفور هدایت می‌کند.

ایزوفرم‌های مختلف LC3 (و پروتئین‌های زیرخانواده وابسته به GABARAP (پروتئین مرتبط با گیرنده (A) GABA)) با فسفاتیدیل اتانول آمین (PE) کونژوگه می‌شوند و این تغییر برای ارتباط با غشای فاگوفور لازم است. در ابتدا، سیستئین پروتئاز ATG4B اسیدهای آمینه C ترمینال pro-LC3 را حذف می‌کند تا بقایای گلیسین را آشکار کند و یک فرم سیتوزولی به نام LC3-I ایجاد کند. سپس LC3-I متعاقباً توسط ATG7 فعال شده و از طریق آنزیم E2-مانند ATG3 کونژوگه می‌شود، که منجر به ایجاد شکل مرتبط با غشاء، LC3-II می‌شود. گروه PE در نهایت می‌تواند توسط ATG4B در یک مرحله جداسازی، که برای حفظ سطح مناسب فعالیت اتوفاژی مهم است، جدا شود.

نقش‌های فیزیولوژیکی

اتوفاژی نقشهای فیزیولوژیکی زیادی دارد. اولاً، اتوفاژی یک مکانیسم محافظ در برابر استرس سلولی است. برای مثال، اتوفاژی در تامین قطعات ساختاری ضروری یا سوبسٹراهای متابولیکی مانند اسیدهای آمینه که در شرایط محرومیت از مواد مغذی برای حفظ بقای سلول در شرایط نامطلوب حیاتی هستند، نقش دارد؛ تخریب و بازیافت اتوفاژیک سلول‌ها را قادر می‌سازد تا سنتز پروتئین‌های ضروری را حفظ کرده و ATP تولید کنند.

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که اتوفاژی نیز در طول رشد ضروری است. یک نمونه از چنین نقشی پس از لقاح تخمک در *C. elegans* دیده می‌شود که در آن اتوفاژی در از بین بردن میتوکندری‌های مادر نقش دارد؛ با این حال، به نظر نمی‌رسد این مورد در پستانداران وجود داشته باشد. علاوه بر این، در طول رشد جنبی، پاکسازی سلول‌های آپوپوتیک از طریق اتوفاژی حاصل می‌شود. اتوفاژی در افزایش طول عمر نیز نقش دارد؛ القای اتوفاژی باعث افزایش طول عمر در چندین ارگانیسم مدل شده است و نقش آن در پاکسازی پروتئین‌های مستعد تجمع و میتوکندری‌های آسیب دیده ممکن است با اثرات ضد پیری آن مرتبط باشد.

از آنجایی که اتوفاژی برای از بین بردن بسیاری از اجزای مضر در سلول عمل می‌کند، سوء عملکرد اتوفاژی نیز با بیماری‌های مختلفی مانند سرطان، تخریب عصبی، میوپاتی‌های قلبی عروقی و اختلالات ذخیره سازی لیزوژومی مرتبط بوده و یا علت آن است. به عنوان مثال، تخریب انتخابی میتوکندری‌های آسیب دیده به عنوان زمینه ساز اثرات ضد توموری اتوفاژی، احتمالاً از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و جلوگیری از آسیب DNA، فرض شده است. چندین خط شواهد نشان می‌دهند که نقش اتوفاژی در پاکسازی پروتئین‌های سمی مستعد تجمع برای جلوگیری از انواع خاصی از تخریب عصبی، از جمله موارد مرتبط با بیماری‌های هانتینگتون، آلزایمر و پارکینسون، حیاتی است.

اتوفاژی و ایمنی

زنوفاژی (بیگانه خواری): پاکسازی اتوفاژیک میکرووارگانیسم‌های درون سلولی

برای دهه‌ها، دانشمندان چگونگی مبارزه بدن ما با عوامل بیماری‌زای مهاجم را بررسی کرده‌اند. حتی با وجود اینکه شناخت سیستم ایمنی ما به طور پیوسته افزایش یافته، یک مشکل عمدۀ نادیده گرفته شدن یا حداقل بی پاسخ ماندن این سوال است که چگونه یک سلول، یک پاتوژن درون سلولی را بدون آسیب رساندن به خود تجزیه می‌کند؟ اخیراً محققان دریافت‌های اتوفاژی نقشی حیاتی در این فرآیند بازی می‌کند. این نوع خاص از اتوفاژی "زنوفاژی" نامیده می‌شود.

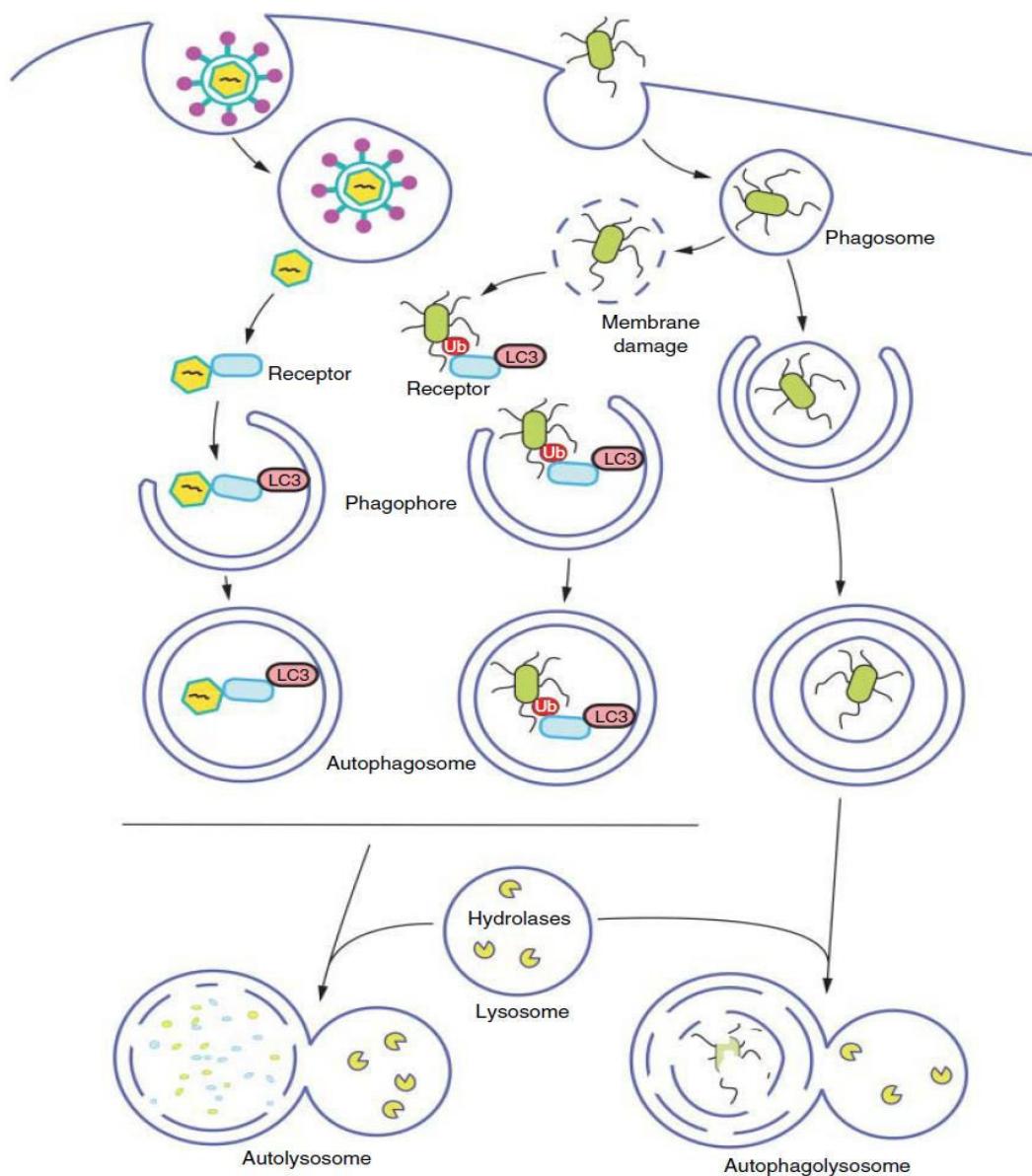
تخریب اتوفاژیک باکتری‌ها و انگل‌ها. چندین مطالعه مستقل نشان داده است که زنوفاژی بسیاری از باکتری‌های مختلف و سایر میکروب‌ها را از بین می‌برد. نمونه خوبی از پاکسازی انگل توسط *Toxoplasma gondii* دیده شده است. این انگل قادر است در داخل ماکروفازها با جاگیری در واکوئل‌های انگل ساز¹ که برای جلوگیری از همچوشه با لیزوژوم‌ها تغییر یافته‌اند، زنده بماند. با این حال، تحریک ماکروفازهای آلوده به CD40 با (مولکول CD40، عضو سوپرخانواده گیرنده TNF)، عضوی از ابرخانواده گیرنده TNF (فاکتور نکروزه کننده تومور)، باعث همنشین² شدن واکوئل‌های انگل ساز و LC3 می‌شود. بر عکس، درمان سلول‌های آلوده با مهارکننده اتوفاژی ۳-متیل آدنین (MA-۳) یا حذف BECN1، ادغام واکوئل‌های انگل ساز با محفظه‌های لیزوژومی را مسدود می‌کند. بنابراین، این نتایج نشان

¹ parasitophorous

² colocalization

می‌دهد که فاگوفورها انگل‌هایی را که در این واکوئل‌ها ساکن هستند، گرفته و آنها را برای تخریب به سمت لیزوژوم هدایت می‌کنند.

در مورد پاکسازی باکتریایی، شواهد نشان می‌دهد که اتوفاگوزوم‌ها می‌توانند هم باکتری‌هایی را که در بخش‌های غشایی ساکن هستند و هم باکتری‌های موجود در سیتوزول را از طریق مکانیسم‌هایی که همپوشانی دارند، اما متمایز هستند، توقیف کنند (شکل ۱,۲). پاکسازی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نمونه خوبی از بلعیدن باکتری‌های ساکن در فاگوزوم است. پس از ورود به سلول از طریق اندوسیتوز، *M. tuberculosis* می‌تواند به طور فعال در سلول میزبان زنده بماند و با مهار بلوغ فاگوزوم از دفاع میزبان فرار کند. با این حال، اگر اتوفاژی با کمبود نیتروژن یا تیمار را پامایسین ایجاد شود، مهار بلوغ فاگوزومی توسط *M. tuberculosis* سرکوب شده و بقای باکتری‌های داخل سلولی به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. همچنین، تجمع قابل توجهی از فاگوزومهای حاوی *M. tuberculosis* با اتوفاگوزومها پس از القای اتوفاژی مشاهده می‌شوند که این ایده را پشتیبانی می‌کند که فاگوفورها باکتری‌های ساکن در داخل فاگوزوم‌ها را می‌گیرند و آنها را برای تخریب به بخش‌های لیزوژومی می‌رسانند.



شکل ۱,۲ مدل‌های حذف اتوفازیک پاتوژن‌های مهاجم، بروتین‌های ویروسی درون سلولی توسط گیرنده‌های اتوفازی شناخته شده و با تعامل بین گیرنده‌ها و LC3 در اتوفاغوزوم‌ها جذب می‌شوند. هم باکتری‌های داخل فاگوزوم‌ها و هم باکتری‌هایی که از فاگوزوم‌ها فرار کرده‌اند می‌توانند از طریق اتوفازی تجزیه شوند. باکتری‌های ساکن در فاگوزوم می‌توانند توسط فاگوفور بلعیده شوند. پس از اتمام جداسازی، اتوفاغوزوم حاصله سپس با لیزوزوم ترکیب می‌شود و یک اتوفاغولیزوزوم ایجاد می‌کند. (توجه داشته باشید که ما قویاً توصیه می‌کنیم که این اصطلاح برای توصیف فضایی که از ادغام لیزوزوم‌ها با اتوفاغوزوم‌های حاوی فاگوزوم‌ها به وجود می‌آید، و نه برای فضاهایی که از ادغام سایر اتوفاغوزوم‌ها با لیزوزوم‌ها به وجود می‌آیند و اتولیزوزوم نامیده می‌شوند، استفاده شود). برخی از باکتری‌ها می‌توانند به غشای فاگوزومی آسیب رسانده و به سیتوپلاسم سلول میزبان فرار کنند. این باکتری‌های سیتوزوولی پلی یوبی کوئیتینه می‌شوند و توسط پروتین‌های گیرنده اتوفازی شناسایی و به فاگوفورها تحويل داده می‌شوند.

با توجه به باکتری‌های سیتوزولی، یک مشکل/چالش عمدۀ این است که این میکروب‌ها باید به طور خاص شناسایی و از سایر غشاهای درونی «خودی»، از جمله نوادگان درون همزیست آن‌ها، میتوکندری، تشخیص داده شوند. اتوفاژی ناشی از گرسنگی معمولاً غیرانتخابی است، اما انواع انتخابی اتوفاژی نیز وجود دارد. مطالعات اخیر در مورد اتوفاژی انتخابی یک مدل بار-لیگاند-گیرنده-داربست مشترک را نشان می‌دهد. یک پروتئین گیرنده لیگاندهای روی بارها را شناسایی می‌کند و همزمان به پروتئین داربست دستگاه اتوفاژی متصل می‌شود که در نتیجه به طور انتخابی بارها در مسیر اتوفاژی قرار می‌گیرند. گیرنده‌های خاصی شناسایی شده‌اند که باکتری‌های داخل سلولی را در طی زنوفاژی تشخیص می‌دهند، از جمله SQSTM1/p62 (دومین ۱)، NBR1 (همسایه ۱ ژن BRCA1)، CALCOCO2/NDP52 (دومین ۲) متصل شونده به کلسیم و مارپیچ (optineurin). معمولاً باکتری‌های داخل سلولی سیتوزولی با پلی یوبی‌کوئیتین پوشانده می‌شوند و این گیرنده‌ها می‌توانند به طور همزمان باکتری‌های یوبی‌کوئیتین و LC3 را به هم متصل کرده و بار را با دستگاه اتوفاژی مرتبط کنند. به این ترتیب، باکتری‌های داخل سلولی به طور خاص، برای تخریب، هدف قرار می‌گیرند.

علیرغم کاربرد زنوفاژی در تخریب باکتری‌های داخل سلولی، پاتوژن‌های خاصی در توسعه استراتژی‌هایی برای فرار از اتوفاژی موفق بوده‌اند. یکی از نمونه‌های چنین فراری در لیستریا *L. monocytogenes* مونوسیتوژنیز دیده می‌شود. پس از عفونت ماکروفاژهای میزبان، جمعیتی از فاگوسیت‌ها آسیب می‌رسانند و به داخل سیتوزول رها می‌شوند، جایی که در نهایت با اتوفاژی شناسایی می‌شوند. با این حال، بیان عامل حدت ActA، باعث پلیمریزاسیون اکتین سلول میزبان می‌شود. این امر باعث تحرک مبتنی بر اکتین برای باکتری‌ها شده و به گسترش سلول به سلول و جلوگیری از تخریب اتوفاژیک منجر می‌شود.

حذف اتوفاژیک ویروس‌ها. بار زنوفاژی به انگل‌ها و باکتری‌های تک یاخته‌ای محدود نمی‌شود. اتوفاژی همچنین می‌تواند ویروس‌های مهاجم را نیز به دام بیاندازد. به طور کلی، مکانیسم درگیر در شناسایی ویروس‌ها و جداسازی آنها توسط فاگوسیت‌ها از نظر مفهومی مشابه با باکتری‌های سیتوزولی است (شکل ۱,۲). به عنوان مثال، پس از آن که ویروس Sindbis سیستم عصبی مرکزی موش را آلوده می‌کند، SQSTM1 با پروتئین‌های کپسیدی ویروس Sindbis، برهمنکش کرده و باعث تخریب بیشتر آنها از طریق اتوفاژی می‌شود. این عمل به طور قابل توجهی مرگ سلولی ناشی از ویروس را کاهش می‌دهد.

مانند باکتری‌ها، بسیاری از ویروس‌ها نیز برای جلوگیری از اتوفاژی عمل می‌کنند تا بتوانند سبب بیماری شوند. ویروس‌های متعددی می‌توانند مسیرهای پیام رسانی ضد ویروسی را که باعث اتوفاژی می‌شوند مهار کرده و یا یک مسیر بازدارنده اتوفاژی را فعال کنند. EIF2AK2/PKR (فاکتور شروع ترجمه یوکاربیوتی ۲-آلfa کیناز ۲) یک حسگر RNA دو رشته‌ای القایی با اینترفرون است که از طریق فسفوریلاسیون EIF2A (فاکتور شروع ترجمه یوکاربیوتی ۲، A₂, ۶۵ کیلو دالتون) باعث کاهش کلی ترجمه در سلول‌های میزبان می‌شود. این مسیر سیگنالینگ همچنین به طور مثبت اتوفاژی ناشی از ویروس را تنظیم می‌کند. ویروس‌ها استراتژی‌های متعددی را برای مسدود کردن مسیر EIF2AK2 توسعه داده‌اند. به عنوان مثال، در طول عفونت، ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (HSV-1) پروتئین US11، برای مقابله با فسفوریلاسیون که با واسطه EIF2AK2 انجام می‌شود، را بیان می‌کند که به کیناز متصل و بنابراین از EIF2A القای اتوفاژی جلوگیری می‌کند. همانطور که در بالا توضیح داده شد، سیگنالینگ MTOR یک تنظیم کننده منفی اتوفاژی است. پس از آلوده شدن سلول‌های دندریتیک، ویروس نقص ایمنی انسانی ۱ (HIV-1) با القاء MTOR و کیناز S6 RPS6KB/p70 (پروتئین کیناز ریبوzومی S6، ۷۰ کیلو دالتون)، اتوفاژی را کاهش داده و بنابراین تکثیر ویروس را در سلول‌های میزبان تحریک می‌کند.

علاوه بر این، یک عامل شدت بیماری زایی ممکن است مستقیماً دستگاه اتوفاژی را برای تنظیم منفی اتوفاژی مورد هدف قرار دهد. به عنوان مثال، پروتئین ICP34.5 در HSV-1 به BECN1 متصل می‌شود تا اتوفاژی را، احتمالاً از طریق مهار فعالیت کیناز PIK3C3، مسدود کند.

نمونه دیگری از فرار ویروسی از اتوفاژی، در همولوگ‌های ویروسی CFLAR/FLIP (تنظیم کننده آپوپتوز شبه CASP8 و FADD)، که توسط ویروس تبخل مرتبط با سارکوم Kaposi، *Molluscum contagiosum* و *Herpesvirus saimiri*^۱، که می‌تواند مستقیماً با ATG3 برهمکنش داشته باشد، دیده شده است. برهم کنش بین پروتئین‌های CFLAR ویروسی و ATG3 مانع از اتصال به LC3 شده و بنابراین مانع بیوژنر اتوفاگوزوم می‌شود.

^۱ آنزیم شبه E2 که کونژوگه شدن LC3 با PE را ممکن می‌کند

علاوه بر این، برخی از ویروس‌ها باعث ایجاد اتوفاژی می‌شوند اما تجزیه اتوفاژیک را مسدود کرده و تکثیر ویروس را در سلول‌های میزبان تسهیل می‌کنند. پس از عفونت سلول‌های هپاتومای انسانی، پروتئین X ویروس هپاتیت B به PtdIns3K کلاس III متصل می‌شود تا فعالیت خود را افزایش داده و بنابراین شروع اتوفاژی را تحریک کند. با این حال، این القاء اتوفاژی با افزایش تخریب اتوفاژیک پروتئین همراه نیست. در واقع، القای پاسخ اتوفاژیک، تکثیر DNA ویروسی را افزایش می‌دهد، در حالی که از حذف ATG7 سطح DNA ویروس هپاتیت B را در سلول‌های میزبان آلوده، به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد. بنابراین، با القای تشکیل اتوفاگوزوم اما مسدود کردن پاکسازی و تخریب اتوفاگوزوم، ویروس‌ها یک نیچ^۱ تکثیری را در داخل این محفظه ایجاد می‌کنند.

به طور خلاصه، زنوفاژی با حذف مستقیم عوامل بیماری زاء، از سلول‌های میزبان محافظت می‌کند. با این حال، عوامل بیماری زای درون سلولی نیز راهکارهای متعددی را برای فرار از اتوفاژی برای ایجاد بیماری زایی بوجود آورده‌اند. بحث ما در مورد این موضوع فقط اطلاعات کلی در مورد زنوفاژی ارائه می‌دهد. چندین فصل در این کتاب با جزئیات بسیار بیشتری در مورد نقش اتوفاژی در دفاع در برابر عفونت‌های باکتریایی و ویروسی می‌پردازد.

اتوفاژی و کریپتیدها

مثال دیگری از نقش اتوفاژی در ایمنی ذاتی، دخالت اتوفاژی در تولید کریپتیدها (پیتیدهای نئوآنتی میکروبیال) از پروتئین‌های سیتوزولی است که علیه میکروب‌های داخل سلولی عمل می‌کنند. همانطور که در بالا ذکر شد، باکتری *M. tuberculosis* از طریق مهار بلوغ فاگوزومی می‌تواند به طور فعال در فاگوزوم‌های سلول‌های میزبان زنده بماند. گذشته از حذف مستقیم باکتری‌های ساکن در فاگوزوم‌ها (شکل ۱,۲)، اتوفاژی همچنین کشتن باکتری‌ها را از طریق رساندن کریپتیدها به فاگوزوم‌های حاوی مایکروبکتریوم نیز تسهیل می‌کند.

در سلول‌های آلوده به *M. tuberculosis*، پروتئین گیرنده اتوفاژی SQSTM1/p62، پروتئین‌های میکروب کش سیتوزولی مانند FAU (تلفیقی از پروتئین شبه یوبیکوئیتین با RPS30) را در اتوفاگوزوم‌ها جذب می‌کند که باعث تجزیه پروتئولیتیک آنها به پیتیدهای کوچکتر با فعالیت ضد

¹ Niche

میکروبی می‌شود (به عنوان مثال، کریپتیدها)، که سپس به فاگوزوم‌های حاوی مایکوباتریوم منتقل می‌شوند. در یک مطالعه، عصاره‌های فاگوزوم‌های تصفیه شده از سلول‌های وحشی که برای اتوفازی ایجاد شده اند، توانایی کشتار قابل توجهی برای *M. tuberculosis* را در محیط *in vitro* نشان می‌دادند، اما نه آنها‌یی که از سلول‌های بدون SQSTM1 بدست آمده بودند. این نتایج این ایده را تأیید می‌کند که تحويل اتوفازیک کریپتیدها به فاگوزوم‌های حاوی باکتری، کنترل عفونت میکروبی را تسهیل می‌کند.

اتوفازی و گیرندهای تشخیص الگو (PRR)

به عنوان بخشی از سیستم ایمنی ذاتی، گیرندهای تشخیص الگو (PRRs)، الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن میکروبی خارجی (PAMPs) را، برای دفاع در برابر عوامل بیماری زا تهاجمی، تشخیص داده و آبشارهای سیگنالینگ ایمنی را آغاز می‌کنند. مطالعات اخیر نقش اتوفازی را در تحويل PAMP‌ها به PRR نشان می‌دهند. یکی از اولین شواهد از مطالعه ویروس دارای رشته منفی RNA، vesicular stomatitis virus (VSV) حاصل شد. در سلول‌های دندریتیک پلاسماسیتوئید (pDCs)، TLR7 اندوزومی اسیدهای نوکلئیک ویروسی را تشخیص داده و یک آبشار سیگنالینگ پایین دست را روشن می‌کند تا تولید بالای IFNA (اینترفرون، آلفا) را میانجی گری کند. با این حال، مهار دارویی اتوفازی در pDC‌های آلوده به VSV، تشخیص ویروس توسط تولید TLR7 و IFNA را کاهش می‌دهد. علاوه بر این، سیستم اتوفازی سالم برای این فرایند مورد نیاز است. DC‌های دارای نقص ATG5 به میزان قابل توجهی IFNA و IL12 (ایترلوکین ۱۲ (عامل تحریک کننده سلول‌های کشنده طبیعی، فاکتور بلوغ لنفوسيت‌های سیتوتوکسیک)) کمتری را علیه عفونت VSV بیان می‌کنند. بنابراین، بنظر می‌رسد که اسید نوکلئیک ویروسی سیتوزوولیک از طریق مسیر اتوفازی به TLR‌های اندوزومی تحويل داده شده و باعث شروع یک پاسخ ایمنی ذاتی پایین دست در برابر عوامل بیماری زا می‌شوند.

علاوه بر این، PRR‌ها می‌توانند به عنوان حسگرهای درون سلولی برای فعال سازی اتوفازی عمل کنند. به عنوان مثال، در ماکروفازهای اولیه انسانی، لیپوپلی ساکارید اتوفازی را به روشنی وابسته به سیگنال TLR4 القا می‌کند. علاوه بر این، گیرندهای NOD مانند سیتوزوولی، NOD1 و NOD2 (دومین الیگومریزه متصل به نوکلئوتید ۱ و ۲)، عفونت باکتریایی را با فعال کردن اتوفازی کنترل می‌کنند. NOD1 و NOD2 پپتیدوگلیکان را تشخیص داده و ATG16L1 را به

غشای پلاسمایی جذب می‌کند تا اتوفاژی شروع و از ورود باکتری جلوگیری شود. این فرایند ممکن است با پاتوژن بیماری کرون مرتبط باشد که بعداً در این فصل مورد بحث قرار می‌گیرد.

اتوفاژی و ارائه آنتی ژن MHC

اتوفاژی نه تنها نقش مهمی در ایمنی ذاتی دارد، بلکه در ایمنی تطبیقی نیز نقش دارد. سیستم ایمنی ذاتی به طور عمومی یا غیر اختصاصی آنتی ژن‌های خارجی را تشخیص می‌دهد، در حالی که سیستم ایمنی تطبیقی از طریق فرایندی به نام ارائه آنتی ژن، واکنش‌های اختصاصی آنتی ژن را آغاز می‌کند. با این فرایند، سیستم ایمنی تطبیقی آنتی ژنهای "خودی" بیان شده توسط سلول میزبان را از آنتی ژن‌های "غیر خودی" یا "خارجی" بیان شده توسط پاتوژن متمایز می‌کند. پس از شناسایی آنتی ژن‌های خارجی بارگذاری شده بر روی مولکولهای کمپلکس سازگاری بافتی توسط گیرنده سلول T در لنفوسيتهای T نابالغ، این لنفوسيتها بالغ شده و برای مبارزه با عوامل بیماری زا فعال می‌شوند. دو نوع مولکول MHC وجود دارد: کلاس I و II که به ترتیب آنتی ژن‌هایی را در سطح سلول به سلول‌های CD8⁺ T و CD4⁺ T ارائه می‌دهند. شواهد در حال ظهر نشان می‌دهند که اتوفاژی در ارائه MHC کلاس I و II آنتی ژن نقش دارد.

ارائه آنتی ژن MHC کلاس I. در فرآیند ارائه آنتی ژن MHC کلاس I، آنتی ژن‌های درون زا مانند پروتئین‌های ویروسی سنتز شده توسط سلول‌های میزبان آلوده، توسط پروتئوزوم‌ها در سیتوپلاسم تجزیه و سپس به شبکه آندوپلاسمی منتقل می‌شوند و در آنجا به مولکول‌های کلاس I MHC بارگذاری می‌شوند؛ این فرایند سبب ایجاد اتوفاژی می‌شود. به عنوان مثال، در ۶-۸ ساعت پس از عفونت ماکروفازها با HSV-1، فعال شدن سلول‌های CD8⁺ T القا شده توسط پردازش گلیکوپروتئین B (gB) MHC کلاس I، به اتوفاژی وابسته است. مهار دارویی اتوفاژی توسط MA-۳ یا از بین بردن ژنتیکی ATG5 منجر به کاهش قابل توجه فعال سازی سلول‌های T CD8⁺ اختصاصی gB می‌شود. همچنین، ماکروفازهای آلوده به HSV-1 Fagcd ICP34.5، سلول‌های CD8⁺ T اختصاصی gB را به طور موثرتری نسبت به آنها بیکاری که با نوع وحشی HSV-1 آلوده شده اند، تحریک می‌کند و بیشتر نشان می‌دهد که اتوفاژی باعث بارگیری آنتی ژن MHC I می‌شود.

ارائه آنتی ژن MHC کلاس II. اتوفاژی برای ارائه آنتی ژن خارجی HIV-1 به مولکول‌های MHC II مورد نیاز است. در مقایسه با سلول‌های کنترل، سلول‌های دندریتیک الوده به HIV-1 که در آنها LC3A و LC3B توسط siRNA نابود می‌شوند، کارآیی به مراتب کمتری را در ارائه آنتی ژن خارجی مشتق از HIV-1، به سلول‌های CD4⁺ T را نشان می‌دهد. به طور مشابه، تیمار DC‌ها با MA-۳ باعث کاهش پاسخ‌های با واسطه آنتی ژن سلول‌های CD4⁺ T می‌شود. این نتایج این ایده را تایید می‌کند که اتوفاژی بارگیری آنتی ژن بروزرا را بر روی مولکول‌های کلاس II MHC تسهیل می‌کند.

اگرچه عقاید دیرینه نشان می‌دهد که فقط آنتی ژن‌های اگزوژن بر روی مولکول‌های MHC کلاس II بارگذاری می‌شوند، اکنون مشخص شده است که پروتئین‌های سیتوزولی (درون زا)، از جمله آنتی ژن‌های مرتبط با تومور، پیتیدهای باکتریایی و پروتئین‌های ویروسی نیز می‌توانند از طریق مولکول‌های MHC کلاس II، از طریق اتوفاژی، عرضه شوند. به عنوان مثال، آنتی ژن هسته ای ۱ ویروس اپشتین بار درون زا (EBNA1) برای پردازش آنتی ژن از طریق اتوفاژی به لیزوژوم‌ها هدایت می‌شود و متعاقباً روی مولکول‌های MHC کلاس II بارگذاری می‌شود. مهار اسیدی شدن لیزوژومی باعث تجمع EBNA1 در اتوفاگوژوم‌ها می‌شود. مهار ژنتیکی اتوفاژی با حذف ATG12 منجر به کاهش شناسایی EBNA1 توسط سلول‌های CD4⁺ T محدود به MHC کلاس II می‌شود. علاوه بر این، موش‌های با حذف شرطی Atg5 سلول دندریتیک، کاهش پرایمینگ^۱ سلول‌های CD4⁺ T را پس از عفونت HSV-1 یا لیستریا مونوцитوژن، نشان می‌دهند. DC‌های فاقد Atg5 در پردازش و ارائه آنتی ژن‌های فاگوسیتوز شده به MHC کلاس II ناتوان هستند. این شواهد نقش ضروری اتوفاژی را در میانجی‌گری ارائه آنتی ژن‌های سیتوزولی بر روی مولکول‌های MHC کلاس II تأیید می‌کنند.

تنظیم اتوفاژی توسط مولکول‌های پیام رسان ایمنی

ما در مورد اینکه اتوفاژی چگونه ایمنی ذاتی و تطبیقی را تنظیم می‌کند، بحث کرده‌ایم، اما برعکس، آیا مولکول‌های سیگنال دهنده ایمنی اتوفاژی را تنظیم می‌کنند؟ پاسخ بله است. مولکول‌های سیگنال دهنده ایمنی که به طور مثبت اتوفاژی را تنظیم می‌کنند شامل EIF2AK2، NOD-مانند IFN (اینترفرون، گاما)، TNF، CD40 و PRR هایی مانند TLR و گیرندهای NOD-مانند

^۱ Priming

هستند. در مقابل، اتوفاژی توسط NFKB (فاكتور هسته ای تقویت کننده ژن پلی پپتید سبک کاپا در سلول های B) و سایتوکاین های Th2 مانند IL4 (اینترلوکین ۴) و IL13 مهار می شود. اگرچه در بیشتر موارد مکانیسم های مولکولی تنظیم اتوفاژی توسط مولکول های سیگنال دهنده ایمنی هنوز مشخص نیست، اما نمونه هایی از فعل و انفعالات فیزیکی بین این مولکول ها و ماشین های اتوفاژی وجود دارد که ممکن است با این مکانیسم ها مرتبط باشند. به عنوان مثال، همانطور که در بالا توضیح داده شد، گیرنده های NOD-مانند NOD1 و NOD2، ATG16L1، NOD1، NOD2 را به غشای پلاسمایی جذب می کنند تا ورود باکتری را مسدود کنند. با این وجود، مطالعات بیشتری هنوز مورد نیاز است تا مکانیسم هایی را که از طریق آن مولکول های سیگنال دهنده ایمنی، اتوفاژی را تنظیم می کنند، روشن شود.

اتوفاژی، التهاب، و خود ایمنی

نقش اتوفاژی که به تازگی در پاکسازی التهاب ها مشخص شده است، اهمیت اتوفاژی در التهاب را به شدت نشان می دهد. اینفلازوم ها^۱ پلت فرم های مولکولی حاوی گیرنده های NOD-مانند هستند. آنها پس از عفونت سلولی فعال شده و باعث فعال شدن CASP1 (کاسپاز ۱، سیستئین پپتیداز مرتبط با آپوپتوز) و بلوغ سیتوکین های پیش التهابی مانند IL1B (اینترلوکین ۱، بتا) برای شروع دفاع های ایمنی ذاتی می شوند. القای اینفلازوم های AIM2 و NLRP3 توسط محرک های هم جنس باعث اتوفاژی می شود، همنشینی اتوفاگوزوم ها و اینفلازوم ها نیز مشاهده شده است. از نظر مکانیکی، اینفلازوم ها تحت پلی یوبی کوئیتیناسیون مرتبط با Lys63 قرار گرفته و SQSTM1 را به کار می گیرند، که در نتیجه تحويل آنها به اتوفاگوزوم ها را تسهیل می کند.

علاوه بر این، اتوفاژی با حذف بقایای سلول های آپوپتویک، که برای پیشگیری از التهاب بافت حیاتی است، مرتبط است. در طول مرگ برنامه ریزی شده سلول، جنین موش های دارای نقص در Atg5 و یا Beclin1، در پاکسازی سلول های آپوپتویک اختلال داشته و التهاب در بافت ها افزایش می یابد. جالب است که کمبود کلیرانس سلول های آپوپتویک در بیماران خود ایمنی لوپوس اریتماتوز سیستمیک نیز مشاهده می شود که نقش احتمالی اتوفاژی را در این بیماری نشان می دهد.

¹ Inflammasome

اتوفاژی همچنین با بیماری خودایمنی کرون نیز مرتبط است. چندین مطالعه در سطح ژنوم، سه ژن مستعد در ایجاد بیماری کرون، IRGM (رمزکننده GTPase مربوط به ایمنی، M)، NOD2 و ATG16L1 را شناسایی کرده‌اند که در اتوفاژی نقش دارند. اول، پروتئین IRGM برای اتوفاژی القا شده با INFG مورد نیاز است و تخریب اتوفاژیک مایکوباکتری‌ها را در ماکروفازها تسهیل می‌کند. دوم، همانطور که در بالا مورد بحث قرار گرفت، NOD1 و NOD2 به عنوان حسگرهای باکتریایی برای القای اتوفاژی عمل می‌کنند. NOD2 همچنین برای ارائه آنتی ژن پیتیدهای باکتریایی در MHC کلاس II مورد نیاز است. سوم، سلول‌های دندریتیک که حامل واریانت مستعد ATG16L1 (T300A) بیماری کرون هستند، در ارائه آنتی ژن باکتریایی به سلول‌های T $CD4^+$ ناتوان هستند. این واریانت همچنین نقص‌هایی را در واسطه‌های اتوفاژی، در برابر سالمونلا تیفی موریوم، نشان می‌دهد. با این حال، علی‌رغم اینکه یک نقص در اتوفاژی با بیماری کرون مرتبط است، مکانیسم‌های مولکولی دقیق آن هنوز شناخته نشده است. با این وجود، مطالعات بیشتر در مورد اتوفاژی و بیماری کرون ممکن است ما را قادر سازد تا استراتژی‌های درمانی امیدوارکننده‌ای را برای این بیماری ایجاد کنیم.

نتیجه گیری

تخریب اجزای درون سلولی مبتنی بر لیزوژوم که به صورت تکاملی نیز حفظ شده، اتوفاژی، اکنون به عنوان یک بازیگر ضروری در عفونت و ایمنی مورد توجه قرار گرفته است. در این فصل، مورفولوژی، ماشین‌های مولکولی و نقش‌های فیزیولوژیکی اتوفاژی را معرفی کردیم. ما همچنین پیشرفت‌های اخیر در مورد ارتباط متقابل بین اتوفاژی و مسیرهای ایمنی ذاتی و تطبیقی را مورد بررسی قرار دادیم. یک نوع انتخابی اتوفاژی، بیگانه‌خواری، با حذف میکروب‌های داخل سلولی برای دفاع از سلول میزبان عمل می‌کند، هرچند این میکروب‌ها نیز استراتژی‌های متعددی را برای مقابله با مکانیسم‌های دفاعی مرتبط با اتوفاژی میزبان توسعه می‌دهند. همچنین بین اتوفاژی و مسیرهای گیرنده TLR و NOD-مانند برای مبارزه جمعی با پاتوژن‌های مهاجم، ارتباطات متقابلی وجود دارد. اتوفاژی نه تنها در پاسخ‌های ایمنی ذاتی دخیل است، بلکه با ترویج پردازش آنتی ژن‌های میکروبی و ارائه آنتی ژن-MHC به سلول‌های T، در ایمنی تطبیقی نیز نقش دارد. علاوه بر این، اتوفاژی با التهاب و بیماری‌های خود ایمنی نیز مرتبط است. درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی که زمینه ساز اتوفاژی و مسیرهای سیگنالینگ ایمنی هستند ممکن است

۳۵ **فصل ۱: اتفاقاًزی و اینمنی**

بینش و درک بسیاری از بیماری‌های عفونی، التهابی و خودایمنی را تسهیل کرده و در نهایت کشف اهداف درمانی جدید را برای درمان بالینی این بیماری‌ها ممکن سازد.

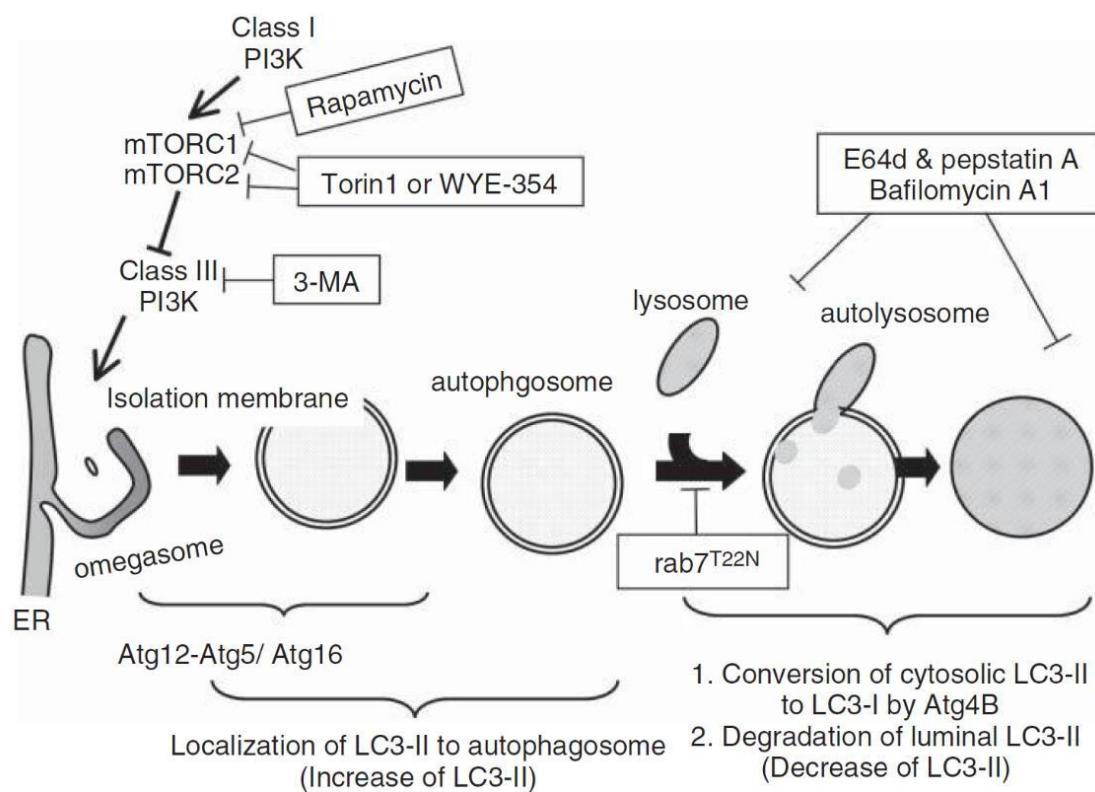
فصل ۲

تکنیک هایی برای مطالعه اتوفازی

مقدمه

اتوفازی برای پاکسازی داخل سلولی سیتوزول، اندامک ها، باکتری ها، ویروسها و پروتئین پریون^۱ ضروری است. علاوه بر این، اتوفازی نابجا با بیماری های نورودژنراتیو، کاردیومیوپاتی، تومورزاوی، دیابت، کبد چرب، بیماری کرون و غیره نیز مرتبط است. هنگامی که اتوفازی القا می شود، ساختارهای غنی از P(3)Amگازوم تشکیل می شود (شکل ۲،۱ را ببینید). پس از تشکیل Amگازوم، غشاها جداکننده دولایه فنجانی شکل به نام پیش اتوفاغوزوم یا فاگوفور ایجاد می شوند. غشاها جداکننده طویل شده تا اجزای سیتوزولی را بلعیده و در نهایت محصور شده و اتوفاغوزومها را تشکیل دهنند. اتوفاغوزومها با لیزوزومها ترکیب می شوند و اتولیزوزومها را تشکیل می دهنند. محتويات داخل اتوفاغوزومی توسط هیدرولازهای لیزوزومی هضم می شوند. یک سری حوادث اتوفازیک در کبد، در عرض ده دقیقه، رخ می دهد.

^۱ Scrapie prion protein



شکل ۲،۱ طرح دینامیک غشاء و محصولات ژنی مرتبط با اتوفازی در طول اتوفازی. DFCP1 به امگازوم‌ها، محل شروع اتوفاغوزوم، متمرکز است. مزدوج ATG12-ATG5 در غشای جداسازی متمرکز است. LC3-II (کونثوگه LC3-PE) نیز در اتوفاغوزوم‌ها جای دارد. پس از تشکیل اتوفاغوزوم، لیزوژوم‌ها با اتوفاغوزوم‌ها ترکیب می‌شوند و اتولیزوژوم را تشکیل می‌دهند. پس از ادغام لیزوژوم-اتوفاغوزوم، LC3-II روی سمت سیتوزولی توسط ATG4B به LC3-I و PE تبدیل شده و LC3-II نیز در سمت لومینال توسط هیرولازهای لیزوژومی تجزیه می‌شود.

برای نظارت بر اتوفازی، چندین نشانگر مشخص و مورد استفاده قرار گرفته‌اند. DFCP1 یک نشانگر برای امگازوم‌ها در طول اتوفازی است، اگرچه در شرایط غنی از مواد مغذی در شبکه آندوپلاسمی متمرکز می‌شود. ATG12 یک اصلاحگر^۱ شبیه یوبیکوئیتین است و توسط ATG7 (آنزیم E1-مانند) و ATG10 (آنزیم E2-مانند) از طریق واکنشی شبیه به یوبیکوئیتینیاسیون به ATG5 کونثوگه می‌شود تا کونثوگه ATG5-ATG12 را تشکیل دهد. کونثوگه ATG5-ATG12 یک کمپلکس با ATG16L تشکیل می‌دهد و در غشاها جداسازی جاگیری می‌کند. ATG5 محل تشکیل اتوفاغوزوم را تعیین می‌کند. GFP-ATG5 معمولاً برای مانیتور کردن

¹ Modifier

این مرحله استفاده می‌شود. کمپلکس ATG12/ATG16L-ATG5 قبل از محصور شدن غشاها اتوفاغزومی، از غشاهاي جداسازی، جدا می‌شود.

LC3، یکی از همولوگ‌های ATG8 پستانداران و دومین اصلاحگر یوبیکوتئین مانند، یک نشانگر اتوفاغزومی است که به طور گستردۀ مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما دو شکل وجود دارد: LC3-I (فرم سیتوزولی) و LC3-II (فرم متصل به غشاء). پس از ترجمه LC3 (proLC3)، انتهای کربوکسیل آن توسط ATG4B (یک سیستئین پروتئاز) برای در معرض قرار گرفتن Gly برباده می‌شود. این شکل سیتوزولی LC3 است که LC3-I نامیده می‌شود. LC3-I ATG7 توسط و ATG3 (یک آنزیم E2-مانند دوم) به فسفاتیدیل اتانول آمین (PE) کونژوگه می‌شود تا کونژوگه LC3-PE را تشکیل دهد، که LC3-II نامیده شده و در اتوفاغزوم‌ها متمرکز می‌شود. پس از ادغام اتوفاغزوم‌ها با لیزوژوم‌ها، LC3-II داخل اتوفاغزومی توسط هیدرولازهای لیزوژومی تجزیه و روی سطح سیتوزولی اتوفاغزوم‌ها توسط ATG4B به LC3-I و PE تبدیل می‌شود، به بیان ساده، در مرحله اولیه اتوفازی (مرحله تشکیل اتوفازوم)، LC3-II افزایش می‌یابد. با این حال، در دو مرحله آخر اتوفازی، LC3-II کاهش می‌یابد (شکل ۲.۱ را ببینید). بنابراین، مقدار موقتی LC3-II چیزی در مورد فعالیت اتوفازی منعکس نمی‌کند. در عوض، تغییرات و شار^۱ لیزوژومی LC3-II منعکس کننده فعالیت شار مسیر اتوفازیک است. نظارت بر "شار" اتوفازیک LC3-II، یعنی مقدار LC3-II تجزیه شده توسط هیدرولازهای لیزوژومی، برای تخمین فعالیت اتوفازیک مهم است.

معرف‌ها و ابزارهایی برای مطالعه اتوفازی

معرف‌هایی برای نظارت بر شار لیزوژومی LC3-II

برای مانیتور کردن "شار" تخریب لیزوژومی LC3-II، افزایش مقدار LC3-II باید با مهار فعالیت هیدرولازهای لیزوژومی یا اسیدی شدن لیزوژومی تخمین زده شود. کاتپسین‌های D و L پروتئازهای لیزوژومی اصلی در پستانداران هستند و علاوه بر تجزیه پروتئین‌های فرستاده شده به لیزوژوم، در فعل شدن سایر هیدرولازهای لیزوژومی نیز نقش دارند. ترکیبی از E-64-d (بازدارنده کاتپسین‌های B، H و L) و پیپستاتین A^۲ (بازدارنده کاتپسین D) برای مهار کاتپسین‌های

¹ Flux

² Pepstatin A

لیزوزومی در سلول‌های کشت شده استفاده می‌شود. محلول استوک آن ($\times 1000$) حاوی ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر در دی متیل سولفوکسید بوده و در دمای ۲۰– درجه سانتیگراد به مدت سه ماه پایدار است. در حضور این مهارکننده‌ها (هر کدام $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) و در شرایط غنی از مواد مغذی، نشانه کمی از رشد و مورفولوژی صحیح سلول‌های کشت داده شده، به مدت ۲۴ ساعت، وجود دارد. E-64 و E-64-c برای مهار کاتپسین‌ها در داخل بدن مناسب نیستند، زیرا آنها مانند E-64-d در غشاء نفوذپذیر نیستند.

لوپیتین^۱ سیستئین، سرین و پیپیدازهای ترئونین را مهار می‌کند و به طور کارآمد در کبد تجمع می‌یابد. تزریق داخل وریدی لوپیتین به موش و رت در شرایط گرسنگی، منجر به تجمع اتوالیزوزوم‌ها در کبد می‌شود. با این حال، لوپیتین غیرقابل نفوذ به غشاء است. هنگامی که از لوپیتین به جای E-64-d و پیستاتین A به عنوان مهارکننده‌های کاتپسین استفاده می‌شود، باید مراقب عدم نفوذ غشایی آن بود.

برای مهار اسیدی شدن لیزوزومی از بافیلومایسین A1^۲ استفاده می‌شود. بافیلومایسین A1 یک مهارکننده ATPase-H⁺ واکوئولی است. از آنجایی که pH بهینه هیدرولازهای لیزوزومی اسیدی است، تیمار بافیلومایسین A1 با سلول‌ها، اسیدی شدن لیزوزومی را مهار می‌کند و در نتیجه هیدرولازهای لیزوزومی غیرفعال می‌شوند. بنابراین، LC3-II در اتوالیزوزوم سلول‌های تیمار شده با بافیلومایسین A1 تجمع می‌یابد. تجمع LC3-II توسط تیمار بافیلومایسین A1، بیشتر از تیمار با E-64-d و پیستاتین A رخ می‌دهد. با این حال، ما باید همچنین مهار اندوسیتوز، فاگوسیتوز و مسیر ترشحی تیمار با بافیلومایسین A1 را هم در نظر بگیریم، زیرا H⁺-ATPase واکوئولی علاوه بر لیزوزوم‌ها، برای اسیدی شدن اندامک‌هایی از جمله گلزی، اندوزوم‌ها و فاگوزوم‌ها نیز ضروری است.

معرفی اتوفالزی را القاء می‌کند

راپامایسین^۳ (Sirolimus)، یک معرف سرکوب کننده سیستم ایمنی، به عنوان یک محرک اتوفالزی استفاده می‌شود. مسیر پیام رسانی کیناز mTOR (هدف پستانداران راپامایسین) اتوفالزی را تنظیم می‌کند. مهار mTORC1 منجر به فعال شدن اتوفالزی می‌شود. راپامایسین به FKB12

¹ Leupeptin

² Bafilomycin

³ Rapamycin

(پروتئین متصل شونده به FK506 ۱۲ کیلو دالتونی) متصل می‌شود و کمپلکس را پامایسین-¹ FKBP12 کمپلکس mTORC1 را مهار می‌کند و در نتیجه باعث فعال شدن اتوفازی می‌شود. مهارکننده‌های mTOR کیناز، از جمله torin1 و WYE-354 نیز برای القای اتوفازی استفاده می‌شوند. WYE-354 و Torin1 مهارکننده‌های قوی، انتخابی و رقابتی با mTOR ATP هستند و دارای اختصاصیت حدود هزار برابری برای mTOR کیناز نسبت به سایر کینازهای PI3K هستند. این معرف‌ها هر دو کمپلکس mTORC2 و mTORC1 را مهار می‌کنند و در نتیجه باعث فعال شدن موثرتر اتوفازی در مقایسه با راپامایسین می‌شوند. کلرید لیتیوم، ترھالوز و L-690330 (یک مهارکننده قوی اینوزیتول مونوفسفاتاز) نیز از طریق یک مسیر مستقل از mTOR به عنوان محرك‌های اتوفازی گزارش شده‌اند. Brefeldin A و tunicamycin، القاء کننده استرس ER، نیز القاکننده اتوفازی هستند.

معرف‌ها و ابزارهای نوترکیبی که اتوفازی را مهار می‌کنند

۳-متیل آدنین (MA-3) برای مهار و مطالعه مکانیسم اتوفازی استفاده می‌شود. MA-3 کینازهای تیپ III فسفاتیدیل اینوزیتول-۳ (PI3Ks) را مهار می‌کند. کمپلکس PI3K‌های کلاس III نقشی اساسی در اتوفازی دارند. تیمار سلول‌ها با MA-3 در شرایط گرسنگی مانع از تشکیل اتوفاغوزوم، به عنوان مثال با مهار افزایش LC3-II می‌شود. با این حال، یکی از کمپلکس‌های PI3K کلاس III نیز به دسته بندی¹ هیدرولازها از طریق مسیر دسته بندی پروتئین واکوئولی/لیزوژومی (Vps) کمک می‌کند. علاوه بر این، MA-3 ممکن است نشان دهد که سمیت سلولی منجر به القای آپوپتوز می‌شود. باید مراقب عوامل مسئول این فاکتورها بود.

جهش در جایگاه فعال $ATG4B^{C47A}$ ، ATG4B، نیز برای مهار اتوفازی استفاده شده است. ATG4B یکی از همولوگ‌های پستانداران سیستئین پروتئاز ATG4 است که هم برای پردازش LC3-I و هم برای تبدیل LC3-II به proLC3 ضروری است. موتانت $ATG4B^{C47A}$ در هر دو فرآیند ناتوان است. بنابراین، بیان بیش از حد موتانت $ATG4B^{C47A}$ منجر به مهار اتوفازی می‌شود.

¹ Sorting

Rab7 عضوی از خانواده Rab از پروتئین‌های متصل شونده به گوانوزین تری فسفات (GTP) مرتبط با RAS است که در آندوزوم‌های دیررس جاگیری می‌کند. علاوه بر اتصال با تاخیر آندوزوم-لیزوژوم، Rab7 به ادغام اتوفاگوزوم‌ها با لیزوژوم‌ها نیز کمک می‌کند. یک جهش غالب منفی در $Rab7^{T22N}$ ، از همچوشی اتوفاگوزوم-لیزوژوم جلوگیری می‌کند.

تشخیص LC3-I و LC3-II با Immunoblotting

حرکت LC3-II (کونژوگه LC3-PE) در SDS-PAGE سریعتر از LC3-I (حدود ۱۶ کیلو دالتون) است، اگرچه وزن مولکولی محاسبه شده LC3-II بیشتر از LC3-I است. ماهیت باردار PE کونژوگه ممکن است بر تحرک LC3-II در SDS-PAGE تأثیر بگذارد. به طور کلی، تکنیک خاصی برای تشخیص LC3-I و LC3-II توسط ایمونوبلات با آنتی بادی ضد LC3 وجود ندارد، اما برخی نکات کلیدی برای تشخیص موفقیت آمیز این دو شکل از هم وجود دارد. یکی تهیه ژل برای SDS-PAGE است. ژل پلی آکریل آمید ۱۲/۵ درصد در جداسازی LC3-I و LC3-II بهتر از یک ژل ۱۵ درصد یا گرادیان ۱۰-۲۰ درصد است. نسبت بهینه آکریل آمید: متیلن-بیس اکریل آمید برای ژل ۲۹:۱ (وزنی/وزنی) است نه ۳۰:۱. اگر می‌خواهید از ژل آماده تجاری استفاده کنید، ژل ۱۲٪ NuPAGE bis-tris SDS-PAGE (Life Tech.) توصیه می‌شود.

دومین نکته کلیدی زمان بندی بهینه برای توقف الکتروفورز است. الکتروفورز SDS-PAGE باید زمانی متوقف شود که بروموفنل آبی در بافر اصلاح شده Laemmli به انتهای ژل برسد – در حالت ایده آل، زمانی که مقدار کمی رنگ شروع به خروج از انتهای ژل کند. این مرحله برای به دست آوردن جداسازی خوب LC3-II از LC3-I مهم است.

انتخاب آنتی بادی ضد LC3 یکی از نکات مهم برای تشخیص LC3-I و LC3-II درون زا است. در حال حاضر بسیاری از آنتی بادی‌های ضد LC3 به صورت تجاری در دسترس هستند. به عنوان اولین انتخاب از آنتی بادی، ما یک آنتی بادی ضد LC3 مونوکلونال خرگوشی (Cell Signaling Tech., #3868) را برای آنالیزهای ایمونوبلات و ایمونوفلورسانس LC3 درون زا توصیه می‌کنیم، زیرا واکنش پذیری بالایی دارد و مشخص شده است که واریانت‌های کمتری از آن در مقدار زیادی از آنتی بادی وجود دارد. برای تشخیص LC3-I و LC3-II، یک شب

فصل ۲: تکنیک هایی برای مطالعه اتوفاژی ۴۳

انکوباسیون در دمای 4°C برای واکنش آنتی بادی اولیه^۱ بهتر از یک ساعت در دمای اتاق است. انتخاب یک آنتی بادی ثانویه^۲ نیز برای به حداکثر رساندن حساسیت تشخیص LC3 درون زا مهم است. هنگامی که سیگنال LC3 درون زا کمی با استفاده از معرفهای نورزای شیمیایی^۳ به دست می‌آید، بهتر است که معرفهای حساس تری را بکار بگیریم.

آلیزهای ایمونوفلورسانس LC3 درون زا

تکنیک‌های رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس LC3 درون زا به طور مفصل قبلاً توضیح داده شده است. با این حال، باید مراقب شرایط نفوذ سلول‌های ثابت بود. تیمار سلول‌ها با Triton X-100 بر مورفولوژی اتوفاگوزوم‌ها/اتولیزوزوم‌ها تأثیر می‌گذارد. بنابراین، دترجنت‌های ملایم‌تری مانند دیژیتونین یا استرپتولیسین O باید به عنوان معرفهای نفوذپذیر سلولی برای تشخیص LC3 درون زا استفاده شوند.

نظارت بر اتوفاژی با استفاده از LC3 دارای پروتئین فلورسنت

LC3‌های دارای پروتئین فلورسنت (عمدتاً GFP-LC3) برای نظارت بر اتوفاژی در سلول‌های زنده و ثابت شده استفاده می‌شوند. با این حال، به دلیل محدودیت‌های GFP-LC3 باید احتیاط کرد. GFP-LC3 تمایل دارد تا در سلول‌ها، مستقل از اتوفاژی، تجمعی^۴ را ایجاد کند و فلورسانس GFP در لیزوژوم‌ها ممکن است حتی پس از تخریب LC3 نیز رخ دهد. بنابراین، تعداد نقاط تجمع یافته GFP-LC3، تعداد اتوفاگوزوم‌ها را بیش از حد تخمین می‌زند. این مشکلات ممکن است با استفاده از یک موتانت، GFP-LC3 ΔG که قادر پایانه کربوکسیل ضروری گلایسین است، به عنوان یک کنترل منفی، رفع شود (شکل ۲، ۲ را ببینید). با این حال، موش‌های تاریخته GFP-LC3 می‌توانند برای مطالعه اتوفاژی در بسیاری از بافت‌های خارج از مغز مورد استفاده قرار گیرند.

پروتئین پشت سر هم فلورسنت – (tf LC3/RFP-GFP-LC3) برای تمایز بین اتوفاگوزوم و اتلیزوزوم استفاده می‌شود. pH داخل لومن اتوفاگوزوم‌ها شبیه pH سیتوزولی است. از طرف دیگر، اتلیزوزوم‌ها از آنجا که حاوی H⁺-ATPase واکوئولی مشتق شده از لیزوژوم‌ها هستند،

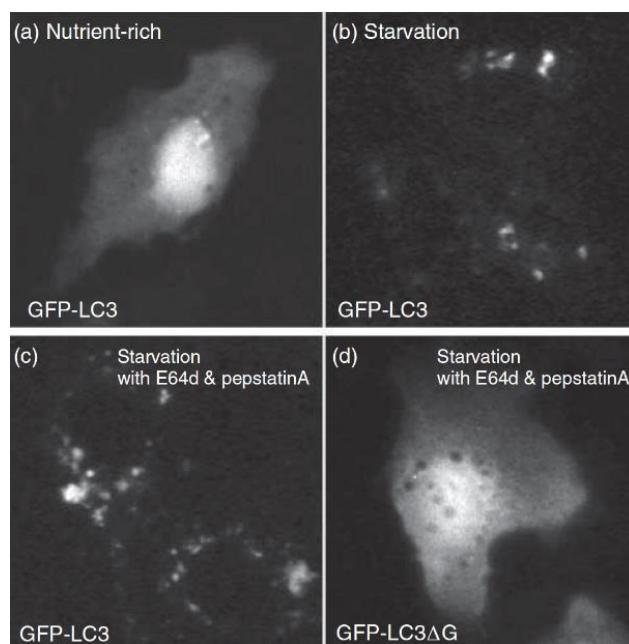
¹ Primary antibody

² Secondary antibody

³ Chemiluminescent

⁴ Puncta

اسیدی‌اند. فلورسانس پروتئین فلورسن特 مونومر قرمز (mRFP) در این pH اسیدی پایدار است، در حالی که فلورسانس پروتئین فلورسن特 سبز (GFP) در pH اسیدی کاهش می‌یابد. هنگامی که نقاط فلورسن特 سبز و قرمز متتمرکز شده در tfLC3 مشاهده می‌شوند، نشان دهنده اتوفاگوزوم هستند. هنگامی که سیگنال سبز کاهش می‌یابد، این نشان دهنده تحویل tfLC3 به بخش‌های اسیدی است؛ یعنی همچوشی بین اتوفاگوزوم‌ها و لیزوژوم‌ها اتفاق افتاده است. اگرچه tfLC3 برای پایش هم زمان^۱ (و کوتاه‌مدت) اتوفازی مناسب است، باید در نظارت طولانی مدت اتوفازی مراقب بود، زیرا گزارش شده است که فلورسانس حاصل از GFP در لیزوژوم‌ها هنوز هم حتی پس از تخریب LC3 مشاهده می‌شود. برای غلبه بر این مشکلات، یک LC3 با برچسب پشت سر هم فلورسن特 بهبود یافته (mTagRFP-mWasabi-LC3) و کنترل منفی آن، mTagRFP-mWasabi-LC3ΔG اخیراً گزارش شده است.



شکل ۲،۲ تشکیل نقاط تجمع یافته GFP-LC3 در طول اتوفازی ناشی از گرسنگی. انکوبه سلول‌های Huh7 بیان کننده GFP-LC3 تحت شرایط غنی از مواد مغذی (a) یا گرسنگی (b) به مدت ۴ ساعت. سلول‌ها با مهارکننده‌های کاتپسین E64d و پیپستاتین A در (c) و (d) تیمار شدند. توجه داشته باشید که نقاط تجمع یافته GFP-LC3 در شرایط گرسنگی (b) مشاهده شد و تعداد نقاط تجمع یافته در حضور E64d و پیپستاتین A افزایش یافته است که نشان می‌دهد GFP-LC3 توسط هیدرولازهای لیزوژومی تجزیه می‌شود (c). به عنوان یک کنترل

^۱ Real-time

منفی برای GFP-LC3ΔG، GFP-LC3، که فاقد C-ترمینال Gly ضروری برای ترکیب آن با PE است، استفاده شد (d).

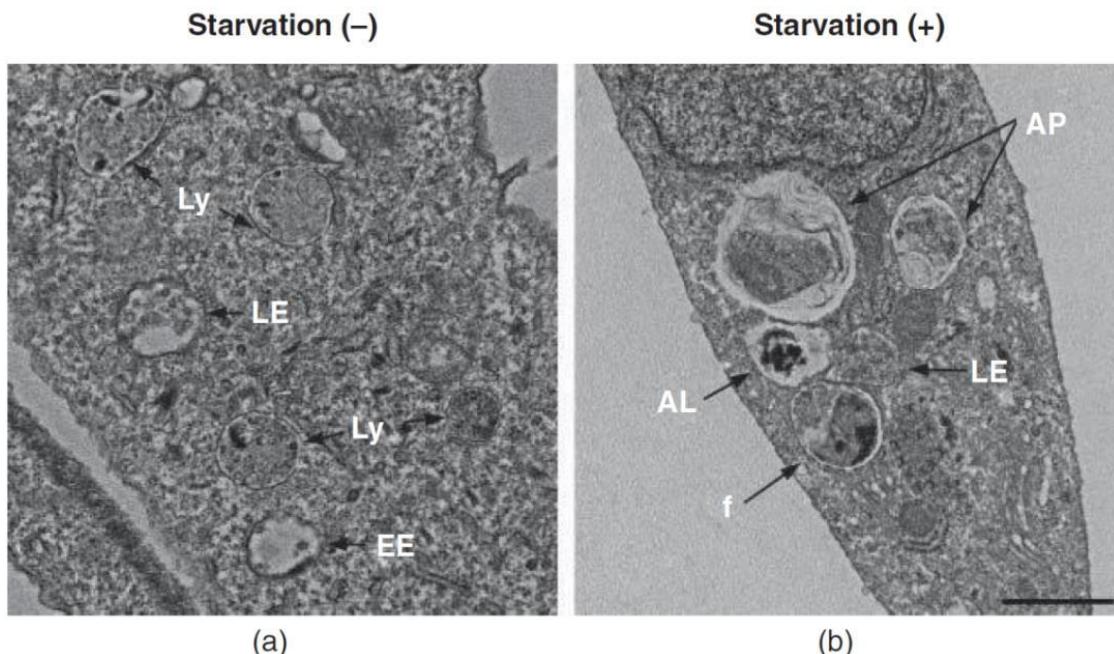
آنالیز مورفولوژیکی اتوفاگوزوم‌ها و اتولیزوزوم‌ها توسط TEM

اگرچه LC3 یک نشانگر شناخته شده برای تشکیل اتوفاگوزوم / واکوئل‌های اتوفاژیک / اتوفاگوزوم‌ها است، همانطور که در بالا توضیح داده شد، رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای LC3 به تنها بی همیشه کافی نیست. LC3 تحت شرایط خاصی در لیزووزوم‌ها تجمع می‌یابد و همچنین در اندامک‌هایی غیر از واکوئل‌های اتوفاژیک مانند فاگوزوم‌ها و قطرات چربی نیز جاگیری می‌کند. در سلول‌های کبدی و نورون‌های موش‌های دارای ژن Atg7 حذف شده، LC3-I (LC3-I) در تجمع‌های p62- و یوبیکوئین مثبت نیز گنجانیده می‌شود که منجر به رنگ‌پذیری گرانولی LC3 در این سلول‌های دارای نقص در اتوفاژی می‌شود. بنابراین، مشاهده اتوفاژی توسط میکروسکوپ الکترونی معمولی هنوز هم مهم است.

هنگامی که نمونه‌ها در رزین‌های پلاستیکی معمولی مانند Epon جاسازی می‌شوند، واکوئل‌های اتوفاژیک را می‌توان با علائم مورفولوژیکی معمول اتوفاژی که در زیر توضیح داده شده است، شناسایی کرد. واکوئل‌های اتوفاژیک را می‌توان در دو تیپ طبقه‌بندی کرد (شکل ۲,۳ را ببینید): واکوئل‌های اتوفاژیک ابتدایی یا اولیه (یعنی اتوفاگوزوم)، که توسط غشاهای دو یا چند لایه احاطه شده‌اند و حاوی سیتوپلاسم دست‌نخورده از لحاظ مورفولوژیکی هستند، و واکوئل‌های اتوفاژیک دیررس یا تخریب‌کننده (یعنی اتولیزوزوم)، که توسط غشاهای منفرد احاطه شده‌اند و حاوی مواد نیمه تخریب شده با چگالی الکترونی بالا هستند. اتوفاگوزوم‌ها همچنین می‌توانند با اندوزوم‌های دیررس ترکیب شوند. محصولات حاصل از هم‌جوشی اندوزوم - اتوفاگوزوم به عنوان آمفیزوم شناخته می‌شوند.

اتوفاژی با تشکیل یک غشای جداسازی/فاگوفور آغاز می‌شود. یک فاگوفور به یک اتوفاگوزوم دو غشایی گسترش می‌یابد که بخشی از سیتوپلاسم را احاطه کرده است. با این حال، در یک میکروگراف الکترونی، تشخیص اتوفاگوزوم‌های بسته و اتوفاگوزوم‌های نوبا یا باز دشوار است. مطالعات اخیر نشان داده است که هم شبکه آندوپلاسمی و هم میتوکندری منبع غشایی فاگوفورها هستند. باز هم، در یک میکروگراف الکترونی تکی، یافتن ارتباط مستقیم بین فاگوفورها و این اندامک‌ها دشوار است. برای بررسی فاگوفورها، برش سریالی و/یا تکنیک توموگرافی

ضروری است. علاوه بر ارائه میکروسکوپ الکترونی، تجزیه و تحلیل مورفومتریک کمی اغلب مورد نیاز است. کمی سازی اتوفاغوزومها و اتولیزوزومها را می‌توان با استفاده از روش شمارش نقطه‌ای همانطور که قبلاً توضیح داده شد انجام داد.



شکل ۲،۳. (a) میکروگراف الکترونی از اندوزوم‌های اولیه (EE) و دیرس (LE) و لیزوزوم‌ها (Ly) در سلول‌های Huh7 تحت شرایط غنی از مواد مغذی. در طول بلوغ از اندوزوم‌های اولیه تا اندوزوم‌های دیرس، وزیکول‌های داخلی در لومن واکوئل اندوزومی تجمع می‌یابند. لیزوزوم‌ها علاوه بر وزیکول‌های داخلی حاوی مخلوطی از مواد آمورف و ساختارهای غشایی هستند. (b) اتوفاغوزوم‌های معمولی (AP)، آمفیزوم‌ها (Am) و اتولیزوزوم‌ها (AL) که توسط میکروسکوپ الکترونی مشاهده شده است. سلول‌های Huh7 در بافر کربس-رینگر به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. در اتوفاغوزوم‌ها، بخشی از سیتوپلاسم دست نخورده (مورفولوژیکی) توسط غشاهای دو یا چند لایه احاطه شده است. اتولیزوزوم‌هایی که توسط یک غشاء احاطه شده‌اند دارای مواد الکترونی متراکم هستند که از مواد سیتوپلاسمی تخریب شده‌اند. آمفیزوم‌ها از ادغام اتوفاغوزوم‌ها و اندوزوم‌های دیرس تشکیل می‌شوند. خط تیره، ۱ میکرومتر را نشان می‌دهد.

فضای بین غشای داخلی و خارجی اتوفاغوزوم‌ها به عنوان یک محصول مصنوعی تولید شده در طول تثبیت شیمیایی معمول پیشنهاد شده است. بنابراین در میکروسکوپ الکترونی معمولی این فضا باید کاملاً از لحاظ الکترونی شفاف^۱ باشد. توجه داشته باشید که شبکه آندوپلاسمی خشن اندامک‌هایی مانند میتوکندری یا میتوکندری متورم با غشاهای دوگانه و ماتریکس الکترونی شفاف را احاطه کرده است و این ساختارها می‌توانند به اشتباه به عنوان اتوفاغوزوم تعبیر شوند.

¹ Electron-lucent

در برخی از سلول‌های بافتی بسیار متمایز با ساختارهای مشخص، فرآیندهای سلولی که به سلول‌های همسایه وارد می‌شوند نیز می‌توانند با اتوفاگوزوم‌ها اشتباہ گرفته شوند. به عنوان مثال، آکسون‌های میلین دار تورفتگی^۱ غشای پلاسمایی همراه با سیتوپلاسم الیگودندروسیت‌های مجاور را نشان می‌دهند و وزیکول‌های دو جداره ای را تشکیل می‌دهند.

تبییت بافت جوندگان باید با پرفیوژن کل بدن از طریق بطن چپ انجام شود. نمونه‌های بیوپسی باید به قطعات با اندازه و جهت مناسب بریده شوند و در اسرع وقت در فیکساتور غوطه ور شوند. روش دقیق تعییه رزین در بافت‌ها یا نمونه‌های بیوپسی در جاهای دیگر توضیح داده شده است. در مورد سلول‌های کشت‌شده، سلول‌ها را می‌توان به صورت پلت در رزین جاسازی کرد یا برای جاسازی مسطح پردازش کرد. پلت‌های سوسپانسیون سلولی و میکروب‌ها معمولاً پس از تبییت با تتروکسید اسمیم^۲، در آگارز با نقطه ذوب پایین قرار می‌گیرند.

مواد یا محلول‌های استوک

(آ) محلول استوک ۸٪ پارافورمالدئید (PA). پودر پارافورمالدئید (مرک) را در آب گرم شده با دمای تقریبی ۷۰ درجه سانتیگراد با چند دقیقه هم زدن حل کنید تا یک سوسپانسیون سفید همگن به دست آید. سپس یک قطره ۱N NaOH به آن اضافه کنید تا محلول شفاف شود. پس از سرد شدن محلول را صاف کرده و در دمای ۴°C نگهداری کنید. برای مطالعات EM، از PA تازه تهیه شده استفاده کنید.

(ب) محلول ۲۵٪ گلوتارآلدئید (GA) (Nakalai)، کیوتو، ژاپن).

(ج) بافر فسفات (PB): بافر فسفات M ۰/۲، pH = ۷/۴.

(د) تتروکسید اسمیم (OsO₄): محلول استوک آبی OsO₄ ۴٪ (مرک) تهیه شود. این معرف بسیار سمی است و بنابراین باید با اقدامات احتیاطی مناسب در یک هود استفاده شود. محلول استوک را در یک بطری قهوه ای دربسته در دمای ۴۰°C برای محافظت در برابر نور نگهداری کنید.

¹ Invagination

² Osmium tetroxide

(۵) می‌توان از پروپیلن اکسید (n-butyl glycidyl ether) QY-1، توکیو، ژاپن)، Nisshin EM) (کیت رزین Epon 812، Berkshire، UK، TAAB) برای تهیه ۱۰ گرم رزین اپوکسی (مخلوط Epon 812 ۵۵ گرم ۳۰ MNA و ۱۵ گرم DDSA) مخلوط و بیش از ۳۰ دقیقه هم زده شود. سپس ۱,۵ گرم DMP-30 اضافه و دوباره به مدت بیش از ۱۰ دقیقه هم زده شود. پس از گاز زدایی، می‌توان آن را در دمای 30°C - ذخیره کرد.

(۶) مخلوط رنگ تولویدین بلو: ۱ گرم تولویدین بلو و ۱ گرم بورات سدیم را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و هم بزنید تا رنگ حل شود. قبل از استفاده فیلتر کنید.

(۷) اورانیل استات: محلول آبی ۴٪ تهیه شود.

(۸) سیترات سرب: سیترات سرب ساتو (Sato, ۱۹۶۸) تهیه و در دمای 4°C نگهداری شود.

جاسازی رزین پلت‌های سلولی یا میکروب‌ها

(۹) برای سلول‌های چسبنده، سلول‌ها را در پلیت‌های ۱۰ سانتی‌متری به صورت نیمه پر کشت کنید. یک روز قبل از تثبیت، محیط کشت را با افزودن ۵ میلی لیتر محیط تازه به دقت جایگزین کنید. ۵ میلی لیتر PA ۴٪ - ۴٪ GA (فیکساتور با غلظت دوبرابر) در M / ۰ PB در دمای اتاق به محیط اضافه و به آرامی مخلوط کنید. پس از چند دقیقه، فیکساتور را به ۲٪ - ۲٪ GA (فیکساتور با غلظت معمولی) در M / ۰ PB تغییر دهید و سلول‌ها را در همان فیکساتور حداقل به مدت ۲ ساعت در دمای 4°C فیکس کنید. پس از تثبیت، مراحل ج تا ذ را دنبال کنید.

(۱۰) برای سلول‌ها یا میکروب‌های غیر چسبنده، سلول‌ها یا میکروب‌های معلق را با حجم مساوی PA ۴٪ - ۴٪ GA (فیکساتور با غلظت دوبرابر) در M / ۰ PB در دمای اتاق، در محیط کشت مخلوط کنید. پس از سانتریفیوژ ملایم (کمتر از ۲۰۰۰ g)، مایع رویی را بردارید و پلت‌های سلولی را در ۱/۵ - ۱ میلی لیتر PA ۲٪ - ۲٪ GA در M / ۰ PB (تازه آماده شده) معلق کنید و آنها را برای پردازش بیشتر به لوله‌های میکروسانتریفیوژ منتقل کنید. سلول‌ها را حداقل به مدت ۲ ساعت در دمای 4°C در همان فیکساتور غوطه ور کنید.

فصل ۲: تکنیک هایی برای مطالعه اتوفاژی ۴۹

- ج) سه بار توسط PBS در دمای 4°C نمونه‌ها را شستشو دهید. برای سلول‌های چسبنده، ۱/۵ میلی‌لیتر ژلاتین ۱ درصد را در دمای اتاق اضافه کنید و سلول‌ها را به آرامی از ظروف با اسکراپر سلولی خراش دهید و به لوله‌های میکروسانتریفیوژ منتقل کنید. ژلاتین کشش سطحی را کاهش می‌دهد و سلول فرو می‌رود و سلول‌های بیشتری را می‌توان به راحتی جمع آوری کرد.
- د) فیکس ثانویه در ۱٪ OsO₄ در PBS به مدت ۱ ساعت در دمای 4°C در تاریکی.
- ۵) شستشو سه بار با آب مقطر در دمای اتاق.
- و) به آرامی به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید (g ۱۵۰۰) تا یک پلت شل تشکیل شود و آب مقطر خارج شود.
- ز) با استفاده از یک پیپت پلاستیکی گرم، به سرعت ۳۰۰ میکرولیتر آگارز^۱ گرم (60°C) ۱٪ را به پلت درون میکروتیوب اضافه کرده و آن را به آرامی در آگارز گرم معلق کنید.
- ح) با استفاده از یک روتور چرخشی، میکروتیوب را به آرامی به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ کنید و لوله را روی یخ قرار دهید تا آگارز جامد شود.
- ط) آگارز را با استفاده از یک تیغ تیز به صورت مکعب‌های ۱-۲ میلی‌متری برش دهید.
- ی) مکعب‌ها را یک بار با آب مقطر بشویید.
- ک) بلوک‌ها را در اورانیل استات ۲ درصد در آب در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت رنگ کنید (اختیاری).
- ل) سه بار با آب مقطر در دمای اتاق بشویید (اختیاری).
- م) دهیدراته کردن (آب گیری) با یک شیب غلظت اتانول (از ۵۰٪ تا ۹۰٪). در هر مرحله بافت‌ها را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق به خوبی تکان دهید.
- ن) سه بار با اتانول ۱۰۰٪ به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق آبگیری کنید.
- س) نمونه‌ها را در مخلوط ۱:۱ اتانول و 1 (n-butyl glycidyl ether) QY-1 به مدت ۱۰ دقیقه غوطه ور کنید.

¹ Low melting agarose

- ع) غوطه ور سازی به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰٪ QY-1.
- ف) غوطه ور سازی به مدت ۱ ساعت در مخلوط ۱:۱ QY-1 و ۸۱۲ Epon.
- ص) غوطه ور سازی به مدت ۱ ساعت در مخلوط ۱:۳ QY-1 و ۸۱۲ Epon.
- ق) نمونه‌ها را در ۸۱۲ Epon خالص غوطه ور کرده و آنها را به مدت یک شب در یک محفظه بسته قرار دهید.
- ر) نمونه‌ها را در ۸۱۲ Epon تازه آماده شده قرار داده و رزین را در دمای ۸۰°C به مدت ۴۸ ساعت پلیمریزه کنید.
- ش) بلوک‌ها را با یک چاقوی شیشه‌ای برش بزنید. با استفاده از اولترامیکروتوم (Ultracut N, Reichert-Nissei, توکیو، ژاپن، یا Leica UCT، UC6 یا UC7، Vienna، اتریش)، بخش‌های نیمه نازک (حدود ۵۰۰ نانومتر تا ۱ میکرومتر) را توسط یک چاقوی الماس برش بزنید.
- ت) بخش‌های نیمه نازک را با تولویدین آبی به مدت ۵ دقیقه در دمای رنگ آمیزی کنید.
- ث) بلوک‌های نمونه را با یک چاقوی شیشه‌ای برش دهید و بخش‌های بسیار نازک ۷۰ تا ۸۰ نانومتری را توسط یک چاقوی الماسی ایجاد کنید.
- خ) برش‌ها را با اورانیل استات و سیترات سرب رنگ آمیزی کنید.
- ذ) برش‌ها را با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مشاهده کنید.

جاسازی مسطح رزین از سلول‌های رشد یافته روی لامل‌های^۱ شیشه‌ای یا پلاستیکی

- آ) رشد سلول‌ها بر روی لامل (ماتسونامی، اوزاکا، ژاپن) با پوشش مناسب. برای یک پلیت ۲۴ خانه، از روکش‌هایی با قطر تقریبی ۱۲ میلی متر استفاده کنید. کنترل لامل‌های بزرگتر آسان نیست و در حین انجام عمل شکسته می‌شوند. علاوه بر این، همانطور که در زیر توضیح داده

¹ Coverslips

شده است، قطر لامل‌ها باید بیشتر از قطر کپسول‌های ژلاتینی باشد. سلول‌ها را همیشه در طول عمل مرتبط نگه دارید.

ب) برای ثبیت سلول‌ها، حجم مساوی PA ۴٪ - ۴٪ BAFFER را با MPB ۱/۱ pH ۷/۲، را به آرامی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق به محیط کشت اضافه کنید. فیکساتور را به آرامی آسپیره کرده و با ۱٪ - ۲٪ PB در M ۰/۱ GA جایگزین کنید. سلول‌ها را به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق ثابت کنید.

ج) سلول‌ها را با PBS سه بار بشویید.

د) سلول‌ها را در ۱٪ OsO₄ در PBS به مدت ۱ ساعت در دمای C ۴° در تاریکی قرار دهید.

۵) سلول‌ها را سه بار با آب مقطر بشویید.

و) سلول‌ها را در ۲٪ اورانیل استات در آب در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت رنگ آمیزی کنید (اختیاری).

ز) سلول‌ها را با آب مقطر سه بار در دمای اتاق بشویید (اختیاری).

ح) سلول‌ها را با شبیی از غلظت اتانول (از ۵۰٪ تا ۹۰٪) دهیدراته کنید. در هر مرحله بافت‌ها را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاث تکان دهید.

ط) سلول‌ها را با اتانول مطلق سه بار به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق دهیدراته کنید.

ی) لامل‌ها را به مدت ۵ ساعت در مخلوط ۱:۱ اتانول و Epon 812 غوطه ور کنید.

ک) لامل‌ها را به مدت ۵ ساعت در مخلوط ۱:۳ اتانول و Epon 812 غوطه ور کنید.

ل) لامل‌ها را در Epon 812 خالص غوطه ور کنید، آنها را برعکس کنید تا اتانول خارج شود و یک شب آنها را در یک محفظه بسته قرار دهید.

م) لامل‌ها را به صورت وارونه روی کپسول‌های ژلاتینی که با Epon 812 پر شده‌اند قرار دهید. مطمئن شوید که هیچ حباب هوایی در زیر لامل‌ها وجود نداشته باشد.

ن) رزین را در دمای C ۸۰° به مدت ۴۸ ساعت پلیمریزه کنید.

س) با گرم کردن کپسول‌ها روی یک صفحه داغ، لامل‌های شیشه‌ای را بردارید. اطمینان حاصل کنید که تمام شیشه‌ها برداشته شده‌اند.

ع) با یک چاقوی الماسی، بخش‌های فوق نازک ۷۰ تا ۸۰ نانومتری را برش داده و بدست آورید.

ف) برش‌ها را با ۴٪ اورانیل استات آبی و ۰/۴٪ سیترات سرب، هر کدام به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی کرده و مطابق آنچه در بالا توضیح داده شد مشاهده کنید.

تکنیک‌هایی برای میکروسکوپ ایمنوالکترونی

اگرچه LC3 درون زا را می‌توان با ایمونوفلورسانس و آنالیزهای ایمونوهیستوشیمی تشخیص داد، اما هیچ آنتی بادی تجاری علیه LC3 برای تشخیص LC3 درون زا توسط میکروسکوپ ایمنوالکترونی وجود ندارد. متناوباً، با استفاده از آنتی بادی‌های ضد GFP، GFP-LC3 را می‌توان در سطحی فراساختاری^۱ تشخیص داد. متدائل ترین روش‌ها برای میکروسکوپ ایمنوالکترونی در زیست‌شناسی سلولی، روش توکویاسو^۲ و برچسب گذاری بر روی مقاطع رزین متاکریلات^۳ است. برای تشخیص سیگنال‌های GFP با میکروسکوپ ایمنوالکترونی، روش توکویاسو با استفاده از مقاطع بخ زده بسیار نازک^۴ ترجیح داده می‌شود. در این روش، برچسب‌گذاری دوگانه GFP و Lamp1 درون زا، یک نشانگر لیزوژومی، نیز با استفاده از آنتی بادی‌های دوم کونژوگه به ذرات طلای کلوئیدی با قطرهای مختلف امکان‌پذیر است. به دلیل استفاده از اولترامیکروتوم‌های بهتر (مانند UCT/FCS، Leica ultracut و UC7/FC7) و پیشرفت در چاقوهای الماسی، روش توکویاسو در حال حاضر کاملاً قابل اعتماد شده است. جزئیات روش توکویاسو در مقالات دیگری گفته شده است.

¹ Ultrastructural

² Tokuyasu

³ Methacrylate

⁴ Ultrathin cryosections

فصل ۳

نقش اتوفاژی در عفونت ویروس‌های DNA دار in vivo در

مقدمه

ماکرواتوفاژی (که از این به بعد اتوفاژی نامیده می‌شود) یک مسیر تکاملی باستانی است که نقش‌های اساسی در چندین فرآیند فیزیولوژیکی اساسی از جمله هموستاز، بقا، توسعه، تمایز و ایمنی ایفا می‌کند. دهه گذشته شاهد انفجار سریع مطالعات در مورد نقش اتوفاژی در سلامت انسان و بیماری‌ها از جمله انواع بیماری‌های عفونی بوده است. مدولاسیون فارماکولوژیک اتوفاژی ممکن است یک استراتژی درمانی جدید برای درمان بیماری‌های ناشی از ویروس‌های مهم پزشکی (و سایر پاتوژن‌های داخل سلولی) باشد. نکته مهم این است که سازگاری‌های متقابل طولانی‌مدت در طول تکامل مشترک ویروس‌ها و یوکاریوت‌ها، تعامل بیچیده‌ای را بین اتوفاژی و ویروس‌ها شکل داده است، همانطور که در چندین برسی اخیر و همچنین در چندین فصل دیگر در این کتاب مورد بحث قرار گرفته است.

پیشرفت‌های اخیر نقش ضد ویروسی و پیش‌ویروسی اتوفاژی و همچنین عملکردهای مستقل از اتوفاژی پروتئین‌های مرتبط با اتوفاژی را در کنترل عفونت‌های ویروسی نشان داده است. در این فصل، ما بر روی تعامل درون تنی بین اتوفاژی و ویروس‌های مختلف DNA دار انسانی تمکز خواهیم کرد. (برای بحث مفصل در مورد اتوفاژی و ویروس‌های RNA دار در *in vivo*،

به فصل ۴ مراجعه کنید). ما از اصطلاح "in vivo" برای نشان دادن رویکردهای تجربی انجام شده در موجودات زنده استفاده می‌کنیم.

روش‌های تجربی آزمایشگاهی (یعنی مطالعات با استفاده از سلول‌های کشت شده) برای کشف مکانیسم‌های مولکولی که توسط آن ویروس‌ها و سایر پاتوژن‌های داخل سلولی با اتوفاژی در سلول‌های هدف میزبان برهمنش می‌کنند، حیاتی هستند. با این حال، تأثیر چنین رویکردهایی به شدت به ارتباط آنها با فرآیندهای بیولوژیکی در *in vivo* بستگی دارد. نتیجه یک عفونت ویروسی مشخص و تداخل آن با مسیر اتوفاژی در *in vivo* شامل عوامل متعددی است از جمله دوز عفونت، مسیر ورود و انتشار، تروپیسم سلولی و نقش‌های مختلف پروتئین‌های اتوفاژی در انواع سلول‌های متمایز، برهمنش‌های میزبان / پاتوژن اختصاصی هر گونه، و تعامل با ایمنی ذاتی و اکتسابی. بنابراین، اغلب نمی‌توان نتیجه مطالعات درون تنی عفونت‌های ویروسی را بر اساس مطالعات آزمایشگاهی پیش بینی کرد. به عنوان مثال، اتوفاژی، تکثیر ویروس chikungunya را در سلول‌های کشت شده افزایش می‌دهد. با این حال، در طول عفونت ویروس Atg16l در *in vivo* chikungunya افزایش داده‌اند و موش‌هایی که با پیتیدهای القاکننده اتوفاژی درمان شده‌اند، کشنده‌گی را کاهش داده‌اند. بنابراین، مطالعات درون تنی روی اتوفاژی و عفونت‌های ویروسی فرصتی منحصر به فرد برای بررسی لایه‌های متعدد عملکرد اتوفاژی و اثرات خالص آن‌ها بر نتیجه بیماری‌های ویروسی فراهم می‌کند.

تا به امروز، بیشتر مطالعات درون تنی که نقش اتوفاژی در عفونت ویروس‌های DNA دار را مورد بررسی قرار می‌دهند، شامل دو ویروس هستند، ویروس هرپس آلفا با پوشش بزرگ، ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (HSV-1)، و ویروس هپادنا با پوشش کوچک، ویروس هپاتیت (HBV). HSV-1 باعث انواع سندروم‌های بالینی مختلف در انسان می‌شود، از جمله عفونت‌های منتشر نوزادان، عفونت‌های دهانی تناسلی، بیماری‌های چشمی و آنسفالیت پراکنده تهدید کننده زنده‌گی. عفونت HBV یکی از علل عمدۀ جهانی هپاتیت مزمن، سیروز و کارسینوم کبدی است. مطالعات انجام شده از چندین آزمایشگاه نشان داده‌اند که اتوفاژی یک مکانیسم ضد ویروسی ضروری برای میزبان است که تکثیر، انتشار و پاتوژن‌*z*-1 *in vivo* را در HSV-1 محدود می‌کند (مورد بحث در بخش ۱,۳,۳). در مقابل، اتوفاژی، نقش پروویروسی را در طول عفونت HBV در کبد ایفا

۵۵ :: فصل ۳: نقش اتوفاژی در عفونت ویروس‌های DNA دار در *in vivo*

می‌کند (مورد بحث در بخش ۲,۳). در این فصل، ما این مطالعات را مرور خواهیم کرد و تأثیر متقابل پیچیده بین اتوفاژی و پاتوژن ویروس‌های DNA دار مهم پزشکی را آشکار خواهیم کرد.

تداخل درون تنی بین اتوفاژی و ویروس‌های DNA دار در گیاهان و بی مهرگان

همانطور که در فصل ۱ بحث شد، اتوفاژی یک مسیر باستانی تکاملی است که نشان داده شده است گیاهان و بی مهرگان را در برابر ویروس‌های RNA دار محافظت می‌کند. تعامل درون تنی بین اتوفاژی و ویروس‌های DNA دار در گیاهان و بی مهرگان هنوز به خوبی مورد مطالعه قرار نگرفته است. با این حال، مشاهدات اولیه نقش احتمالی اتوفاژی را در پاسخ ایمنی ذاتی مگس سفید، حشره ناقلی که Begomovirus، ویروس چینی برگ زرد گوجه فرنگی (TYLCCNV) را به گیاهان گوجه فرنگی منتقل می‌کند، نشان می‌دهد. تجزیه و تحلیل‌های گسترده پاسخ رونویسی مگس‌های سفید به TYLCCNV، تنظیم مثبت ژن‌های مربوط به اتوفاژی (Atg3، Atg9)، و Atg12) و عملکرد لیزوژومی (کاتپسین B و v-ATPase) را نشان داد. علاوه بر این، در طی عفونت گوجه فرنگی با یک Begomovirus، درمان با راپامایسین، یک فعال کننده اتوفاژی، تجمعات پروتئین پوششی ویروسی با اندازه کوچک و متوسط را کاهش داد، در حالی که درمان با ورتمانین، یک مهارکننده اتوفاژی، منجر به تجمع توده‌های پروتئین پوششی ویروسی نامحلول شد. مطالعات بیشتری برای ارزیابی بیشتر نقش اتوفاژی در مگس‌ها و سایر بی مهرگان در پاسخ ایمنی ذاتی به عفونت با Begomoviruses و سایر ویروس‌های DNA دار مورد نیاز است.

تداخل درون تنی بین اتوفاژی و ویروس‌های DNA دار در مهره داران

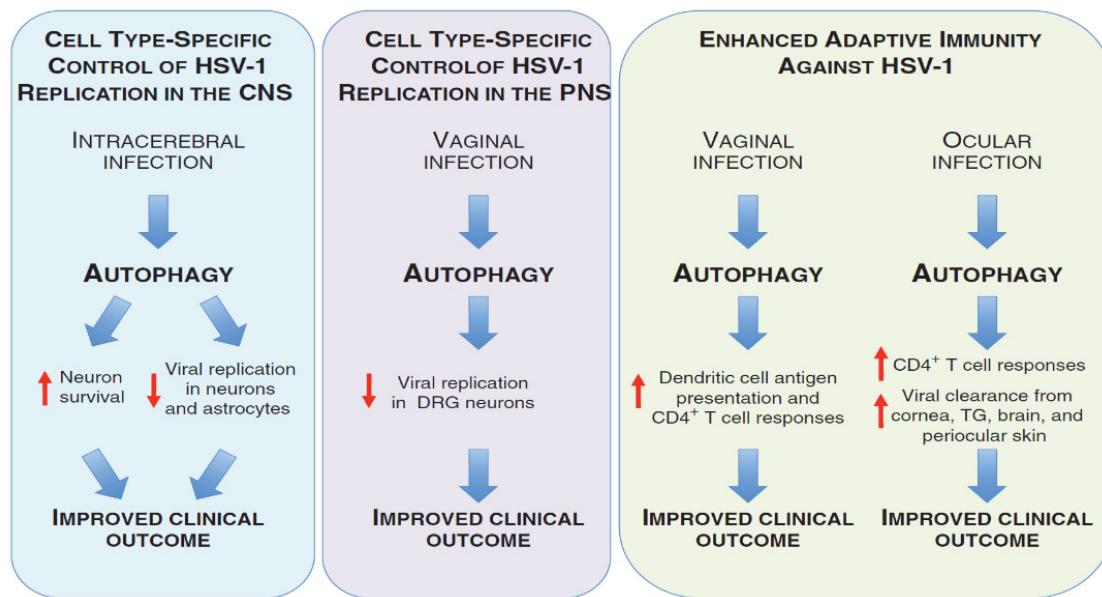
اتوفاژی یک مکانیسم ضد ویروسی ضروری است که در برابر HSV-1 در حالت درون تنی محافظت می‌کند

اولین ارتباط بین عفونت‌های ویروس DNA و اتوفاژی توسط یک مطالعه میکروسکوپ الکترونی (EM) در اواخر دهه ۱۹۷۰ توصیف شد که در آن ویریون‌های HSV-1 و سیتومگالوویروس در داخل اتوفاگوزوم‌ها یافت شدند. با این حال، برای چندین دهه، اهمیت اتوفاژی در پاتوژن ویروسی ناشناخته بود. همانطور که در فصل‌های ۴ و ۱۷ بحث شده است، در سال ۱۹۹۸، آزمایشگاه ما نشان داد که بیان عصبی اجباری پروتئین اتوفاژی 1 Beclin در نورون‌های آلووده به ویروس،

تکثیر ویروس، آپوپتوز عصبی و مرگ و میر حیوانات را در موش‌های آلوده به ویروس Sindbis کاهش می‌دهد. این مشاهدات نشان داد که تنظیم مثبت اتوفاژی (از طریق بیان بیش از حد پروتئین اتوفاژی) در *in vivo* می‌تواند نتایج بالینی را در موش‌های آلوده به ویروس بهبود بخشد. با این حال، این مطالعه به نقش مسیر درون زا در دفاع ضد ویروسی میزان پرداخت. آزمایشگاه ما مدلی را برای بررسی این سوال با ساخت یک ویروس هرپس سیمپلکس جهش یافته که قادر به مهار اتوفاژی نیست توسعه داد. ما این کار را با حذف ۲۰ اسید آمینه در دامنه N ترمینال پروتئین عصبی، ICP34.5 انجام دادیم، که از تعامل آن با پروتئین اتوفاژی، Beclin 1، بدون تأثیر بر توانایی آن در جلوگیری از خاموش شدن سلول میزان جلوگیری می‌کند (که توسط دامنه C GADD34.5 ICP34.5 انجام می‌شود). در سال ۲۰۰۷، ما گزارش دادیم که جهش Beclin 1، HSV-1 Δ 68-87، HSV-1 Δ BBD (یا Δ 68H) فاقد دامنه اتصال به Beclin 1 (BBD) که قادر به مهار اتوفاژی نیست، در موش‌ها بسیار ضعیف شده است. این یافته‌ها نقش مهمی را برای فرار HSV-1 از اتوفاژی در شدت تکثیر ویروسی پیشنهاد می‌کند و اولین مورد این اصل را ارائه می‌دهد که فرار ویروسی از اتوفاژی ممکن است در پاتوژنر ویروسی نقش داشته باشد. این اصل نقش مهمی را برای مسیر اتوفاژی درون زا در دفاع ضد ویروسی پستانداران در *in vivo*، حداقل در عفونت‌های نوروتروپیک، نشان می‌دهد.

از سال ۲۰۰۷، چندین مطالعه دیگر نیز از ویروس جهش یافته HSV-1 مهارکننده اتوفاژی (Δ BBD) برای مطالعه بیشتر تعامل بین اتوفاژی و جنبه‌های مختلف پاتوژن HSV-1 استفاده کرده‌اند. علاوه بر این، موش‌ها فاقد میکرو RNA (miR-155) هستند که یک فعال کننده اتوفاژی است. به دنبال عفونت چشمی HSV-1، پاسخ‌های سلول‌های CD8+ T مختل شده و نوروپرولانس HSV-1 افزایش یافته است. درکل، بر اساس این مطالعات، چند اصل کلی مهم در مورد اتوفاژی و پاتوژن HSV-1 پدیدار شده است (شکل ۳، ۱). اول، اتوفاژی نقش اختصاصی سلولی را در دفاع ضد ویروسی HSV-1 ایفا می‌کند و تکثیر ویروس را در نورون‌ها کاهش می‌دهد، اما نه در سلول‌های اپیتلیال (یا سایر سلول‌های میتوزی). این مورد مربوط به مدل‌های عفونت HSV-1 سیستم عصبی است، چه از طریق تلقیح مستقیم داخل مغزی ویروس یا از طریق انتشار از محل تلقیح مخاط وازن، و همچنین پیامدهایی برای توسعه ناقل‌های انکولیتیک HSV-1 برای درمان تومورهای مغزی انسان دارد. دوم، اتوفاژی نقش مهمی در افزایش پاسخ‌های ایمنی اکتسابی به HSV-1 ایفا می‌کند. این امر به ویژه در کنترل گسترش ویروسی

و محدود کردن عوارض ناشی از عفونت چشمی HSV-1 و عفونت واژینال-HSV-2 مهم است. در بخش‌های فرعی زیر، داده‌های حمایتی از هر یک از این مفاهیم بررسی خواهد شد.



شکل ۳.۱ عملکرد اتوفاژی در دفاع ضد HSV-1 in vivo. پانل‌های سمت چپ و مرکزی به ترتیب نقش اتوفاژی را در محافظت در برابر عفونت HSV-1 در سیستم عصبی مرکزی (CNS) و سیستم عصبی محیطی (PNS) پس از عفونت داخل مغزی یا واژن نشان می‌دهند، همانطور که توسط مطالعات با استفاده از یک سویه جهش یافته از HSV1 نشان داده شده است. یک حذف در پروتئین عصبی، ICP34.5، که توانایی آن را برای اتصال به 1 Beclin و مهار اتوفاژی مسدود می‌کند. پانل سمت راست نقش اتوفاژی را در تقویت اینمنی تطبیقی در برابر عفونت HSV-1 در مدل‌های عفونت واژینال و چشمی نشان می‌دهد، همانطور که توسط مطالعات با استفاده از سویه جهش یافته با نقص مهارکننده اتوفاژی HSV-1 و/یا موش‌هایی با جهش‌های مهندسی شده ژنتیکی در ژن‌های میزبان نشان داده شده است. برای توضیحات بیشتر به متن مراجعه کنید. DRG، گانگلیون ریشه پشتی، TG، گانگلیون سه قلو.

اتوفازی یک مکانیسم دفاعی مهم میزبان در برابر عفونت HSV-1 در سیستم عصبی مرکزی و سیستم عصبی محیطی است

اثرات اتوفاژی بر دفاع میزبان در سیستم عصبی مرکزی (CNS) با استفاده از تلقیح داخل جمجمه ای مستقیم HSV-1 Δ BBD (همچنین به عنوان δ 68H شناخته می‌شود) و ویروس نشانگر نجات آن (معروف به HSV-1 δ 68HR یا HSV-1 Δ BBDR) ارزیابی شده است. اگرچه این یک مسیر طبیعی عفونت نیست، اما یک مدل مفید برای دور زدن مراحل اولیه پاتوژن ویروسی (از جمله تکثیر در محل اولیه ورود و انتشار) برای مطالعه مستقیم تعاملات بین HSV-1 و اتوفاژی در

سیستم عصبی مرکزی ارائه می‌کند. به استثنای یک مطالعه محدود که روی موش‌های بسیار حساس A/J انجام شد، همه مطالعات دیگر نشان داده‌اند که تکثیر HSV-1ΔBBD در مغز موش‌های نوع وحشی مختل شده است، همانطور که ویروس‌زایی عصبی HSV-1 نیز مختل است. علاوه بر این، ویروس‌زایی عصبی HSV-1ΔBBD در موش‌های -/-pkr و -/-PrP بازیابی می‌شود، که نشان می‌دهد مولکول سیگنال‌دهنده eIF2α کیناز ضد ویروسی، PKR، و پروتئین پریون سلولی هر دو در بالادست Beclin 1 برای القای اتوفاژی عمل می‌کنند.

در مدلی که گسترش طبیعی عفونت HSV-1 را تقلید می‌کند، به وضوح نقش مختص نورون برای اتوفاژی در دفاع ضد ویروسی در برابر عفونت HSV-1 در سیستم عصبی محیطی (PNS) را نشان داده است. به دنبال عفونت داخل واژینال، HSV-1ΔBBDR و HSV-1ΔBBD موش‌ها و موش‌های نوع وحشی با ناک اوت خاص کراتینوسیت زن اتوفاژی، Atg5 را به طور مشابه تکرار می‌کنند، که نشان می‌دهد اتوفاژی تکثیر HSV-1 را در مکان‌های اپیتلیال مخاطی کنترل نمی‌کند. با این حال، علی‌رغم سطوح مشابه تکثیر ویروسی در مخاط و اژن، موش‌های آلوه به HSV-1ΔBBDR کاهش وزن، آسیب زایی و کشندگی را نشان دادند که با سطوح بالاتری از تکثیر در نورون‌های گانگلیون ریشه پشتی (DRG) همراه بود که مخاط واژینال را عصب دهی می‌کنند. علاوه بر این، نورون‌های گانگلیون ریشه پشتی (DRG) آلوه خارج از بدن که کمبود Atg5 داشتند، سطوح مشابهی از همانندسازی HSV-1ΔBBD و HSV-1ΔBBDR را بروز می‌دهند، که نشان می‌دهد نقص تکثیر HSV-1ΔBBD در نورون‌های DRG می‌تواند در غیاب اتوفاژی میزان بازیابی شود. علاوه بر این، سطوح تکثیر HSV-1ΔBBD و HSV-1ΔBBDR در نورون‌های DRG دارای کمبود Atg5 در مقابل نورون‌های نوع وحشی بالاتر بود، اما در فیبروبلاست‌های جنینی موش با کمبود MEFs (MEFs) در مقابل MEFs نوع وحشی بالاتر نبود. علاوه بر این، شده تکثیر HSV-1 نوع وحشی (HSV-1ΔBBDR) در موش‌های فاقد سلول‌های CD4+ و افزایش یافت، که نشان می‌دهد که اتوفاژی برای محدود کردن شدت HSV-1 به دنبال عفونت داخل واژینال مستقل از پاسخ‌های سلولی کافی است. این داده‌ها با هم از نقش مستقل سلولی برای اتوفاژی در کنترل تکثیر HSV-1 در نورون‌ها پشتیبانی می‌کنند، اما نه در کراتینوسیت‌ها یا MEFs.

اساس مکانیکی نقش منحصر به فرد اتوفاژی در کنترل HSV-1 در نورون‌ها هنوز شناخته نشده است. از نظر پاتوژن آنسفالیت HSV-1، اتوفاژی ممکن است در ارتقاء بقای نورون‌های آلوه

فصل ۳: نقش اتوفاژی در عفونت ویروس‌های in vivo دار در DNA

نقش داشته باشد. در واقع اهمیت فعالیت پیش‌بقا/ضد اپوپتوز ژن‌های اتوفاژی در یکی دیگر از عفونت‌های ویروسی نورونوتروپیک، یعنی ویروس آنسفالیت Sindbis نشان داده شده است. اثرات ضد ویروسی اتوفاژی در نورون‌ها همچنین ممکن است اهمیت منحصر به فرد بیگانه خواری (و مکانیسم‌های غیر سیتولیتیک کنترل ویروس) را در سلول‌های پست میتوتیک غیرقابل تجدید حیاتی مهم نشان دهد. در واقع، ما دریافتیم که ویریون‌های HSV-1 (قاد ICP34.5 یا BBD ICP34.5) در داخل اتوفاگولیزوزوم‌ها در نورون‌های سمپاتیک کشت اولیه تخریب می‌شوند. تا کنون، تفاوت‌های تکثیر در سلول‌های دارای اتوفاژی در مقابل سلول‌های دارای نقص اتوفاژی (که با بیان آتناگونیست HSV-1 اتوفاژی میزبان یا حذف ژن اتوفاژی میزبان، Atg5 دچار نقص اتوفاژی می‌شوند) در کل مغز موش (به دنبال عفونت داخل مغزی)، ساقه مغز (به دنبال عفونت داخل چشمی)، نورون‌های گانگلیونی DRG (به دنبال عفونت‌های داخل واژن)، نورون‌های DRG کشت اولیه، و آستروسیت‌ها، کراتینوسیت‌ها، یا سلول‌های عصبی کشت اولیه قشر مغز مشاهده شده است. هنوز مشخص نیست که چرا چنین تفاوت‌هایی در آستروسیت‌ها و جمعیت‌های خاص اما نه همه جمعیت‌های نورونی مشاهده شده است. با این وجود، روی هم رفته، داده‌های درون تنی، همراه با داده‌های سلول‌های عصبی DRG فاقد Atg5 کشت‌شده اولیه، شواهد قانع‌کننده‌ای ارائه می‌کنند که اتوفاژی اثرات مهاری قابل توجهی بر تکثیر HSV-1 در نورون‌ها دارد.

یوردی و همکاران چندین فرضیه برای توضیح نقش خاص نورون بیگانه‌خواری در دفاع ضد HSV-1 ارائه کرده‌اند. اینها شامل (۱) افزایش سطح اتوفاژی در نورون‌های DRG در مقابل سلول‌های میتوزی (۲) ویژگی‌های منحصر به فرد چرخه زندگی HSV-1 در نورون‌ها، که ممکن است ویریون‌ها را نسبت به بیگانه خواری حساس‌تر کند. و (۳) پرده برداشتن از بیگانه خواری در anti-HSV-1 در انواع سلول‌هایی که در برابر کنترل ویروسی با مکانیسم‌های دیگری که در سلول‌های میتوزی مهم هستند، مقاوم‌تر هستند. شامل پاسخ‌های اینترفرون نوع I و سایر مکانیسم‌های ایمنی سیتولیتیک. در واقع، یوردی و همکاران نشان دادند که نورون‌های آلوده به HSV-1 در مقایسه با سلول‌های میتوزی، IFN نوع I کمتری تولید می‌کنند و تحت تاثیر یک برنامه ضد ویروسی IFN کمتر موثر قرار می‌گیرند. اگرچه نورون‌ها سطوح بالاتری از بازیلن ۱ را نسبت به بسیاری از انواع سلول‌های دیگر بیان می‌کنند و اتوفاژی پایه به ویژه در کنترل کیفیت پروتئین و اندامک‌ها در نورون‌ها مهم است.

هنوز مشخص نیست که آیا میزان اتوفاژی ناشی از ویروس در نورون‌ها بیشتر از سلول‌های پس از میتوز(پسامیتوزی) است یا خیر. با این حال، واضح است (به ویژه از مطالعات با وکتورهای انکولیتیک HSV-1، که در زیر ببینید)، که آنتاگونیسم ۱ HSV-1 Beclin ۱ برای همانندسازی در نورون‌ها ضروری است اما در سلول‌های میتوزی در CNS ضروری نیست. یک فرضیه جالب کشف نشده این است که تنظیم مکانی و زمانی منحصر به فرد بیوژن اتوفاژگوزوم در آكسون‌های عصبی ممکن است به نوعی در کنترل اتوفاژیک نورون خاص ویروس‌ها کمک کند. مطالعات بیشتری برای ارزیابی مکانیسم‌های دقیقی که توسط آن تکثیر HSV-1 توسط اتوفاژی در نورون‌ها کنترل می‌شود، مورد نیاز است.

اهمیت نسبی اتوفاژی در کنترل تکثیر HSV-1 در نورون‌ها در مقایسه با سلول‌های میتوزی و شناسایی دومین اتصالی بازلین ۱ HSV-1 ICP34.5 پیامدهای بالینی مستقیمی برای توسعه وکتورهای انکولیتیک HSV-1 برای درمان تومورهای مغزی انسان دارد. چندین مطالعه پیش بالینی کارایی بالقوه HSV-1 ICP34.5 فاقد کل ژن GADD34 را در درمان تومورهای مغزی ارزیابی کرده‌اند. با این حال، از آنجایی که HSV-1 ICP34.5 برای مسدود کردن سلول میزان در طول عفونت ویروسی مورد نیاز است (از طریق تعامل دامنه PP1α متعلق به eIF2α هدایت می‌کند)، تکثیر این ویروس حتی در سلول‌های سرطانی، به ویژه سلول‌های بنیادی گلیوبلاستوما (GSCs)، به دلیل ناتوانی آن در مقابله با توقف انتقال میزان، بسیار ضعیف می‌شود. کنایی و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که یک ساختار-HSV-1 جهش یافته فاقد دومین اتصال به Beclin ۱ از ژن ICP34.5 در کشتن GSC‌ها در شرایط آزمایشگاهی و در طولانی کردن بقای موش‌های حامل تومورهای مغزی مشتق از GSC موثرتر از یک جهش یافته فاقد کل ژن ICP34.5 بود. (هر دو جهش یافته همچنین دارای جهش دیگری در ژن HSV-1 ICP6 برای اطمینان از ایمنی در *in vivo* بودند). این مطالعه مزیت بالقوه حذف یک دامنه مهارکننده اتوفاژی یک پروتئین عصبی ویروسی را نشان می‌دهد تا یک ویروس را قادر سازد تا به طور موثر سلول‌های سرطانی، اما نه نورون‌های طبیعی را در مغز بکشد.

اتوفاژی نقش اساسی در اینمنی ضد HSV-1 ایفا می‌کند

استفاده از ویروس جهش یافته HSV-1 که قادر به مهار اتوفاژی نیست همچنین به روشن شدن نقش کلیدی اتوفاژی در اینمنی ضد ویروسی HSV-1 منجر شده است. به دنبال عفونت قرنیه، تیترهای کمتری از HSV-1ΔBBDR در مقابل HSV-1ΔBBD در نقاط زمانی دیرتر، در قرنیه، عقده‌های سه قلو، مغز، و به وضوح پوست دور چشم مشاهده کردند. این با بهبود نمرات بالینی و نفوذ التهابی کمتر در پوست همراه بود. این یافته‌ها باعث شد که محققان فرض کنند که HSV-1ΔBBD ممکن است به دلیل افزایش پاسخ‌های اینمنی اکتسابی ضعیف شود. در حمایت از این فرضیه، آنها دریافتند که عصب کشی HSV-1ΔBBDR تلقيق داخل جمجمه‌ای در موش هایی که دارای نقص اینمنی ذاتی بودند، به دلیل جهش‌های بی معنی در MyD88 یا Irf3 یا بازسازی نشد. فقدان یک فنوتیپ Irf3-/- در موش مهم است زیرا BBD HSV-1 ICP34.5 با دامنه درگیر در اتصال TBK1 همپوشانی دارد، که در بالادست Irf3 در سیگنال دهنده اینمنی ذاتی عمل می‌کند. در مقابل، ویروس زایی عصبی HSV-1ΔBBD در موش‌های Rag1-/- که قادر HSV-1ΔBBD ورود سلول T و بازیابی شد. علاوه بر این، موش‌های مبتلا به عفونت قرنیه- اکنش‌های افزایش حساسیت نوع تاخیری را افزایش دادند که با کاهش سلول‌های CD4+ T مسدود شد، که نقش اتوفاژی را در افزایش نمایش MHC II درون‌زا HSV-1 به سلول‌های CD4+ در in vivo نشان می‌دهد. مطابق با این یافته‌ها، دریافتند که موش‌هایی با حذف اختصاصی ژن اتوفاژی در سلول‌های دندربیتیک، Atg5، پاسخ سلول‌های CD4+ T را مختل کرده‌اند و به دنبال عفونت داخل واژینال با هرپس ویروس به سرعت تسلیم بیماری کشند شدند.

یک مطالعه اخیراً همچنین نشان داد که تیتر HSV-1ΔBBD در اوخر عفونت ناحیه قدامی چشم کاهش یافته است. این با آسیب کمتر شبکیه، التهاب کمتر چشم، و کاهش مرگ و میر ناشی از آنسفالیت HSV-1 به دنبال انتشار به مغز همراه بود. نویسنده‌گان مجموعه‌ای از سیتوکین‌ها را در چشم‌های آلدده به HSV-1ΔBBD و HSV-1ΔBBDR و در هسته ادینگر-وستفال (EW) که اولین هدف HSV-1 پخش شده از چشم آلدده به مغز است، اندازه‌گیری کردند. آنها بیشترین تغییرات را در سطوح بیان ژن التهابی، Nlrp3، و تغییرات کمتری در چندین مونوکاین و ژن‌های پاسخ ضد ویروسی ذاتی و افزایش تعداد ماکروفاژها در چشم‌های آلدده به HSV-1ΔBBD در زمان‌های اولیه پیدا کردند. این یافته‌ها به وضوح تغییرات در پاسخ اینمنی به عفونت چشمی

HSV-1ΔBBDR و HSV-1ΔBBD را نشان می‌دهد. با این حال، هیچ مطالعه‌ای برای تعیین اینکه آیا تغییرات بیان ژن پاسخ ایمنی مشاهده شده در موش‌های آلوده به HSV-1ΔBBD مسئول فنتیپ بیماری ضعیف شده است یا خیر، انجام نشد. سوال مهم دیگر این است که اساس مکانیکی کاهش شدت کلی انفیلتراسیون‌های التهابی چشم و آسیب شبکیه در موش‌های آلوده به HSV-1ΔBBD، با توجه به افزایش بیان Nrlp3 و سایر ژن‌های التهابی و همچنین افزایش انفیلتراسیون اوایله ماکروفاژها، چیست.

مطالعات درون تنی که در بالا توضیح داده شد، به وضوح نقش مهمی را برای HSV-1 آنتاگونیسم Beclin1 در تعديل ایمنی میزبان در برابر پاتوژن HSV-1 و HSV-1، به ویژه در کاهش پاسخ‌های سلول T CD4+ که در کنترل عفونت HSV-1 مهم هستند، نشان می‌دهد. سایر مطالعات انجام شده در شرایط آزمایشگاهی نیز نقش BBD HSV-1 ICP34.5 در جلوگیری از بلوغ اتوفاگوزوم‌ها در سلول‌های دندریتیک و تحریک پاسخ سلول‌های TCD4+ اختصاصی آنتی ژن نشان داده‌اند. این نشان می‌دهد که HSV-1 ICP34.5 ممکن است در زمینه‌های خاص سلولی عمل کند تا تشکیل اتوفاگوزوم و بلوغ آن را مسدود کند، که هر کدام ممکن است به اختلال در ارائه آنتی ژن MHC II درون‌زا کمک کند.

اگرچه، مسلماً نقش اتوفاژی در پاتوژن ویروسی in vivo برای HSV-1 بیش از هر ویروس دیگری مورد مطالعه قرار گرفته است، اما سؤالات مهم بسیاری باقی مانده است. عملکرد منحصر به فرد اتوفاژی در کنترل عفونت‌های HSV-1 در نورون‌ها و نقش اتوفاژی در ارائه درون‌زا MHC II در حال حاضر به خوبی ثابت شده‌اند. با توجه به اینکه نوروویرولانس-HSV-1ΔBBD پس از عفونت داخل جمجمه‌ای در موش‌های فاقد CD4 بازیابی می‌شود، همچنین به نظر می‌رسد که این دو عملکرد اصلی در تعیین پاتوژن HSV-1 CNS تلاقی داشته باشند. با این حال، ماهیت دقیق چنین گفتگوهای متقابل درک نشده است. همچنین، باید دید که آیا تنظیم اتوفاژیک ایمنی ذاتی و/یا سایر جنبه‌های پاتوژن HSV-1، مانند انتشار از مکان‌های تکثیر غیر عصبی به سلول‌های عصبی، به دفاع ضد ویروسی HSV-1 کمک می‌کند یا خیر. تا کنون، حداقل بر اساس مطالعه‌ای که ژنوم‌های ویروسی را در گانگلیون سه قلو در اواخر پس از عفونت قرنیه تعیین می‌کند، به نظر نمی‌رسد شواهدی برای نقش اتوفاژی در کنترل تأخیر HSV-1 وجود داشته باشد. در مقابل، داده‌های in vivo کاملاً قوی هستند و نشان می‌دهند که اتوفاژی،

فصل ۳: نقش اتوفاژی در عفونت ویروس‌های DNA دار در *in vivo*

احتمالاً از طریق نقش آن در بیگانه‌خواری، ارائه آنتی‌زن، و مکانیسم‌های هنوز توصیف نشده، برای تعیین نتیجه عفونت لیتیک HSV-1 در میزبان پستانداران ضروری است.

عامل اتوفاژی-HBV در *in vivo*: تعادل بین ویروسی

استثمار و سرکوب تومور

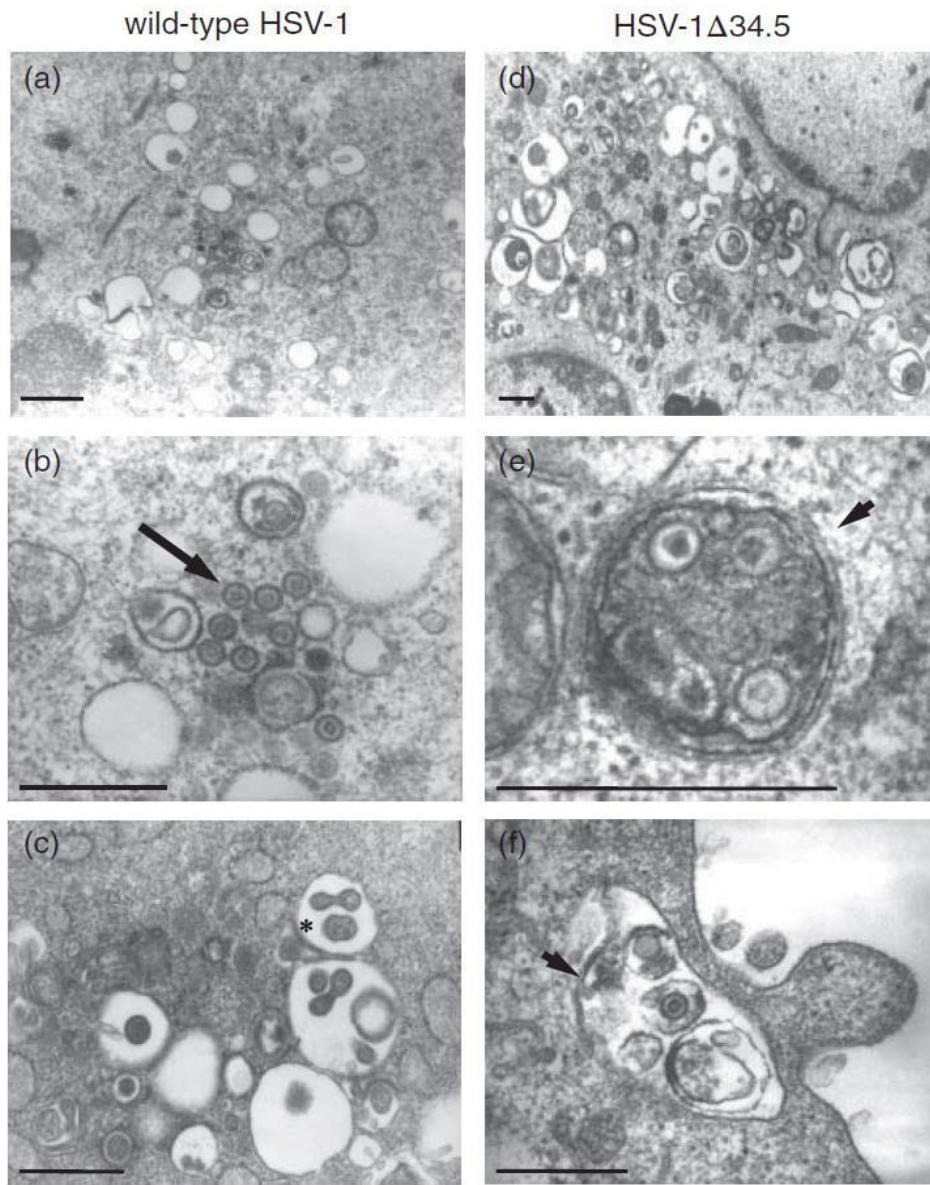
HBV از اتوفاژی برای تکثیر ویروسی استفاده می‌کند

برای سال‌ها، بر اساس مطالعات آزمایشگاهی مشخص شده است که ویروس‌ها می‌توانند از اتوفاژی و/یا ماشین‌های اتوفاژی برای تسهیل عفونت خود استفاده کنند. اخیراً، این مفهوم در (in vivo) نشان داده شده است، به ویژه برای ویروس دارای RNA، کوکساکی ویروس B (HBV) (مورد بحث در فصل ۴) و برای ویروس‌های دارای DNA، ویروس هپاتیت B3 (شکل ۳). نقش پروویروسی برای اتوفاژی در عفونت HBV در *in vivo* برای اولین بار با مشاهده اینکه روزه داری، که اتوفاژی را در کبد فعال می‌کند، تکثیر DNA HBV را در موش هایی که به صورت داخل کبدی با ساختار HBV-لوسیفراز تزریق شده‌اند یا HBV را به صورت ترازیخته بیان می‌کنند، پیشنهاد شد یک مطالعه جدیدتر نشان داد که knockout (حذف) اختصاصی زن Atg5 کبدی باعث کاهش واسطه‌های تکثیر کننده HBV DNA در کبد به سطوح تقریباً غیرقابل شناسایی و گردش HBV در سرم تا بیش از ۹۰ درصد کاهش یافت، که نشان می‌دهد Atg5 برای تکثیر ویروس در موش ترازیخته HBV مورد نیاز است. با این حال، هنوز به طور کامل درک نشده است که آیا کاهش تکثیر HBV در موش‌هایی که زن Atg5 ناک آوت (knockout) شده به دلیل اتوفاژی معیوب است یا فقدان سایر عملکردهای وابسته به Atg5. بر اساس مطالعات آزمایشگاهی، یک مکانیسم ممکن برای این یافته‌های درون تنی این است که HBV ممکن است از مراحل اولیه مسیر اتوفاژی برای تسهیل تکثیر آن در سلول‌های کبدی استفاده کند. اگرچه پوشش پروتئینی کوچک HBV (آنتی زن کوچک سطحی هپاتیت B یا SHB) باعث ایجاد استرس در شبکه آندوپلاسمی (ER) می‌شود که منجر به القای اتوفاژی می‌شود، HBx (HBX) بلوغ اتوفاگوزوم را از طریق تعامل با v-ATPase و اختلال در اسیدی شدن لیزوژومی مهار می‌کند. همچنین دریافتند که عفونت HBV در سلول‌های مجاز منجر به فعال شدن مراحل اولیه، اما نه دیررس، اتوفاژی می‌شود. مراحل اولیه اتوفاژی تکثیر DNA

HBV و پوشش ویروسی را تقویت می‌کند. یک سوال باز این است که دقیقاً چگونه دستگاه اتوفازی این اثرات را واسطه می‌کند. یک احتمال (با بروز یابی از مطالعات در مورد نقش اتوفازی در چرخه زندگی پیکورناویروس‌ها) این است که فعال شدن مراحل اولیه اتوفازی ممکن است به نفع پوشش HBV و انتشار آن از طریق ترافیک مستقیم آندوزوم / اگزوژوم باشد. مطالعات اخیر مورفوژنز HBV از مدلی پشتیبانی می‌کند که در آن نوکلئوکپسید (هسته) و پروتئین‌های پوششی HBV به اجسام چند وزیکولی جوانه می‌زند و از طریق یک مسیر اگزوژوم از سلول‌ها خارج می‌شوند، همانطور که در مورد ویروس نقص ایمنی انسانی ۱ (HIV-1) در ماکروفازها و سلول‌های T-لیفوبلاستیک انسانی چنین است.

سوال جالب دیگر این است که آیا HBV اتوفازی را در سطح رونویسی دستکاری می‌کند؟ بیان بیش از حد HBx منجر به افزایش بیان ژن 1 beclin 1 و LC3 و Lamp2a می‌شود. سلول‌های HepG2.2.15 تکثیر شونده HBV سطوح بیان ژن 1 beclin 1 را در مقایسه با سلول‌های بدون HBV نشان می‌دهند و فعال شدن اتوفازی توسط راپامایسین افزایش می‌یابد در حالی که مهار اتوفازی توسط MA-۲ به ترتیب میزان بیان پروتئین 1 Beclin 1 را کاهش می‌دهد. با این حال، برخی از مطالعات انجام شده در بیماران مبتلا به سرطان کبد انسان نتوانستند تنظیم مثبت آماری معنی‌دار بیان پروتئین 1 Beclin 1 را در بافت‌های HBV مثبت مشاهده کنند.

۶۵ ^{***} in vivo دار در DNA ویروس‌های اتفاقی در عفونت فصل ۳: نقش



شکل ۳،۲ ۳ تصاویر میکروسکوپی الکترونی نمایشی از تخریب اتفاقی HSV-1 در نورون‌ها. نورون‌های سمتیک موش با نوع وحشی HSV-1 یا یک سویه جهش یافته، HSV-1Δ34.5، که قادر ژن ICP34.5 نوروپرولانس (که یک آنتاگونیست اتفاقی میزان را کد می‌کند) آلوده شدند. در نورون‌های آلوده به نوع وحشی HSV-1 (a-c)، تعداد بسیار کمی ویریون در داخل اتوفاگوزوم‌ها یا اتلیزوزوم‌ها مشاهده می‌شود. در مقابل، سیتوپلاسم حاوی تعداد زیادی ویریون‌های درون سیتوپلاسمی آزاد (پیکان) و ویریون‌های درون وزیکول‌های ویروسی تک غشایی (آستریکس) است که واسطه‌هایی در خروج ویروس از محل هسته‌ای تکثیر DNA به خارج از سلول هستند. در نورون‌های آلوده به HSV-1Δ34.5 (d-f)، ویریون‌ها در داخل اتوفاگوزوم‌های اولیه دست‌نخورده (e) و همچنین در اتلیزوزوم‌هایی که حاوی ویریون‌های تا حدی تخریب شده (f) هستند مشاهده می‌شوند. در (e-f)، ساختارهای اتوفاگوزوم و اتلیزوزوم با نوک پیکان برچسب گذاری شده‌اند. نوار مقیاس، ۰,۵ میکرومتر.

اتوفازی ممکن است انکوژن مرتبط با HBV را سرکوب کند

عفونت مزمن HBV یکی از علل اصلی کارسینوم کبدی سلولی انسانی (HCC)، یکی از علل اصلی مرگ و میرهای مرتبط با سرطان در سراسر جهان است. با استفاده از یک مدل موش تاریخته HBV، متوجه شدیم که حذف تک الی Beclin 1 به طور قابل توجهی باعث تسريع ایجاد ضایعات پیشین بدخیم ناشی از HBV در موش‌ها می‌شود و اولین نشانه را ارائه می‌دهد که یک ژن اتوفازی می‌تواند شروع تومور را توسط آنکوژنیک عفونی کننده سرکوب کند. از دست دادن مونوآلی بکلین ۱ نیز در غیاب بیان تاریخته HBV منجر به سرطان کبد می‌شود. و حذف کبدی ژن‌های اتوفازی، Atg5 و Atg7، منجر به بروز بالای تومورهای خوش خیم کبدی می‌شود. در کل، این داده‌ها نقش کلی مسیر اتوفازی را در جلوگیری از شروع تومور در کبد، از جمله در تنظیم یک عامل ویروسی انکوژن، نشان می‌دهد. در واقع، فعالیت سرکوب کننده تومور ۱ Beclin در موش‌های تاریخته HBV احتمالاً از طریق اثرات بازدارنده مستقیم بر تکثیر HBV نیست، زیرا همانطور که در بالا بحث شد، Atg5 HBV را در *in vivo* تکثیر تسهیل می‌کند (در بخش آخر بحث شده است).

مکانیسم یا مکانیسم‌هایی که توسط آن اتوفازی ممکن است انکوژن ناشی از HBV را سرکوب کند هنوز شناخته نشده است. یک مطالعه اخیر مدلی را پیشنهاد کرده است که در آن تخریب اتوفازی یک microRNA، miR-224، با نقش انکوژنیک در سرطان کبد ممکن است به سرکوب انکوژن مرتبط با HBV با واسطه اتوفازی کمک کند. سطح miR-224 در بافت‌های HCC در مقایسه با بافت‌های غیر توموری مجاور و در کبد موش‌های تاریخته پروتئین HBV X بالاتر است. که این با کاهش بیان Atg5 همراه است. در موش‌های با مدل تومور HBV ارتوتوپیک، درمان با داروی القاکننده اتوفازی، آمیودارون، یا یک آنتاگونیست miR-224 باعث افزایش تخریب miR-224 با واسطه اتوفازی و سرکوب تشکیل تومور کبدی شد. این مطالعات این موضوع جالب را مطرح می‌کند که تخریب میکروRNAهای سرطان زا با واسطه اتوفازی ممکن است به محافظت در برابر سرطان کبد ناشی از HBV کمک کند.

اتوفازی ممکن است عفونت پایدار ویروس هرپس را سرکوب کند

۷-هربپس ویروس‌ها یک عفونت پایدار مدام‌العمر را در *in vivo* ایجاد می‌کنند و نقش مسیبی را در طیف گسترده‌ای از بدخیمی‌ها ایفا می‌کنند. هربپس ویروس مرتبط با سارکوم کاپوزی

KSHV)، همچنین به عنوان ویروس هرپس انسانی ۸، HHV-8 شناخته می‌شود) یک ویروس هرپس ۷ است که منجر به سارکوم کاپوزی (KS)، سندرم کستلمن، لنفوم حفره بدن و سایر اختلالات لنف تکثیری در انسان می‌شود. عفونت نهفته برنامه پیش‌فرض عفونت KSHV است و اعتقاد بر این است که در پاتوژن‌زد سارکوم کاپوزی ضروری است. یک سوال مهم این است که آیا فرار ویروسی از اتوفاژی به پاتوژن‌زد ویروس‌های ۷-هربپس انکوژن کمک می‌کند.

مشابه با ویروس α-هربپس، HSV-1، گاما-هربپس ویروس‌های انکوژن پروتئین‌های حدت را رمزگذاری می‌کنند که پروتئین اتوفاژی، Beclin 1 را هدف قرار می‌دهند. M11، و یک ویروس دیگر به نام Bcl-2، هر دو از طریق تعامل خود با دامنه BH3 Beclin 1، اتوفاژی را مهار می‌کنند. KSHV حداقل دو مهارکننده اتوفاژی اضافی را در ژنوم خود کد می‌کند، v-FLIP، یک پروتئین نهفته که از طریق تعامل با ATG3، اتوفاژی را مسدود می‌کند. و K7، یک پروتئین لیتیک که بلوغ اتوفاگوزومی را از طریق تعامل با روپیکون مهار می‌کند. وجود مهارکننده‌های متعدد اتوفاژی در ژنوم ویروس‌های ۷-هربپس این سوال را مطرح می‌کند که آیا اتوفاژی به عنوان یک مکانیسم دفاعی میزبان حیاتی برای کنترل عفونت ۷-هربپس ویروس در *in vivo* عمل می‌کند، در نتیجه فشار انتخابی برای ظهور استراتژی‌های فرار اتوفاژی در طول تکامل طولانی‌مدت با میزبان پستانداران ایجاد می‌کند.

یک مطالعه نقش فرار اتوفاژی را در پاتوژن‌زد ویروس ۷-هربپس در موش با استفاده از یک جهش HV68-γ که حاوی حذفی در M11 است فعالیت ضد اتوفاژی آن را مسدود می‌کند اما فعالیت ضد آپوپتوز آن را مسدود نمی‌کند، مورد بررسی قرار داد. این ویروس جهش یافته در حفظ عفونت مزمن در موش‌ها دچار اختلال شد (اگرچه به طور معمول تاخیر ایجاد می‌کرد)، نشان می‌دهد که اتوفاژی ممکن است یک عامل تعیین کننده حیاتی در ماندگاری ویروس ۷-هربپس در *in vivo* باشد. مطالعات بیشتری برای مشخص کردن مکانیسم‌هایی لازم است که توسط آن اتوفاژی تداوم ویروس ۷-هربپس و همچنین نقش فرار اتوفاژی در انکوژن‌زد ناشی از ویروس ۷-هربپس را کنترل می‌کند.

نتیجه گیری

در دهه گذشته، پیشرفت‌های قابل توجهی در درک تعامل پیچیده بین اتوفاژی و ویروس‌های DNA دار در سیستم‌های تجربی درون تنی صورت گرفته است. در این فصل، ما در درجه اول

بر دو گروه مختلف ویروس که با مسیر اتوفاژی به شیوه ای متناقض تعامل دارند، تمرکز کرده ایم. هرپس ویروس‌ها با اتوفاژی میزبان به عنوان بخشی از استراتژی حدت در تضاد هستند در حالی که به نظر می‌رسد ویروس هپاتیت B برای تکثیر بهینه به سیستم اتوفاژی نیاز دارد. شایان ذکر است که، به ویژه در مورد HSV-1، به نظر نمی‌رسد که استراتژی‌های فرار از اتوفاژی ویروسی برای تکثیر HSV در اکثر انواع سلول در شرایط آزمایشگاهی مهم باشد، که بر اهمیت مطالعات درون تنی برای بررسی اهمیت دفاع ضد ویروسی اتوفاژی تاکید می‌کند. علاوه بر این، همچنین شایان ذکر است که بسیاری از ویروس‌ها استراتژی‌هایی برای فرار از اتوفاژی میزبان ایجاد کرده‌اند، و در چنین مواردی (همانطور که در این فصل با HSV-1 نشان داده شده است)، مسدودسازی ژنتیکی چنین استراتژی‌هایی ممکن است برای کشف نقش اتوفاژی در اینی ضد ویروسی ضروری باشد.

با وجود پیشرفت‌های متعددی که در دهه گذشته در مدل‌های درون تنی HSV-1، HSV-68 و HBV انجام شده است، بسیاری از سؤالات اساسی مهم باقی مانده است. ما هنوز نمی‌دانیم که چگونه اتوفاژی در طول عفونت‌های ویروسی یا مجموعه متنوعی از استراتژی‌هایی که ویروس‌های DNA دار ممکن است برای مقابله با مسیر اتوفاژی استفاده کنند، فعال و تنظیم می‌شود. در حالی که آشکارا سیستم اتوفاژی تکثیر برخی از ویروس‌ها، مانند HBV (مورد بحث در این فصل) و پیکورناویروس‌ها (مورد بحث در فصل‌های ۴ و ۵) را تسهیل می‌کند، ما هنوز مکانیسم‌های دقیقی را که توسط آن پروتئین‌های اتوفاژی بر مراحل مشخص تکثیر ویروسی و پاتوژن ویروسی تاثیر می‌گذارند، درک نکرده ایم. ما شروع به درک این موضوع کردۀایم که پروتئین‌های اتوفاژی می‌توانند اثرات ذاتی سلولی داشته باشند که عفونت‌های ویروسی را تعدیل می‌کنند، مانند بیگانه‌خواری (که ضد ویروسی است) و نقش‌هایی در نقل و انتقال غشاء (که ممکن است پروویروسی باشد) و همچنین اثرات گسترده‌تری بر تنظیم اینی ذاتی و اکتسابی داشته باشند. با این حال، هنوز چیزهای بیشتری در مورد اینکه چگونه این عملکردهای متنوع از نظر مکانی و زمانی برای تنظیم پاتوژن دورن تنی عفونت‌های ویروسی هماهنگ می‌شوند، را باید آموخت. کشف پاسخ این سؤالات درک ما از اتوفاژی، ویروس شناسی و ایمونولوژی را افزایش می‌دهد، و همچنین به طور بالقوه اهداف دیگری را شناسایی می‌کند که می‌توانند برای تعديل درمانی مسیرهای مستقل اتوفاژی و/یا اتوفاژی در درمان بیماری‌های ویروسی مورد استفاده قرار گیرند.

فصل ۴

مطالعه ویروس‌های RNA دار و اتوفازی *in vivo*

مقدمه

در سال ۱۹۹۸، لوین و همکارانش پروتئین جدیدی به نام beclin را شناسایی کردند که با Bcl-2 تعامل داشت. این پروتئین هنگامی که از یک ویروس نوترکیب Sindbis (SINV) بیان می‌شود، تکثیر ویروس را در سیستم عصبی مرکزی موش‌های جوان مهار کرده و به طور قابل توجهی بیماری‌زای ویروس را کاهش می‌دهد. مطالعات بعدی نشان داد که beclin ارتولوگ پستانداران ATG6 مخمر (زن مرتبط با اتوفازی) بوده است و نقش کلیدی در تنظیم اتوفازی و آپوپتوز دارد. بنابراین، این مطالعه در سال ۱۹۹۸ مطالعه‌ای مهم بود که یک زن مرتبط با اتوفازی را در تعديل عفونت ویروس RNA دار را در داخل بدن برجسته می‌کرد.

در سال‌های بعد، تعاملات با اتوفازی برای بسیاری از ویروس‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت (که اخیراً توسط دونگ و لوین، ۲۰۱۳ بررسی شده است) اما اکثر این تجزیه و تحلیل‌ها به مطالعات در سلول‌های کشت بافت محدود شده‌اند و در بسیاری از موارد، بر سلول‌های نامیرا (به عنوان مثال، HeLas) تکیه کرده‌اند که اگرچه به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما ممکن است لزوماً منعکس کننده فعل و انفعالاتی نباشد که در طول عفونت طبیعی انواع سلول‌هایی که ویروسی خاص برای آنها گرایش دارد، رخ می‌دهد. در این راستا، مهم است که توجه داشته باشیم که هدف، در این فصل، بررسی برهمکنش‌های *in vivo* بین ویروس‌های RNA دار و اتوفازی است. اصطلاح "*in vivo*" تا حدودی مبهم است، زیرا نه تنها برای اشاره به مطالعات

مربوط به موجودات زنده دست نخورده (گیاهان و حیوانات)، بلکه برای آنالیز سلول‌های کشت بافت نیز استفاده شده است. این آزمایشگاه همیشه از این اصطلاح برای اشاره به سناریوی اولی استفاده می‌کند. از این رو، هدف این فصل این است که بررسی کند چگونه مسیر اتوفاژی، و/یا ژن‌های منحصر به فرد مرتبط با اتوفاژی، بر پیامد عفونت‌های ویروس RNA دار در گیاهان و حیوانات تأثیر می‌گذارند. مطالعاتی که کاملاً محدود به کشت بافت هستند، بدون داده‌های *in vivo* تکمیلی، در اینجا به طور گسترده مورد بررسی قرار نخواهند گرفت. به همین دلیل، آنالیزهای جالب کشت بافت پاتوژن‌های مهم انسانی مانند ویروس هپاتیت C و ویروس دنگی^۱ مورد بحث قرار نخواهد گرفت. خوب‌بختانه این موضوعات در فصول دیگر این کتاب مطرح شده‌اند. ویروس‌ها ممکن است در سطوح مختلف با اتوفاژی تعامل داشته باشند. بارزترین آنها یک تقاطع مستقیم بین مسیر اتوفاژی متعارف و چرخه حیات ویروسی است: به عنوان مثال، مسیر اتوفاژی ممکن است مواد ویروسی را جذب کند، مانع عفونت تولیدی شود (همانطور که برای برخی آلفاویروس‌ها رخ می‌دهد، به بخش ۴,۳,۱ مراجعه کنید) یا بر عکس، ویروس ممکن است مسیر را مهار کند، از اثرات سرکوبگر آن اجتناب کند و به طور بالقوه اتوفاژی را به سمت اهداف خود منحرف کند (به عنوان مثال، ویروس کوکساکی^۲، به بخش ۴,۳,۵). با این حال، در برخی موارد، عفونت ویروسی ممکن است به طور غیرمستقیم بر مسیر اتوفاژی تأثیر بگذارد، شاید از طریق سیتوکین‌هایی که در پاسخ به عفونت ایجاد می‌شوند؛ در این موارد، ویروس حتی ممکن است سلولی را که در آن مسیر اتوفاژی مختل شده است، آلوده نکند (به عنوان مثال، نوروویروس موش، به بخش ۴,۳,۲ مراجعه کنید). در نهایت، به طور فزاینده‌ای آشکار شده است که برخی از پروتئین‌های مربوط به اتوفاژی (و حتی برخی از کمپلکس‌های چند پروتئینی مربوط به اتوفاژی) عملکردهایی دارند که از مسیر اتوفاژی متعارف جدا هستند. به عنوان مثال، LC3 به طور معمول یک "پروتئین اتوفاژی" در نظر گرفته می‌شود؛ شکی نیست که برای مسیر اتوفاژی مهم است، اما این امر نقش آن را در سایر فرآیندهای سلولی رد نمی‌کند. از این رو، این مقاله مروری همچنین به تعامل بین ویروس‌های RNA دار و پروتئین‌های مرتبط با اتوفاژی، حتی زمانی که به نظر نمی‌رسد این تعامل شامل مسیر اتوفاژی متعارف باشد، نیز می‌پردازد. در نهایت، ویروس‌های RNA دار ممکن است بر اتوفاژی، حتی در سلول‌های غیر آلوده، احتمالاً با تحریک تولید سیتوکین‌هایی که می‌توانند مسیر اتوفاژی را تغییر دهند، تأثیر بگذارند (دوباره به

¹ Dengue² Coxsackievirus

بحث نورویروس‌ها در بخش ۴,۳,۲ مراجعه کنید). اگر این سیتوکین‌ها اتوفاژی را در سلول‌های سیستم ایمنی تعدیل کنند، به عنوان مثال، سلول‌های ارائه‌دهنده آنتیژن، این می‌تواند پاسخ ایمنی متعاقب را نیز تغییر دهد. با این حال، فصل ۱۸ این کتاب به تأثیر اتوفاژی بر ارائه آنتیژن اختصاص دارد. در نتیجه در اینجا مورد بحث قرار نخواهد گرفت.

برهمکنش‌های in vivo بین اتوفاژی و ویروس‌های RNA دار در گیاهان و بی‌مهرگان

گیاهان

گیاهان یک پاسخ ذاتی دارند که به آن پاسخ ازدیاد حساسیت گفته می‌شود که به صورت نوعی مرگ برنامه ریزی شده سلولی ظاهر می‌شود و معمولاً در موضع ترومما/عفونت رخ می‌دهد. با استفاده از مدلی از عفونت گیاه *Nicotiana benthamiana* توسط ویروس موزاییک تنباقو (TMV)، یک توباموویروس، با ژنوم RNA تک رشته ای سنس مثبت^۱، نشان داده شد که کنترل انتشار ویروس بستگی به beclin داشته، و خاموش کردن این ژن (یا Atg3, PI3K/VSP34) منجر به افزایش تکثیر موضعی TMV و پاتولوژی گسترده‌تر آن به برگ‌های مجاور و غیرعفونی شد و پیری به طور سریع‌تری گسترش یافت. از این رو، در این مدل، یک مسیر اتوفاژی دست نخورده به نظر می‌رسد که تکثیر ویروس را محدود کرده و همچنین پاسخ ازدیاد حساسیت بالقوه مضر را به مکان‌های عفونت واقعی محدود می‌کند.

بی‌مهرگان

مگس میوه، *Drosophila melanogaster*، ارگانیسمی است که در آن ژن Toll کشف شد و نشان داد که پاسخ ایمنی حشره به عفونت قارچی را تنظیم می‌کند. این موضوع زمینه را برای شناسایی گیرنده‌های Toll مانند در پستانداران را فراهم کرد و در ارتباط با این فصل، این مدل ژنتیکی in vivo، که بسیار نزدیک و مرتبط با ایمنی مهره‌داران است، را ایجاد کرد. آزمایشگاه Cherry با استفاده از یک مدل جدید از عفونت توسط ویروس استوماتیت وزیکولال رابدوویروس VSV (که دارای ژنوم RNA سنس منفی است) این مفهوم را گسترش داده است تا اتوفاژی را

^۱ Positive-sense

نیز در برگیرد. نویسندها با استفاده از سلول‌های مگس در کشت بافت شروع کردند و نشان دادند که VSV، به احتمال زیاد از طریق گلیکوپروتئین غشای ویروسی VSV-G، باعث اتوفاژی می‌شود و خاموش کردن ژن‌های مختلف اتوفاژی منجر به افزایش بسیار کوچک (دو برابری) اما از نظر آماری معنی‌دار در تولید ویروس شد. یک تفاوت کوچک مشابه (حدود سه برابر) در تیتر ویروسی در *in vivo*، در مگس‌هایی که عملکرد ژن Atg18 آن‌ها مختلف شده بود، مشاهده شد، اما با وجود این، افزایش چشمگیری در مرگ و میر ناشی از VSV وجود داشت؛ مگس‌های معمولی زنده مانند، در حالی که ۹۰٪ از مگس‌های فاقد Atg18 تسليیم شده بودند. مطالعات بیشتر از آزمایشگاه Cherry نتایج بیشتری به همراه داشته است. *D. melanogaster* – مانند پستانداران – تعدادی از ژن‌های Toll مختلف را رمزگذاری می‌کند، و اخیراً نشان داده شده است که ژن Toll-7 مگس یک گیرنده تشخیص الگوی واقعی است که باعث اتوفاژی می‌شود و در کنترل عفونت VSV در داخل بدن نقش دارد.

تعاملات درون تنی بین اتوفاژی و ویروس‌های RNA در مهره داران

Togaviridae

نشان داده شده است که دو توگاویروس به اثرات اتوفاژی در *in vivo* حساس هستند. هر دو عضوی از جنس آلفا ویروس هستند و به این ترتیب، ویروس‌هایی پوشش دار با ژنوم RNA دار تک رشته‌ای با سنس مثبت هستند. به دنبال مطالعات Beclin 1 که در بالا ذکر شد، نشان داده شد که SINV باعث ایجاد اتوفاژی در سلول‌های عصبی موش‌هایی می‌شود که در ۱ تا ۲ روزگی به صورت داخل مغزی آلوده شده‌اند و آنتی‌ژن ویروسی با اتوفاگوزوم‌ها در نورون‌ها همنشین می‌شود. علاوه بر این، با استفاده از موش‌هایی که در آنها ژن Atg5 به طور خاص در نورون‌ها مختلف شده بود، نویسندها نشان دادند که Atg5 به محافظت در برابر عفونت کشنده SINV کمک می‌کند. در غیاب Atg5 عملکردی نورونی، پاکسازی آنتی‌ژن SINV از CNS به تاخیر افتاده و افزایش مرگ عصبی رخ می‌دهد؛ علاوه بر این، داده‌های *in vitro* نشان داده‌اند که اتوفاژ و افزایش مرگ عصبی رخ می‌دهد؛ این داده‌ها در تیتر ویروسی، سطوح IFN نوع I، یا نفوذ به CNS مشاهده نشد.

فصل ۴: مطالعه ویروس‌های RNA دار و اتوفاژی *in vivo*

همچنین به نظر می‌رسد که اتوفاژی درجاتی از محافظت را در هنگام عفونت توسط ویروس CHIKV (Chikungunya)، ایجاد می‌کند. عفونت باعث اتوفاژی می‌شود، که بقای سلولی را طولانی می‌کند و اثرات سیتوپاتیک ویروس را محدود می‌کند؛ در مقابل، سرکوب ژن‌های مختلف اتوفاژی (۱) آپوپتوز را تسريع می‌کنند و (۲) تکثیر ویروسی را در کشت بافت افزایش می‌دهند. این اثرات به عرصه *in vivo* گسترش یافته است: موش‌هایی که در آنها اتوفاژی مختل می‌شود، احتمال بیشتری داشت که تسلیم عفونت CHIKV شوند.

Caliciviridae

نوروویروس‌های موشی (MNV)، اعضایی از جنس نوروویروس در خانواده Caliciviridae، ویروس‌های RNA دار رشته مثبت بدون پوشش هستند. آنها در سال ۲۰۰۳ کشف شدند، اما به طور قابل توجهی به درک ما از تعاملات *in vivo* بین ویروس‌های RNA دار و اتوفاژی کمک کردند.

آلودگی با ویروس RNA دار می‌تواند اتوفاژی را به طور غیرمستقیم تغییر دهد، بدون اینکه سلول‌های آسیب دیده را آلوده کند

با استفاده از روش تله ژنی^۱، موش‌هایی تولید شدند که برای بیان ATG16L1 (معادل پستاندارانی Atg16 مخمر)، هیپومورفیک (HM) بودند، که همراه با ATG5 و ATG12، نقش اصلی را در پردازش و ادغام LC3-II به اتوفاگوزوم در حال توسعه ایفا می‌کنند. موش‌های *Atg16L1^{HM}*، ناهنجاری‌های مشخصی را در سلول‌های پانت^۲، سلول‌های اپیتلیال تخصصی که در پایه کریپت‌های روده‌ای قرار دارند، نشان دادند؛ سلول‌ها کاهش در عملکرد اگزوستیوژ طبیعی و افزایش بیان ژن‌های سیتوکین پیش التهابی را نشان دادند. با این حال، قابل توجه است که وقتی این موش‌ها مجدداً طی یک فرآیند (Enhanced barrier facilities) به دست آمدند، سلول‌های پانت آن‌ها از سلول‌های حیوانات تیپ و حشی غیرقابل تمایز بودند، که در نتیجه نشان می‌دهد عاملی برونزا در القای ناهنجاری‌های گزارش شده اولیه دخیل است. آزمایشات بعدی عفونت MNV پایدار را به عنوان یک محرک بالقوه شناسایی کرد. بنابراین، تغییرات مربوط به *ATG16L1^{HM}* در سلول‌های پانت که در ابتدا گزارش شده بود، احتمالاً مربوط به عفونت ناشناخته

¹ Gene trap

² Paneth

پایدار MNV بوده است. مطالعه دیگری نشان داد که نه تنها MNV درگیر است، بلکه عفونت طولانی مدت نیز مهم است، زیرا سویه متفاوت، نزدیک اما غیرمداوم MNV قادر به ایجاد این ناهنجاری ها، علیرغم ایجاد تیترهای مشابه در مرحله حاد عفونت، نبود. علاوه بر این، تغییرات در سلول های پانت با افزایش حساسیت به بیماری روده ای ناشی از سم همراه بود. با این حال، مکانیسم های مولکولی زمینه ای که باعث ایجاد نقص در سلول های پانت و افزایش همزمان حساسیت به بیماری می شوند، نامشخص هستند. تفاوت معنی داری در مقدار ویروس موجود در مدفوع موش های *Atg16L1^{HM}* در مقایسه با حیوانات دست نخورده ژنتیکی وجود نداشت و تجزیه و تحلیل دقیق نشان داد که MNV، سلول های پانت را آلووده نمی کند. روی هم رفته، این داده ها نشان می دهند که اثر عفونت MNV روی سلول های پانت باید غیرمستقیم باشد. اثرات ناشی از ویروس در موش های *Atg16L1^{HM}* - هم تغییرات در سلول های پانت و هم بیماری روده - به سیتوکین ها وابسته بود، بنابراین ممکن است قرار گرفتن طولانی مدت در معرض سیتوکین های ناشی از ویروس، مسیر مربوط به اتوفاژی را در سلول های پانت تعديل کند که، در موش های *Atg16L1^{HM}*، در نهایت ناکارآمد می شود و به سلول و میزان آسیب می رساند. با این حال، اگرچه وسوسه انگیز است که نتیجه گیری کنیم که باید یک رابطه علت و معلولی بین تغییرات در سلول های پانت و افزایش حساسیت به بیماری روده وجود داشته باشد، اما باید توجه داشت که بیان غیر طبیعی *Atg16L1* در تمام سلول های موش *Atg16L1^{HM}* وجود دارد. بنابراین، این امکان وجود دارد که سلول های پانت یک شاه ماهی قرمز باشند و عفونت مداوم MNV باعث ایجاد پاسخ های غیرطبیعی مرتبط با اتوفاژی در سایر انواع سلولی، هنوز ناشناخته باشد. این می تواند به طور مستقیم (اگر سلول های ناشناخته ای تحت تأثیر ویروس آلووده شده باشند) یا به طور غیرمستقیم (به عنوان مثال، اگر سلول ها تحت تأثیر سیتوکین ها قرار گرفته باشند) رخ دهد، و تغییرات حاصل در این سلول ها، به جای آسیب مشاهده شده در سلول های پانت، می تواند مسئول افزایش حساسیت به بیماری های روده ای آن باشد.

عفونت ویروس RNA دار ممکن است توسط کمپلکس های چند پروتئینی مرتبط با اتوفاژی که مستقل از مسیر متعارف عمل می کنند، سرکوب شود. پیچیدگی آنالیز مسیر اتوفاژی در *in vivo* در مطالعه ثانویه ای که بر روی MNV انجام گرفته، ویروسی که در ماکروفاژها تکثیر می شود، بیشتر مورد تاکید قرار گرفت. برای اولین بار توسط (هوانگ و همکاران، ۲۰۱۲) نشان داده شد که موش های فاقد گیرنده T1IFN (موش T1DFNRKO) به عفونت MNV مقاوم هستند و

این مقاومت به واسطه IFN γ است. سپس، آنها موش‌های T1IFNRKO را تولید کردند که در آن‌ها ژن Atg5 به طور خاص در ماکروفاژها مختل شده بود و متوجه شدند که این نقص موش‌ها را به عفونت کشنده MNV حساس می‌کند. این داده‌ها نشان می‌دهد که سیگنال دهی IFN γ به ماکروفاژها در MNV, *in vivo*, را به شیوه ای وابسته به Atg5 سرکوب می‌کند، و این در کشت بافت تایید شد؛ IFN γ نتوانست تکثیر MNV را در ماکروفاژهای دارای کمبود Atg5 سرکوب کند. قابل توجه است که اثر محافظتی IFN γ که نیاز به Atg5 دارد، شامل مسیر اتوفاژی متعارف نمی‌شود، زیرا تجویز القاکننده‌ها یا مهارکننده‌های مسیر نه تکثیر MNV را تغییر داده و نه از سرکوب ویروس به وسیله IFN γ جلوگیری می‌کند. در عوض، به نظر می‌رسد که مهار مبتنی بر ایترافرون گاما MNV، نیاز به کمپلکس چند پروتئینی ATG5-ATG12/ATG16L1 دارد، که – با یک مکانیسم ناشناخته – تشکیل پلت فرم‌های تکثیر MNV را مسدود می‌کند. در غیاب ATG5، این کمپلکس نمی‌تواند تشکیل شود؛ این به نوبه خود، از توانایی IFN γ در سرکوب تکثیر MNV در ماکروفاژها جلوگیری می‌کند. همانطور که نویسنده‌گان خاطرنشان کرده‌اند، این یافته‌ها نشان می‌دهد که تکامل به ارگانیسم‌های چند سلولی اجازه می‌دهد تا «کاست‌های» چند پروتئینی تولید کنند، که عملکرد آنها – در این مورد، در دفاع میزبان – می‌تواند به شیوه‌ای متفاوت، خاص سلول باشد.

Orthomyxoviridae

این خانواده شامل شش جنس، از جمله سه جنس ویروس آنفلوانزا (A, B، و C) است که ویروس‌های RNA تک رشته‌ای با سنس منفی هستند. ویروس آنفلوانزا A یک پاتوزن مهم انسانی است که پتانسیل ایجاد یک بیماری همه گیر را دارد که منجر به مرگ میلیون‌ها نفر می‌شود. اخیراً، سویه‌های H5N1 نگرانی خاصی ایجاد کرده‌اند و یک مطالعه تجمع اتوفاگوزوم‌ها در سلول‌های آلوئولی انسان و موش‌های آلوده به ویروس H5N1 را نشان داده است. آنالیزهای آزمایشگاهی نشان داد که سلول‌های آلوده به H5N1 از طریق مسیری شامل کیناز Akt، پروتئین سرکوب‌کننده TSC2 و هدف پستانداران را پامایسین، تحت مرگ سلولی اتوفاژیک قرار گرفتند. علاوه بر این، در یک مدل موش از عفونت و بیماری H5N1، با تجویز پیشگیری کننده یا درمانی MA-۳ (مهارکننده اتوفاژی)، التهاب ریوی کاهش و بقا افزایش یافت، و همین امر در مورد ورتمانین (مهارکننده PI3K) نیز صادق بود، که اتوفاژی را نیز مهار می‌کند. جالب توجه است که تیتر ویروسی تغییر نکرده بود؛ این نشان می‌دهد که در این مدل، هزینه‌های یک مسیر

اتوفاژی دست نخورده – افزایش حساسیت به مرگ اتوفاژیک در طول عفونت H5N1 – ممکن است بیشتر از مزایای آن باشد. علاوه بر این، اثرات مشاهده شده بر اتوفاژی و بیماری بین ویروس‌های H1N1 و H5N1 بسیار متفاوت است، که ویژگی عالی پاسخ‌های میزبان به عفونت را برجسته می‌کند و در مقابل در مورد نتیجه‌گیری کلی در مورد تأثیر اتوفاژی بر خانواده‌ها، جنس‌ها یا سویه‌های مختلف ویروس را هشدار می‌دهد.

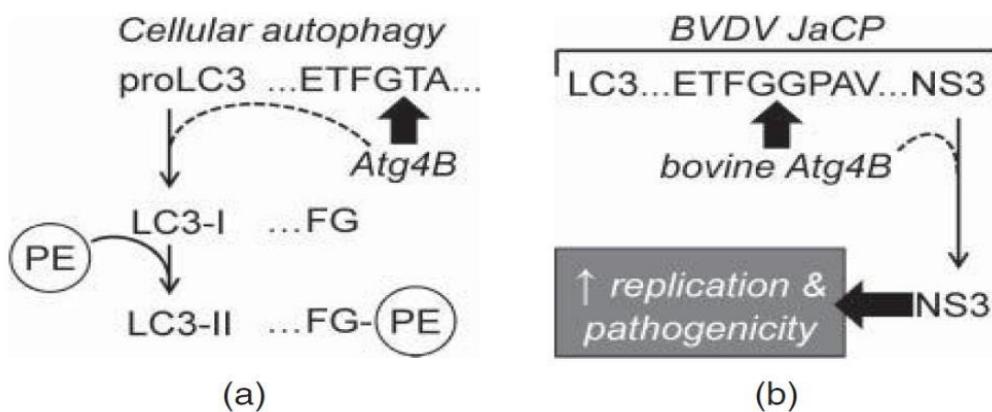
Flaviviridae

ویروس اسهال ویروسی گاوی (BVDV)، یکی از اعضای جنس Pestivirus (خانواده Flaviviridae، جنس Pestivirus) یک ویروس پوشش دار با ژنوم RNA دار سنس مثبت تک رشته‌ای به طول ۱۲۳۰۰ باز است که حاوی یک قاب خواندن باز منفرد است. پس از ترجمه، پلی پروتئین منفرد توسط پروتئازهای ویروسی و سلولی برای تولید پروتئین‌های ویروسی کاربردی بریده می‌شود. بیشترین ارتباط با موضوع فعلی یک پروتئین پیش ساز غیرساختاری، NS2/3، است. این پیش ساز بدون شکاف برای تولید ویروس عفونی ضروری است، اما NS3 بالغ (که نیاز به برش پیش ساز دارد) برای همانندسازی RNA ضروری است. همانند سایر Pestivirus‌ها، BVDV در دو «بیوتیپ^۱» سیتوپاتیک (cp) و غیر سیتوپاتیک (ncp) وجود دارد که با تأثیر ویروس بر سلول‌های کشت بافت تعریف می‌شود. این فنوتیپ‌ها تا حد زیادی با تعدیل کارایی برش NS2/3 NS2/3 کنترل می‌شوند. در cpBVDV، برش NS3 در اوایل عفونت نسبتاً کارآمد است و امکان تکثیر RNA را فراهم می‌کند، اما کارایی برش به طور چشمگیری بعد از عفونت کاهش می‌یابد، تکثیر مداوم را به شدت محدود می‌کند و منجر به تولید مقادیر کم ویروس عفونی می‌شود. در مقابل، در ncpcpBVDV، تولید بسیار کارآمد NS3 آزاد حفظ می‌شود (با مکانیسمی که در زیر توضیح داده شده است)، که منجر به فراوانی RNA داخل سلولی BVDV و افزایش همزمان در اثر سیتوپاتیک آن می‌شود. cpBVDV‌ها به طرق مختلف از ncpcpBVDV به وجود می‌آیند، اما سویه‌های cpBVDV دو ویژگی اصلی مشترک دارند: (۱) بیشتر آنها ناشی از رویدادهای نوترکیبی RNA هستند و (۲) تولید افزایش یافته و طولانی پروتئین NS3 آزاد را نشان می‌دهند. نوترکیبی بین ژنومی یک ویژگی کاملاً شناخته شده بیولوژی ویروس RNA دار است، اما به طور قابل توجهی، بیشتر cpBVDV‌ها از ترکیب مجدد بین ncp RNA ویروسی و

^۱ Biotypes

۷۷ فصل ۴: مطالعه ویروس‌های RNA دار و اتوفاژی in vivo

mRNA‌های سلولی تولید می‌شوند. چرا این مربوط به اتوفاژی است؟ هزاران ژن توسط ژنوم میزبان کدگذاری می‌شوند و بسیاری از mRNA‌های مرتبط (احتمالاً) برای نوترکیبی در دسترس هستند؛ با این حال، تنها چند توالی میزبان در cpBVDV شناسایی شده است و یکی از آنها است. میر^۱ و همکارانش یک سویه cpBVDV به نام JaCP را توصیف کردند که حاوی LC3 است. NS2/3 بومی همراه با یک NS3 کپی شده^۲ بود که توسط یک شکل کوتاه از LC3 سلولی ایجاد می‌شود. توالی اسید آمینه مربوطه در شکل ۴,۱ نشان داده شده است.



شکل ۴,۱ ادغام LC3 کوتاه شده توسط ncp BVDV یک سایت برش حساس به Atg4B ایجاد می‌کند و منجر به cpBVDV JaCP می‌شود. پانل (۱) خلاصه‌ای از پردازش عادی proLC3 را ارائه می‌دهد. سمت راست پانل اسیدهای آمینه مربوطه را در پروتئین نشان می‌دهد (به عنوان مثال، ETFGTA = FSGT). PE = فسفاتیدیل اتانولامین. پانل (ب) توالی آمینو اسیدی پیوندی را بین LC3 میزبان و پروتئین NS3 یک سویه سیتوپاتیک BVDV، به نام JaCP را نشان می‌دهد (متن را ببینید).

همانطور که در شکل (آ ۴,۱) نشان داده شده است، در طول اتوفاژی طبیعی، پروتئین سلولی proLC3 توسط پروتئاز سلولی ATG4B، نزدیک دیستال به یک واحد گلیسین خاص، شکسته می‌شود و LC3-I را تولید می‌کند؛ این پروتئین تحت پیوند کووالانسی سریع با فسفاتیدیل اتانول آمین (PE)، LC3-II را تولید می‌کند، که در اتوفاگوزوم در حال توسعه، گنجانده شده است. در JaCP (شکل ب ۱)، توالی‌هایی که واحدهای LC3 تا شامل این گلیسین را کد می‌کنند، درون چارچوب ژنوم ویروسی گنجانده شده‌اند و یک توالی پیوندی هیبریدی LC3/NS3 (TFG/GP) را ایجاد می‌کنند که به عنوان محل برش برای ATG4B گاوی عمل می‌کند. این برش پروتئولیتیک با واسطه ATG4B در معرض رویدادهای تنظیمی که برای برش پیش‌ساز

¹ Meyers

² Duplicated

NS2/3 اعمال می‌شود، منجر به سطح بالای مداوم NS3 آزاد شده و به نوبه خود منجر به افزایش بیماری‌زایی ویروسی می‌شود که نه تنها خود را با افزایش اثرات سیتوپاتیک در کشت بافت نشان می‌دهد، بلکه همچنین با پیامد کشنده در گاوهای آلوده نیز خود را بروز می‌دهد. به طور جالب توجهی، مطالعات بیشتر نشان داد که دو همولوگ دیگر LC3 سلولی، GABARAP و GATE-16 (به ترتیب پروتئین مرتبط با گیرنده ۲-آمینو بوتیریک اسید نوع A و تقویت کننده ATPase مرتبط با گلزی ۱۶ کیلو دالتونی)، نیز توسط ATG4B بریده شده و به غشاهای اتوفاگوزومی وارد می‌شوند؛ این پروتئین‌ها همچنین می‌توانند در ncpBVDV گنجانده شده و cpBVDV را تولید کنند.

Picornaviridae

ویروس‌های این خانواده بدون پوشش بوده و دارای RNA تک رشته‌ای با سنس مثبت هستند. این خانواده در حال حاضر دارای ۱۷ جنس است. همانطور که در زیر به تفصیل شرح داده شده است، مطالعات *in vivo* اعضایی از جنس انترووویروس را به کار گرفته‌اند که تعدادی از آنها پاتوژن‌های مهم انسانی هستند.

مطالعات آزمایشگاهی پیکورناویروس‌ها و اتوفاژی

شایان ذکر است که چندین مطالعه عالی در شرایط *in vitro*، عمدهاً با استفاده از رده‌های سلولی نامیرا، پایه و اساس تجزیه و تحلیل‌های بعدی را از تعاملات بین پیکورناویروس‌ها و اتوفاژی در *in vivo* ایجاد کرده‌اند. همانطور که در بالا ذکر شد، وظیفه این فصل بحث در مورد مطالعاتی است که *in vivo* انجام شده‌اند. علاوه بر این، فصل ۵ در این جلد بر پیکورناویروس‌ها و اتوفاژی تمرکز دارد. در نتیجه، نظرات ما در مورد یافته‌های کشت بافت اولیه مختصر خواهد بود. عفونت سلول‌های پستانداران با پیکورناویروس‌ها منجر به تجمع چشمگیر غشاهای بازآرایی شده و وزیکوله شده در سلول‌ها می‌شود و همانطور که برای سایر ویروس‌های RNA دار نیز صادق است، تصور می‌شود که این ساختارهای غشایی به عنوان بسترها برای تکثیر ویروس عمل می‌کنند. در سال ۲۰۰۰، گروه کرکاردن شان داد که پروتئین‌های ویروس فلج اطفال جدا شده (به عنوان مثال، 3A، 2BC) می‌توانند باعث ایجاد وزیکول‌های غشایی شوند که قابل مقایسه با آنهایی هستند که در سلول‌های آلوده مشاهده می‌شوند؛ مهمتر از همه، این نویسندها پیشنهاد کردند که این غشاهای از مسیر اتوفاژی سرچشمه می‌گیرند. مطالعات بعدی سلول‌های آلوده به

فصل ۴: مطالعه ویروس‌های RNA دار و اتوفاژی *in vivo*

ویروس فلچ اطفال، وجود وزیکول‌های اتوفاژی مانند را تشریح کردند و در سال ۲۰۰۸، دو مطالعه آزمایشگاهی نشان دادند که دستگاه اتوفاژی نیز در طول عفونت کوکساکی ویروس B (CVB) نیز فعال می‌شود. اولین مورد، با استفاده از CVB3، همچنین نشان داد که یک مسیر اتوفاژی دست نخورده ممکن است برای ویروس مفید باشد، زیرا مسدود کردن مسیر باعث کاهش تولید ویروس از سلول‌های کشت بافت آلووده می‌شود؛ با این حال، اثر نسبتاً متوسط بود (دو تا سه برابر). یک اثر مشابه دیگر، با شدت مشابه، برای عفونت 4 نورون‌های اولیه موش نیز گزارش شده است. علاوه بر تعامل با غشاها مربوط به اتوفاژی، پروتئین‌های 2B هم ویروس فلچ اطفال و هم ویروس کوکساکی می‌توانند نفوذپذیری غشاها ترشحی و غشای پلاسمایی را تغییر دهند. این توانایی برای اصلاح غشاها داخل سلولی ممکن است با ماهیت بیوفیزیکی پروتئین‌های ویروسی توضیح داده شود. پروتئین 2B کوکساکی ویروس حاوی یک مارپیچ آلفا آمفی پاتیک فرضی است و چنین پروتئین‌هایی توانایی ارتباط با یکی از دو لایه غشا را دارند و در نتیجه باعث عدم تقارن و انحنای غشاء می‌شوند. از این رو، غشای سلولی نشان دهنده یک نقطه کلیدی از تعامل بین دستگاه اتوفاژی سلولی و ویروس‌های RNA دار (و پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک آنها) است.

پیکورناویروس‌ها اتوفاژی را در داخل بدن فعال می‌کنند

همانطور که در ابتدای این فصل ذکر شد، تجزیه و تحلیل فراساختاری پانکراتای^۱ آلووده به ویروس کوکساکی، که در دهه ۱۹۷۰ انجام شد، تجمع وزیکول‌ها را در سلول‌های آسینار^۲ شناسایی کرد. این وزیکول‌ها که وزیکول‌های غشایی ترکیبی (CMVs) نامیده می‌شوند، کوچک و پلئومورفیک بودند و به نظر می‌رسید که مربوط به اتوفاژی باشند. فعال شدن اتوفاژی کبدی در موش‌های آلووده به ویروس آنفلوآنزا V نیز گزارش شده است. با این حال، طبق دانش ما، بیش از دو دهه قبل از مطالعه *in vivo* بعدی که در آن، با استفاده از immuno-EM، نویسنده‌گان نشان دادند که نورون‌های موش‌های آلووده به انتروویروس ۷۱ حاوی وزیکول‌هایی شبیه اتوفاگوزوم هستند که برای پروتئین VP1 ویروسی مثبت هستند، می‌گذرد. آزمایشگاه ما متعاقباً دو مطالعه *in vivo* را با استفاده از کوکساکی ویروس B3 (CVB3) انجام داد و همانطور که در زیر ارائه شده است، دریافتیم که: (۱) عفونت CVB3 به طور چشمگیری مسیر اتوفاژی در

¹ Pancreata

² Acinar

سلول‌های آسینار پانکراس را در داخل بدن تغییر می‌دهد؛ (۲) CVB3 تکامل یافته تا نه تنها از اثرات سرکوبگر بالقوه مسیر اتوفاژی اجتناب کند، بلکه آن را به نفع خود بکار گیرد؛ (۳) یک مسیر اتوفاژی فعال ممکن است بیماری ناشی از ویروس را به جای بهبودی تشید کند؛ و در نهایت، (۴) داده‌های جدید، که در شکل ۴،۵ نشان داده شده است (بعداً را ببینید)، ما را به این امر سوق داد که همه اشکال پانکراتیت - چه توسط ویروس‌ها یا عوامل دیگر ایجاد شود - ممکن است توسط مکانیسم مولکولی مشابه و وابسته به اتوفاژی توضیح داده شود.

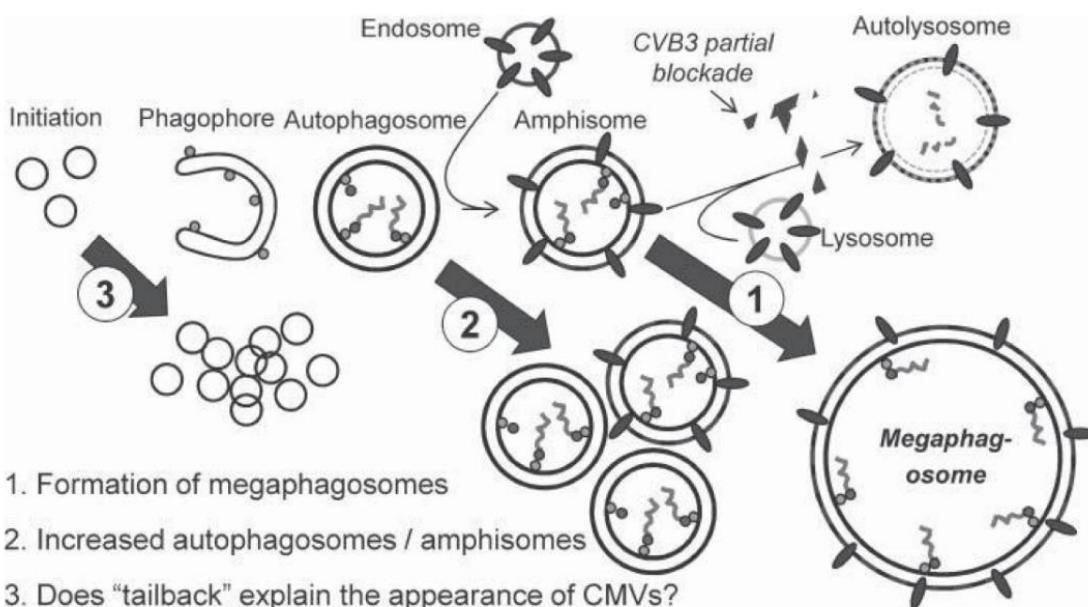
CVB3 و اتوفاژی در *in vivo*: دلایل تمرکز بر پانکراس. آزمایشگاه ما بر همکنش‌های *in vivo* بین CVB3 و اتوفاژی در پانکراس را ارزیابی کرده است. این ارگان به شش دلیل انتخاب شد. اول، CVB3 باعث پانکراتیت عمیق در موش‌ها و مردان می‌شود. دوم، این اندام یکی از اولین اعضاًی است که پس از عفونت توسط ویروس هدف قرار گرفته می‌شود؛ RNA ویروسی ظرف چند ساعت قابل تشخیص است (داده‌ها نشان داده نشده است). سوم، در طول عفونت *in vivo* ویروس بر روی سلول تمام سلول‌های آسینار پانکراس آلوود می‌شوند و توانایی ما را برای شناسایی اثرات *in vivo* ویروس بر روی سلول هدف آن به حداقل می‌رساند. چهارم، این عفونت گستردۀ اجازه می‌دهد تا تیترهای ویروسی در پانکراس به سطوح بالاتری نسبت به هر بافت دیگری برسد. تیتر ممکن است تا 10^{11} pfu/g در پانکراس در مقایسه با 10^8 pfu/g در قلب برسد. پنجم، همانطور که در بالا توضیح داده شد، مطالعات قدیمی نشان داده‌اند که ویروس کوکساکی CMVs را در سلول‌های آسینار القا می‌کند. در نهایت، سلول‌های آسینار پانکراس نسبت به سایر بافت‌های انسان بالغ، سرعت سنتز پروتئین بالاتری دارند و به مقدار زیادی شبکه آندوپلاسمی (ER) نیاز دارند؛ در نتیجه، ما حدس زدیم (۱) که فراوانی غشای داخل سلولی در سلول‌های آسینار ممکن است تا حدی سطح بالای تکثیر CVB3 در آن سلول‌ها را توضیح دهد و (۲) که این سلول‌ها ممکن است هدف امیدوارکننده‌ای برای حذف یک ژن مرتبط اتوفاژی، که به طور بالقوه باعث تغییر بیوژنز غشاء و در نتیجه، ظرفیت سلول‌ها برای حمایت از تکثیر CVB3، را نشان دهند.

CVB3 با اتوفاژی سلول آسینار در داخل بدن تعامل دارد و به طور چشمگیری آن را تغییر می‌دهد

اولین مطالعه منتشر شده ما از موش‌های ترا ریخته GFP-LC3، که نشان داده شده است ابزار نسبتاً قابل اعتمادی برای ارزیابی اتوفاژی *in vivo* هستند، استفاده کرد. به دنبال عفونت داخل

صفاقی، سطح LC3-I در روز اول پس از تزریق سه برابر افزایش یافت. اما پس از آن تنزل یافت. کاهش LC3-I با افزایش قابل توجه LC3-II در روز ۲ پس از تزریق همزمان بود. در روز ۳ پس از تزریق، تنها مقدار بسیار کمی از LC3-I قابل تشخیص بود، در حالی که LC3-II نسبتاً فراوان بود. این داده‌ها دو چیز را پیشنهاد می‌کنند: (۱) اینکه LC3-I به طور کامل به LC3-II تبدیل شده است و LC3-I جدید به دلیل ظرفیت ثبت شده CVB3 برای مهار سنتز اکثر پروتئین‌های سلول میزبان تولید نشده است؛ و (۲) که ممکن است کاهشی در شار اتوفاژی وجود داشته باشد زیرا، اگر کاملاً طبیعی بود، می‌توان انتظار مصرف تدریجی LC3-II را نیز داشت. علاوه بر این، وسترن بلات وجود کمپلکس ATG12-ATG5، ATG12-ATG5 سیتوزولی را، در روز ۳ پس از تزریق نشان داد؛ این موضوع این ایده که CVB3 سنتز پروتئین میزبان را متوقف کرده است، ثابت می‌کند. ما همچنین اتوفاگوزوم‌ها را مستقیماً با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و میکروسکوپ کانفوکال از برش‌های ویبراتوم ضخیم (حدود ۸۰ میکرومتری) نمایان و کمی کردیم. با استفاده از این رویکردها، سه مشاهده داشتیم. اول، با خلاصه کردن کار از دهه ۱۹۷۰، سلول‌های آسینار آلوده به CVB3 دارای تعداد زیادی CMV بودند؛ ما دریافتیم که این ساختارها دو غشایی هستند و بنابراین می‌توان آنها را به‌طور دقیق «وزیکول‌های اتوفاگوزوم مانند» نامید (مثال‌هایی در شکل (آ، ب، ۳) نشان داده شده‌اند؛ اندازه‌های آنها از ۷۰ تا ۴۰۰ نانومتر متغیر است). دوم، سلول‌های آسینار آلوده دو برابر بیشتر از سلول‌های آسینار غیر عفونی حاوی اتوفاگوزوم بودند. سوم، آنها مملو از وزیکول‌های بسیار بزرگ، با قطر ۵-۱۰ میکرومتر بودند (در مقایسه، یک اتوفاگوزوم طبیعی ۱/۵ - ۱/۵ میکرومتر است). بسیاری از این ساختارهای بزرگ حاوی GFP-LC3 و غشای دوگانه بودند که با منشاء خود یعنی مسیر اتوفاژی مطابق بودند؛ در نتیجه، ما آنها را "مگافاگوزوم" نامیدیم. اما نکته مهم این است که عملکرد - در صورت وجود - این اجسام بزرگ ناشناخته باقی مانده است. آنالیزهای بیشتر شار اتوفاژیک، از جمله مطالعات p62/sequestosome-1، نشان داد که CVB3 هم رویدادهای اولیه مسیر اتوفاژی را تنظیم می‌کند و هم به طور قابل توجهی (هر چند به طور ناقص) مرحله بعدی در مسیر را با محدود کردن ادغام اتوفاگوزوم‌ها (و/ یا آمفیزوم‌ها) با لیزوگوزوم‌ها، در سلول‌های آسینار، مسدود می‌کند. این نتایج با ارزیابی اثرات عفونت CVB3 بر توزیع پروتئین سلولی LAMP-1، یک نشانگر اندوزوم‌ها و لیزوگوزوم‌های دیررس، تأیید شد. نتیجه گیری کلی ما در مورد تأثیر CVB3 بر اتوفاژی سلول آسینار، بر اساس داده‌های منتشر شده، به صورت نموداری در شکل ۴،۲ خلاصه

شده است. ما فرض می‌کنیم که تنظیم مثبت مراحل اولیه در اتوفاژی، همراه با مسدودسازی جزئی ناشی از ویروس در یک مرحله دیررس در مسیر ("T" هاشور دار در شکل)، با هم یک "پشت دم"^۱ در سلول آسینار آلوده ایجاد می‌کنند، که منجر به (۱) تولید مگافاگوزوم‌ها؛ (۲) افزایش فراوانی اتوفاگوزوم‌ها و آمفیزوم‌ها؛ و (۳) تجمع وزیکول‌های اتوفاژی مانند (CMVs)، که شاید از کمپلکس‌های شروع اتوفاژی "استفاده نشده" تشکیل شده باشد، می‌شود.



شکل ۴،۲ خلاصه‌ای از اثرات CVB3 بر اتوفاژی سلول آسینار در داخل بدن، و سه پیامد عمده آن. قسمت بالای شکل، شیمایی از مسیر اتوفاژی در یک سلول آسینار آلوده به CVB3 را نشان می‌دهد و "T" هاشور خورده نشان دهنده مرحله‌ای است که به نظر می‌رسد عفونت تا حدی مسیر را مسدود می‌کند. سه پیامد این مسدود سازی نشان داده شده و در متن مورد بحث قرار گرفته است.

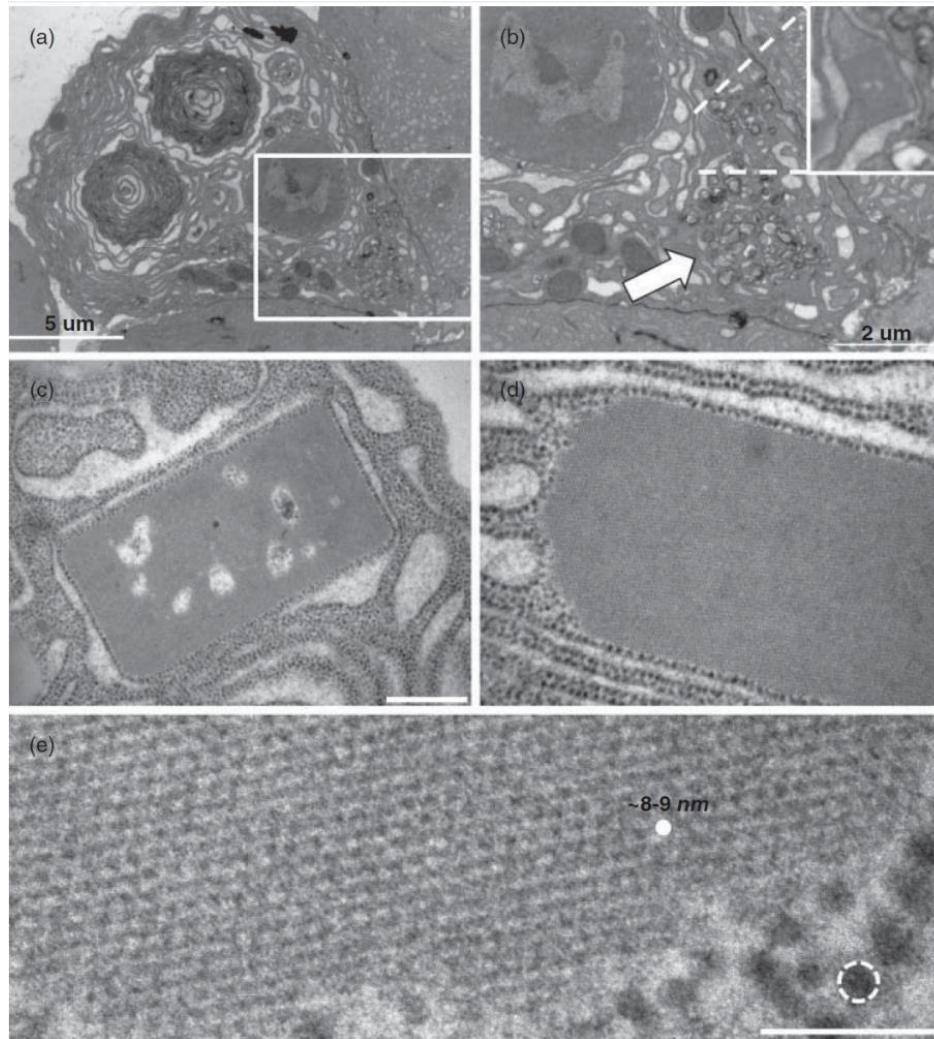
عفونت CVB3 سلول‌های آسینار باعث ایجاد شبکه‌های پاراکریستالی می‌شود

مدتی پیش، آزمایشگاه کرکگارد نشان داد که RNA پلیمراز سه بعدی ویروس فلج اطفال جدا شده از سلول‌های کشت بافت آلوده با غشاها مرتبط است و پروتئین خالص شده می‌تواند در شرایط آزمایشگاهی خود را سرهم کرده و یک شبکه تشکیل دهد؛ آنها پیشنهاد کردند که تکثیر ویروس فلح اطفال ممکن است روی قشری از پلیمرازهای مرتبط با غشاء انجام شود. طبق اطلاعات من، تا زمان کار ما هیچ کس ساختارهای مشابهی را در سلول‌های آلوده مشاهده نکرده

^۱ Tailback

فصل ۴: مطالعه ویروس‌های RNA دار و اتوفاژی *in vivo*

بود، اما، در طی آنالیزهای EM، ما از سلول‌های آسینار پانکراس آلوده به CVB3، آرایه‌های پاراکریستالی^۱ (با فراوانی بالا) را شناسایی کردیم که شامل چندین زیر واحد ظاهرًا یکسان است که همیشه توسط آنها احاطه شده‌اند. ریبوزوم‌ها و غشاها لیپیدی برخی از تصاویری که قبلاً منتشر نشده، در شکل ۴,۳ نشان داده شده است.



شکل ۴,۳ تجزیه و تحلیل EM سلول‌های آسینار آلوده، CMV و شبکه‌های پاراکریستالی را نشان می‌دهد که ممکن است مکان‌های تکثیر ویروس باشند. تصاویر EM از سلول‌های آسینار (اتوفاژی سالم) آلوده به ویروس نشان داده شده است. پانل (a) سلول آلوده را با ER فراوان و چرخیده نشان می‌دهد. موبع سفید، با بزرگنمایی بیشتر، در پانل (b) نمایش داده شده که مجموعه‌ای از CMV‌ها (فلشن سفید) را نشان می‌دهد. پانل (b) همچنین حاوی یک مربع سفید است که یک شبکه پاراکریستالی را با بزرگنمایی بالاتر نشان می‌دهد. پانل‌های (c) و

¹ Paracrystalline arrays

(d) آرایه‌های پاراکریستالی اضافی را نشان می‌دهند و تصویر با قدرت بالاتر (e) اجازه می‌دهد تا اندازه تقریبی هر زیر واحد تخمین زده شود.

این شبکه‌ها اغلب نزدیک به تجمع CMV‌ها بودند؛ یکی از این شبکه‌ها در شکل (4,3-b) وجود دارد. این شبکه نزدیک به CMV‌هایی است که با فلش سفید نشان داده شده‌اند و با بزرگنمایی بیشتر در پانل (b) نشان داده شده است. پانل (c) یک آرایه تیپیک مستطیل شکل را نشان می‌دهد که توسط ریبوزوم‌ها محصور شده و طول آن حدود ۲ میکرومتر است (نوار سفید = ۵۰۰ نانومتر). ماهیت فاصله‌های درون آرایه ناشناخته است؛ این ویژگی‌های ناشناس اغلب مشاهده می‌شوند – در واقع، آنها در شبکه نشان داده شده در پانل b نیز وجود دارند. ما حدس می‌زنیم که این آرایه‌ها ممکن است ورقه‌های پروتئینی مسطحی را نشان دهند که توسط ساختارهای مرتبط با لیپید پشتیبانی می‌شوند که در این تصاویر متقطع EM، به عنوان فاصله ظاهر می‌شوند. آرایه‌ها عموماً مستطیل شکل هستند، اما انتهای آن می‌تواند گرد باشد (شکل ۴,3-d). اندازه تقریبی هر زیر واحد را می‌توان از پانل e استنباط کرد؛ نوار سفید = ۱۰۰ نانومتر و به عنوان مرجع بیشتر، یک ریبوزوم مجاور (قطر تقریبی ۲۰ نانومتر) در یک دایره چین‌دار سفید محصور شده است. بنابراین، قطر یک زیر واحد از شبکه (که به صورت یک نقطه سفید نشان داده شده است) تقریباً ۸-۹ نانومتر است. RNA پلیمراز CVB از نظر ساختاری بسیار شبیه به RNA پلیمراز ویروس فلج اطفال است که اندازه یک مولکول منفرد آن $8/8 \times 8/8 \times 15/8$ نانومتر است. بنابراین، ما پیشنهاد کرده‌ایم که این شبکه‌ها ممکن است آرایه‌هایی از RNA پلیمرازهای CVB را در یک سلول آسینار پانکراس آلوده نشان دهند و ما حدس می‌زنیم که تکثیر CVB در داخل بدن ممکن است در این صفحه از پلیمرازهای مطابق با پیشنهاد آزمایشگاه کرکاراد، انجام شود. طبق دانش ما، اینها اولین شناسایی چنین ساختارهایی در سلول‌های آلوده به پیکورناویروس هستند. مشخص نیست که چرا این ساختارها – که ۱۰۰٪ مختص سلول‌های آلوده هستند – قبلًا مشاهده نشده‌اند. شاید آنها در رده‌های سلولی نامیرا (مانند Vero, HeLa) به فراوانی وجود نداشته باشند، اما در سلول‌هایی که اهداف طبیعی عفونت را نشان می‌دهند، مانند سلول‌های آسینار پانکراس، فراوان هستند. با این حال، تا به امروز، هیچ مدرک مستقیمی وجود ندارد که زیر واحدهای ۸-۹ نانومتری، پروتئین‌های ویروسی (متمايز از ميزبان) باشند.

حذف ژن Atg5، به طور خاص در سلول‌های آسینار، به طور قابل ملاحظه‌ای تکثیر CVB را تغییر می‌دهد

در مطالعه فوق، ما تأثیر عفونت CVB3 را بر اتوفاژی سلول‌های آسینار در *in vivo* ارزیابی کردیم. کار جدیدتر ما روی دیگر سکه را هدف قرار داده بود: تأثیر اتوفاژی بر تکثیر CVB3 و پاتوژن در *in vivo*. ما موش‌هایی تولید کردیم که در آنها ژن Atg5 به طور مشروط فقط از سلول‌های آسینار پانکراس حذف شد. این با کراس¹ بین دو سویه موش موجود، Elastase-Cre (که Cre recombinase را در سلول‌های آسینار بیان می‌کند) و *Atg5*^{fl/fl} به دست آمد. پس از بک کراس مناسب، ما موش‌های *Atg5*^{ff}/*Cre*⁺ را به دست آوردیم که در آن‌ها Cre recombinase اگزون ۳ را از ژن Atg5 در سلول‌های آسینار حذف می‌کرد، در نتیجه از تشکیل کمپلکس ATG12-ATG5 جلوگیری کرده و مسیر طبیعی اتوفاژی را غیرفعال می‌کند. تولید مثل آنها همچنین دو ژنتیپ مغاید دیگر را تولید کرد: *Atg5*^{ff}/*Cre*⁻, Cre-littermate (برای *wt*) و *Atg5*^{ff/wt}/*Cre*⁺ (با یک آلل نوع وحشی Atg5 که این موضوع امکان ارزیابی هر گونه اثر ژن Atg5 را فراهم می‌کند). موش‌های *Atg5*^{ff}/*Cre*⁺ هیچ ناهنجاری در ژنتیکی بسیار وزن، سطح گلوکز و تولید آنزیم‌های سلول آسینار نشان ندادند و فقط تعییرات بافت‌شناسی بسیار جزئی را نشان دادند. با این حال، اثرات اشاره شده به دنبال عفونت CVB3 مشاهده شد. برای هر یک از سه رد موش فوق، سینتیک تکثیر ویروس در یک دوره ۷ روزه در شکل (a) نشان داده شده و نسبت تیترهای ویروس (*Cre*⁻/*Cre*⁺) در هر یک از چهار نقطه زمانی در شکل (b) خلاصه شده است.

داده‌های موجود در شکل کمی با داده‌هایی که قبلاً منتشر شده بود متفاوت است زیرا در این میان، آزمایش‌های بیشتری انجام شده است و تعداد کل موش‌های حاضر بیشتر بود. با این حال، نتیجه گیری ما مشابه است. در روز بعد از عفونت، تیتر ویروسی در پانکراتای دارای کمبود Atg5 (نوار سفید) بیش از ۳۰۰۰ برابر در مقایسه با همزاویان نوع وحشی (نوار سیاه) کاهش می‌یابد، که نشان می‌دهد CVB3 از مسیر اتوفاژی دست نخورده سود می‌برد. حضور یک آلل دست نخورده Atg5 برای حفظ تکثیر ویروسی در سطوح نزدیک به نرمال کافی بود (نوار خاکستری). اگرچه تفاوت بین حیوانات دارای کمبود Atg5 و تیپ وحشی به ۱۰۰ برابر کاهش یافت، الگوهای

¹ Crossing

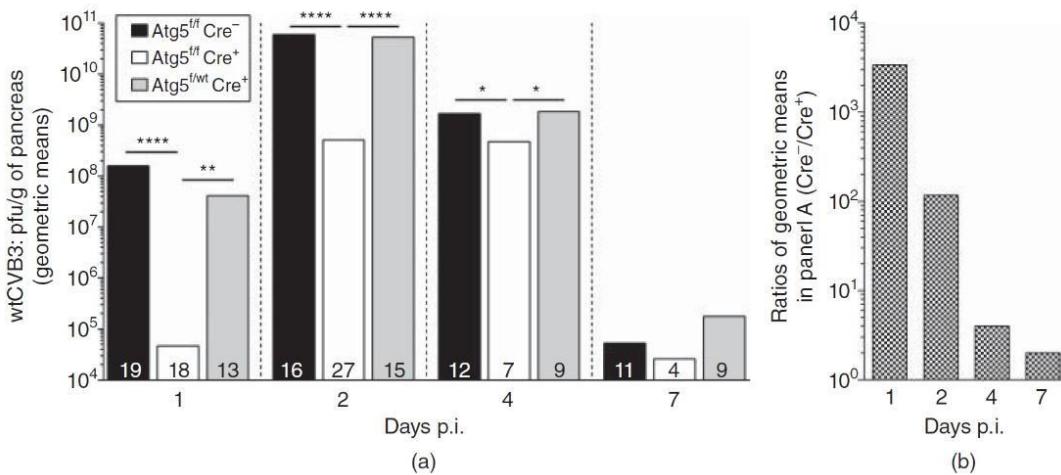
مشابهی در روز ۲ بعد از تزریق مشاهده شد. کاهش بیشتر در اثر اتوفاژی در روزهای ۴ و ۷ پس از تزریق نیز مشاهده شد. بنابراین، اتوفاژی تأثیر مثبت عمیقی بر عفونت CVB3 سلول‌های آسینار در *in vivo* دارد، اما این اثر به سرعت در طول یک عفونت حاد کاهش می‌یابد.

هیچ مرحله‌ای از چرخه زندگی ویروسی را نمی‌توان به عنوان مسئول تفاوت‌های بزرگ در *in vivo*، در تیترها، شناسایی کرد

کاهش قابل توجه تیتر ویروسی در لوزالمعده موش‌های *Atg5^{ff}/Cre⁺* ما را به این سوال سوق داد که فقدان *Atg5* بر کدام بخش از چرخه زندگی ویروسی تأثیر محربی گذاشته است. پارامترهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت؛ برخی از آزمایش‌ها به مدل *in vivo* متکی بودند، اما برخی دیگر در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از سلول‌های آسینار جدا شده از موش‌های *Atg5^{ff}/Cre⁻* و *Atg5^{ff}/Cre⁺* که با *CVB3* آلوده شده بودند و ۲۴ ساعت پس از تزریق آنالیز شدند، بهتر انجام شد. داده‌ها منتشر شده‌اند و در اینجا نشان داده نمی‌شوند. به طور خلاصه موارد زیر را یافتیم. عدم وجود *Atg5* "عفونت‌پذیری" سلول‌های آسینار را کاهش نداد. با این حال، ما دریافتیم که تکثیر ژنوم در سلول‌های آسینار با کمبود در *Atg5* ۱۰ تا ۱۰۰ برابر کاهش یافت. تفاوت ده برابری را نمی‌توان نادیده گرفت، به ویژه به این دلیل که بسیاری از مطالعات کشت بافت اتوفاژی و پیکورناویروس‌ها تفاوت‌های حتی کوچکتر (دو تا سه برابر) را گزارش کرده‌اند. با این حال، به طور قابل توجهی کمتر از اثر بیش از ۳۰۰۰ برابر مشاهده شده در ۱ روز بعد از تزریق است. (شکل ۴). در نتیجه، ما تعجب کردیم که این اثر ممکن است با نقص‌های اضافی که مراحل بعدی، چرخه زندگی ویروس را به خطر می‌اندازد، افزایش یافته باشد. عصاره‌های پروتئینی پانکراتای موش‌های *Cre⁺* و *Cre⁻* *CVB3* به *CVB3* توسط وسترن بلاط، با استفاده از آنتی‌بادی‌های مختلف علیه پروتئین‌های ساختاری و غیرساختاری *CVB3*، مورد ارزیابی قرار گرفتند. باز هم، هیچ تفاوت قابل توجهی مشاهده نشد: (۱) پردازش پلی پروتئین ویروسی در غیاب ATG5 طبیعی به نظر می‌رسد و (۲) مقادیر پروتئین، زمانی که برای تیتر ویروس بررسی شدند، تقریباً معادل هم بودند. کارایی بسته بندی RNA ویروسی، با مقایسه تیتر ویروس با تعداد کپی ژنوم ویروس RNA برآورد شد. ما استدلال کردیم که اگر سرهم بندی در سلول‌های دارای کمبود *Atg5* معیوب باشد، ممکن است RNA ویروسی در مقایسه با ویروس عفونی زیاد باشد. با این حال، نسبت مشابهی از تعداد کپی ژنوم به تیتر ویروس (~۱۶۰:۱) در موش‌های *Cre⁻* و

فصل ۴: مطالعه ویروس‌های RNA دار و اتوفاژی in vivo

۸۷ مشاهده شد. در نهایت، پیشنهاد شده است که اتوفاژی ممکن است اجازه انتشار غیر لیتیک انتروویروس‌ها را از سلول‌ها بدده، بنابراین خروج ویروس را در سلول‌های سالم از لحاظ اتوفاژی و کمبود اتوفاژی مقایسه کردیم. سلول‌های آسینار جدا شده با CVB3 آلوده شدند و در ۲–۲۴ ساعت بعد از تزریق، سلول‌ها و مایع رویی برداشت و تیتر شدند. اگر خروج در سلول‌های آسینار $Atg5^{ff}/Cre^+$ کاهش می‌یابد، ما کاهش تیتر رویی و احتمالاً افزایش همزمان در تیتر مرتبط با سلول را پیش‌بینی می‌کنیم. با این حال، نسبت تیتر سلول: سوپرناتانت در هر دو نوع سلول تقریباً یکسان بود، که نشان می‌دهد کمبود $Atg5$ هیچ تأثیر آشکاری بر خروج CVB3 ندارد. بنابراین، تا به امروز ما یک نقص را فقط در تکثیر RNA شناسایی کردایم و اثر آن نقص بر تولید ویروس به طور قابل توجهی کمتر از آنچه در in vivo مشاهده می‌شود، است. یک راه حل ممکن برای این پارادوکس ظاهری این است که اولین تجزیه و تحلیل in vivo در ۲۴ ساعت پس از تزریق انجام شد، زمانی که در آن چرخه‌های متعدد (احتمالاً ۳–۴) عفونت رخ داده است. اگر هر چرخه عفونت در سلول‌های $Atg5^{ff}/Cre^+$ ده برابر ویروس کمتری تولید کند، ممکن است انتظار داشته باشیم که این تفاوت با چندین دور عفونت تقویت شود. بنابراین، پس از (مثالاً) سه دور عفونت، بازده ویروس از سلول‌های $Atg5^{ff}/Cre^+$ ۱۰۰ برابر کمتر از بازده سلول‌های $Atg5^{ff}/Cre^-$ خواهد بود.



شکل ۴، ۴ تکثیر CVB3 در in vivo از یک مسیر اتوفاژی سالم، به ویژه در مراحل اولیه عفونت، سود می‌برد. سه سویه مشخص شده موش با 10^4 pfu (wtCVB3) آلوده شدند و در روزهای ۱، ۲، ۴، ۷ یا ۲۷ پس از تزریق پانکراتا برداشت و تیتر ویروس با استفاده از روش ارزیابی پلاک تعیین شد. A. میانگین‌های هندسی نشان داده شده است. عدد در پایه هر نوار نشان دهنده تعداد موش‌های آنالیز شده است. مقادیر p کمتر از ۰.۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد و به صورت زیر نشان داده می‌شود: * ۰.۰۵ ≤ p < ۰.۰۱؛ ** ۰.۰۱ ≤ p < ۰.۰۰۱؛ *** ۰.۰۰۱ ≤ p < ۰.۰۰۰۱.

0.0001 $\geq p > 0.0001$; **** p ≤ 0.0001 . میله‌ها در پانل B، نسبت‌های میانگین‌های هندسی در Atg5^{ff}/Cre⁻ پانکراتا را در مقابل تیترهای Atg5^{ff}/Cre⁺ پانکراتا، در هر نقطه زمانی نشان می‌دهند (یعنی نمودار داده‌ها را در پانل (a)، به صورت (مقدار نوار سیاه ÷ مقدار نوار سفید)) نمایش داده است. پانل (b) این واقعیت را برجسته می‌کند که وضعیت Atg5 سلول‌های آسینار پانکراس تأثیر چشمگیری بر تیترهای ویروسی در زمان‌های اولیه پس از تزریق دارد، اما این اثر پس از آن کاهش می‌یابد.

یک مسیر اتوفازی سالم به طور قابل توجهی آسیب ناشی از ویروس را افزایش می‌دهد

ما همچنین آسیب شناسی پانکراس را ارزیابی کردیم. سلول‌های آسینار پانکراس حاوی چندین آنزیم مانند آمیلاز و لیپاز هستند که پس از مرگ سلول‌های آسینار، در جریان خون آزاد می‌شوند. از این رو، افزایش این آنزیم‌ها نشان دهنده مرگ سلول‌های آسینار و شدت پانکراتیت است. ما دریافتیم که سطح آمیلاز سرم در موش‌های Atg5^{ff}/Cre⁺ آلوده به ویروس بالا بود، اما به میزان قابل توجهی کمتر از موش‌های Atg5^{ff}/Cre⁺ بود، که نشان می‌دهد بیماری پانکراس ناشی از CVB3 در پانکراتای دارای کمبود اتوفازی کاهش یافته است. این با تجزیه و تحلیل‌های بافت شناسی تایید شد که نشان داد پانکراتیت در این موش‌ها محدود است. ما حدس زدیم که دو اثر متمایز مرتبط با اتوفازی ممکن است به صورت جداگانه یا ترکیبی به افزایش آسیب شناسی در پانکراتای wt (اتوفازی دست نخورده) کمک کند. اولین و واضح‌ترین، افزایش تیتر ویروسی در موش‌های wt است (شکل a ۴،۴)، که ممکن است منجر به مرگ آپوپتویک و نکروز گسترده‌تر سلول‌های آلوده به ویروس شود. دوم، دیگران نشان داده‌اند که یک مسیر اتوفازی سالم، تحويل واسطه‌های تکثیر ویروس RNA دار به لیزوژوم‌ها را تسهیل می‌کند، جایی که آنها با TLRs مواجه می‌شوند و پاسخ سلولی ذاتی را تحریک می‌کنند. بنابراین، کاهش التهاب در موش‌های TLRs ممکن است تا حدودی ناشی از ناتوانی سلول‌های آلوده در رساندن RNA CVB3 به Cre⁺ هایشان باشد و در نتیجه پاسخ ذاتی در پانکراس کاهش یابد.

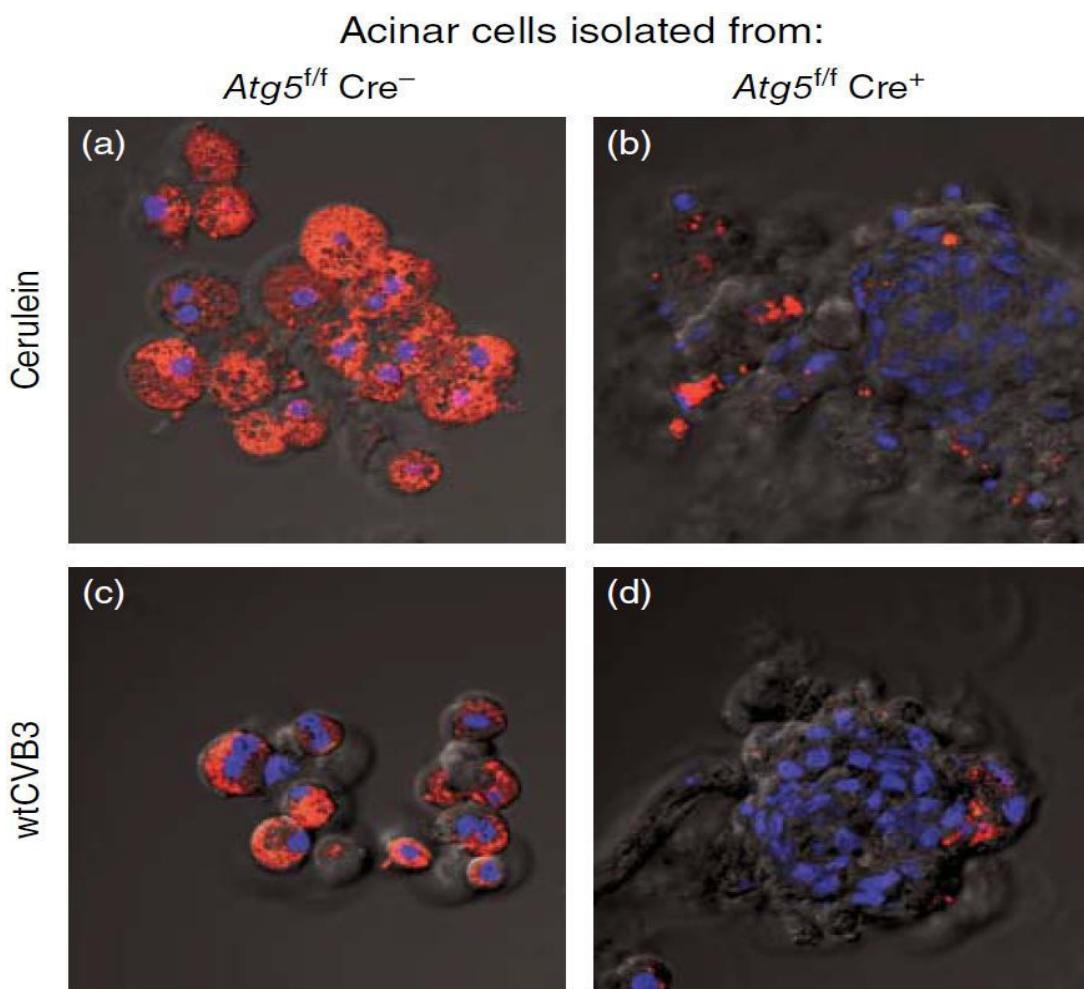
عفونت CVB3 سلول‌های آسینار منجر به فعالیت تریپسین درون سلولی وابسته به اتوفاژی می‌شود

علاوه بر موارد فوق، ما حدس می‌زنیم که ممکن است مکانیسم سومی وجود داشته باشد که از طریق آن یک مسیر اتوفاژی سالم به پانکراتیت ناشی از CVB کمک می‌کند. سرولئین^۱ یک آنالوگ دکاپتید ترشح کننده کوله سیستوکینین پانکراس است و تجویز آن به موش باعث پانکراتیت حاد می‌شود. اثرات مضر سرولئین مربوط به مسدود شدن مرحله آخر مسیر اتوفاژی است که منجر به فعال شدن زودهنگام تریپسینوژن داخل سلولی به تریپسین می‌شود. تصور می‌شود که این پروتئاز قوی محرک اولیه پانکراتیت بعدی باشد. اگر اتوفاژی از بین برود، فعال سازی تریپسینوژن داخل سلولی اتفاق نمی‌افتد، بنابراین سلول‌های آسینار پانکراس در برابر اثرات سرولئین محافظت می‌شوند. از این رو، پانکراتیت سرولئین مستلزم آن است که مسیر اتوفاژی هم (۱) فعال و (۲) در پایین دست مسدود شود. این فنتیپ دقیقاً همان چیزی است که ما در طول عفونت CVB3 سلول‌های آسینار گزارش کرده ایم. از این رو، ما این احتمال که عفونت CVB3 سلول‌های آسینار منجر به فعال شدن تریپسینوژن داخل سلولی شود را بررسی کرده ایم.

سلول‌های آسینار از موش‌های *Atg5^{fl/fl}/Cre⁺* و از کنترل‌های Cre-littermate جدا شدند. به عنوان یک کنترل مثبت، برخی از سلول‌ها در معرض سرولئین قرار گرفتند و سپس با BZiPAR، رنگی که پس از برش توسط تریپسین، فلورسانس قرمز ساطع می‌کند، انکوبه شدند (شکل ۴,۵)، ردیف بالا). همانطور که انتظار می‌رفت، سرولئین باعث برش تریپسینوژن داخل سلولی در سلول‌های آسینار برداشت شده از حیوانات دست نخورده ژنتیکی شد که منجر به فعالیت تریپسین درون سلولی شد (شکل a ۴,۵، بخش Plate را ببینید). فعال‌سازی تریپسینوژن تا حد زیادی وابسته به اتوفاژی بود، زیرا در سلول‌های جدا شده از موش *Cre⁺* بسیار کاهش یافت (شکل b ۴,۵). همچنین، سلول‌های آسینار با wtCVB3 آلوده شدند و ۶ ساعت بعد با BZiPAR (ردیف پایین) رنگ‌آمیزی شدند. دو مشاهده جدید را می‌توان از داده‌ها انجام داد. اول، عفونت CVB باعث فعال شدن گستردگی تریپسینوژن در سلول‌های آسینار می‌شود (شکل c ۴,۵). تا جایی که ما می‌دانیم، این اولین اثباتی است که نشان می‌دهد یک عفونت ویروسی می‌تواند تریپسینوژن را در سلول‌های آسینار فعال کند. دوم، فعال‌سازی وابسته به اتوفاژی است، زیرا در سلول‌های

^۱ Cerulein

آسینار آلوده موش‌های $Atg5^{ff}/Cre^+$ بسیار کاهش می‌یابد (شکل ۴,۵ d)، سلول‌های آسینار دور یک جزیره جمع شده‌اند). این داده‌های جدید ما را به این فرضیه سوق داد که برش تریپسینوژن درون سلولی ممکن است یک مسیر مشترک نهایی باشد که با آزاد کردن فعالیت تریپسین در داخل سلول‌های آسینار، بدون در نظر گرفتن علت به همه پانکراتیتیدها کمک می‌کند.



شکل ۴,۵ عفونت CVB3 سلول‌های آسینار، تریپسینوژن داخل سلولی را به روشنی وابسته به اتوفازی فعال می‌کند. کشت‌های اولیه سلولی آسینار کوتاه‌مدت از موش‌های $Atg5$ سالم (ستون چپ) یا از موش‌های $Atg5^{ff}/Cre^+$ (ستون سمت راست) ایجاد شد. سلول‌ها در معرض سروളین ۱۰ نانومولار (ردیف بالا) قرار گرفتند یا با $wtCVB3$ (ردیف پایین) آلوده شدند. سلول‌ها با معرف BZiPAR (در حضور تریپسین فعال) انکوبه شدند و با ۳۳۴۲ رنگ آمیزی شدند (به بخش Plate مراجعه کنید).

۹۱ فصل ۴: مطالعه ویروس‌های RNA دار و اتوفاژی in vivo

نتیجه گیری

دانش ما در مورد فعل و انفعالات بین ویروس‌های RNA دار و اتوفاژی در مراحل اولیه است. همانطور که در یک مقاله مروری اخیر به درستی اشاره شد، سوالات زیادی باقی مانده است که باید به آنها پرداخته شود، اما داده‌های موجود نشان می‌دهد که ما از درک عمیق‌تر این مکانیسم‌ها می‌توانیم بیشتر بهره‌مند شویم، و ممکن است وسیله‌ای برای نه تنها درمان عفونت‌ها، بلکه برای کاهش بیماری‌های ناشی از اتوفاژی نیز فراهم کنیم.

فصل ۵

اتوفاژی و عفونت پیکورناویروس

مقدمه

سلول‌های یوکاریوتی با زندگی آزاد اولیه، نیاز به سازگاری با محیط‌های به سرعت در حال تغییر و تأمین غذای نامشخص دارند و تصور می‌شود که این امر، تکامل یک مسیر تردد غشایی به نام اتوفاژی را به دنبال داشته است. لغت اتوفاژی از لغات یونانی *auto* به معنی خود و *phagein* به معنی خوردن گرفته شده است و فرایندی را توصیف می‌کند که سلول‌ها، پروتئین‌ها و اندامک‌ها را برای تجزیه از سیتوزول به لیزوژوم‌ها می‌رسانند (یانگ و کلیونسکی، ۲۰۱۰). این یک راه تأمین کوتاه مدت آمینو اسیدها است که امکان حرکت و جستجوی غذا برای یوکاریوت‌های تک سلولی اولیه را فراهم می‌کند. اتوفاژی، این سلول‌ها را با مکانیزم قدرتمندی مجهز کرده است تا پاتوژن‌های درون سلولی را تجزیه کنند. این مسیر، بیگانه خواری^۱ نامیده می‌شود زیرا منجر به حذف موجودات زنده^۲ خارجی می‌شود (لوین، ۲۰۰۵) و یک نسخه بسیار اولیه در تکامل ایمنی ذاتی می‌باشد.

چندین مسیر اتوفاژی توصیف شده‌اند که پروتئین‌ها را به لیزوژوم‌ها تحویل می‌دهند. میکرواتوفاژی و اتوفاژی به واسطه چاپرون، منجر به انتقال مستقیم پروتئین‌ها از سیتوزول به لومن لیزوژوم‌ها می‌شوند. در مقابل، ماکرواتوفاژی، غشاهای جدیدی در سلول‌ها به نام واکوئل

¹ xenophagy

² organism

خودخوار^۱ را تولید می‌کند، که پروتئین‌ها را از سیتوزول درون وزیکول‌های دوغشایی که با لیزوژوم‌ها ترکیب می‌شوند، می‌گیرد. ماکرواتوفاژی در زمینه عفونت پیکورناویروس مهم است و در باقی متن به عنوان اتوفاژی قید می‌شود. اتوفاژی حداقل به ۳۶ پروتئین نیاز دارد و تعداد زیادی از این‌ها از مخمر تا سلول‌های پستانداران کاملاً متمایز حفظ می‌شوند (زای و کلیونسکی، ۲۰۰۷). اتوفاژی توسط راپامایسین کیناز (TOR) تنظیم می‌شود، که می‌تواند سطح آمینواسید را در سیتوزول حس کند. وقتی آمینواسیدها فراوان هستند، TOR کیناز برای افزایش سنتز پروتئین و افزایش توده سلولی فعال می‌شود. وقتی سطوح آمینواسید پایین می‌آید، فعالیت TOR کیناز کاهش می‌یابد و این اتوفاژی را برای تولید آمینواسید از طریق تجزیه پروتئین در لیزوژوم (شکل ۵,۱) فعال می‌کند. بسیاری از محفظه‌های غشایی سلولی می‌توانند اتوفاگوزوم تولید کنند، اما بهترین مسیرهای مشخص شده شامل شبکه آندوپلاسمی (ER)^۲ و یا میتوکندری می‌باشد (آکس^۳ و همکاران، ۲۰۰۸؛ هamasaki^۴ و همکاران، ۲۰۱۳؛ هیلی^۵ و همکاران، ۲۰۱۰).

تشکیل اتوفاگوزوم با فسفرزدگی^۶ موضعی لیپیدها حین تقسیمات غشا^۷ی سلولی از قبیل ER با گروهی از پروتئین‌ها آغاز می‌شود که شامل ژن‌های Beclin 1/ATG و VPS34 ATG14 (PIK3C3) می‌باشند. فسفرزدگی ساخت دایره‌های غشایی کوچکی به شکل فنجان به نام فاگوفور^۸ را آغاز می‌کند (امگازوم یا غشاهای ایزوله نیز نامیده می‌شوند)، که در ادامه پروتئین‌های اتوفاژی بیشتری را جهت بسط اتوفاگوزوم جذب می‌کند (شکل ii و i). پروتئین ساختاری اصلی اتوفاگوزوم، ATG8/LC3، پس از ترکیب شدن با فسفاتیدیل اتانول آمین (PE)، از سیتوزول ATG12 و ATG5 محدود به ATG16L1 است. جفت LC3-PE (تحت عنوان LC3-II) با اتوفاگوزوم تا مرحله ادغام با لیزوژوم‌ها و برچسب LC3 زدن به پروتئین فلوئوروستن سبز (GFP-LC3) ضروری شده است تا در نتیجه اتوفاگوزوم‌ها به عنوان نقطه‌های GFP-LC3 در سلول‌های پستاندار مجسم شوند (شکل aia). افزودن PE به LC3، تحرک الکتروفورتیک^۹ LC3 را با امکان استفاده بلات غربی به عنوان سنجش بیوشیمیایی برای اتوفاژی، افزایش می‌دهد.

¹ autophagosome

⁶ phosphorylation

² Endoplasmic reticulum

⁷ membrane

³ Axe

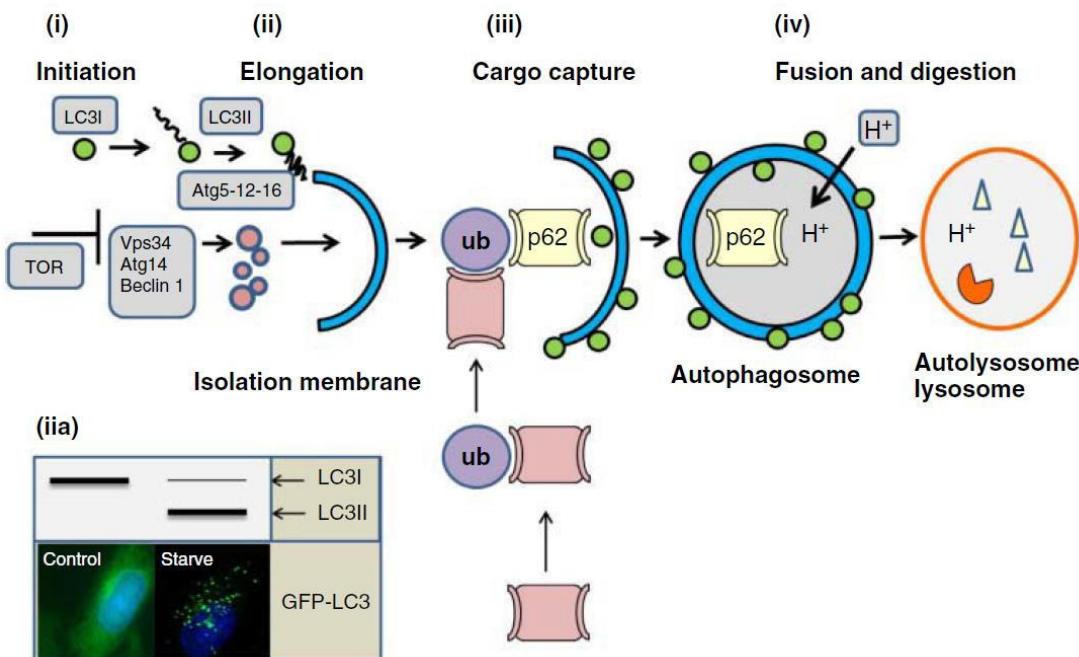
⁸ Phagophore

⁴ Hamasaki

⁹ electrophoretic

⁵ Hailey

فصل ۵: اتوفازی و عفونت پیکورناویروس ۹۵



شکل ۱ تولید اتوفاغوزوم‌ها . (i) شروع اتوفازی توسط TOR کیناز تنظیم می‌شود . هنگامی که سطح اسید آمینه کاهش می‌یابد . TOR کیناز مهار می‌شود و به PI3 کیناز VPS34 و Beclin1 اجازه می‌دهد تا درغشای غنی شده برای ATG14، شکل اتوفاغوزوم را آغاز کنند . اثرات اتوفازی بر بازده ویروس را می‌توان با مسدود کردن فعالیت PI3 کیناز با ورتمانین یا ۳-متیل آدنین تجزیه و تحلیل کرد . راپامایسین با مهار TOR باعث افزایش اتوفازی می‌شود . انبساط و طویل شدن غشاء بهمجتمع ATG5-12:16 و به کارگیری LC3/ATG8 می‌نماید . (ii) سنجش‌های رایج برای LC3 پس از تبدیل به LC3-II و افزودن فسفاتیدیل اتانول آمین از سیتوزول استخراج می‌شود . اتوفازی اغلب با خاموش کردن ژن‌های ضروری اتوفازی، به عنوان مثال ATG5، مهار می‌شود . (iii) سنجش‌های رایج برای اتوفازی . تبدیل LC3-I به LC3-II تحرک الکتروفورتیک LC3 را افزایش می‌دهد و اجازه می‌دهد LC3-II با وسترن بلات آنالیز شود . جذب LC3-II به غشاهای در طول عفونت، LC3-puncta تولید می‌کند که می‌تواند با استفاده از GFP-LC3 دنبال شود . (iv) اتوفازی انتخابی زمانی رخ می‌دهد که پروتئین یوبی کوتینه شود . پروتئین‌های یوبی کوتینه شده توسط گیرنده‌های اتوفازی، مانند p62، که یوبی کوتین و LC3 را به هم متصل می‌کنند، جذب می‌شوند . (v) اتوفاغوزوم‌ها با لیزوژوم‌ها ترکیب می‌شوند تا یک اتوفاغولیزوژوم تولید کنند که قادر به تجزیه پروتئین‌ها، پاتوژن‌های داخل سلولی مانند ویروس‌ها و اندامک‌ها است . تجزیه p62 را می‌توان برای اندازه گیری تحويل محموله‌ها به لیزوژوم‌ها استفاده کرد .

اتوفازی انتخابی، گیرنده‌گان اتوفازی را با حوزه‌های فعل و اتفاعات LC3 در بر می‌گیرد

به طور کلی تصور می‌شود که اتوفازی در پاسخ به گرسنگی منجر به تحويل غیر اختصاصی پروتئین‌ها و اندامک‌ها به لیزوژوم‌ها می‌شود . در هر حال، فعل سازی اتوفازی به دنبال عفونت،

اغلب منجر به تنزل انتخابی پاتوژن‌ها می‌شود که توسط یک رده جدیدی از گیرنده‌های ایمنی ذاتی به نام منطقه تعاملی LC3 عمل می‌کند (پروتئین‌های LIR یا گیرنده‌های شبه سکوئستازوم (SLRs) (بررسی شده توسط درتیک، ۲۰۱۲). سکوئستازوم ۱ (SQSTM1) p62 نیز نامیده می‌شود) با اتصال به یوبیکوتین از طریق یک دامنه اتصال یوبیکوتین به عنوان یک پروتئین پیوند دهنده عمل می‌کند (UBD)، و در همان زمان، با استفاده از دامنه LIR، LC3 را در غشای اتوفاگوزوم متصل می‌کند (پانکیو و همکاران، ۲۰۰۷). به این ترتیب، پروتئین‌های یوبیکوتین شده به داخل اتوفاگوزوم کشیده و به لیزوژوم‌ها تحول داده می‌شوند (شکل ۵، i, ii و iv). لیزوژوم در این نقطه، اتلیزوزوم یا اتوفاگولیزوزوم^۱ نیز نامیده می‌شود. جذب خاص برای ویروس‌های ژنتیکی متمایز، مانند ویروس DNA دار از جمله هرپس سیمپلکس^۲ ۱، و ویروس‌های RNA دار مانند ویروس سیندیبیس (أرووال و همکاران، ۲۰۱۰)، ویروس بیماری دهان و پا (تب برفکی) (بریمن و همکاران، ۲۰۱۰) و ویروس چیکینگانیا^۳ (جودیس و همکاران، ۲۰۱۳) نشان داده شده است.

فعال سازی اتوفاژی طی عفونت ویروسی

ویروس‌ها، سلول‌ها را با تحويل ژنوم یا ذرات نوکلئوپروتئین هسته به سیتوپلاسم، آلوده می‌کنند. ویروس‌ها پاتوژن‌های داخل سلولی اجباری هستند و باعث افزایش در سنتز پروتئین می‌شوند که به دنبال تکثیر ژنوم اتفاق می‌افتد و ممکن است اسیدهای آمینه را از سیتوزول تخلیه کنند، ممکن است متعاقباً با سرکوب mTOR کیناز، اتوفاژی را فعال کند. ویروس‌ها همچنین می‌توانند با کاهش فشار ER یا پاسخ‌های پروتئینی آشکار نشده (UPRs) طی سنتز پروتئین‌های پوششی، اتوفاژی را کاهش دهند. اتوفاژی همچنین طی عفونت ویروسی زمانی فعال می‌شود که الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب و یا مرتبط با پاتوژن (DAMPS and PAMPs)، با گیرنده‌های شبه با جگیر^۴ (TLRs) متصل شوند و یا هلیکازهای سیتوزولی مانند آنتی ژن شماره ۵ مرتبط با تقییک ملانوم (MDA5) و ژن القاء اسید رتینویک ۱ (RIG-I) که RNA ویروسی را پیوند می‌دهد فعال شوند (بررسی شده با درتیک و همکاران، ۲۰۱۳).

¹ autophagolysosome

² herpes simplex 1

³ Chikungunya virus

⁴ Toll-like receptors

پیکورناویروس و اتوفاژی

متن بالا دلایل متعددی برای این پرسش که چرا ویروس‌ها ممکن است در فعال سازی اتوفاژی محتاط باشند ارائه می‌کند. بنابراین، زمانی که اولین مطالعات اتوفاژی طی عفونت پیکورناویروس انجام شد، نشان داد که ظاهرًاً ویروس فلج اطفال از اتوفاژی سود می‌برد (جکسون و همکاران، ۲۰۰۵). زمانی که راپاماسین اتوفاژی را فعال کرد، بازده PV به اندازه ۱۰ برابر افزایش یافت و زمانی که پروتئین‌های ضروری ساخت اتوفاگوزوم (LC3 or ATG12) سرکوب شدند، بازده کاهش یافت چگونگی تسهیل تولید پیکورناویروس بوسیله اتوفاژی از مرور مختصر فعل و انفعالات ویروس-سلول درک می‌شد که روی تکثیر پیکورناویروس اثر می‌گذارد.

پیکورناویروس‌ها، ویروس‌های RNA تک رشته ای مثبت بدون پوشش هستند. ژنوم (شکل ۵,۲a) یک پلی پروتئین منفرد (P1-P2-P3) را کدگذاری می‌کند که برای تولید پروتئین‌های کاپسید (p1-4) از p1 و پروتئین‌های غیرساختاری مورد نیاز برای تولید از ناحیه p2-p3^۱، توسط پروتئاز ویروسی (3C/3CDpro) پردازش می‌شود. ویروس فلج اطفال^۲ دارای هلیکاز و بن مایه NPT-ase و 3D^{pol} است، RNA پلیمراز وابسته به RdRp است. تکثیر ژنوم پیکورناویروس، همانند همه ویروس‌های RNA تک رشته ای مثبت، در سطح محفظه‌های غشایی داخل سلولی رخ می‌دهد (بررسی شده با کاتم^۳ و همکاران، ۲۰۰۹؛ نترتون^۴ و ویلمن، ۲۰۱۱). اولین میکروگراف‌های الکترونی از سلولهای آلدوه به ویروس، ساماندهی مجدد گسترده غشاها، طی آلدگی به ویروس فلح اطفال که منجر به تولید وزیکول با قطر ۲/۰-۴/۰ میکرومتر می‌شود را نشان داد (دیلز و همکاران، ۱۹۶۵). ارزیابی وزیکول‌های تولید شده با ویروس فلح اطفال به وسیله تثبیت سرما با فشار بالا و جایگزینی انجماد برای حفظ غشاها شکننده در طول میکروسکوپ الکترونی نشان داد که وزیکول‌ها دو لایه غشا دارند (اشلیگل^۵ و همکاران، ۱۹۹۶) و مواد سیتوپلاسمی را احاطه کرده است. بنابراین، این وزیکول‌های دوغشایی ویروس القا شده (DMVs) در خصوصیات ساختاری زیادی با اتوفاگوزوم‌ها مشابه هستند. برچسب گذاری ایمونوگولد بعدی نشان داد که آنها حاوی ۲C و ۳D هستند و ممکن است در تکثیر ویروس نقش داشته باشد.

¹ Poliovirus

² Cottam

³ Netherton

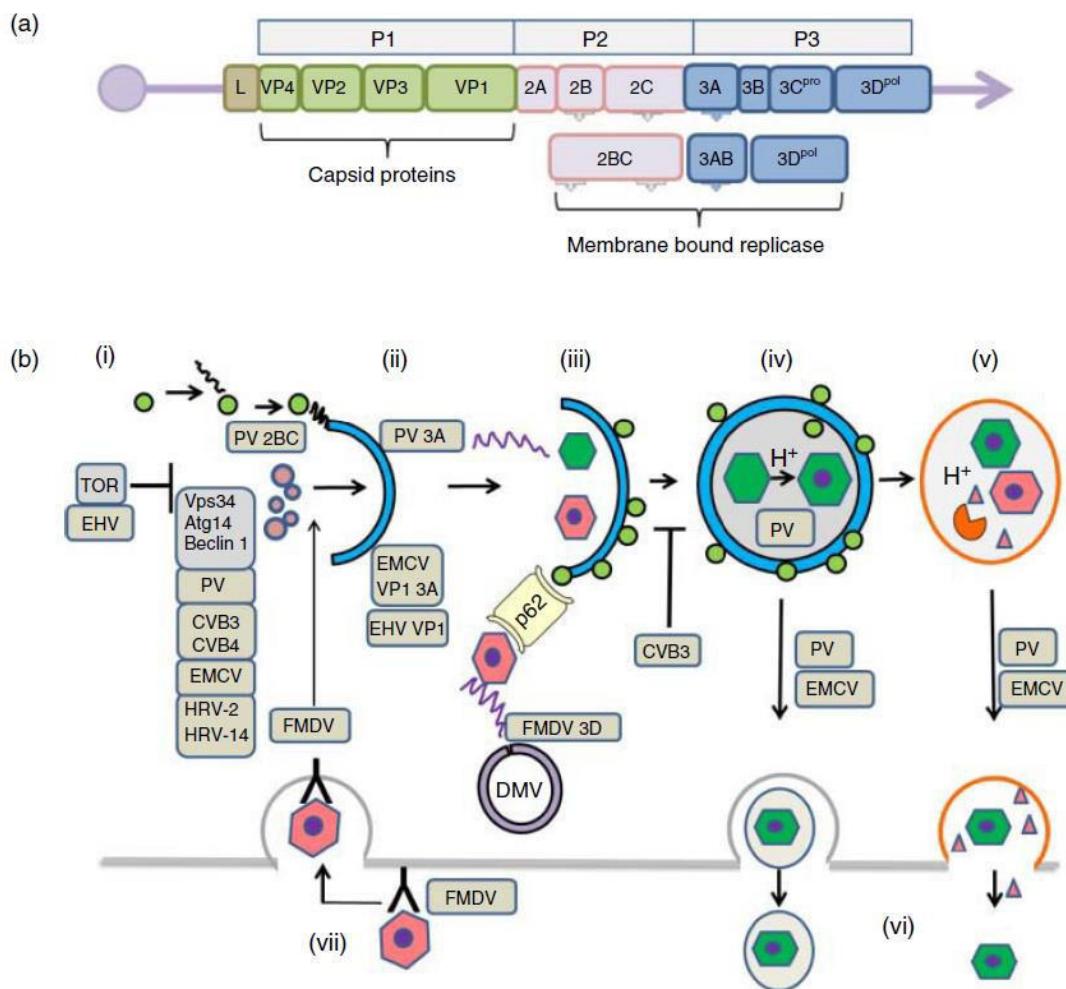
⁴ Schlegel

پلی ویروس

DMV‌های القاشهه توسط PV (ویروس فلج اطفال) و اتوفاژی با مشاهده عفونت سلول‌ها با PV، ریز منفذ LC3 که نشانده‌هسته اتوفاگوزوم است (جکسون و همکاران، ۲۰۰۵) و بیان مشترک ۳A و ۲BC، اما نه ۳A و ۲BC به تنها‌یی، ساخت DMV‌های القاشهه (سوهی و همکاران، ۲۰۰۰) را ایجاد می‌کند. این به خوبی با هم بیانی پروتئین ۳A رپلیکاز ویروس فلج اطفال با اتوفاگوزوم‌ها در سلول‌های آلوود شده (شکل ۵,۲ ب، ii) ارتباط دارد و پایه و اساس این فرضیه را ایجاد کرد که اتوفاگوزوم‌ها طی آلوودگی به ویروس فلح اطفال، بستری را برای پروتئین‌های رپلیکاز فراهم می‌کنند (جکسون و همکاران، ۲۰۰۵؛ بررسی مجدد توسط کرکیگارد و همکاران، ۲۰۰۴؛ ویلمز، ۲۰۰۶).

ارتباط بین اتوفاژی و تکثیر، با بیان پروتئین‌های رپلیکاز ویروس فلح اطفال به تنها‌یی یا ترکیب در سلول‌ها، بیشتر مورد بررسی قرار گرفته است. RNA ۳D^{pol} پلیمراز وابسته به RNA است که برای تکثیر ژنوم پیکورناویروس ضروری است (شکل ۵,۲ الف). پس از پردازش پیش‌ساز ۳ABCD، ۳D^{pol}، مستقیماً به ۳AB متصل می‌شود، به بخش آبگریز ۳A امکان هدف قرار دادن پلیمراز به صفحه میان یاخته‌ای بخش‌های غشای سلولی را می‌دهد. کمپلکس رپلیکاز همچنین حاوی پروتئین‌های ۲BC و ۲C می‌باشد که توسط بخش‌های آبگریز خود، غشاهاي سلولی را هدف قرار می‌دهند. بیان ۲BC و نه ۲B یا ۲C به تنها‌یی (شکل ۵,۲ ب، I و ii) منجر به تبدیل GFP-LC3 به LC3-II و جذب LC3-II به غشاهاي می‌شود که با تشکیل نقطه LC31 نشان داده می‌شود (تاپلر و کرکیگارد، ۲۰۰۷)، اما ایجاد نقطه GFP-LC3 که قادر به ترکیب با اندوزوم‌ها و لیزوژوم‌های ۳A نیاز دارد (جکسون و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعات اخیر نشان داد که هم بیانی ۲BC و ۳A، همچنین نیازمند ایجاد DMV‌های قابل مشاهده بوسیله میکروسکوپ الکترونی است (سوهی و همکاران، ۲۰۰۰). این نشان داد که همگذاری کمپلکس رپلیکاز، یا حداقل اصلاح غشاها در طول عفونت، با عمل هماهنگ ۳A و ۲BC منجر به ساخت DMV‌ها و یا اتوفاگوزوم‌ها می‌شود.

فصل ۵: اتوفازی و عفونت پیکورناویروس



شکل ۵،۲ تعامل بین پیکورناویروس‌ها و اتوفازی پانل (الف): سازمان ژنوم پیکورناویروس. پیکورناویروس‌ها دارای ژنوم RNA رشته‌ای مثبت (+) هستند که یک پلی پروتئین منفرد (P1-P2-P3) را کد می‌کند، که توسط پروتئاز ویروسی (3C/3CDpro) پردازش می‌شود تا پروتئین‌های کپسید (VP1-4) از P1 تولید کند. ناحیه P2-P3 حاوی پروتئین‌های replicase است، C2 دارای نقوش هلیکاز و NPT-ase RNA³ است و Dpol RNA³ پلیمراز وابسته به RNA است. دامنه‌های آبگریز در B2، C2 و A3 کپی را به سطح سیتوپلاسمی بخش‌های غشای داخل سلولی قرار می‌دهند. پانل (ب): مکان‌های تعامل بین پیکورناویروس‌ها و اتوفازی. (i) شروع: ویروس‌ها با مهار TOR یا با فعال کردن کمپلکس 1 VPS34-ATG14-Beclin 1 اتوفازی را فعال می‌کنند. (ii) طویل شدن غشای جداسازی: PV 2BC و A3 باعث انتقال LC3 به غشاهای جداسازی و تشکیل اتوفاگوزوم‌های غشایی دوگانه می‌شود. پروتئین‌های PV replicase در اتوفاگوزوم‌ها قرار می‌گیرند و RNA ویروسی تولید می‌کنند. PV: FMDV و A3 نیز با اتوفاگوزوم‌ها هم روابط دارند. (iii) طویل شدن غشای جداسازی: خبط محمله VP1 روی DMV هایی که نشانگرهای اتوفازی را حمل نمی‌کنند، تکرار می‌شود. کپسیدهای FMDV با p62 و LC3-II colocalized می‌شوند و این منجر به تخریب LC3 می‌شود، که نشان می‌دهد تحويل کپسیدهای FMDV به لیزوزوم های BC2 و A3 باعث انتقال LC3 به غشاهای جدا شده و تشکیل اتوفاگوزوم‌های غشایی دوگانه می‌شود. پروتئین‌های PV replicase در اتوفاگوزوم‌ها قرار می‌گیرند و RNA ویروسی تولید می‌کنند. EMCV

V_{P1} و A^۳ نیز با اتوفاگوزوم‌ها مرتبط هستند. (IV) فیوژن: CVB3 همجوشی اتوفاگوزوم- لیزوژوم را مسدود می‌کند. کپسیدهای PV نابالغ به لیزوژوم‌ها تحویل داده می‌شوند که در آن pH پایین (H⁺) بلوغ ذرات عفونی را تسهیل می‌کند، که ممکن است به لیزوژوم‌ها منتقل شوند. (V) هضم: پیکورناویروس‌های تحویل داده شده به لیزوژوم‌ها ممکن است تخریب شوند اما PV و EMCV زنده می‌مانند. (VI) انتشار غیر لیتیک از سلول‌ها: ویروس‌هایی که از اتوفاژی جان سالم به در می‌برند، به عنوان مثال، PV و EMCV زمانی که اتوفاگوزوم‌ها یا اتولیزوژوم‌ها با اندوزوم‌ها یا غشای پلاسمایی ترکیب می‌شوند، از سلول‌ها آزاد می‌شوند. (VII) فعال شدن اتوفاژی در حین ورود به سلول: FMDV با اتصال گیرنده‌ها یا در حین ورود به اندوزوم، اتوفاژی را فعال می‌کند. فعال سازی اتوفاژی نیازی به تکثیر ویروس ندارد و کمپلکس 1 VPS34-ATG14-Beclin 1 را دور می‌زند.

مطالعاتی انجام شده که اثرات از کار انداختن ژن را بر روی تکثیر ویروس فلج اطفال نشان می‌دهد. در این مطالعات مشخص شد که از بین رفتن LC3/ATG8 یا ATG12 کاهش بیشتری را در ویروس خارج سلولی در مقایسه با ویروس داخل سلولی ایجاد می‌کند (جکسون و همکاران، ۲۰۰۵). این نشان می‌دهد که اتوفاگوزوم‌ها ممکن است آزادسازی ویروس‌ها را از سلول‌ها تسهیل کنند. اتوفاگوزوم‌های تولید شده در سلول‌های آلووده به ویروس فلج اطفال، با بیان 2BC و 3A با اندوزوم‌ها و لیزوژوم‌ها ترکیب می‌شوند (جکسون و همکاران، ۲۰۰۵) که منجر به تخریب پروتئین گیرنده اتوفاژی p62/SQSTM1 می‌شود (ریچارد و جکسون، ۲۰۱۲)، و به نظر می‌رسد این همجوشی و فیوژن^۱ برای ایجاد ویروس خارج سلولی مهم است. این امکان وجود دارد که اتوفاگوزوم‌ها در طول عفونت، ویروس‌ها را به کُندی در سیتوپلاسم جذب کنند و پس از همجوشی با اندوزوم‌ها و غشاهای پلاسمایی، ویروس‌ها را از سلول‌ها رها سازند (جکسون و همکاران، ۲۰۰۵، و شکل ۵,۲ ب، iv تا vi). لومن اندوزوم‌ها و لیزوژوم‌ها در ph اسیدی با یک ATPase^۲ و اکوئلی حفظ می‌شوند که H⁺ را از سیتوپلاسم به اندامک^۳ پمپ می‌کند. اسیدی شدن برای فعالیت پروتئازهای اسید لیزوژومی مهم است و ph پایین در اندوزوم‌ها، طی اندوسیتوز^۴، تجزیه لیگاند^۵ گیرنده را تسهیل می‌کند. مهار پروتئازهای لیزوژومی، تأثیر کمی بر تکثیر ویروس فلح اطفال، یا تولید ویروس‌های عفونی در سلول‌ها دارد. با این حال، بازده ویروس عفونی، بویژه به بافیلومایسین A حساس بود، که ATPase و اکوئلی را مهار می‌کند (ریچاردز و جکسون، ۲۰۱۲). بافیلومایسین A بر تکثیر ژنوم تأثیری نداشت، اما از بلوغ پروتئین کاپسید جلوگیری کرد. نتایج نشان می‌دهد که در اسیدی سازی اتوفاگوزوم‌ها، آلودگی ویروس فلح اطفال با تقویت

^۱ Fusion^۲ ATPase^۳ organelle^۴ درون یاختگی^۵ ligand

بلغ کاپسید از طریق تبدیل خود یعنی کاتالیز VP0 به VP2 و VP4، افزایش می‌یابد (شکل ۵,۲ ب، iv).

ویروس کوکساکی^۱

مسیر رهاسازی سلول غیرلیتیک که شامل عبور از طریق اندامک‌های اسیدی است، حاوی آنزیم‌های پروتئولیتیک است که ممکن است برای انتروویروس هایی مانند ویروس فلج اطفال مناسب باشند که در زمان آلودگی از طریق دستگاه گوارش، معده را درگیر می‌کنند. ویروس کوکساکی B3 (CVB3)، یک انتروویروس از خانواده پیکورناویروس است که می‌تواند سبب میوکاردیت^۲ ویروسی شود. CVB3 ایجاد DMV‌های متعدد در سلول‌هایی با قطرهایی از ۰/۲ تا ۱ میکرومتر را القا می‌کند (وانگ و همکاران، ۲۰۰۸). عفونت منجر به تبدیل LC3-I به LC3-II و ایجاد نقطه GFP-LC3 بزرگی می‌شود، که با افزایش فسفوریلاسیون eIF2a همراه است، eIF2a پروتئینی است که تصور می‌شود اتوفاژی را تنظیم می‌کند. بازده CVB3 در اشتراک با ویروس فلج اطفال، پس از مهار mTOR با راپامایسین، افزایش می‌یابد و زمانی کاهش می‌یابد که زن‌هایی مانند ATG7، BECN1 و VPS34 که برای اتوفاژی ضروری اند، سرکوب شوند. متحمل به نظر نمی‌رسد، با اینحال، CVB3 از مسیر همچوشی اتوفاگوزوم/اندوزوم/لیزوزوم برای خروج از سلول‌ها استفاده می‌کند. حتی اگر اتوفاژی توسط ویروس فعال شود، p62/SQSTM1 در سلول‌های آلوده شده با CVB3 تجزیه نمی‌شود و به نظر می‌رسد که ویروس همچوشی اتوفاگوزوم/لیزوزوم را مهار می‌کند (وانگ و همکاران، ۲۰۰۸، و شکل ۵,۲ ب، iii و iv). همچوشی اتوفاگوزوم-لیزوزوم ممکن است پروتئین‌های مهم برای تکثیر را تجزیه کند زیرا اگر همچوشی اتوفاگوزوم-لیزوزوم با سرکوب LAMP2 مهار شود، تکثیر CVB3 افزایش می‌یابد. وجود مانع در همچوشی اتوفاگوزوم-لیزوزوم ممکن است تشکیل نقطه LC3 در سلول‌های دیر آلوده شده طی چرخه عفونی و تشکیل مگافاگوزوم‌ها در سلول‌های آسینار پانکراس را نیز توضیح دهد (کمبال و همکاران، ۲۰۱۰). مطالعات بیشتر، رویکردی ژنتیکی را در پیش گرفته‌اند تا نقش اتوفاژی در تکثیر CVB3 درون سلول را بررسی کنند (علیرضایی و همکاران، ۲۰۱۲). موش‌هایی که زن Atg5 آنها توسط توالی‌های loxP احاطه شده است، با

¹ Coxsackievirus

² التهاب ماهیچه قلب

موس هایی آمیخته شدند که cre¹ ریکامبیناز تقویت کننده الاستاز ۱ را بیان می کنند، که مخصوص سلول های آسینار پانکراس است. نتیجه زاد و ولد + Atg5 Cre، مدلی از بافت را ارائه می کند که نقصان خاص اتوفاژی دارد، زیرا برای آن ها بیان پروتئین ATG5 در سلول های آسینار پانکراس از بین می رود. نقصان Atg5 سبب کاهش قابل توجه تیترهای CVB3 در اوایل عفونت شد و پاتولوژی پانکراس را کاهش داد. بررسی سلول های آسینار فاقد Atg5 به وسیله میکروسکوپ الکترونی، کاهش علامت تورم ER و کمبود DMV ها و مگافاگزوم ها را نشان داد. این مورد، یکی از مطالعات کمی است که نشان می دهد اتوفاژی برای تکثیر پیکورناویروس هم در داخل و هم در خارج سلول حائز اهمیت است.

ویروس کوکساکی B4 (CVB4) منژیت آسپتیک و آنسفالیت به خصوص در نوزادان را سبب می شود. آلدگی کشت های اولیه نورون قشری موس با CVB4 تبدیل LC3-I به LC3-II را افزایش می دهد و DVM هایی ایجاد می کند که با میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده هستند (یون و همکاران، ۲۰۰۸). این نشانه های فعال سازی اتوفاژی زمانی کاهش یافتند که سلول ها با مهار کننده های کالپین^۲ (سیتین پروتئاز وابسته به کلسیم) انکوبه^۳ شدند. این لزوماً به این معنا نیست که کالپین ها برای اتوفاژی ضروری هستند. این اثر ممکن است روی تکثیر ویروس مؤثر باشد زیرا فعال سازی کالپین برای تکثیر پیکورناویروس های متعدد مورد نیاز است (آپلا و همکاران، ۲۰۰۸).

انترووویروس انسانی ۷۱

انترووویروس انسانی ۷۱ (EHV71) سبب ابتala به بیماری های دهان و دست و پا می باشد که در کودکان خردسال می تواند منجر به منژیت آسپتیک شود. عفونت خطوط سلول عصبی و ماهیچه ای با EHV71، شکل گیری نقطه GFP-LC3، تولید LC3-I به LC3-II و DMV های قابل مشاهده به وسیله میکروسکوپ الکترونی را القا می کند (هوانگ و همکاران، ۲۰۰۹). عفونت EHV71، هم فسفوریلاسیون mTOR و هم اثر کننده p70S6K mTOR^۴ فعال شده بود (شکل ۵,۲ ب). نشان می دهد که اتوفاژی از طریق مهار سازی پیام دهنده TOR^۴ شده بود (شکل ۵,۲ ب). تبدیل LC3-II به LC3-I و تولید DMV ها، همچنین در نورون های نخاعی در موس ها بعد

¹ cre recombinase

² calpain

³ incubate

⁴ signaling

فصل ۵: اتوفاژی و عفونت پیکورناویروس ۱۰۳

از عفونت دهانی با سویه EHV71 سازگار با موش مشاهده شد. اتوفاژی در اشتراک با ویروس فلچ اطفال^۱ در کشت سلولی برای EHV71، سودمند است. تیترهای خارج سلولی EHV71 تحلیل شده در اجسام شناور سلولی زمانی کاهش یافتند که اتوفاژی مهار شد و زمانی تیترهای ویروس افزایش یافتند که اتوفاژی بوسیله تاموکسیفن، راپامایسین، یا گرسنگی فعال شده بودند (هوانگ و همکاران، ۲۰۰۹).

ویروس انسفالومیوکاردیت

ویروس انسفالومیوکاردیت (EMCV)، محدوده میزبانی گستردۀ ای دارد. موش‌های صحراوی و موش‌ها بعنوان مخزن EMCV در نظر گرفته می‌شوند در حالیکه عفونت‌های حیوانات اهلی می‌توانند منجر به میوکاردیت حاد کشنده شود. عفونت خطوط سلولی، DMV‌های قابل مشاهده به وسیله میکروسکوپ الکترونی را القا می‌کند و بسیاری از این‌ها حاوی مواد سیتوپلاسمی است که نشان می‌دهد که آنها اتوفاگوزوم هستند. تبدیل LC3I به LC3II، هنگامی که سلول‌ها با ویروس غیر فعال شده به وسیله‌ی ماوراءبنفس انکوبه شدند، رخ نداد و بنابراین نیاز به تکثیر EMCV است. نقطه EMCV، با 3A و VP1 (شکل ۵،۲ ii) و هم VP1 و 3A در DMV‌ها با میکروسکوپ الکترونی ایمونوگلد^۲ قابل ارزیابی‌اند (هوانگ و همکاران، ۲۰۱۱)، این شواهد قوی ارائه می‌دهد که اتوفاگوزوم‌ها برای همگذاری^۳ کمپلکس EMCV ریلیکاز، بکار می‌روند و با افزایش^۴ برابری در تولید ویروس در حضور راپامایسین سازگار است، زمانی که اتوفاژی به وسیله ۳ متیادین^۵ یا سرکوب^۶ Atg7 مهار می‌شود، بازده کاهش می‌یابد. فعال سازی اتوفاژی، ویروس خارج سلولی را نسبت به ویروس داخل سلولی دو یا سه برابر افزایش داد که نشان می‌دهد همانطور که برای ویروس فلچ اطفال دیده شد، اتوفاژی ممکن است رهاسازی EMCV را از سلول‌ها گسترش دهد (شکل ۵،۲ b, vi). با مشاهده انکوباسیون سلول‌های آلوده به E64-d^۷، یک مهارکننده پروتئاز لیزوژومی، سطوح افزایش یافته LC3-II و p62/SQSTM1 اثبات می‌شود. بررسی‌ها نشان می‌دهد که اتوفاگوزوم‌هایی که توسط EMCV القا شدند (تحریک شدند) محتويات خود را به لیزوژوم تحويل می‌دهند و بنابراین می‌توانند کاسپید سیتوپلاسمی را به اتولیزوزوم‌ها تحويل دهند. EMCV به ph پایین و سطوح VP1 افزایش یافته در حضور E64-d

¹ poliovirus

² Immunogold

³ assemble

⁴ methyadenine

حساس است که نشان می‌دهد کاپسیدها به تجزیه در لیزوزوم‌ها حساسند (ژوانگ و همکاران، ۲۰۱۱). مشخص نیست که ویروس‌ها در حین عبور از اتوفاگوزوم‌ها چگونه از خود در مقابل ph پایین و پروتئازها محافظت می‌کنند.

ویروس بیماری دهان و دندان

ویروس بیماری دهان و دندان (FMDV)، گونه‌ای در دسته آپتوویروس^۱ (از آفت^۲ یونانی، تاولچه‌ها در دهان) است، که شامل ویروس‌های ورم مخاط بینی^۳ اسبی و گاوی می‌باشد. دو مطالعه نشان می‌دهد که عفونت سلول‌ها با FMDV، اتوفاژی را فعال می‌کند. با ایجاد نقطه GFP-LC3 (أدائل^۴ و همکاران، ۲۰۱۰؛ بریمن و همکاران، ۲۰۱۲)، فرآیند LC3-II به LC3-I و حضور DMV‌ها با میکروسکوپ الکترونی نشان داده می‌شود (أدائل و همکاران، ۲۰۱۰؛ موناگان^۵ و همکاران، ۲۰۰۴). برخلاف انتروویروس‌ها، FMDV نسبت به اسید بسیار آسیب پذیر است و این در طول ورود به سلول، برای ویروس امکان جداسازی از اندوزوم‌ها در pH پایین را فراهم می‌سازد. با توجه به این حساسیت به اسید، پیش‌بینی می‌شد که FMDV برخلاف انتروویروس‌ها به اتوفاژی حساس باشند و اینکه بازده ویروس در صورت مهار اتوفاژی افزایش خواهد یافت. جالب اینجاست که به نظر می‌رسد برعکس این موضوع، در هنگام سرکوب 8/LC3/Atg12، Atg12 وجود داشته باشد (أدائل و همکاران، ۲۰۱۰)، کشت FMDV در فیبروبلاست‌های جنینی موش (MEF) که از موش‌های Atg^{+/+}^۶ جدا شده است، منجر به کاهش تولید ویروس می‌شود (بریمن و همکاران، ۲۰۱۲)، و تولید ویروس زمانی افزایش می‌یابد که اتوفاژی با راپامایسین فعال شود (أدائل و همکاران، ۲۰۱۰). سرکوب ژن‌های اتوفاژی تولید ویروس را به طور ثابت کاهش دهد، اما تولیدات داخل سلولی و خارج سلولی برخلاف PV و FMDV به یک اندازه تحت تأثیر قرار گرفتند. به نظر می‌رسد، تأثیرات فعالسازی اتوفاژی با راپامایسین به نوع سلول وابسته باشد. راپامایسین تأثیر کمی روی بازده FMDV از سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO) داشت (بریمن و همکاران، ۲۰۱۰)، اما بازده سلول‌های اولیه کشت شده از گلوی گاو، ۱۰ برابر و از سلول‌های MCF-10A، ۱۰۰ برابر افزایش یافت (أدائل و همکاران، ۲۰۱۰)، یک خط سلولی مخاطی پستان در انسان مربوط به سلول‌های MCF-7 برای مطالعات در مورد PV مورد استفاده

¹ Aphthovirus

⁴ O'Donnell

² aphta

⁵ Monaghan

³ rhinitis

فصل ۵: اتوفاژی و عفونت پیکورناویروس ۱۰۵

قرار گرفت. عفونت FMDV، منجر به کاهش SQSTM1/p62 می‌شود که نشان دهنده این است که اتوفاگوزوم‌های القا شده توسط FMDV، محموله اتوفاژی را به لیزوژوم‌ها تحويل می‌دهند (بریمن و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین بعيد به نظر می‌رسد، همانطور که برای CVB3 نشان داده شد، FMDV با انسداد همچوشی اتوفاگوزوم-لیزوژوم زنده بماند.

هم بیانی LC3 با پروتئین رپلیکاز 3A ویروس فلج اطفال نشان داد که اتوفاگوزوم‌ها عنوان مکانی برای تکثیر PV استفاده می‌شوند (جکسون و همکاران، ۲۰۰۵). عفونت FMDV از سلول‌های MCF-10 منجر به هم بیانی جزئی بین LC3-II و 2B FMDV و 2C می‌شود (أدائل IBRS2 و همکاران، ۲۰۱۰). تحلیل سلول‌های CHO، سلول‌های MEF، و سلول‌های خوکی ۹۶٪ از وزیکول‌های که با FMDV آلوده شدند، جداسازی تقریباً کامل نقطه LC3/Atg8 (٪) از وزیکول‌های حاوی پروتئین‌های رپلیکاز 3A و 3D ویروس بیماری دهان و پا (تب برفکی) را نشان می‌دهد. وقتی نقاط فلورسنت به مجموعه داده‌های دیجیتال تبدیل شدند و به صورت آماری تحلیل شدند، ۵۰٪ از نقاط LC3 با پروتئین کاسپید، VP1 هم بیان کردند. آزمایشات برچسب گذاری ۳ گانه نشان داد که VP1 با LC3-GFP و نیز p62 هم بیان بودند که نشان می‌دهد پروتئین‌های کاسپید احتمالاً به عنوان محموله‌های اتوفاژی مشخص شده‌اند (شکل ۵، ب، iii) (بریمن و همکاران، ۲۰۱۲). محموله‌های اتوفاژی توسط پروتئین‌های موتوری داینئین به سمت ساترزوژوم در امتداد میکروتوبول‌ها کشیده می‌شوند. شناخت محموله‌های یوبی کوئیتین تا حدی توسط هیستون داستیلاز ۶ (HDAC6) انجام می‌شود، یک توبولین داستیلاز که به پروتئین‌های یوبی کوئینه و موتور داینئین متصل می‌شود (لی و همکاران، ۲۰۱۰). مشاهده کمک اسکریپت^۱ که HDAC6 را مهار می‌کند، منجر به پراکندگی گروههای پری نوکلئر^۲ VP1-LC3 دو نقطه مثبت می‌شود که شاهد بیشتری برای تحويل کاسپیدهای ویروس تب برفکی^۳ به اتوفاگوزوم‌ها ارائه می‌کند (بریمن و همکاران، ۲۰۱۰). از آنجایی که EV71 از VP1 با نقاط GFP-LC3 در کشت سلولی و DMV‌های بررسی شده در نورون‌های نخاعی به وسیله میکروسکوپ الکترونی هم بیانی دارند، کاسپیدهای EV71 نیز ممکن است محموله‌های اتوفاژی باشند (هوانگ و همکاران، ۲۰۰۹).

¹ Script

² perinuclear

³ FMDV

مشاهده سلول‌های MEF، و سلول‌های IBRS2، تیترهای FMDV تولید می‌کند اما حدود ۹۰٪ از نقاط LC3-II برای پروتئین‌های رپلیکاز منفی هستند که نشان می‌دهد برای ویروس تب برفکی، پروتئین‌های رپلیکاز با اتوفاگوزوم برای تکثیر نیاز نیست یا اینکه تکثیر با ۵-۱۰٪ تأمین می‌شود. محل دقیق رپلیکاز ویروس تب برفکی به سختی باقی می‌ماند (ناکس و همکاران، ۲۰۰۵؛ موناگان و همکاران، ۲۰۰۴) و ممکن است با وزیکول‌های غشایی یا DMV هایی که اتوفاگوزوم نیستند همراه باشند. تحلیل دوره زمانی عفونت ویروس تب برفکی نشان داد که نقاط GFP-LC3 قبل از شروع تکثیر ویروس ظاهر شد. این موضوع، منجر به حمایت بیشتر از این ایده می‌شود که فعالسازی اتوفاژی احتمالاً به تکثیر ویروس تب برفکی ارتباط ندارد و با نشان دادن نقاط GFP-LC3 که با ویروس غیرفعال UV و با کاسپیدهای خالی تحریک شد، تأیید شد. فعالسازی اتوفاژی توسط کاسپیدهای خالی نشان داد که اتوفاژی ممکن است با اتصال ویروس تب برفکی به گیرنده‌های سطح سلول رها شود (شکل ۵,۲ ب، vii). ویروس تب برفکی برای ورود به سلول‌ها، می‌تواند حداقل از دو دسته گیرنده استفاده کند. سویه‌های زمینه‌ای از پروتئین‌های سطح سلولی^۱ اتصال دهنده RGD استفاده می‌کنند و این‌ها احتمالاً به عنوان گیرنده در میزبان حیوان به کار گرفته می‌شوند، در حالیکه، هپارین سولفات به دنبال سازگاری با کشت سلول استفاده می‌شود. سلول‌های CHO، فاقد گیرنده‌های پروتئین سطح سلولی برای ویروس تب برفکی هستند و این امکان را فراهم می‌کند که تشکیل نقطه GFP-LC3 در سلول‌های CHO با اتصال ویروس تب برفکی به هپارین سولفات القا شود. جالب است که ویروس تب برفکی O1Kcad2 را شناسایی می‌کند، که از پروتئین‌های سطح سلولی به عنوان تنها گیرنده آن استفاده می‌کند، همچنین نقاط LC3 القا شده در سلول‌های IBRS2 خوکی، نشان می‌دهند که اتوفاژی می‌تواند با انعقاد هرنوع گیرنده ای فعال شود. القای اتوفاژی با ویروس تب برفکی از یک جنبه مهم با گرسنگی متفاوت است. ورتمانین^۲، یک مهارکننده PI3 کیناز است که به طور معمول برای جلوگیری از فسفوریلاسیون لیپیدهایی بکار می‌رond که ساخت اتوفاگوزوم را در طی گرسنگی آغاز می‌کنند. تولید نقطه LC3 به وسیله ویروس تب برفکی، با ورتمانین مهار نمی‌شود (بریمن و همکاران، ۲۰۱۰). فقدان اثر ورتمانین بر القاء نقطه LC3 با ویروس تب برفکی بر این موضوع دلالت دارد که ساخت اتوفاگوزوم به فعالیت دسته VPS34 کیناز III PI3 مرتبط است.

¹ integrin² ligation³ Wortmannin

نیاز ندارد و ممکن است فعال سازی اتوفاژی با مسیری دیگر را طی ترکیب با گیرنده‌های غشای پلاسمایی یا طی اندوستیوز نشان دهد (شکل ۵، ۲ ب، vii).

راینو ویروس‌های انسانی^۱

راینو ویروس‌های انسانی (HRVs) مسئول سرماخوردگی معمولی، را می‌توان به ۹۹ سروتاپ تقسیم کرد که از نظر گیرنده‌های مورد استفاده برای ورود به سلول طبقه بندی می‌شوند. HRV-14 یکی از راینو ویروس‌های گروه اصلی است که از ICAM-1 برای ورود به سلول استفاده می‌کند در حالیکه HRV1 و HRV2 ویروس‌های گروه اصلی هستند که از گیرنده لیپوپروتئین با چگالی کم استفاده می‌کنند. HRV-14، اتوفاژی را تحریک می‌کند (شکل ۵، ۲ ب، i) و اتوفاژی برای تکثیر سودمند است (جکسون و همکاران، ۲۰۰۵). به نظر می‌رسد فعال سازی اتوفاژی به وسیله HRV2 به نوع سلول بستگی دارد. عفونت HRV2 از سلول‌های هلا^۲ در القاء نقطه-GFP شکست خورد و مدولاسیون اتوفاژی تأثیر کمی بر بازده ویروس داشت (بربی-زاروبا^۳ و همکاران، ۲۰۰۷). در هر حال، عفونت ۲۹۳ سلول با HRV2، نقطه GFP-LC3 و تبدیل LC3 به LC3II را القا می‌کند؛ بعلاوه، مهارسازی اتوفاژی بازده ویروس را کاهش می‌دهد در حالیکه فعالسازی اتوفاژی تکثیر HRV2 را افزایش می‌دهد (کلین و جکسون، ۲۰۱۱).

احتیاط در تفسیر القای نقطه LC3 و وزیکول‌های دو غشایی در زمانیه اتوفاژی

نقاط LC3

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که LC3-GFP^۴ می‌تواند برای DMV‌های القا شده با ویروس هپاتیت موش و کرونا ویروس، بکار رود (رجیوری و همکاران، ۲۰۱۰). این مسیر مستقل از اتوفاژی است و به ساخت وزیکول‌هایی به نام پیکورناویروس در ارتباط است، که مراقبان ER را از ادموزوم‌ها حمل می‌کنند. کرونا ویروس‌ها مانند پیکورناویروس‌ها، ویروس‌های RNA رشته‌ای مثبت (+) هستند و ممکن است که برخی از نقاط LC3 که در طی عفونت پیکورناویروس مشاهده شد، تشکیل اندوزوم را در بر می‌گیرد، به خصوص اگر پروتئین‌های رپلیکاز در ER قرار گیرند. Atg5 برای اتوفاژی ضروری است، اما برای تشکیل DMV ضروری

¹ rhinoviruses

² Hela cells

³ Brabec-Zaruba

نیست و توانایی ویروس‌ها برای تولید نقطه LC3 در سلول‌های Atg^{5/-} می‌تواند برای بررسی تشکیل اندوزوم به کار رود. تولید نقطه LC3 طی اتوفاژی، نیازمند حذف آمینواسیدهای ترمینال C از LC3 و افزایش PE که LC3-II را تولید می‌کند می‌باشد. این افزایش GFP برای بکارگیری LC3-I برای ادموزوم‌ها نیاز نیست. یک توانایی برای تولید نقاط GFP-LC3 در سلول‌هایی که GFP-LC3-G120A را بیان می‌کنند، جایی که جایگزینی G120A، مانع تقسیم LC3 می‌شود، می‌تواند به عنوان آزمایش دوم برای تشکیل ادموزوم بکار رود (بریمن و همکاران، ۲۰۱۰).

نقطه LC3 می‌تواند توسط مسیری به نام فاگوسیتوزهای مرتبط با LC3 (LAP)، نیز تولید شود. این شامل اتصال مستقیم LC3 به اندوزوم‌ها و فاگوزوم‌ها به دنبال فعال سازی گیرنده‌های شبه با جگیر^۱ می‌باشد (سنچوان^۲ و همکاران، ۲۰۰۷). این نقاط LC3 با اتوفاگوزوم‌ها تفاوت دارد زیرا آنها غشاهاي منفرد هستند و سیتوزول را جذب نمی‌کنند (سنچوان و همکاران، ۲۰۰۷). تمرکز مطالعات LAP بر روی سلول‌های بیگانه خوار بوده است اما این احتمال که LAP در طی عفونت سلول پوششی^۳ فعال شود، برای بررسی پیکورناویروس استفاده شد و ممکن است دلیل موجهی برای تولید برخی نقاط LC3 در طی عفونت باشد.

وزیکول‌های دوغشایی (DMVs): وزیکول‌های دوغشایی از زمانی که برای اولین بار توسط میکروسکوپ الکترونی در اوخر دهه ۱۹۵۰ و اوایل دهه ۱۹۶۰ شناسایی شدند، ویروس شناسان را مجدوب خود کرده‌اند (دیلز و همکاران، ۱۹۶۵). تاکنون بحث روی شباهت بین وزیکول‌های دوغشایی و اتوفاگوزوم‌ها تمرکز داشته است اما مدارک قابل توجهی وجود دارد که وزیکول‌ها غیر از اتوفاگوزوم‌ها، به تکثیر پیکورناویروس کمک می‌کنند و آن وزیکول‌های دوغشایی می‌توانند مستقل از اتوفاژی تولید شوند (بررسی شده در کوتام و همکاران، ۲۰۰۹). وزیکول‌های دوغشایی القا شده با پیکورناویروس ها، ۴۰۰-۲۰۰ نانومتر قطر دارند و بنابراین، کوچکتر از اتوفاگوزوم‌ها (۵۰۰-۱۰۰۰ نانومتر) هستند. این احتمال را افزایش می‌دهد که وزیکول‌های دوغشایی القا شده توسط پیکورناویروس ها، اتوفاگوزوم‌های اصلاح شده هستند و پیکورناویروس‌ها به نحوی از گسترش اتوفاگوزوم جلوگیری می‌کنند (شکل a).

¹ Toll-like receptors

² Sanjuan

³ epithelial

فصل ۵: اتوفازی و عفونت پیکورناویروس ۱۰۹

همچنین این احتمال وجود دارد که جمعیتی از وزیکول‌های دوغشایی توسط پروتئین‌های رپلیکاز مستقل از اتوفازی تولید می‌شوند. وزیکول‌های دوغشایی به وسیله تعدادی از ویروس‌های RNA رشته‌ای مثبت مختلف از جمله فلاوی ویروس‌ها، کروناویروس‌ها و آرتري ویروس‌ها تولید می‌شوند. در این موارد، پروتئین رپلیکاز روی صفحه سیتوپلاسمی ER جمع می‌شوند جایی که آنها انحنای منفی را تحمیل می‌کنند که منجر به توی هم رفتگی^۱ غشاء به لومِن ER می‌شود (اسنایدر^۲ و همکاران، ۲۰۰۱؛ نوپس^۳ و همکاران، ۲۰۰۸، و شکل ۵,۳b, i). در هم رفتگی مشابه منجر به تولید گویچه‌ها توسط آلفاویروس‌ها و نوداویروس‌ها می‌شود (کوپک و همکاران، ۲۰۰۷). این‌ها به صورت گویچه‌هایی منظم به قطر ۵۰ نانومتر در امتداد غشای محدود کننده اندوزوم‌ها و لیزوژوم‌ها دیده می‌شوند (یا میتوکندری در مورد نوداویروس‌ها)، و حدود ۱۰۰ نسخه از پروتئین رپلیکاز را در خود جای می‌دهد. این امکان وجود دارد که وزیکول‌های دوغشایی GM130 به عنوان گویچه‌های بزرگ از اندامک‌های متصل به غشاء آغاز شوند که توسط تجمع رپلیکاز، القا شده‌اند، و سپس از اندامک تولید کننده وزیکول‌های دوغشایی در سیتوزول جدا می‌شوند (شکل ۵,۳a ii و iii).

سازماندهی مجدد غشایی ناشی از PV با توموگرافی الکترونی تحلیل شده است (بلاو^۴ و همکاران، ۲۰۱۲). خوش‌های کوچکی از وزیکول‌های تک غشایی که با لوله‌های انشعابی به هم متصل شده‌اند، در اوایل عفونت دیده می‌شوند (شکل ۵,۳c, i). برخی از وزیکول‌ها حاوی پروتئین نشانگر گلثی اولیه GM130 هستند و تصور می‌شود که از بخش سیس گلثی گرفته می‌شوند، اما توموگرام^۵‌ها هیچ ارتباطی را بین وزیکول‌های مشتق شده از ویروس و بخش‌های غشایی سلولی نشان نمی‌دهند. بعداً در طول عفونت به نظر می‌رسد حفره لومینال وزیکول‌ها فرو می‌ریزد و به وزیکول‌های دوغشایی تبدیل می‌شوند که بسیاری از آنها مواد سیتوپلاسمی را جذب می‌کنند (شکل ۵,۳c ii). مکانیزم (ساز و کار) ریزش لومینال شناخته شده نیست اما ممکن است پروتئین 2B را در بر بگیرد که منافذ غشاها را تولید می‌کند. مطالعه اخیر نشان می‌دهد که غشاها^۶ی که به تکثیر پیکورناویروس نیاز دارند ممکن است مستقل از بخش‌های غشایی درون زا^۷ تولید شوند (نیکاتم باب و همکاران، ۲۰۱۳). در این مورد پروتئین C2، ورود اسیدهای چرب با زنجیره بلند

¹ invagination

⁵ نوعی عکس برداشته شده با اشعه ایکس

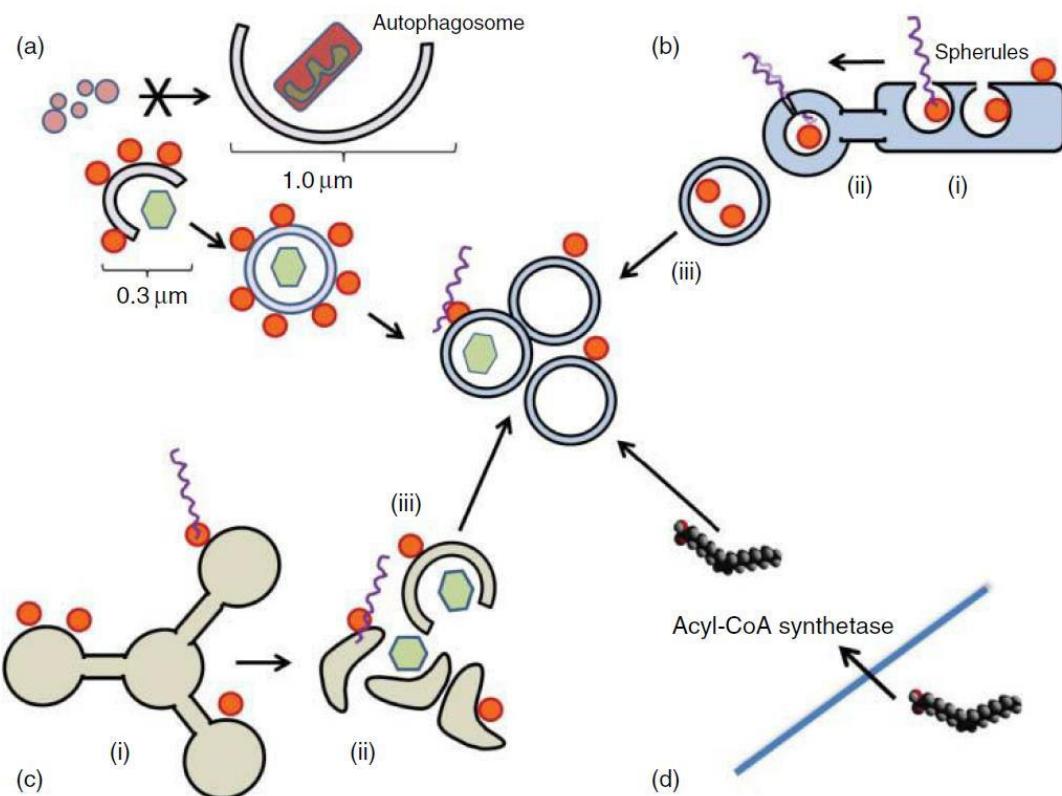
² Snijder

⁶ endogenous

³ Knoops

⁴ Bliv

را به سلول‌ها فعال می‌کند و فعال سازی سنتتاژ آسیل- کوآ^۱، منبعی از لیپید را برای سنتز غشاهای نو فراهم می‌سازد (شکل ۵,۳d).



شکل ۵,۳ مسیرهای جایگزین برای تشکیل وزیکول‌های غشایی دوگانه. پانل (الف): اتوفاگوزوم‌های اصلاح شده. DMV‌های االقا شده توسط پیکورناویروس‌ها کوچکتر از اتوفاگوزوم‌ها هستند. DMV‌های االقا شده توسط پیکورناویروس‌ها ممکن است اتوفاگوزوم‌های اصلاح شده باشند زیرا پیکورناویروس‌ها گسترش اتوفاگوزومی را مهار می‌کنند. پانل (ب): کروی. (i) پروتئین‌های کپی از (کره‌های کوچک) به صورت سیتوپلاسمی اندامک‌های متصل به غشاء جذب می‌شوند، جایی که آنها انحنای غشاء و هجوم به اندامک را االقا می‌کنند و یک کروی بزرگ را تشکیل می‌دهند. انوازیناسیون به غشای محدود کننده اندامک متصل می‌ماند و ژنوم‌های جدید از طریق منفذ وارد سیتوزول می‌شوند. (ii) و (iii) انوازیناسیون در قطب افزایش می‌یابد و نزدیک شدن غشاهای منجر به تشکیل DMV می‌شود که می‌تواند جدا شده و وارد سیتوزول شود. پانل (ج): کمپلکس‌های تکثیر مرتبط با غشاء. تکثیر ویروس باعث ایجاد خوشه‌های کوچکی از وزیکول‌های تک غشایی می‌شود که توسط لوله‌های غشایی منشعب به هم متصل می‌شوند. (ii) و (iii) بعداً در حین عفونت حفره‌های مجرافرو می‌ریزند و وزیکول‌های غشایی دوگانه ایجاد می‌کنند که بسیاری از آنها مواد یا ویروس‌های سیتوپلاسمی را جذب می‌کنند. پانل (د): واردات اسیدهای چرب برای سنتز جدید غشاهای آسیل کوآ در طی تکثیر ویروس منجر

¹ acyl-CoA

به واردات اسیدهای چرب می‌شود که می‌توانند به عنوان پیش ساز لیپیدهای مورد نیاز برای تولید وزیکول‌های دو غشایی استفاده شوند.

نتیجه گیری و تحقیقات آتی

همه پیکورناویروس‌هایی که تا به امروز بررسی شده‌اند، اتوفاژی را در طول عفونت فعال می‌سازند. ویروس‌ها اتوفاژی را به طرق مختلف فعال می‌کنند، اما در هر مورد، اتوفاژی تکثیر ویروس را ارتقا می‌دهد و بازده ویروس را در هنگام تکثیر در کشت سلولی افزایش می‌دهد. تعیین چگونگی فعال سازی اتوفاژی توسط پیکورناویروس‌های منفرد، کار بیشتری را می‌طلبد. آیا این شامل قرار گرفتن در معرض ویروس با واسطه الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوزن است یا به سیگنال‌ها آسیب می‌رساند یا ناشی از کاهش اسید آمینه یا استرس ER ناشی از تکثیر ویروس است؟ مدرکی وجود دارد که پروتئین‌های تکثیری خاص، بعنوان مثال، پروتئین BC2 و 3A ویروس فلج اطفال، اتوفاژی را فعال می‌کند و تعیین چگونگی انجام این کار جالب خواهد بود. سؤال کلیدی دیگر دقیقاً این است که چگونه مسیر اتوفاژی، تکثیر ویروس را بالا می‌برد و آیا می‌توانیم از این اطلاعات برای طراحی داروهای جدید برای مهار تکثیر پیکورناویروس استفاده کنیم؟

اتوفاژی، نقش کلیدی در اینمنی ذاتی در برابر عفونت دارد جایی که تحويل به لیزوژوم‌ها می‌تواند ویروس را بکشد و حضور آنتی ژن‌ها را برای دستگاه اینمنی افزایش دهد. مطالعات در زمینه کشت سلولی باید به مدل‌های حیوانی گسترش یابد تا اثرات اتوفاژی روی نتیجه عفونت مشخص شود. اگر پاسخ‌های اینمنی افزایش یافته توسط اتوفاژی، افزایشات تولید ویروس را جبران کند، اتوفاژی همچنان ممکن است در داخل بدن مضر باشد. مدل‌های موشی، که بیان شرطی پروتئین‌های اتوفاژی را در بافت‌های خاص ممکن می‌سازند، ابزارهایی مهم برای تعیین نقش اتوفاژی در نظارت ایمونولوژیکی و تعیین قدرت عفونت زایی^۱ و بیماری زایی^۲ خواهند بود. یوبیکویتین، در طول اتوفاژی انتخابی، نقش کلیدی در جذب گیرنده‌های اتوفاژی دارد، و پیکورناویروس‌های متعدد، راهشان را به اتوفاگوزوم‌ها باز می‌کنند. مطالعات در مورد ساز و کارهای جذب پیکورناویروس‌ها ممکن است مسیرها را شناسایی کند، برای مثال، لیگاندهای یوبیکویتین E3 که پیکورناویروس‌ها را برای یوبیکویتیناسیون علامت گذاری می‌کنند.

¹ virulence

² pathogenesis

غربالگری‌های گسترده‌ترین اخیر، بیماری‌های انسانی را به جهش‌های پروتئین‌های آتوفاژی ارتباط داده‌اند. بیماری کرون^۱ به جهش‌های پروتئین آتوفاژی ATG16L ارتباط دارد و جهش‌های گیرنده آتوفاژی p62/SQSTM1 به بیماری پاژه استخوان^۲ مربوط است. بیماری کرون توسط عوامل محیطی که ممکن است شامل عفونت ویروسی قبلى از جمله، احتمالاً توسط انتروویروس‌ها، باشد، رسوب می‌کند. تعیین اینکه آیا جهش‌ها در پروتئین‌های آتوفاژی شناسایی شده از طریق برنامه‌های غربالگری، باعث ایجاد بیماری‌هایی مانند بیماری کرون می‌شود مهم است زیرا آنها مدیریت پیکورناویروس‌ها توسط آتوفاژی را به خطر می‌اندازند.

¹ Crohn's disease

² Paget's disease

فصل ۶

فلاوی ویروس‌ها و اتوفاژی

مقدمه

اتوفاژی

اتوفاژی یک فرآیند کاتابولیک بسیار محافظت شده است که برای تخریب و بازیافت، اجزای سیتوزولی را به بخش‌های لیزوژوم تحويل می‌دهد (لوین^۱ و کرومیر^۲؛ ۲۰۰۸؛ میزوشیما^۳ و همکاران، ۲۰۰۸). برای حفظ هم ایستایی سلولی، پاسخ به استرس‌های مختلف، مبارزه با عفونت‌ها بسیار مهم است، و برای توسعه مناسب بسیاری از ساز و کارها ضروری می‌باشد (بویا^۴ و همکاران، ۲۰۰۸، هیل و همکاران، ۲۰۱۳؛ کرومیر و همکاران، ۲۰۱۰).

تنظیم مسیر اتوفاژی، پیچیده است (برای جزئیات بیشتر، آبراهامسان و همکاران، ۲۰۱۲؛ کرومیر و همکاران، ۲۰۱۰؛ ورس و همکاران، ۲۰۱۳).^۳ کانون مرکزی اتوفاژی را به طور خلاصه مورد بحث قرار خواهیم داد: محور AMPK–mTOR–ULK1/2، ترکیب ۱ VPS34–Beclin 1 و سیستم هم آوری شبیه یوبیکوتین ATG12 (LC3) و ATG16. نکته مهم این است که این کانون ها^۵ در مدولاسیون اتوفاژی توسط طیف وسیعی از ویروس‌ها درگیر می‌شوند (بررسی شده در

¹ Levine

⁴ Boya

² Kroemer

⁵ hub

³ Mizushima

دونگ و لوین، ۲۰۱۳؛ جردن و رندال، ۲۰۱۲؛ کیم و همکاران، ۲۰۱۰، و بنابراین ممکن است نقاط مشترک فلاؤی ویروس‌ها و القای اتوفاژی را ارائه نمایند.

فعال سازی اتوفاژی توسط محرک مختلف روی کیناز فعال شونده توسط آدنوزین مونوفسفات^۱ (AMPK) و هدف پستانداری راپامایسین (mTOR) متمرکز می‌شود (کروم و همکاران، ۲۰۱۰). mTOR و AMPK استرس‌های خارجی حس کننده و حالت متابولیک سلولی را به ترتیب با تنظیم مثبت و منفی اتوفاژی، ادغام می‌کنند (الرز و همکاران، ۲۰۱۰؛ اینوکی و همکاران، ۲۰۱۲). آنها این کار را تا حدی با تنظیم فعالیت کینازهای شبه ۵۱ ناهماهنگ^۲ و ۲ (ULK1/2) (ULK1/2) انجام می‌دهند (اگان و همکاران، ۲۰۱۱؛ هاساکاوا و همکاران، ۲۰۰۹؛ کیم و همکاران، ۲۰۱۱).

mTOR (خصوصاً، کمپلکس ۱ mTORC1)، تحت شرایط پایه به ۲ ULK1/2 متصل می‌شود و آن را از طریق فسفریلاسیون‌های متعدد، غیر فعال می‌کند (هاساکاوا و همکاران، ۲۰۰۹؛ کیم و همکاران، ۲۰۱۱). پس از تحریک علامت دهنده اتوفاژی، AMPK به طور مستقیم ULK1/2 mTOR را فسفریله می‌کند، که منجر به جدا شدن آنها و فعال شدن ULK1/2 می‌شود (اگان و همکاران، ۲۰۱۱؛ کیم و همکاران، ۲۰۱۱؛ لی و همکاران، ۲۰۱۰). این، منجر به فسفریلاسیون پایین دست^۳ بعدی ماده زمینه ULK1/2 و شروع اتوفاژی می‌شود. VPS34 و Beclin 1 دو ماده زمینه فعالیت کیناز ULK1 هستند که اخیراً توصیف شده‌اند (راسل و همکاران، ۲۰۱۳).

کمپلکس ۱ VPS34–Beclin 1 توسط فعل و انفعالات^۱ Beclin 1 با جفت‌های اجباری مختلف به شدت تنظیم و هماهنگ می‌شود، اما کمپلکس هسته p150–VPS34–Beclin 1–VPS34^۲ است (ورس و همکاران، ۲۰۱۳). VPS34 و p150 دسته^۳ فسفواینوزیتید^۳–کیناز^۳ (PI3K) را تشکیل می‌دهد که فسفواینوزیتید^۳–فسفات (PI3P) را تولید می‌کند. غنی سازی PI3P کمک می‌کند تا محل تشکیل اتوفاگوزوم‌ها (امگازوم‌ها) و نیز گسترش اتوفاگوزوم‌ها با بکارگیری پروتئین‌های اتوفاژی مختلف ایجاد شود (اکس و همکاران، نودا و همکاران، ۲۰۱۰؛ رابرتز و تیستاکیس، ۲۰۱۳). فعل و انفعال با ۱ Beclin 1، فعالیت VPS34–p150 PI3K را تحریک می‌کند و این فعایت توسط یک فهرست همیشه در حال رشد از جفت‌های Beclin1 بیشتر مدوله می‌شود (ورس و همکاران،

¹ ۵' AMP-activated kinase

³ رابر phosphatidylinositol-3-kinase

² uncoordinated 51-like kinases

۲۰۱۳). جفت‌های الزام آور^۱ Beclin 1، می‌توانند بلوغ اتوفاگوزوم و همجوشی آن با لیزوژوم را تحت تأثیر قرار دهند (لیانگ و همکاران، ۲۰۰۸؛ ماتسوناگا و همکاران، ۲۰۰۹؛ سان و همکاران، ۲۰۰۸؛ ژانگ و همکاران، ۲۰۰۹). اخیراً محققان یک مورد مشابه^۲ Beclin 1 با عملکردهای مشابه در تنظیم اتوفاژی و نقش‌های اضافی در تبادلات اندوسيتوزی یافته‌اند (ھی و همکاران، ۲۰۱۳).

دو توالی شبه اوپیتین که به طور کامل محافظت شده است، گسترش غشای اتوفاگوزومی را کنترل می‌کنند: توالی ATG12 که ATG5 را به ATG12 جفت می‌کند و توالی LC3 که LC3 را به فسفاتیدیل اتانول امین^۳ (LC3-PE or LC3-II) (PE) جفت می‌کند (جنگ و لیونسکی، ۲۰۰۸). جفت شدگی ATG12 به ATG5 نیازمندِ فعالیت شبه E1 از ATG7 و فعالیت شبه E2 از ATG10 است، اما به فعالیت یک آنزیم شبه E3 نیاز ندارد (میزوشیما و همکاران، ۱۹۹۸؛ شیتتانی و همکاران، ۱۹۹۹؛ تانیدا و همکاران، ۱۹۹۹). جفت ATG12–ATG5 توسط ATG16 برای فاگوفور در حال شکل گیری به کار گرفته می‌شوند (فوجیتا و همکاران، ۲۰۰۸). LC3 توسط ATG4 پردازش می‌شود و برای جفت شدن PE توسط ATG7 (E1) و ATG3 (E2) شارژ ATG12–ATG5 می‌شود (ایچیمورا و همکاران، ۲۰۰۰؛ کیریساکو و همکاران، ۲۰۰۰). سپس، ATG12–ATG5 به عنوان آنزیم شبه E3 در فاگوفور بکار می‌رود (هانادا و همکاران، ۲۰۰۷). LC3-II در غشای در حال رشد درج می‌شود، در طول عمر اندامک مرتبط باقی می‌ماند، و بنابراین، به عنوان یک نشانگر خاص برای اتوفاگوزوم‌ها بکار می‌رود. LC3 نشان داده است که در هدایت گسترش غشای فاگوفور در حال رشد و نتیجه همجوشی که اتوفاگوزم را مهر و موم می‌کند، نقش دارد (ویدبرگ^۴ و همکاران، ۲۰۱۰؛ زی^۵ و همکاران، ۲۰۰۸).

در حالیکه زمانی به عنوان تخریب عمدۀ اجزای سیتوزولی شناخته می‌شد، تحقیقات نقش گستردۀ ای را برای هدف گیری خاص محموله توسط اتوفاگوزوم تایید کرده است (اتوفاژی انتخابی) (کرکین و همکاران، ۲۰۰۹؛ ویدبرگ و همکاران، ۲۰۱۱). نشان داده شده است که اتوفاتوفاژی انتخابی برای پاکسازی برخی از اندامک‌ها، پاتوژن‌های مهاجم، و پروتئین‌های انباشته شده، ضروری است (کرکین و همکاران، ۲۰۰۹؛ ویدبرگ و همکاران، ۲۰۱۱). هدف گذاری در مکانیسم‌های وابسته به اوپیکوئیتین و مستقل از مکانیزم محقق می‌شود؛ در هر حال، هر کدام به فعل و انفعالات پروتئین‌های وفق دهنده^۶ با محموله وابسته است. این پروتئین‌های

¹ phosphatidylethanolamine

³ Xie

² Weidberg

⁴ adaptor proteins

وقق دهنده حاوی نواحی تعاملی (LC3) هستند که جذب مستقیم اتوفاگوزوم در حال رشد به محموله را توسط ورق دهنده میسر می‌سازد (بیرگیزدوتیر و همکاران، ۲۰۱۳). شکل‌های متعدد اتوفاژی توصیف شده‌اند که در آن پروتئین‌های مقیم در اندامک خود، حاوی نواحی تعاملی LC3 هستند که اتوفاگوزوم‌ها را جذب می‌کنند (هانا و همکاران، ۲۰۱۲؛ لیو^۱ و همکاران، ۲۰۱۲؛ نواک^۲ و همکاران، ۲۰۱۰؛ سندوال^۳ و همکاران، ۲۰۰۸). اتوفاگوزوم پس از بلع انتخابی محموله، به ادغام با لیزوژوم ادامه می‌دهند و اجزای داخل را تخریب می‌کنند.

فلاؤی ویروس‌ها

فلاؤی ویروس‌ها عمده‌اند، اما نه منحصرآ، پاتوژن‌های بندپاپرده^۴ هستند. آنها از طریق نیش کنه‌ها و یا پشه‌ها به میزبان‌های مهره داران پخش می‌شوند. عفونت‌های حاصل می‌توانند آسیب شناسی‌های مختلفی ایجاد کنند، که شامل بیماری‌های تب دار، تب خونریزی دهنده، و بیماری‌های آنسفالیتیک که منجر به عوارض شدید و مرگ و میر می‌شود.

فلاؤی ویروس‌ها، ویروس‌های RNA مثبت استاندارد کوچکی هستند که در سیتوپلاسم سلول‌های میزبان آلوده تکثیر می‌شوند، آن‌ها انواع سلول‌های میزبان را از طریق درون بری با واسطه گیرنده آلوده می‌کنند و از بخش اندوژومی اسیدی شده برای آزاد کردن ژنوم آنها در سیتوزول استفاده می‌کنند (آکوستا و همکاران، ۲۰۰۸؛ گالینز و پُرترفیلد، ۱۹۸۵، ۱۹۸۶؛ ایشک و همکاران، ۱۹۹۸؛ کریشنان و همکاران، ۲۰۰۷؛ ناوا^۵، ۱۹۹۸؛ ان جی و لو^۶، ۱۹۸۸؛ ون در شار و همکاران^۷، ۲۰۰۸). مدخل بعدی، ترجمه وابسته به کلاه ژنوم ویروسی است که یک پلی پروتئین تولید می‌کند، که به صورت همزمان به ۱۰ پروتئین ویروسی تقسیم می‌شود. این منجر به ۳ پروتئین ویروسی می‌شود تا ساختار ویریون و ۷ پروتئین غیرساختاری (NS1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B, and 5) را شکل دهد که برای تکثیر ویروسی کافی هستند. همانندسازی RNA در تغییرات ویروس القا شده در شبکه آندوبلاسمی (ER) رخ می‌دهد که آنتی ژن‌های ویروسی را از نوکلئاز‌های سیتوزولی و حسگرهای ایمنی ذاتی محافظت می‌کند. ویریون‌ها در مجاورت شبکه آندوبلاسمی جفت می‌شوند، که در آن، آن‌ها با جوانه زدن لومن شبکه آندوبلاسمی، پوشش خود

¹ Liu

⁵ Nawa

² Novak

⁶ Ng and Lau

³ Sandoval

⁷ van der Schaar

⁴ arthropod-borne

فصل ۶: فلاوی ویروس‌ها و اتوفاژی

را بدست می‌آورند. ویریون‌ها از طریق مسیر ترشح سلولی آزاد می‌شوند و به دنبال پروتئولیز prM توسط فورین پروتئاز سلولی در گلثی عفونی می‌شوند (لی و همکاران، استادلر و همکاران، ۱۹۹۷).

احتمالات متعددی برای وقایع در چرخه زندگی ویروسی وجود دارد که می‌تواند سبب اتوفاژی شود و از آن سود ببرد. اگرچه NS4A از ویروس‌های دنگی^۱ و موداک^۲ می‌توانند اتوفاژی را در زمان بیش از حد، القا کنند (مک لین و همکاران، ۲۰۱۱)، مسیرها و مکانیزم‌ها که توسط آن فلاوی ویروس‌ها باعث ایجاد اتوفاژی در طول عفونت می‌شوند، نامشخص باقی می‌ماند. تحقیقات ویروس‌های دیگر موارد زیر را نشان داده است: در گیری با گیرنده ویروسی (دنیزات و همکاران، ۲۰۰۸؛ اسپرت و همکاران، ۲۰۰۶؛ ژوبرت و همکاران، ۲۰۰۹؛ ناکاماتو و همکاران، ۲۰۰۹؛ شلی و همکاران، ۲۰۰۹)، تشخیص الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن ویروسی (PAMPs) توسط گیرنده‌های تشخیص الگوی میزان (PRPs) (دلگادو و همکاران، ۲۰۰۸؛ لی و همکاران، ۲۰۰۷)، و اعمال پروتئین‌های ویروسی منفرد که می‌توانند برای القای اتوفاژی در طی عفونت مفید باشند. همانندسازی، تولید واسطه‌های RNA دو رشته ای (dsRNA) را هدایت می‌کند که می‌تواند توسط پروتئین کیناز R (PKR) سنجش شود (گیلفوی و میسن^۳، ۲۰۰۷؛ تو^۴ و همکاران، ۲۰۱۲). اگرچه فسفریلاسیون پایین دستِ عامل ازدیاد طول آلفا-۲ (EIF2A) (PKR) می‌تواند اتوفاژی را در پاسخ به عفونت ویروسی القا کند (تالوچی^۵ و همکاران، ۲۰۰۶، ۲۰۰۲)، که یکی دیگر از محرک‌های بالقوه اتوفاژی در طی همانندسازی ویروسی است (أگاتا و همکاران، ۲۰۰۶؛ یوریمیتسو و همکاران، ۲۰۰۶). در این فصل، پیشرفت‌های اخیر در درک فعل و انفعالات فلاوی ویروس‌ها را با برنامه اتوفاژی سلولی پوشش خواهیم داد (جدول ۱).

¹ DENV

² Modoc

³ Gilfoy and Mason

⁴ Tu

⁵ Tallóczy

TABLE 6.1 Known interactions between flaviviruses and the autophagic pathway

Virus	Induces autophagy	Cell Type	Role	Inhibiting autophagy	Inducing autophagy	Function of autophagy	Reference
DENV	Yes	Huh7, MEF	Proviral	Decreases replication	Increases viral replication	Unclear	(Lee et al., 2008)
	Yes	HepG2 (DENV-2)	Proviral	Decreases replication	Increases viral replication	Autophagosomes localize with dsRNA and NS1	(Panyasrivanit et al., 2009)
	Yes	HepG2 (DENV-3)	Proviral	Decreases replication	Increases viral replication	Autophagosomes localize with dsRNA and NS1	(Khakpor et al., 2009)
	Yes	Huh7, Huh7.5, HepG2, BHK	Proviral	Decreases replication	Not tested	Lipid metabolism (provides FFAs for b-oxidation)	(Heaton and Randall, 2010)
	Yes	MDCK, MEFs, Vero, 293T, HeLa	Proviral	Increases cell death	Enhances cytoprotection	Cytoprotection	(McLean et al., 2011)
	Yes	BHK, Huh7, AG129 mice (virion)	Proviral	Immature virions released	Increases specific infectivity of virus	Lipid metabolism, virion maturation	(Mateo et al., 2013)
	Yes	U937	Antiviral*	No effect	Decreases replication	Unclear	(Panyasrivanit et al., 2011)
	Yes	MEF	Proviral*	Not tested	Increases viral replication	Not examined	(Teramoto et al., 2013)
	Yes	Vero, MCC, BSC, MEF	Neither	No effect	No effect	No effect	(Beatman et al., 2012)
	No	A549, HeLa, Huh7, Huh 7.5, 293T, Neuro2A, m5-7, fibroblasts, astrocytes	Neither	No effect	No effect	N/A	(Vandergaast and Fredericksen, 2012)
WNV	Not examined	C57BL/6J	Antiviral*	Not tested	Decreases viral replication in neurons	Induction of autophagy limits viral replication	(Shoji-Kawata et al., 2013)
	Yes	NT-2, N-18	Proviral	Decreases replication	Increases viral replication	Early in infection, JEV virion localizes to amphisomes	(Li et al., 2012)
	Yes	Neuro2a, A549	Proviral	Decreases replication, increases cell death, innate immunity	Not tested	Blunted immune response and cell death	(Jin et al., 2013)
Modoc Virus	Yes	MDCK, MEFs, Vero, 293T, HeLa	Proviral	Increases cell death	Enhances cytoprotection	Cytoprotection	(McLean et al., 2011)

*In these studies only the induction of autophagy on top of virus infection was examined or had an effect.

جدول ۶.۱

ویروس دنگی

ویروس دنگی (DENV) از چهار سروتیپ مجزا تشکیل شده است (DENV1–4). عفونت دنگی می‌تواند منجر به تب دنگی و در موارد شدیدتر سبب تب هموراژیک دنگی (DHF) و سندروم شوک دنگی (DSS) شود. این ویروس توسط ناقلان پشه آئدیس اجیپتی^۱ و آئدیس الپاپیکتس^۲ پخش می‌شوند. سالانه تقریباً ۴۰۰ میلیون نفر با ویروس دنگی آلوده می‌شوند و نزدیک به نیمی از جمعیت جهان در نواحی آندمیک-ویروس دنگی از جمله آب و هوای گرمسیری و نیمه گرمسیری زندگی می‌کنند (بات و همکاران، ۲۰۱۳). تجدید حیات ویروس دنگی در دهه‌های گذشته به ترکیبی از عوامل انسانی، ویروسی، ناقل و اکولوژیکی نسبت داده شده است (کایل و هریس، ۲۰۰۸). اخیراً گزارشاتی از عفونت‌های ویروس دنگی در بخش‌هایی

¹ Aedes aegypti

² albopictus

فصل ۶: فلاؤی ویروس‌ها و اتوفاژی ۱۱۹

از ایالات متحده آمریکای جنوبی ارائه شده است (گزارش ۲۰۱۰، رادکه^۱ و همکاران، ۲۰۱۲؛ راموس^۲ و همکاران، ۲۰۰۸؛ شیرمر و همکاران، ۲۰۱۳). با افزایش مجدد عفونت‌ها، ویروس دنگی بعنوان یک عفونت ویروسی با ظهور مجدد شهرت یافته است که تأثیر قابل توجهی بر سلامت جهانی دارد. از آنجایی که تا کنون واکسن یا درمانی برای عفونت ویروس دنگی وجود ندارد، علاقه روز افزونی نسبت به درک بیولوژی سلولی و مولکولی عفونت ویروس دنگی وجود داشته است.

در کشت سلولی، ویروس دنگی طیف وسیعی از انواع سلول‌های حساس و آسیب پذیر را نشان می‌دهد. بسیاری از خطوط سلولی انسانی، از جمله فیبروبلاست‌ها، اپی تلیال، اندوتلیال و هپاتوسیت‌ها قادر به پشتیبانی از همانند سازی ویروسی از طریق آلودگی مستقیم با ویروس هستند. به هر حال، در حالی که حامی عفونت است، این سلول‌ها، اهداف اولیه عفونت ویروس دنگی در داخل سلول نیستند. محل‌های اولیه عفونت ویروس دنگی، سلول‌های اجداد میلوئید هستند که شامل مونوسیت‌ها، ماکروفاژ‌ها، و سلول‌های دندریتی هستند (بلک لی^۳ و همکاران، ۲۰۰۷؛ فام^۴ و همکاران، ۲۰۱۲). به طور متضاد، این نوع سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی، به طور ناچیزی آلوده می‌شوند، مگر با افزایش مکانیزم عفونت متنکی به آنتی بادی (بوناک و همکاران، ۲۰۰۸؛ برندت و همکاران، ۱۹۸۲؛ هالستید و اُرورکه، ۱۹۷۷). غلظت غیرخنثی یا آنتی بادی‌های خنثی کننده، ویریون را متصل می‌کنند و جذب آن را به سلول‌های بیان کننده FcγR تسهیل می‌کنند (بوناک و همکاران، ۲۰۱۱؛ برندت و همکاران، ۱۹۸۲؛ لیتاوا و همکاران، ۱۹۹۰). در داخل سلول، این اتفاق در عفونت ثانویه با یک ویروس هتروتیپی می‌افتد که همانندسازی ویروس به تیتر بالا در تعداد بیشتری از سلول‌ها از طریق عفونت مستقیم را میسر می‌سازد. اعتقاد بر این است که ADE می‌تواند زمینه ساز پیشرفت عفونت به آسیب شناسی‌های شدیدتر DSS و DHF باشد (دِجِنراتسای^۵ و همکاران، ۲۰۱۰؛ گوزمان^۶ و همکاران، ۲۰۱۳).

مطالعه اولیه برای بررسی نقش اتوفاژی در عفونت ویروس دنگی، در سلول‌های Huh7 انجام شد (یک خط سلولی مشتق از هپاتوم^۷) و نشان داد که هردو ویروس دنگی، اتوفاژی را القا

¹ Radke

⁵ Dejnirattisai

² Ramos

⁶ Guzman

³ Blackley

⁷ hepatoma

⁴ Pham

می‌کند و آن اتوفارزی برای همانندسازی ویروسی سودمند است (لی و همکاران، ۲۰۰۸). تحلیل میکروسکوپی الکترونی و کانفوکال، افزایش در نقاط GFP-LC3 و وزیکول‌های دو غشایی LC3+ را به ترتیب در سلول‌های آلوده شده به ویروس دنگی نشان داد. سطوح LC3-II همچنین در طی عفونت، افزایش یافته‌ند. افزایش ۳-متیل آدنین^۱ (3-MA)، که بازدارنده فسفاتیدیل اینوزیتول-۳ کیناز است که القای اتوفارزی را مهار می‌کند، مانع تشکیل نقاط GFP-LC3 و تبدیل LC3-II در طی عفونت ویروس دنگی می‌شود. اتوفاگوزوم‌ها با نشانگر لیزوژومی / اندوژومی کولوکالیزه شد که نشان می‌دهد اتوفاگوزوم‌ها با لیزوژوم‌ها هم‌جوشی داشته‌اند و در LAMP-1 نتیجه بالغ می‌شوند. مهار اتوفارزی با 3-MA یا عفونت فیبروبلاست‌های جنینی موش (MEFs) که در ژن اتوفارزی ضروری^۲ (Atg5^{−/−}) ناکافی است، منجر به کاهش همانندسازی ویروسی شد، در حالیکه القای اتوفارزی با راپامایسین، تعداد سلول‌های آلوده و همانندسازی ویروسی را افزایش داد. این نشان می‌دهد که اتوفارزی، یک عملکرد پروویروسی را در عفونت ویروس دنگی سلول‌های Huh7 انجام می‌دهد (لی و همکاران، ۲۰۰۸). به طور کلی، این نتایج در مطالعات بعدی برای بررسی نقش اتوفارزی در عفونت ویروس دنگی انواع مختلف سلول تکرار شده است (هیتمن و راندال، ۲۰۱۰؛ خاکپور و همکاران، ۲۰۰۹؛ ماتئو^۳ و همکاران، ۲۰۱۳؛ مک لین و همکاران، ۲۰۱۱؛ پانیاسریوانیت و همکاران، ۲۰۰۹؛ ترامتو^۴ و همکاران، ۲۰۱۳).

اتوفا گوزو姆‌ها به عنوان بستری برای همانندسازی؟

تمام ویروس‌های RNA رشته مثبت، غشاهاي سلولی را بازسازی می‌کنند تا یک آشیانه محافظه به منظور تسهیل همانندسازی ژنومشان ایجاد کنند. هدف این ساختارهای القا شده ویروسی احتمالاً سه گانه است: ۱- به عنوان بستر غشایی برای اطلاعات همانندسازی به کار می‌رود، ۲- افزایش غلظت محلی واسطه‌های ضروری برای همانندسازی ویروسی، و حفاظت RNA‌های ویروسی از مسیرهای تخریب RNA سیتوزولی و تشخیص آنها توسط حسگرهای ایمنی ذاتی (نترتون^۵ و همکاران، ۲۰۰۷؛ نواؤ و همکاران، ۲۰۰۵). مانند بسیاری از ویروس‌های RNA رشته مثبت دیگر، بررسی‌های اولیه در مورد نقش اتوفاژی در چرخه زندگی ویروس دنگی، بر روی نقش بالقوه آن در تولید این کمپلکس‌های همانندسازی تمرکز کرده است (خاکپور و همکاران،

¹ 3-methyladenine

2 Mateo

3 Panyasriyanit

4 Teramoto

5 Netherton

6 Novoa

۲۰۰۹؛ پانیاسریوانیت و همکاران، ۲۰۰۹). فلوئورسانس LC3 تا حدی، با نشانگرهای کمپلکس همانندسازی ویروسی در مطالعات اولیه همپوشانی داشت (خاکپور و همکاران، ۲۰۰۹؛ پانیاسریوانیت و همکاران، ۲۰۰۹). در هر حال، بازسازی‌های میکروسکوپ الکترونی کرایو با وضوح بالای قطعات همانندسازی ویروس دنگی نشان داد که این ساختارهای همانندسازی، اصلاً وزیکول نبودند، اما در واقع فرورفتگی‌ها و پیچ خوردگی‌های غشای ER هستند (ولش و همکاران، ۲۰۰۹). بعلاوه، هیچ گروه دیگری ارتباط LC3 را با ساختار رپلیکاز ویروسی تکثیر کرده‌اند (هیتن و راندال، ۲۰۱۰؛ لی و همکاران، ۲۰۰۸؛ مک لین و همکاران، ۲۰۱۱؛ تراموتو و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین، به طور کلی پذیرفته شده است در حالی که اتوفاژی، نقش پروویروسی در چرخه زندگی ویروس دنگی بازی می‌کند، جزئی از این اجزاء همانندسازی نیست.

مدولاسیون متابولیسم لیپید

اکثر مطالعات در مورد اثرات پروویروسی اتوفاژی پیشنهاد کرده بودند که ویروس، مانع بلوغ اتوفاگوزوم‌ها برای بکارگیری مکان‌های تکثیر هستند یا اینکه ویریون‌ها احتمالاً از طریق اتوفاگوزوم‌ها از سلول‌های آلوده شده رها می‌شوند. پیشنهاد جدیدی برای عفونت ویروس دنگی ارائه شده بود که اتوفاژی مستقیماً با تکثیر یا انتشار ویروس مرتبط نیست، اما متناوباً به طور انتخابی برای تنظیم متابولیسم سلولی القا می‌شود (هیتن^۱ و راندال، ۲۰۱۰). اتوفاژی به عنوان تنظیم کننده مرکزی هومئوستازی متابولیک سلولی تحریک می‌شود تا توسط ویروس تخریب شود. ویروس دنگی، متابولیسم را با آغاز یک برنامه اتوفاژی انتخابی، که لیپوفاژی نامیده می‌شود، تنظیم می‌کند که ترجیحاً قطرات چربی (LDs)، ذخایر سیتوزولی تری گلیسیرید و استرهای کلسترول موجود در همه جا را هدف قرار می‌دهد (هیتن و راندال، ۲۰۱۰؛ سینگ^۲ و همکاران، ۲۰۰۹). این موضوع در نهایت به پردازش تری-گلیسیریدها به اسیدهای چرب آزاد (FFAs) و بتا اکسیداسیون بعدی آنها در میتوکندری برای تولید ATP می‌انجامد (سینگ و همکاران، ۲۰۰۹). در سلول‌های غیر عفونی، لیپوفاژی به عنوان یک پاسخ به گرسنگی برای تولید انرژی مورد نیاز یا به عنوان پاسخی به اضافه بار چربی^۳، القا می‌شود (کاشیک^۴ و همکاران، ۲۰۱۱؛ اویمت^۵ و همکاران، ۲۰۱۱؛ سینگ و همکاران، ۲۰۰۹).

¹ Heaton

² Singh

³ lipid

⁴ Kaushik

⁵ Ouimet

مشاهدات اولیه گزارش کرد که در رنگ زدگی قطرات چربی توسط رنگ لیپیدی خنثی Oil Red O در سلول‌های Huh7 آلوده شده با ویروس دنگی کاهشی وجود داشت (هیتن و راندال، ۲۰۱۰). کمی سازی قطرات چربی توسط میکروسکوپ کانفوکال و الکترونی کاهش در آن ناحیه، اما نه تعداد کل قطرات چربی را نشان داد، که نشان می‌دهد آنها احتمالاً محتوای چربی خود را کاهش دهنند. این کاهش در رنگ زدگی قطره چربی همزمان با افزایش جریان اتوفاژی خواهد بود، همانطور که با تشکیل نقاط GFP-LC3 اندازه گیری شد، به طوری که همبستگی معکوس قوی بین تعداد نقاط GFP-LC3 در هر سلول و مقدار نواحی مثبت LD در سلول‌های آلوده وجود داشت. اتوفاگوزوم‌های GFP-LC3 برای قطرات چربی به روش وابسته به زمان متتمرکز می‌شوند. در ۲۴ ساعت پس از عفونت، تعدد اتوفاگوزوم‌ها در سلول آلوده ۴ برابر افزایش یافت، درحالی که درصد مرتبط با LD سه برابر افزایش یافت، بنابراین تولید ۱۲ برابری، اتوفاگوزوم‌های کل مرتبط با قطرات چربی در هر سلول را افزایش می‌دهد. این افزایش در درصد اتوفاگوزوم‌های مرتبط با قطرات چربی در سلول‌های آلوده به ویروس دنگی نشان می‌دهد که عفونت ویروس دنگی، اتوفاژی انتخابی (لیپوفاژی) ^۱ را القا می‌کند. تحلیل قطرات چربی و نیاز برای اتوفاژی در چهار خطوط سلولی منشاء اپی تلیال کلیه و تومور کبدی ^۲ تائید شد (Huh7, Huh-7.5, HepG2, BHK). مهار اتوفاژی با siRNAs 3-MA یا ATG12 و Beclin 1 از تحلیل LD در سلول‌های آلوده به ویروس دنگی جلوگیری کردند (هیتن و راندال، ۲۰۱۰).

مطالعات بیشتر مشخص نمود که اتوفاگوزوم‌های GFP-LC3 در سلول‌های آلوده به ویروس دنگی برای Oil Red O رنگ آمیزی مثبت شدند و فاگوزوم‌ها و نیز چربی‌های مثبت Oil Red O به لیزوژوم‌های اسیدی شده منتقل شدند (هیتن و راندال، ۲۰۱۰). نتیجهٔ تحويل تری گلیسیرید به لیزوژوم‌ها، پردازش آن‌ها و آزادسازی FFAs برای بتا اکسیداسیون است (هیتن و راندال، ۲۰۱۰؛ سینگ و همکاران، ۲۰۰۹). سلول‌های آلوده به ویروس دنگی، نسبت به همتاهاي خود که به طور مصنوعی آلوده شده بودند، نرخ بسیار بالاتری از بتا اکسیداسیون را نشان داد، و این به طور مؤثری در هنگام مهار اتوفاژی با 3-MA، ATG4B، ATG12، Beclin 1، ATG12، ATG4B یا siRNAs که ۳-MA یا

¹ lipophagy

² hepatoma

۱ را هدف قرار می‌دهد، کاهش یافت. علاوه، همانندسازی ویروس را می‌توان با اتوموکسیر، یک مهارکننده دارویی بتا اکسیداسیون مهار کرد.

اگرچه این مطالعات، لیپوفاژی عفونت القایی ویروس دنگی را نشان داد، اما نشان ندادند که لیپوفاژی، عملکرد اتوفاژی ضروری برای همانندسازی ویروس دنگی است. نیاز لیپوفاژی برای همانندسازی ویروس دنگی توسط یک سنجش مکمل لیپیدی (چربی) مشخص شد، که در آن نیاز اتوفاژی برای همانندسازی ویروس دنگی می‌تواند با افزایش چربی اگزوژنی جایگزین شود. اولین بار اتوفاژی توسط ابزارهای متعددی از جمله MA-3¹ یا siRNAs مهار شد که ATG4B²، ATG4B، یا Beclin 1 را هدف قرار می‌دهند. در هر مورد، اسیدهای چرب آزاد^۳ می‌توانند نقص همانندسازی ویروس دنگی را تکمیل کنند. علاوه بر این، تکمیل اتوفاژی مهارشده توسط اسیدهای چرب آزاد به اکسیداسیون نیاز دارد. درمان با اتوموکسیر، از همانندسازی ویروس دنگی در سلول‌های مکمل لیپیدی جلوگیری کرد (هیتن و راندال، ۲۰۱۰). بنابراین، نیاز اصلی اتوفاژی برای همانندسازی ویروس دنگی، تحریک کاتابولیسم لیپید است. در اصل، ویروس دنگی، یک پاسخ سلولی را القا می‌کند تا سلول ذخایر انرژی خود را به نفع ویروس تخلیه کند.

جالب است که ویروس هپاتیت سی^۴ ممکن است یک برنامه اتوفاژی خاص کلسترول را جهت تسهیل همانندسازی آن القا کند (وسکوو^۵ و همکاران، ۲۰۱۲). بیوپسی کبدی بیماران آلوده به ویروس HVC، ارتباط بین نسبتهای LC3-II/I و استئاتوز میکرووزیکولار^۶(کیستهای میکروسکوپی) را آشکار کرد. همانندسازی HVC منجر به افزایش در نقاط LC3 شد که با فیلیپین رنگ آمیزی شده کلسترول محدود شد. مهار اتوفاژی در سلول‌ها با تکثیر ویروس هپاتیت C به طور خاص رنگ آمیزی کلسترول را افزایش داد نه رنگ آمیزی تری گلیسیرید (وسکوو و همکاران، ۲۰۱۲). واضح نیست که چگونه این محموله را به طور انتخابی انجام میدهد. در هر حال، این یافته‌ها نشان می‌دهند که اتوفاژی ممکن است نقشی در تنظیم محیط چربی میزان برای یک طیف گسترده‌ای از ویروس‌ها بازی کند.

¹ FFAHCV

² HCV

³ Vescovo

⁴ microvesicular steatosis

نقش بالقوه برای پروتئین‌های مرتبط به اتوفاژی USP10 و USP13 در بلوغ ویریون ویروس دنگی

ویریون‌های فلاؤی ویروس در ER جمع و از طریق مسیر ترشحی آزاد می‌شوند. ویریون‌ها در ابتدا غیرعفونی هستند و پس از جدا شدن پپتید pr از prM در شبکه ترانس گلتزی توسط فورین پروتئاز سلولی، عفونی می‌شوند (یو و همکاران، ۲۰۰۸؛ ژانگ و همکاران، ۲۰۰۳). پپتید pr شکافته شده در ارتباط با ویریون باقی می‌ماند تا مانع از همچوشه E از وزیکول هایی شود که در طی خروج در آن حرکت می‌کند (الشوبر^۱ و همکاران، ۲۰۰۳؛ لی و همکاران، ۲۰۰۸). با خروج ویریون از سلول، pr از ویریون آزاد می‌شود. این انتشار، به دنبال آن یک سری از تغییرات ساختاری، ویریون را برای عفونت بعدی واجد شرایط می‌کند (موکوپادیای^۲ و همکاران، ۲۰۰۵). کار اخیر که توسط متئو و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شد، نقشی را برای اتوفاژی در این فرایند بلوغ پیشنهاد کرد. این کار به استفاده از یک مهارکننده اتوفاژی که اخیراً توصیف شده، اسپاوتین^۳، که فعالیت پروتئاز USP10 و ۱۳ را مهار می‌کند (لیو و همکاران، ۲۰۱۱). USP10 و ۱۳ به طور غیرمستقیم اتوفاژی را با کنترل تخریب وابسته به یوبیکویتین ۱ Beclin 1 کنترل می‌کنند. مهار USP10 و ۱۳ توسط اسپاوتین-۱ از حذف یوبیکویتین از ۱ Beclin 1 جلوگیری می‌کند، بنابراین باعث تخریب ۱ Beclin و مهار اتوفاژی می‌شود (لیو و همکاران، ۲۰۱۱).

انکوباسیون سلول‌های آلووده به ویروس دنگی با اسپاوتین-۱ نقاط GFP-LC3 را برای جفت گیری و ویریون‌های عفونی داخل و خارج سلولی کاهش می‌دهند بدون اینکه تأثیر زیادی روی سطوح RNA ویروسی ویروس دنگی بگذارند (متئو و همکاران، ۲۰۱۳). سپس نویسندهان، سنجش تکمیلی لیپیدی را که در بالا بحث شد، تکرار و نتیجه را مجدد تولید کردند که مهار-3 MA از همانندسازی ویروس دنگی می‌تواند توسط لیپیدهای اگزوژنی تکمیل شود. بنابراین، لیپیدها می‌توانند همه فرآیندهای معیوب وابسته به کیناز PI-3 را که برای تکثیر ویروس دنگی، مورد نیازند، از جمله اتوفاژی، را تکمیل کنند. لیپیدهای اگزوژنی نمی‌توانند مهار اسپاوتین-۱ از تکثیر ویروس دنگی را کامل کنند. با توجه به اینکه لیپیدها می‌توانند مهار اتوفاژی توسط -3 siRNAs و MA را هدف قرار می‌دهند، تکمیل کنند (هیتن ATG4B، ATG12 یا ۱ Beclin) این قویاً پیشنهاد می‌کند که مهار بلوغ ویروس دنگی توسط و راندال، ۲۰۱۰)، اما نه اسپاوتین-۱، این قویاً پیشنهاد می‌کند که مهار اتوفاژی توسط

¹ Elshuber

² Mukhopadhyay

³ Spautin-1

اسپاوتین-۱، مستقل از اتوفاژی است. توجه به این نکته ضروری است که UPS10 و USP13 طیف گسترده‌ای از فرایندهای مستقل از اتوفاژی مثل فعالیت p53، اصلاحات هیستون، و سیگنال دهی ایترفرون را تنظیم می‌کند (بام برگر^۱ و همکاران، ۲۰۰۹؛ دراکر^۲ و همکاران، ۲۰۱۱؛ اسکارتگانیا^۳ و همکاران، ۲۰۱۱؛ یه^۴ و همکاران، ۲۰۱۳؛ یوان^۵ و همکاران، ۲۰۱۰؛ ژائو^۶ و همکاران، ۲۰۱۱). بعلاوه، دریافتند که UPS10 به ۳' UTR از RNA ویروس دنگی متصل می‌شود و تغییر مکان متوسطی را در محل‌های تکثیر ویروس نشان می‌دهد (وارد و همکاران، ۲۰۱۱). بنابراین، با توجه به اثرات چندگانگی بالقوه اسپاوتین-۱، استفاده از آن باید توسط آزمایشات ژنتیکی مانند تحلیل تداخل RNA یا ناک اوت ATG تکمیل شود تا به فنوتیپ‌های وابسته به اتوفاژی بیانجامد.

از آنجایی که مهار UPS10 و ۱۳ از بلوغ ویریون ویروس دنگی ظاهرأ به اتوفاژی ارتباطی ندارد، نقش آن‌ها در عفونت ویروس دنگی چیست؟ آنها ظاهر می‌شوند تا نقشی در بلوغ ویریون بازی کنند. اسپاوتین-۱ رهاسازی پیتید pr از ویریون‌ها را به دنبال تقسیم prM توسط یک مکانیسم ناشناخته مهار می‌کند. سلول‌های درمانی شده با اسپاوتین-۱ ویریون‌های ویروس دنگی را آزاد می‌کند که ممکن است تأثیر منفی بر ویریون‌های عفونی داشته باشد.

اتوفاژی محافظ سلولی

مک لین و همکاران، (۲۰۱۱) نقش اتوفاژی در محافظت از پانلی از سلول‌ها در برابر کامپتوتسین^۷ القاکننده‌های مرگ سلولی اگزوژنی (CPT)، استارواسپورین^۸ (STS)، و سیکلوهگزامید^۹ (CHX) درمان پانلی از خطوط سلولی اپی تلیال و فیبروبلاست (فیبروبلاست‌های جنینی موش و بستر سوئیس، فیبروبلاست‌های جنینی موش C57/B, Veros, 293Ts, HeLas, و MDCKs) با CPT، مرگ سلولی کمتری را در زمان آلودگی با ویروس دنگی نشان داد. مهار اتوفاژی از طریق مهارکننده‌های PI-3 کیناز ورتمانین یا 3-MA، بعلاوه siRNAs که Beclin 1 و ATG5 را هدف قرار می‌دهد و مانع اثر محافظتی سلولی در برابر عفونت ویروس دنگی سلول‌های MDCK شد،

¹ Bomberger

⁶ Zhao

² Draker

⁷ camptothecin

³ Scortegagna

⁸ staurosporine

⁴ Yeh

⁹ cycloheximide

⁵ Yuan

نشان می‌دهد که اتوفاژی برای فنوتیپ محافظت سلولی، مورد نیاز است. القای اگزوژنی اتوفاژی از طریق درمان گرسنگی یا راپامایسین سبب کاهش بیشتر مرگ سلولی در درمان CPT، سلول‌های آلوده به ویروس دنگی می‌شود (مک لین و همکاران، ۲۰۱۱). بیان بیش از حد NS4A اتوفاژی را القا کرد و برای جلوگیری از مرگ سلولی ناشی از CPT به روش وابسته به اتوفاژی کافی بود (مک لین و همکاران، ۲۰۱۱).

مشخص نیست که چگونه NS4A اتوفاژی را تحریک می‌کند. همانطور که موردی برای پروتئین NS4B در هپاسی ویروس‌ها است، به عنوان یک پروتئین غشای خمیده مرتبط با ER، القای فشار ER امکان پذیر است (لی و همکاران، ۲۰۰۹؛ ژنگ و همکاران، ۲۰۰۵). فشار ER، یک القاکننده اتوفاژی معروف است (کروم و همکاران، ۲۰۱۰). علاوه بر این، غربالگری مخمر دو هیبریدی اخیر از جفت‌های برهم کنش پروتئین NS ویروس دنگی، دو برهم کنشگر NS4A، پروتئین‌های وفق دهنده اتوفاژی CALCOCO2 (NDP52) و TAX1BP1 را شناسایی کرد که در اتوفاژی عمل می‌کنند (کدکا^۱ و همکاران، ۲۰۱۱). اینکه آیا این فعل و انفعالات به هماهنگ کردن القای اتوفاژی توسط NS4A کمک می‌کند، باید مورد آزمایش قرار گیرد. همچنین جالب خواهد بود که مشخص شود آیا NS4A قادر به بازنویسی فنوتیپ لیپوفاژی است یا اینکه ممکن است جنبه متفاوتی از اتوفاژی باشد که ربطی به متابولیسم لیپید ندارد.

نقش اتوفاژی در یک مدل ADE از عفونت مونوسیت

تنها تحقیقی که اثرات اتوفاژی بر روی عفونت ویروس دنگی از مونوسیت‌ها را بررسی می‌کند در مدل عفونت ADE از سلول‌های U937 به کار رفت (پانیاسریوانیت^۲ و همکاران، ۲۰۱۱). عفونت ADE با ویروس دنگی، باعث القای اتوفاژی ضعیف شد، درحالی که مهار اتوفاژی باعث کاهش متوسط تولید تیترهای ویروس دنگی شد (پانیاسریوانیت و همکاران، ۲۰۱۱). القای بسیار زیاد اتوفاژی با استفاده از راپامایسین در دوردهای طولانی (۳-۲ روز) تیترهای ویروس عفونی داخل و خارج سلولی را کاهش داد. داده‌های ایمونوفلورسانس نشان داد که تحت شرایط درمان با راپامایسین (ولی درمان نشده نیست)، LC3 ممکن است با dsRNA هم بیانی شوند، که نویسنده‌گان آن را به عنوان اتوفاگوزوم‌ها و کمپلکس‌های همانندسازی ویروسی توصیف می‌کنند

¹ Khadka

² Panyasrivanit

۶: فلاؤی ویروس‌ها و اتوفاژی

که منشاء مشابهی در غشای ER دارد. بنابراین، نویسنده‌گان پیشنهاد می‌کنند که اتوفاژی ممکن است غشاهای مورد نیاز برای مکان‌های تکثیر را از بین ببرند (پانیاسریونیت و همکاران، ۲۰۱۱).

تفسیر القای طولانی اتوفاژی (و فرآیندهای دیگر) با راپامایسین و تپسیگارگین^۱ در سلول‌های آلوده شده با ویروس دنگی به دلیل مسائل مربوط به زمان بندی و اثرات پلیوتروپیک دشوار است (گنلی^۲ و همکاران، ۲۰۱۱؛ سارباسوف^۳ و همکاران، ۲۰۰۶). ممکن است که تکثیر در مونوسیت‌ها کمتر به اتوفاژی وابسته باشد. از آنجایی که مونوسیت‌ها هدف اولیه سلول ویروس دنگی هستند، این موضوع باید بررسی شود. روش دیگر، عفونت ویروس دنگی با واسطه ADE، وقایع علامت دهی گیرنده ویروس را که در یک عفونت ویروس دنگی اولیه رخ می‌دهد، کنار می‌گذارد و ممکن است برای تحریک اتوفاژ پروویروسی مهم باشد. ارزیابی اهمیت اتوفاژی در عفونت ویروس دنگی با واسطه ADE در درون سلول مهم خواهد بود.

اتوفاژی در عفونت‌های ویروس دنگی در موش‌ها

ارزیابی نقش اتوفاژی در عفونت ویروس دنگی در درون سلول به دلیل محدودیت‌ها با مدل‌های کنونی حیوانی دشوار است. متئو و همکاران (۲۰۱۳) بر روی USP10 و ۱۳ مطالعه کردند که در بالا مورد بحث قرار گرفت، همچنین تأثیر القا یا مهار اتوفاژی در طول عفونت ویروس دنگی موش‌های AG129 را بررسی کردند. ویروس دنگی یک گونه خاص گریز ایمنی ذاتی را تکامل داده است به طوری که می‌تواند علامت دهی اینترفررون نوع ۱ انسانی را مهار کند، اما نوع موش‌ها را نمی‌تواند مهار کند. ویروس دنگی تنها در موش‌هایی با علامت دهی اینترفررون مختل مانند موش‌های AG129 که کمبود گیرنده γ و β/α اینترفررون دارند، به طور مؤثر تکثیر می‌شود (ون دین بروک^۴ و همکاران، ۱۹۹۵). بنابراین، هر نقش ضدویروسی برای اتوفاژی در پاسخ به ایمنی ذاتی به عفونت ویروس دنگی احتمالاً در مدل AG129 نادیده گرفته می‌شود. با این وجود، موش‌های AG129 برای تعیین این موضوع مفیدند که آیا هر نوع تأثیر پیش ویروسی اتوفاژی مشاهده شده در شرایط آزمایشگاهی در داخل بدن تکرار می‌شوند. متئو و همکاران

¹ thapsagargin

² Ganley

³ Sarbassov

⁴ van den Broek

(۲۰۱۳) دریافتند که تحریک اتوفاژی با راپامایسین یا نیکاردیپین^۱ تکثیر ویروس دنگی و پاتوژن^۲ در موش‌های AG129 را افزایش داد.

مطالعه دیگری که اخیراً انجام شده است، بررسی کرده است که آیا اتوفاژی در طی عفونت در داخل بدن در مغز موش‌های شیرخوار سویه ICR القامی شود (لی و همکاران، ۲۰۱۳). نویسنده‌گان تبدیل LC3-I به LC3-II و تجمع نقاط در سلول‌های آلوده را از طریق روش وسترن بلاست و تحلیل کانفوکال نشان می‌دهند. آن‌ها توسط EM همچنین افزایشی را در ساختارهای اتوفاگوزومی در سلول‌های آلوده یافتنند. جالب است وقتی نویسنده‌گان از MA-3 و راپامایسین برای مهار و القای اتوفاژی استفاده می‌کنند، به ترتیب متذکر می‌شوند که القای زیاد اتوفاژی با راپامایسین تأثیر سودمندی بر روی همانندسازی سلولی داشته است در حالیکه MA-3 در هر صورت هیچ تأثیری ندارد. مشخص نیست که اثر یا فقدان این داروها به تأثیرات مستقیم آنها بر روی اتوفاژی ارتباط داشته باشد زیرا هیچ آزمایشی برای مهار اتوفاژی با استفاده از حذف یا ناک اوت ژن خاص انجام نشده است. با این وجود، این گزارش پیشنهاد می‌کند که در یک مکان ثانویه عفونت (سلول‌های ختنی)، ویروس دنگی، اتوفاژی را القامی کند (لی و همکاران، ۲۰۱۳). مطالعات بیشتر مورد نیاز است تا به طور واضح مشخص کند که به هر حال این القا پریوپریووسی است، ضدویروسی است یا برای ویروس ختنی است و نقش اتوفاژی در چرخه زندگی ویروس چیست.

فلاؤی ویروس‌های دیگر

ویروس آنسفالیت^۳ ژاپنی

ویروس آنسفالیت ژاپنی (JEV) یک فلاؤی ویروس آنسفالیت است که توسط چندین پشه از گونه‌های Culex پخش می‌شود. این یک پاتوژن مشترک بین انسان و دام است که چرخه زندگی آن خوک‌ها را به عنوان یک منبع اصلی / میزبان تقویت کننده، پرندگان آبی به عنوان ناقل، و پشه‌ها به عنوان ناقلين درگير می‌کند (بوشر و شرر، ۱۹۵۹). انسان‌ها میزبان بن بست^۴

¹ nicardipine

^۴ ارگانیسمی که یک عامل بیماری زا را در خود جای می‌دهد

² pathogenesis

اما خود هیچ عارضه‌ای را متحمل نمی‌شود

³ encephalitis

⁴ Buescher and Scherer

۶: فلاؤی ویروس‌ها و اتوفاژی ۱۲۹

هستند زیرا سطوح ویروسی آن‌ها برای آلوده کردن پشه‌های تعذیب کننده بسیار کم است. در حالیکه ۱٪ از موارد JEV سبب ظهور بیماری می‌شوند، میزان مرگ و میر بالاست. سالانه ۵۰۰۰۰ مورد تظاهرات بالینی دارند و از این موارد، ۱۵۰۰۰ بیمار می‌میرند (ون دن هارک و همکاران، ۲۰۰۹). این امر، JEV را یکی از مهم‌ترین ویروس‌های انسفالیت بومی در جهان، به ویژه در شرق و جنوب شرقی آسیا تبدیل می‌کند.

دو مطالعه، نقش اتوفاژی را در عفونت JEV در محیط آزمایشگاهی مشخص کرده است و هر دو، نقش پروویروسی اتوفاژی در چرخه زندگی JEV را نشان می‌دهند (جین و همکاران، ۲۰۱۳؛ لی و همکاران، ۲۰۱۲). هر دو مطالعه نشان دادند که در چندین سویه JEV اتوفاژی در طول عفونت ایجاد می‌شود و مهار این فرایند اگر به میزان‌های مختلف بر تکثیر ویروسی اثر منفی دارد. لی و همکاران، (۲۰۱۲) دریافتند که انکوباسیون سلول‌های آلوده با راپامایسین باعث افزایش تکثیر ویروسی شد و این که در مدت زمان مراحل اولیه عفونت، JEV را می‌توان در ساختارهای EEA1+ LC3+ نامشخص باقی می‌ماند. جین و همکاران، (۲۰۱۳) نشان دادند که اتوفاژی در مغز موش‌های آلوده به JEV القا می‌شود. مهار اتوفاژی در طی عفونت JEV سلول‌های نوروبلاستوما^۱ منجر به افزایش جداسازی آنزیم‌های ۳ و ۹ کاسپاز و متعاقب آن مرگ سلولی می‌شود. بنابراین، اتوفاژی ممکن است یک عملکرد محافظت سلولی را در عفونت JEV انجام دهد. به علاوه، مهار اتوفاژی منجر به افزایش فعالیت IRF3 و MAVS و نیز فعالیت و تولید بهبود دهنده IFN-β در طول عفونت می‌شود که نشان می‌دهد این برنامه اتوفاژی، پاسخ سیستم ایمنی ذاتی به عفونت JEV را نیز کاهش می‌دهد (جین و همکاران، ۲۰۱۳). این امر مشابه با گزارشاتی است که اتوفاژی می‌تواند پاسخ ایمنی ذاتی به عفونت‌های مختلف ویروسی را محدود کند (جونای^۲ و همکاران، ۲۰۰۷؛ کی و چن^۳، ۲۰۱۱؛ شریوستاوا^۴ و همکاران، ۲۰۱۱؛ تال^۵ و همکاران، ۲۰۰۹). نویسنده‌گان متذکر شدند که مهار عفونت، تنها نیاز اتوفاژی برای عفونت JEV نیست، چرا که مهار اتوفاژی به تکثیر JEV در یک پس زمینه خالی RIG-I محدود شد (جین و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین،

¹ neuroblastoma cells

⁴ Shrivastava

² Jounai

⁵ Tal

³ Ke and Chen

به نظر می‌رسد که اتوفاژی دو نقش پروروپروسی متفاوتی را در عفونت JEV بازی می‌کند، یکی، محرک تکثیر و دیگری، مهار علامت دهی ایمنی ذاتی.

ویروس موداک

ویروس موداک یک فلاوی ویروس موشی تهاجمی عصبی بدون ناقل شناخته شده ای است که سبب آنسفالیت می‌شود و اغلب به عنوان یک سیستم مدل برای مطالعه آنسفالیت فلاوی ویروس در میزبان طبیعی اش به کار می‌رود. در بررسی مک لین و همکاران، (۲۰۱۱)، نویسندهای از ویروس موداک به موازات ویروس دنگی استفاده کردند و نشان دادند که در سلول‌های اپی تلیال، باعث القاء یک پاسخ اتوفاژیک محافظت سلولی مشابه با ویروس دنگی می‌شود. همچنین مانند ویروس دنگی، بیان بیش از حد NS4A ویروس موداک القاء اتوفاژی را القا می‌کند و می‌تواند فنوتیپ حفاظت کننده سلولی را در چند نسل تکرار کند.^۱

ویروس نیل غربی^۲

ویروس نیل غربی (WNV)، یک فلاوی ویروس نوروتروپیک است که عمدتاً توسط گونه‌های پشه‌های Culex پخش شدنده. ویروس نیل غربی در یک چرخه بیماری حیوانی^۳ بین پشه‌ها و پرندگان حفظ می‌شود، اما می‌تواند اسب‌ها، انسان‌ها و پستانداران متعدد دیگری را که به عنوان میزبان‌های بن بست عمل می‌کنند، نیز آلوده کند. ویروس نیل غربی در بخش‌هایی از آفریقا، اروپا، خاورمیانه و آسیا، بیماری همه گیر بومی است و در ایالات متحده امریکا در سال ۱۹۹۹ پدیدار شد. از سال ۱۹۹۹، بیش از ۳۰۰۰۰ مورد از ویروس نیل غربی وجود داشته است که ۱۲۰۰ مورد منجر به مرگ شد، که آن را به علت اصلی آنسفالیت اپیدمی و منتقله توسط پشه در ایالات متحده تبدیل می‌کند (گزارش ۲۰۱۲؛ پترسن و همکاران، ۲۰۱۳). در حالی که واکسن‌های متعددی برای اسب‌ها وجود دارد، هنوز واکسن یا درمانی برای ویروس نیل غربی در انسان‌ها تأیید نشده است.

در حالی که علائم بیماری عفوت ویروس نیل غربی شدید، اغلب شامل بیماری عصب^۴ می‌باشد، اعتقاد بر این است که دور اولیه تکثیر ویروسی در کراتینوسیت‌ها و سلول‌های لانگرهانس اتفاق

¹ recapitulate

² West Nile virus

³ enzootic

⁴ neuropathy

فصل ۶: فلاؤی ویروس‌ها و اتوفاژی ۱۳۱

می‌افتد که پس از آلوده شدن، به غدد لنفاوی منطقه‌ای انتقال تغییر مکان می‌دهند (جانستون و همکاران، ۲۰۰۰؛ لیم و همکاران، ۲۰۱۱). بعد از تکثیر اولیه، ویروس قادر به انتشار سیستمیک می‌باشد جایی که دور دوم عفونت، در سلول‌های اپی تلیال و ماکروفاژهای کلیه و طحال رخ می‌دهد (بای و همکاران، ۲۰۱۰؛ بن- ناتان و همکاران، ۱۹۹۶؛ ساموئل و همکاران، ۲۰۰۶). ترکیبی از ویرمی^۱ به دست آمده، سازگاری‌های ویروسی و عوامل میزبان مختلف می‌تواند به ویروس نیل غربی اجازه دهد تا از سد خونی مغزی عبور کند و سپس منجر به انسفالیت شود (بیسلی^۲ و همکاران، ۲۰۰۲، ۲۰۰۵؛ گتس^۳ و همکاران، ۲۰۰۸؛ ساموئل و همکاران، ۲۰۰۷؛ ورما^۴ و همکاران، ۲۰۰۹، ۲۰۱۰؛ ونگ و همکاران، ۲۰۰۴، ۲۰۰۸).

مطالعاتی در مورد اینکه آیا عفونت ویروس نیل غربی سبب القای اتوفاژی می‌شود به نتایج متضادی رسیده است (بیتمن و همکاران، ۲۰۱۲؛ وندرگاست و فردیکسن، ۲۰۱۲). مطالعه ای که عدم وجود شواهد برای القای اتوفاژی ویروس نیل غربی را نشان داد از سویه WNV-NY 3356 و WNV-MAD78 جدا شده در انواع مختلف سلول استفاده کرد (وندرگاست و فردیکسن، ۲۰۱۲). هیچ شاهدی نیز وجود نداشت که WNV، القای اتوفاژی را مهار می‌کند. به عبارت دیگر، عفونت با کلون ۳۸۲ WNV-KEN یا WNV-NY اتوفاژی را در شرایط آزمایشگاهی القا کرد (بیتمن و همکاران، ۲۰۱۲). نتایج متضاد در مورد اینکه آیا WNV باعث القای اتوفاژی می‌شود، احتمالاً تفاوت‌هایی را در ویروس جدا شده، سلول‌ها، یا شرایط آزمایشگاهی منعکس می‌کند. با این وجود، هر دو مطالعه موافقند که مهار اتوفاژی از طریق عفونت Atg^{5/-} MEFs یا shRNAهای هدفمند، هیچ نقصی در تولید ویروس ایجاد نمی‌کنند (بیتمن و همکاران، ۲۰۱۲؛ وندرگاست و فردیکسن، ۲۰۱۲). ورتمانین و MA-3 به نظر می‌رسد که تأثیری روی تکثیر ویروس نیل غربی دارند، اما به احتمال زیاد، نتیجه وقایع وابسته به PI3K غیر اتوفاژی دیگر در چرخه زندگی ویروس نیل غربی است (بیتمن و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین، به نظر می‌رسد که ویروس نیل غربی از سایر فلاؤی ویروس‌های بررسی شده متمایز است زیرا تکثیر آن به اتوفاژی وابسته نیست.

اینکه آیا عفونت ویروس نیل غربی باعث القای اتوفاژی در درون بدن می‌شود، مستقیماً بررسی نشده است، اما بررسی اخیر پیشنهاد می‌کند که می‌توان از القای زیاد اتوفاژی در طی عفونت

^۱ پیدایش ویروس در خون

² Beasley

³ Getts

⁴ Verma

ویروس نیل غربی استفاده کرد تا عفونت ویروسی در نورون‌های موشی را محدود کند (شوجی-کاواتا و همکاران، ۲۰۱۳). شوجی کاواتا و همکاران یک القا کننده خاص اتوفاژی را ایجاد کردند که با مهار یک تنظیم کننده منفی اتوفاژی، GAPR-1 عمل می‌کند. آن شامل یک پپتید از Beclin 1 می‌باشد که با پروتئین تات اچ آی وی^۱ ترکیب می‌شود تا جذب سلولی را تقویت کند. سلول‌های Hela که با ویروس نیل غربی (TX02) آلوده شده بودند و سپس با پپتید tat-Beclin1 درمان شدند، کاهش \log_{10} ۱-۲ را در تیترهای ویروسی نشان دادند. هنگامی که در برابر پانلی از ویروس‌ها در داخل بدن آزمایش شدند، نشان داده شد که القای اتوفاژی از طریق این پپتید منجر به کاهش مشابهی در تیترهای ویروسی در مغز موش‌ها شد که به صورت داخل مغزی با MNV تلقیح شدند^۲ (مصر ۱۰۱). در موش‌های تحت درمان با پپتید ۱ tat-Beclin، نورون‌های کمتری با ویروس نیل غربی آلوده شدند، همانطور که با رنگ آمیزی برش‌های مغزی اندازه گیری شد، نورون‌های کمتری به آپووتیک (نوعی مرگ سلولی) دچار شدند (شوجی-کاواتا و همکاران، ۲۰۱۳). تقریباً ۲۰٪ از موش‌ها بقای طولانی مدتی را نشان دادند.

اتوفاژی راههای زیادی برای محدود کردن عفونت‌های ویروسی دارد، خواه، تخریب ویریون و اجزاء ویروسی باشد، تحويل واسطه‌های PAMP تحریکی به PRRهای اندوزومی، یا پردازش و تحويل پپتیدها به مولکول‌های MHC برای تحریک یک پاسخ تطبیقی باشد. بررسی نشد که اتوفاژی با کدام مکانیسم، ویروس نیل غربی را محدود می‌کند، اما برای دو ویروس نورروتروپیک دیگر - ویروس سندبیس و هرپس سیمپلکس نوع ۱ - داده‌ها پیشنهاد می‌کنند که محدودیت در نورون‌ها احتمالاً به علت تخریب مستقیم ویریون یا بخش‌های ویروسی می‌باشد (اروDal^۳ و همکاران، ۲۰۰۷؛ Yordy^۴ و همکاران، ۲۰۱۰).

بازنمود نتیجه

تحقیق در مورد نقش اتوفاژی در چرخه زندگی فلاوی ویروس‌ها پیشنهاد می‌کند که نقش پروویروسی در عفونت‌های ویروس دنگی، موداک و آنسفالیت ژاپنی ایفا می‌کند. متناوباً، اختلال اتوفاژی بر عفونت ویروس نیل غربی در شرایط آزمایشگاهی یا درون تنی تأثیری نمی‌گذارد. به علاوه، ویروس نیل غربی در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی نسبت به اتوفاژی حساس است.

¹ the HIV tat protein

² inoculate

³ Orvedahl

⁴ Yordy

فصل ۶: فلاؤی ویروس‌ها و اتوفاژی

در مورد ویروس دنگی، دو پرسشی که باقی می‌ماند این است که آیا اتوفاژی برای عفونت ویروس دنگی در مونوسیت‌ها در درون بدن مورد نیاز است و چه مکانیسمی از القای اتوفاژی و لیپوفاژی هستند. تلاقی موش‌های AG129 با موش‌های Atg⁵⁻ مدلی را برای آزمایش اینکه آیا این یک نیاز پرورویروسی برای اتوفاژی در سلول‌های میلوبیدی در داخل بدن است، ارائه می‌دهند. نقشی که اتوفاژی در ناقلين برای این ویروس‌ها ایفا می‌کند، همچنان مشخص نیست.

پرسش‌های زیادی برای لیپوفاژی القا شده با ویروس دنگی باقی می‌ماند. در کل، مکانیسم لیپوفاژی ناشناخته است. مسیرهای علامت دهی که باعث لیپوفاژی می‌شوند کدامند؟ چگونه ویروس دنگی، لیپوفاژی را القا می‌کند؟ چگونه قطرات چربی عنوان محموله ای برای اتوفاژی انتخابی، مشخص می‌شوند؟ آیا FFAها به مکان‌های دیگری در سلول مانند کمپلکس‌های تکثیر ویروسی منتقل می‌شوند؟ آیا ویروس دنگی، لیپوفاژی را در سلول‌های تبار میلوبید القا می‌کند؟ آیا NS4A لیپوفاژی را القا می‌کند؟ درک کلی ما از برنامه‌های اتوفاژی انتخابی طی سال‌های اخیر رشد کرده است، و در حالی که مکانیسم لیپوفاژی هنوز مشخص نشده است، استفاده از ویروس دنگی به عنوان یک القاکننده قوی و خاص این فرایند ممکن است به کشف برخی از این رازها کمک کند.

به طور مشابه، مشخص نیست که چرا ویروس دنگی، سطوح بتا اکسیداسیون را در سلول افزایش می‌دهد. تجزیه FFAها توسط بتا اکسیداسیون منجر به افزایش در ATP، NADPH، و تولید کوآنزیم استیل¹ A می‌شود. این‌ها فاکتورهای ضروری برای اسید چرب سنتاز (FASN) هستند، آنزیمی که در مکان‌های تکثیر ویروسی به کار گرفته می‌شود و فعالیت آن توسط NS3 افزایش می‌یابد (هیتون و همکاران، ۲۰۱۰). امکان پذیر است که افزایش در فعالیت FASN ممکن است نیاز سلولی به ATP و کوآنزیم استیل A را افزایش دهد زیرا ویروس دنگی، فرایند بیوسنتزی لیپید را هدایت می‌کند و این کاهش باعث شروع لیپوفاژی می‌شود.

رابطه اتوفاژی برای عفونت ویروس آنسفالیت ژاپنی در داخل بدن، و عملکردهای آن و مکانیسم القای اتوفاژی، پرسش‌های باقی مانده هستند. در نهایت، آیا هدف قرار دادن اتوفاژی برای درمان ضد ویروسی، یک استراتژی ضدویروسی قابل اجرا است؟ برای اکثر ویروس‌ها، صرف نظر از این که اتوفاژی، پرو ویروسی یا ضد ویروسی است، فنوتیپ‌ها متوسط هستند (معمولًاً ۱-۲ تغییر

¹ acetyl-CoA

گزارش در تیترهای ویروس). در هر حال، از آنجایی که اتوفاژی می‌تواند بر بقای سلول نیز تأثیر بگذارد، احتمالاً مدولاسیون اتوفاژی، پاتولوژی عفونت را بدون پاکسازی ویروسی مرتبط تحت تأثیر قرار دهد. یک سؤال مهم این است که آیا القا یا مهار اتوفاژی رویکردی مناسب برای هر ویروس منفرد در داخل بدن است. در مورد ویروس نیل غربی که القای اتوفاژی تأثیرات ضد ویروسی متوسطی را ایجاد کرد و اتوفاژی را بهبود بخشید، که اثبات قانونی برای این رویکرد پیشنهاد می‌کند. در هر حال، منافع یا از طریق القای قوی‌تر اتوفاژی یا استفاده در ترکیب با سایر مهارکننده‌ها، باید افزایش یابد. این یک سؤال مهم باقی می‌ماند که آیا بازدارنده‌های خاص اتوفاژی اثبات مشابهی از اصل را در برابر عفونت ویروس دنگی و ویروس انسفالیت ژاپنی در داخل بدن ایجاد می‌کنند.

قدرتدانی

نویسنده‌گان، از مارلین دروکس و وینیلا چاکاپالی برای متن انتقادی از نسخه خطی قدردانی می‌کنند. T.X.J با کمکِ مالی آموزشی مؤسسه بین‌المللی بهداشت^۱ T32 GM007183 تأمین شد. G.R. توسط مؤسسه ملی آرژی و بیماری‌های واگیردار ایالات متحده آمریکا^۲ (AI080703 and AI102236)، انجمن سلطان آمریکا (RSG-10-059-01-MPC) و سوزان و دیوید شرمن^۳ حمایت می‌شود.

¹ NIH

² NIAID

³ Susan and David Sherman

فصل ۷

اتوفاژی: یک بازسازی کننده خانگی برای ویروس هپاچیت C

مقدمه

اتوفاژی

ماکرواتوفاژی^۱ (از این پس اتوفاژی نامیده می‌شود) یک مسیر کاتابولیک است که در بین ارگانیسم‌های یوکاریوتی حفظ شده است که توسط آن سلول‌ها، اندامک‌ها و توده‌های پروتئینی بالقوه مضر یا آسیب دیده را تجزیه می‌کنند (بررسی شده در هاما‌سکی و همکاران، ۲۰۱۳؛ یانگ و کلیون-اسکای، ۲۰۱۱). بنابراین، در حذف توده‌های پروتئینی بالقوه از سلول در طی فرآیندهای رو به زوال یا پیری مفید است. همچنین در بازیافت مواد مغذی سلولی برای حفظ انرژی نقش دارد. فعالیت اتوفاژی، توسط شرایط تنفسی مختلفی مثل گرسنگی، وجود عوامل رشد، یا تنش شبکه اندوپلاسمی (ER) و جای تعجب نیست که عفونت میکروبی می‌تواند اتوفاژی را از طریق مکانیسم‌های متعدد افزایش دهد (بررسی شده توسط لوین و همکاران، ۲۰۱۱).

برخلاف سیستم پروتئاز-یوبیکوئین، سیستم تخریبی دیگری که پروتئین‌های یوبیکوئین شده را هدف قرار می‌دهد، اتوفاژی به بازارایی‌های غشایی پویا برای تخریب هدفمند متکی است. مسیر اتوفاژی به دو فاز تقسیم می‌شود. اول، اجزای سیتوپلاسمی توسط یک غشای دولایه

¹ Macroautophagy

فتحانی شکل به نام غشای جداسازی (یا اتوفاژی) جدا می‌شوند، که برای تشکیل وزیکول‌های دوغشایی تحت عنوان اتوفاگوزوم‌ها از هم باز می‌شوند. دوم، اتوفاگوزوم‌ها در طول فاز بلوغ، می‌توانند با وزیکول‌های مسیر اندوژرومی برای تشکیل آمفیزوم‌ها^۱ همچوشی کنند. این دومی، در نهایت با لیزوژروم‌ها ادغام می‌شود و تشکیل ساختاری به نام اتوفاگولیزوزوم را می‌دهد که مادهٔ جدا شدهٔ تخریب می‌شود. دستگاه مولکولی اصلیٰ اتوفاژی -پروتئین‌های اتوفاژی، اکثراً توسط زن‌هایی به نام ATG (مرتبط با اتوفاژی) کدگذاری شده‌اند - این بازارایی غشای فعال را هماهنگ می‌کند (بررسی شده در هاماساکی و همکاران، ۲۰۱۳؛ یانگ و کلیونسکی، ۲۰۱۱). در طول ساخت اتوفاگوزوم، پروتئین‌های اتوفاژی به طور منظم در مکان‌های متعدد نزدیک به شبکهٔ آندوپلاسمی تجمع می‌یابند (ایتاکورا و میزوشیما، ۲۰۱۰). انباست^۲ پروتئین‌های اتوفاژی باید با تأمین چربی برای هستهٔ سازی و طویل شدن یک غشای مجزا همراه باشد. در واقع، برخلاف اندامک‌ها، اتوفاگوزوم از نو ساخته می‌شود، بنابراین، سؤالات منحصر به فردی در مورد تکامل حیات غشای آن، مطرح می‌شود. شبکهٔ آندوپلاسمی، میتوکندری، گلتری / اندوژروم، و غشای پلاسمایی همگی به عنوان منابع غشایی اتوفاگوزوم پیشنهاد شده‌اند (بررسی شده در هاماساکی و همکاران، ۲۰۱۳). گزارشات متعدد، رابطهٔ قوی بین شبکهٔ آندوپلاسمی و ساخت اتوفاگوزوم را نشان دادند که از این مفهوم حمایت می‌کند که وزیکول‌های اتوفاژی نوپا از این بخش زیر سلولی نشأت می‌گیرند. در ابتدا، پروتئین‌های اتوفاژی اولیه (یعنی، ULK1 و ATG16L) ساختارهای نقطه‌ای را در مجاورت شبکهٔ آندوپلاسمی تشکیل می‌دهند (ایتاکورا و میزوشیما، ۲۰۱۰؛ ماتسوناگا^۳ و همکاران، ۵۰۱۰). دوم، عملکرد ATG14L برای تشکیل اتوفاگوزوم به سیگنال متمنکری شده شبکهٔ آندوپلاسمی نیاز دارد (ماتسوناگا و همکاران، ۲۰۱۰). بعلاوه، فسفاتیدیل‌اینوزیتول تری فسفات (PI3P) در ترکیب با پروتئین (DFCP1) به یک ساختار امگا شکل در شبکهٔ آندوپلاسمی متمنکر می‌شود، و یک غشای جداسازی از امگازوم بیرون می‌آید (اکس و همکاران، ۲۰۰۸؛ پولسون^۴ و همکاران، ۲۰۱۰). در نهایت، بازسازی سه بُعدی نشان داد که اتوفاگوزوم‌ها در یک زیرساخت شبکهٔ آندوپلاسمی در تماس با میتوکندری شکل می‌گیرند

¹ amphisomes⁴ Hayashi-Nishino² Matsunaga⁵ Yla-Anttila³ Polson

فصل ۷: اتوفاژی: یک بازسازی کننده خانگی برای ویروس هپاتیت C

(هاماگاسکی و همکاران، ۲۰۱۳)، در ناحیه‌ای به نام غشای مرتبط با میتوکندری (MAM)، که تصور می‌شود یک محور میتوکندری-شبکه آندوپلاسمی را فراهم می‌کند که پاسخ‌های تنفسی را به اجزای کوچکتر، مسیرهای متابولیک، و علامت دهی ضد ویروسی تقسیم می‌کند (فردمان و همکاران، ۲۰۱۱؛ فوجیموتو و هایاشی، ۲۰۱۱؛ ونس، ۱۹۹۰). بعلاوه، تصور می‌شود وزیکول‌هایی که حاوی ATG9 هستند-پروتئینی که در سطح شبکه ترانس-گلزی (TGN) و آندوزوم حضور دارد-در تکامل حیات یک غشای جداسازی شرکت می‌کند (ماری و همکاران، ۲۰۱۰؛ یاماماتو و همکاران، ۲۰۱۲؛ یانگ^۱ و همکاران، ۲۰۰۶). در هر حال، مقادیر لبیپید ارائه شده توسط وزیکول‌های ATG9 برای حمایت از تشکیل یک اتوفاگوزوم کامل کافی نیست و سایر منابع لبیپیدی احتمالاً وجود دارند.

فاز کشیدگی وزیکول‌های اتوفاژی، سیستم‌های آمیختگی دو شبیه یوبیکوتین را در بر می‌گیرد (بررسی شده در هاماگاسکی و همکاران، ۲۰۱۳؛ یانگ و کلیونسکی، ۲۰۱۰). در سیستم اول، ATG10 و ATG12 از طریق ارتباط کووالانسی ATG5 و ATG12 هستند. سپس، کمپلکس ATG5-ATG12 با ATG16L1 مرتبط می‌شود که کمپلکس را به غشای بیرونی غشای جداسازی متصل می‌کند. در دومین سیستم آمیختگی، ATG3 و ATG7، واسطه فسفاتیدیل اتانول آمین (PE) با پروتئین زنجیره سبک - ۳ (LC3) مرتبط با میکروتوبول، که به عنوان LC3-II نامیده می‌شود، است. در انتهای مرحله کشیدگی، عناصر مورد هدف، درون اتوفاگوزوم تازه شکل یافته احاطه شده است. در طول فاز نهایی، همچوشی اتوفاگوزوم‌ها با لیزوژوم‌ها نیاز به کمپلکسی دارد که حاوی ۱ UVRAG، Beclin 1 (زن مرتبط با مقاومت در برابر اشعه UV) و VPS34 (یعنی فسفاتیدیلینوزیتول-۳-کیناز (PI3K) و نیز به کارگیری GTPase Rab7 کوچک باشد (بررسی شده در یانگ و کلیونسکی، ۲۰۱۰). بعلاوه بر این، شواهد اخیر نشان دادند که همچوشی اتوفاگوزوم با لیزوژوم‌ها یا آندوزوم‌های متأخر به فعل و انفعالات بین SNARE VAMP8 لیزوژومی و یک SNARE دم-لنگری از نوع سنجاق سری و syntaxin 17 نیاز دارد (هاماگاسکی و همکاران، ۲۰۱۳؛ ایتاکورا و همکاران، ۲۰۱۲).

به نظر می‌رسد که دستگاه اتوفاژی به عنوان یک پاسخ تنفسی تکامل یافته است که اجازه دسترسی انرژی و کنترل کیفیت اندامک را در یوکاریوت‌های تک سلولی و ارگانیسم‌های

¹ Young

بیوکاریوتی بالاتر می‌دهد و عملکردهای متنوعی در ارگانیسم‌های بیوکاریوتی بالاتر دارد تا پاسخ‌های دفاعی متعددی را به صورت‌های مختلف تنش تنظیم کند. جای تعجب نیست که اتوفاژی توسط تنش‌های سلولی ناشی از عفونت ویروسی فعال می‌شود و می‌تواند اجزاء میکرووارگانیسم‌های داخل سلولی شامل ویروس‌ها را تخریب کند (بررسی شده در دروکس و چیساری، ۲۰۱۰؛ جردن و راندال، ۲۰۱۲). به علاوه، دستگاه اتوفاژی، یک عملکرد تنظیمی بنیادی در پاسخ میزبان در برابر این عفونتها ایفا می‌کند. پروتئین‌های اتوفاژی خصوصاً برای ایجاد تعادلِ القا در برابر سرکوب پاسخ‌های التهابی و ضد ویروسی به کار می‌روند، بدین ترتیب پیامدهای مضرِ محافظتی یا بالقوه این پاسخ‌ها را تنظیم می‌کنند (بررسی شده در لوین و همکاران، ۲۰۱۱). با توجه به اینکه اتوفاژی با پاسخ‌های میزبان، تلاقی می‌کند، جای تعجب نیست که به نوبهٔ خود ویروس‌ها مکانیسم‌هایی را برای دستکاری این مسیر ایجاد کرده‌اند (بررسی شده در دروکس و چیساری^۱، ۲۰۱۰؛ جردن و راندال، ۲۰۱۲). این رابطه متقابل پیچیده بین ویروس‌ها و دستگاه اتوفاژی ممکن است شدت و نتیجهٔ عفونت را تحت تأثیر قرار دهد.

بیماری ویروسی هپاتیت (HCP)، ژنوم و تکثیر

ویروس هپاتیت C (HCV)، یک پاتوژن اصلی انسانی است که به طور مداوم ۱۳۰ میلیون نفر را در سراسر جهان آلوده می‌کند و در نتیجه، خطر ابتلا به بیماری مزمن کبدی، شامل استئاتوز^۲، فیروز، سیروز کبدی و سرطان کبد را افزایش می‌دهد (لاوانچی^۳، ۲۰۰۹). واکسن پیشگیرانه در دسترس نیست و رشد آن به طور جدی توسط تنوع ژنتیکی بالای ویروس مختلط شده است. علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر در توسعه گزینه‌های درمانی امیدوارکننده برای عفونت مزمن ویروس هپاتیت C (پاولوتسکی^۴، ۲۰۱۳؛ سارازین^۵ و همکاران، ۲۰۱۲)، درمان‌های فعلی از بروز عوارض جانبی شدید (آگمو و همکاران، ۲۰۱۰) و خطر مقاومت درمانی (ورمهن^۶ و همکاران، ۲۰۱۲) رنج می‌برند. بنابراین، درمان‌های معالج مفیدتری مورد نیاز هستند، که برای درک بهتر اصول اساسی، کنترل تکثیر ویروسی ضروری می‌باشد.

ویروس هپاتیت C به جنس هپاسی ویروس همراه با هپاسی ویروس‌های جونده و جانواران غیر نخستینی اخیراً شناسایی شده در خانواده فلاموی ویرید، تعلق دارد (کاپور و همکاران، ۲۰۱۱،

¹ Chisari

⁴ Pawlotsky

² Steatosis

⁵ Sarrazin

³ Lavanchy

⁶ Vermehren

فصل ۷: اتفاقاًزی: یک بازسازی کننده خانگی برای ویروس هپاتیت C

۶/۹~ ۲۰۱۳). ژنوم ویروس هپاتیت C یک مولکول RNA بدون پوشش تک رشته‌ای kb از قطبیت مثبت است که حاوی یک چارچوب خوانش باز بلند منفرد (ORF) می‌باشد که توسط مناطق ترجمه نشده' ۵' و ۳' (UTRs) در کنار آن قرار دارد. هر دو UTRها ساختار بسیار بالایی دارند و در تکثیر RNA ویروسی نقش دارند، در حالی که یک سایت ورودی ریبوزوم داخلی (IRES) موجود در ۵' UTR واسطه ترجمه ژنوم ویروسی RNA رشته مثبت است (بررسی شده در لیندن بک و رایس، ۲۰۱۳؛ مرادپور و همکاران، ۲۰۰۷). پس از ترجمه ORF، حداقل ۱۰ پروتئین ویروس هپاتیت C از یک پیش ساز پلی پروتئینی ایجاد می‌شود که همزمان و پس از ترجمه توسط پروتئازهای ویروسی و سلولی جدا می‌شود. تولیدات^۱ تقسیم حاصله، سه پروتئین ساختاری هستند (هسته، پروتئین پوششی ۱(E)، و پروتئین پوششی ۲(E2))، ویروپروتئین p7 و شش پروتئین غیر ساختاری (NS) (NS5B، NS2، NS3، NS4A، NS4B، NS5A).

عفونت ویروس هپاتیت C با اتصال ذرات ویروسی پوششی به یک سری گیرنده‌های سطح سلولی سپس درونی شدن آنها در اندوزومها به روشی وابسته به کلاترین آغاز می‌شود (بررسی شده در لیندن بک و رایس، ۲۰۱۳). به نظر می‌رسد رهاسازی ژنوم ویروسی RNA رشته مثبت در سیتوپلاسم، پس از همجوشی القا شده با pH پایین غشاها ویروسی و اندوزومی رخ می‌دهد، فرایندی که توسط گلیکوپروتئین‌های پوششی ویروسی انجام می‌شود. ترجمه پلی پروتئین ویروس هپاتیت C و تقسیم بعدی آن به پروتئین‌های ویروسی منفرد، منجر به استقرار کمپلکس‌های تکثیر در اجزای غشایی مشتق شده از دستگاه گلتری می‌شود، جایی که تکثیر ژنوم ویروسی از طریق سنتز میانی رشته منفی رخ می‌دهد (لیندن بک و رایس، ۲۰۱۳). ژنوم‌های ویروسی نتاج^۲، یا به پروتئین‌های ویروسی اضافی ترجمه می‌شوند یا برای جمع آوری ویروس عفونی نتاج بسته بندی می‌شوند. جمع آوری ذره ویروسی نه تنها به پروتئین‌های ساختاری و غیر ساختاری وابسته است (NS5A، p7، NS2، NS3) بلکه به عوامل سلولی از جمله آن‌هایی که در بیوسنتز لیپو پروتئین حضور دارند، وابسته است، و تصور می‌شود که در بخش مشتق شده از ER در مجاورت نزدیک به قطرات چربی رخ دهد (بررسی شده در بارتان شلاگر^۳ و همکاران، ۲۰۱۱؛ هرکر و اوتن^۴، ۲۰۱۱؛ لیندن بک و رایس، ۲۰۱۳؛ روینگارد و دپلا^۴).

¹ progeny

² Bartenschlager

³ Herker and Ott

⁴ Roingeard and Depla

TABLE 7.1 Effects of modulating autophagy on HCV

<i>In vitro</i> studies	HCV infection model	Cell lines used	Main approaches	Major conclusions
Ait-Goughoulte et al., 2008	HCV infection (genotype 1a–JFH1 strain and 2a–JFH1 strain)	immortalized human hepatocytes and Huh7.5 cells	Atg5 and LC3-GFP localization	<ul style="list-style-type: none"> • accumulation of Atg5 and LC3-positive dots • no colocalization of LC3 with viral proteins
Sir et al., 2008	HCV transfected cells, replicon (genotype 2a–JFH1 and 1b–con1)	Huh7.5 cells	GFP-LC3 localization, LC3 lipidation, P62 content UPR regulator expression DR of PERK, Ire1, Atg6, LC3 and Atg7	<ul style="list-style-type: none"> • induction of incomplete autophagic process • no colocalization of LC3 with Core proteins • UPR triggers autophagy • DR of UPR and autophagy proteins reduces HCV replication
Dreux et al., 2009	HCV infection (genotype 2a–JFH1) acute and chronic infection HCV SGR (genotype 2a–JFH1 and 1b–con1)–transient and stable replication replication-deficient SGR (genotype 2a–JFH1) HCVpp (cell entry assay)	Huh7 cells	LC3-GFP localization LC3 lipidation DR of Beclin 1, At4B, Atg12–expression of dominant negative Atg5 (K130R)	<ul style="list-style-type: none"> • accumulation of LC3-positive vesicles • no colocalization of LC3 with viral proteins (Core, E2, NS4A/NS4B, NS5A) • requirement of autophagy proteins for translation and/or delivery of incoming viral RNA to the translation apparatus • autophagy proteins are required for the initiation of HCV replication but not to maintain it

Tanida et al., 2009	HCV infection (genotype 2a-JFH1)	Huh7.5.1 cells	DR of Atg7 and Beclin 1	<ul style="list-style-type: none"> DR of Atg7 and Beclin 1 decreases the release of HCV particles little evidence of colocalization of LC3 with NS5A and core
Guevin et al., 2010	HCV infection (genotype 2a-JFH1)	Huh7 cells	yeast two-hybrid, co-IP Atg5 localization DR of Atg5	<ul style="list-style-type: none"> Atg5 interacts with NS5B Atg5 colocalizes with NS4B and NSSB transiently at the onset of infection DR of Atg5 decreases intracellular HCV RNA and core protein levels
Mizui et al., 2010	HCV SGR (genotype 2a-JFH1)	Huh7	drug treatment (autophagy inhibitor, 3MA) and DR of Atg5, Atg7 and LC3	<ul style="list-style-type: none"> small decrease of HCV SGR replication
Ferraris et al., 2010	HCV SGR (genotype 2a-JFH1)	Huh7.5 cells	immuno-EM sucrose gradient separation	<ul style="list-style-type: none"> accumulation of double membrane vesicles and multivesicular units presence of double-stranded RNA and NS5A in DMVs co-fractionation of LC3 with NS3, NS5A and HCV RNA
Ke and Chen, 2010	HCV infection (genotype 2a-JFH1) synthetic HCV PAMPs	Huh7 and Atg5-/- MEFs	UPR regulator expression DR of Atg5, LAMP1 and Rab7 DR of CHOP, IRE1 α , ATF6 and PERK	<ul style="list-style-type: none"> autophagic vesicle maturation and autolysosome formation UPR triggers autophagy autophagy elongation and maturation repress HCV-PAMP-induced RIG-I signaling autophagy elongation and maturation repress DENV-PAMP-induced RIG-I signaling

(continued overleaf)

TABLE 7.1 (continued)

In vitro studies	HCV infection model	Cell lines used	Main approaches	Major conclusions
Taguwa et al., 2011	HCV SGR (genotype 2a–JFH1 and 1b–con1)	Huh7 cells	endogenous LC3 and mRFP-GFP-LC3 localization expression of protease-inactive mutant of Atg4B (C74A)	<ul style="list-style-type: none"> • accumulation of LC3-positive vesicles • no colocalization of endogenous LC3 and NS5A • autophagic flux is impaired in HCV con1 SGR cells • incomplete acidification of autolysosome leading to enhanced secretion of immature cathepsin B from con1—but not JFH1—SGR cells • expression of Atg4B mutant compromises cell survival of con1 SGR cells
Su et al., 2011	NS4B individual expression	Huh7.5.1 cells	LC3 lipidation and localization	<ul style="list-style-type: none"> • accumulation of LC3-positive vesicles
Shrivastava et al., 2011	HCV infection (genotype 2a–chimeric virus: 16CF and JFH1) and HCV infection (genotype 1a–H77 and 2a–JFH1)	immortalized human hepatocytes (IHH) and Huh7.5 cells	DR of Atg7, Rab5 and Vps34 NS4B-VPS34-Rab5 co-IP DR of Beclin1 and Atg7	<ul style="list-style-type: none"> • NS4B expression triggers autophagy via interaction with Rab5 and Vps34 • DR of Atg7 and Beclin 1 decreases viral growth • DR of Atg7 and Beclin 1 increases expression levels of ISGs and type I IFN mRNA in HCV infected IHH • HCV infection in Beclin 1 DR cells induces apoptosis via caspase 3 and 4 activation

Gregoire et al., 2011	HCV infection (genotype 2a–JFH1)	Huh7.5 cells	<ul style="list-style-type: none"> yeast two-hybrid, co-IP DR of IRGM 	<ul style="list-style-type: none"> NS3 interacts with IRGM NS3 induces autophagic vesicle accumulation via IRGM DR of IRGM decreases HCV-induced autophagy and viral production
Chu et al., 2011	full-length replicon and SGR (geno-type 1a–H77c) tet-inducible core expression (geno-type 1a–H77c)	Huh7 cells	<ul style="list-style-type: none"> HCV non-structural protein expression induces accumulation of autophagy vesicles, oxidative stress and, membrane blebbing in the endoplasmic reticulum 	<ul style="list-style-type: none"> accumulation of LC3-positive vesicles in SGR cells without inhibition of their maturation colocalization of LC3 and unesterified cholesterol (filipin probe) in SGR cells autophagy selectively engulfs intracellular lipid deposit, but not p62 in SGR cells increased cholesterol synthesis induced by HCV could act as an autophagy stimulus impaired autophagy causes cholesterol accumulation
Vescovo et al., 2012	HCV SGR (genotype 1b–con1)	Huh-7 and Huh7.5 cells	<ul style="list-style-type: none"> LC3 lipidation and localization cholesterol synthesis inhibition DR of Beclin1 	<ul style="list-style-type: none"> HCV infection (genotype 2a–JFH1 strain) DR of Beclin1
Shrivastava et al., 2012	HCV infection (genotype 2a–JFH1)	immortalized human hepatocytes (IHH)	<ul style="list-style-type: none"> DR of Beclin1 	<ul style="list-style-type: none"> HCV infection upregulates Beclin 1 expression HCV enhances mTOR signaling NSSA expression triggers autophagy NSSA upregulates IFN signaling in Beclin 1 DR cells enhanced mitochondrial ROS production in Beclin 1 down regulated cells infected with HCV

(continued overleaf)

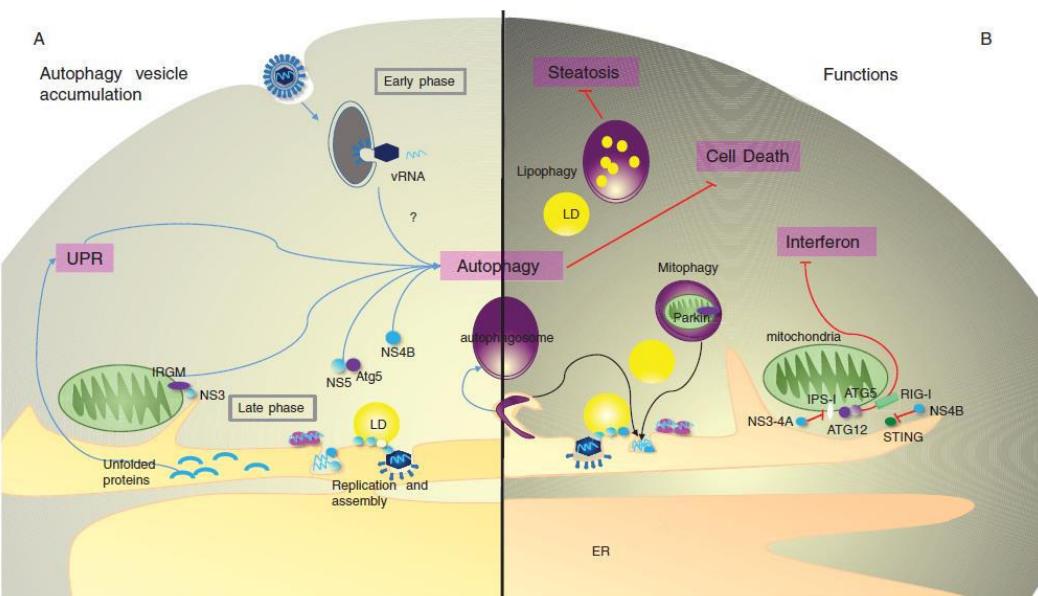
TABLE 7.1 (continued)

In vitro studies	HCV infection mode	Cell lines used	Main approaches	Major conclusions
Mohl et al., 2012	HCV infection and transfection (genotype 2a-JFH1 and chimeric genome J6CF/JFH1)	Huh-7 and Huh7.5 cells	LC3 lipidation and localization UPR regulator expression	<ul style="list-style-type: none"> LC3 lipidation precedes UPR induction HCV triggers LC3 lipidation in absence of UPR induction and independently of Ire1
	HCV SGR (genotype 2a-JFH1 and 1b-FK5.1)		DR of Ire1	<ul style="list-style-type: none"> no colocalization of endogenous LC3 with NS5A
Sir et al., 2012	HCV SGR (genotype 1b-N)	Huh7 cells	DR of Atg7, LC3 and VS34 nascent HCV RNA labelled with BrdU	<ul style="list-style-type: none"> DR of Atg7 and LC3 decreases HCV RNA replication colocalization of endogenous LC3 with NS5A, NS5B and nascent BrdU-labelled RNA co-immunoprecipitation of NS5A, NS5B with GFP-LC3
Aweya et al., 2013	p7 individual expression (genotype 2a-JFH-1 and 1b-S1)	Huh7.5 cells		<ul style="list-style-type: none"> p7 interacts with Beclin1, but expression of p7 does not increase LC3 lipidation
Shinohara et al., 2013	HCV SGR (genotype 1b-O)	Huh7 cells	UPR regulator expression drug treatment: autophagy inhibitor (3MA) and UPR inhibitors	<ul style="list-style-type: none"> UPR and autophagy induction inhibition of HCV replication and autophagy by UPR inhibitors
Kim et al., 2013	HCV infection (genotype 2a JCI chimeric genome-J6CF/JFH1) full-length replicon and SGR (genotype 2-JFH1 strain) and SGR-BM4-5 Fco (genotype 1b)	Huh7 and Huh7.5.1	Parkin and PINK1 ubiquitination and sub cellular localization DR Parkin and PINK1	<ul style="list-style-type: none"> HCV infection induces Parkin-dependent mitophagy DR of Parkin and PINK1 hinders HCV replication

In Vivo studies	HCV infection model	Main approaches	Major conclusions
Desai et al., 2011	inducible NS3/4A transgenic mice (NS3/4A x Alb-Cre)	challenge with recombinant VSV and hydrodynamic injection of synthetic HCV RNA genome	<ul style="list-style-type: none"> NS3/4A expression results in cleavage of intrahepatic MAVS but type I IFN responses induced by VSV or synthetic HCV genome are not diminished compared to control mice. IFNB promotes degradation of NS3/4A by autolysosome MAVS contributes to type I IFN-induced autophagic response
Ratou et al., 2011 Vescovo et al., 2012	liver biopsy samples from HCV infected patients	LC3 lipidation and transmission electron microscopy analysis LC3 lipidation	<ul style="list-style-type: none"> increased autophagic response in the liver of chronically HCV infected patients inverse correlation between microvesicular steatosis and level of autophagy, thus low levels of autophagy are associated with increased incidence of lipid accumulation in liver of HCV patients

Abbreviations: DR, downregulation

جدول ۱



شکل ۷,۱ القای اتفاژی و نقش‌های آزمایشی حین تکثیر HCV. اجزای HCV و ویروسی به رنگ آبی، وزیکول‌های اتفاژیک و پروتئین‌های بنفسن، میتوکندری و پروتئین ایمنی طبیعی رنگ سبز، و قطره‌های چربی در زرد. آبی، سیاه و اشعه‌های قرمز، نشان دهنده تکثیر سلولی خودبه‌خودی و جلوه‌ای از سلول‌ها هستند. به ترتیب عفونت HCV باعث تجمع وزیکول‌های اتفاژیک در چندین مکانیسم می‌شود. ابتدا در طول عفونت فاز اولیه، RNA ویروسی در سیتوپلاسم ممکن است باعث خودفاژی شود. سپس در طول عفونت فاز آخر، عوامل غیرساختاری، NS، B5، NS3، تشکیل اتفاژکوزوم را تشویق می‌کند. علاوه بر این، تکثیر و بیان HCV به طور مفرد باعث افزایش تعداد پروتئین‌های تا شده در آن می‌شود و UPR را فعال می‌کند، که باعث ایجاد مجدد و القای اتفاژی می‌شود. علاوه بر این، احتمالاً در MAM، زیردامنه‌ای از membrane ER نزدیک به میتوکندری RIG-I and ATG12 از تعامل RIG-1 در صورت تعامل با IPS-I، و مختل کردن سیگنال‌های ناشی از ATG5 می‌گیری می‌کند. علاوه بر این، HCV باعث ایجاد میتوفاژی با واسطه پارکین می‌شود که به طور مثبت تکثیر ویروسی را تنظیم می‌کند. در نهایت، با وجود جذب کلسترول و اسید چرب خنثی استریفیک نشده، وزیکول اتفاژی باعث محدود شدن استئاتوز میکروسیکولار می‌شود. (به بخش Plate مراجعه کنید).

چندین گزارش اخیر از مدولاسیون فرایند اتفاژی با ویروس هپاتیت C و توانایی پروتئین‌های اتفاژی متعدد برای تنظیم مثبت عفونت تولیدی ویروس هپاتیت C فاش شده است (جدول ۷,۱). در اینجا ما این پیشرفتها را بررسی خواهیم کرد؛ ما درک خود را از مکانیسم‌هایی ارائه می‌کنیم که توسط آن ویروس هپاتیت C باعث انساست وزیکول اتفاژی می‌شود و چگونه، به نوبه خود پروتئین‌های اتفاژی می‌توانند عفونت ویروس هپاتیت C را افزایش دهند؛ و ما در مورد پیامدهای آن مفاهیم برای انتشار ویروس هپاتیت C بحث خواهیم کرد.

ویروس هپاتیت C یک اتوفاژی پرورویروسی را القا می کند

ویروس‌های مختلف از خانواده فلاؤی ویریده و نیز کلاس‌های دیگر ویروس‌های RNA و DNA، انباست اتوفاگوزوم‌ها یا وزیکول‌های مرتبط با اتوفاژی را در سلول‌های آلوده القا می‌کند (بررسی شده در دروکس و چیساری، ۲۰۱۰). قوع افزایش تعداد وزیکول‌های اتوفاژی در سلول‌های آلوده به ویروس هپاتیت C توسط آزمایشگاه‌های مختلفی که از خطوط سلولی، رشته‌های ویروسی، و روش‌های تشخیص مختلف استفاده می‌کنند، گزارش شده است (آیت گوگولته^۱ و همکاران، ۲۰۰۸؛ دروکس و همکاران، ۲۰۰۹؛ فراریز و همکاران، ۲۰۱۰؛ گرگوری و همکاران، ۲۰۱۱؛ گووین و همکاران، ۲۰۱۰؛ که و چن^۲، ۲۰۱۰؛ مول^۳ و همکاران، ۲۰۱۲؛ شینوهارا و همکاران، ۲۰۱۳؛ شریوستاوا و همکاران، ۲۰۱۲؛ سر و همکاران، ۲۰۰۸؛ سو و همکاران، ۲۰۱۱؛ تانیدا و همکاران، ۲۰۰۹؛ وسکووا و همکاران، ۲۰۱۲) (جدول ۷،۱) و شکل ۱A) را ببینند، بخش بشقاب (Plate section) را ببینید). نکته مهم، مطابق با توانایی ویروس هپاتیت C برای القای اتوفاژی در سلول‌های آلوده در شرایط آزمایشگاهی و حامی ارتباط فیزیولوژیکی و بالینی بررسی‌های داخل سلولی، رائوتو و همکاران (۲۰۱۱) شواهدی برای یک پاسخ اتوفاژی افزایش یافته در کبد بیماران مبتلا به ویروس هپاتیت C مزمن نسبت به کبد طبیعی و همچنین نسبت به بیماران مبتلا به استئاتوھپاتیت غیر الکلی، بیماری کبد الکلی و عفونت هپاتیت B را گزارش کردند.

چندین آزمایشگاه مستقل گزارش کرده‌اند که پروتئین‌های اتوفاژی یعنی، Beclin 1, LC3, ATG4B, ATG5, ATG7, ATG12 هپاتیت C تولیدی هستند (دروکس و همکاران، ۲۰۰۹؛ گرگوری و همکاران، ۲۰۱۱؛ گووین و همکاران، ۲۰۱۰؛ که و چن، ۲۰۱۰؛ میزوئی و همکاران، ۲۰۱۰؛ شریوستاوا و همکاران، ۲۰۱۱؛ سر و همکاران، ۲۰۱۰؛ تانیدا و همکاران، ۲۰۰۸) (شکل ۷،۱B). تشریح مراحل فردی چرخه زندگی ویروس هپاتیت C پیشنهاد می‌کند که پروتئین‌های اتوفاژی کلیدی (یعنی، Beclin 1, LC3, ATG4B و ATG5) برای آغاز ترجمه / تکثیر RNA ویروس هپاتیت C ویروسی ورودی در سلول‌ها آلوده نوظهور و بنابراین، برای استقرار تکثیر ویروس هپاتیت C مورد نیاز هستند (دروکس و همکاران، ۲۰۰۹؛ گووین و همکاران، ۲۰۱۱؛ که و چن، ۲۰۱۰). به طور مداوم، گووین

¹ Ait-Goughoulte

³ Mohl

² Ke and Chen

و همکاران (۲۰۱۲) هم بیانی قوی بین NS5B و ATG5 شناسایی کردند که به طور مقاوم به نقاط اولیه عفونت محدود می‌شود. مشاهده این برهمکنش NS5B/ATG5 از نظر زمانی ناپایدار، با نیاز پروتئین‌های اتوفاژی برای استقرار تکثیر ویروس هپاتیت C سازگار است اما زمانی که این فرآیند ایجاد شد آنرا حفظ نمی‌کند (دروکس و همکاران، ۲۰۰۹). بعلاوه، تانیدا و همکاران، (۲۰۰۹) مشاهده کردند که رهاسازی هسته ویروس هپاتیت C و ذرات ویروسی از سلول‌های آلوده شده، در سلول‌های تنظیم شده با BECN1 و ATG7 (یعنی کمتر از ۱۰ برابر کاهش) اندکی کاهش می‌یابند، و آنها پیشنهاد دادند که پروتئین‌های اتوفاژی نیز به تجمع و یا خروج ذرات ویروس هپاتیت C کمک می‌کنند.

چگونه ویروس هپاتیت C باعث تجمع وزیکول اتوفاژی می‌شود؟

عفونت‌های سلولی احتمالاً با غلبه بر ER با مقدار افزایش یافته‌ای از پروتئین‌ها که ترجمه می‌شوند و باید به درستی تا شوند، اغلب تنش ER را القا می‌کنند (بررسی شده در دیهله و همکاران، ۲۰۱۱). تنش ER از طریق پاسخ پروتئین تا نشده (UPR) حس می‌شود، یک همگرایی چند توالی علامت دهنده سلولی که به انباشت پروتئین‌های تاشده در ER پاسخ می‌دهند (بررسی شده در هی^۱، ۲۰۰۶). پاسخ UPR سلول‌ها را قادر می‌سازد تا با کاهش ترجمه، با گسترش ER برای کنترل مقدار پروتئین‌های داخلی، و نیز با تنظیم افزایشی بیان چاپرون و تخریب عواملی که پروتئین‌های تاشده را دوباره تا می‌کنند یا حذف می‌کنند، از تنش ER بھبود یابد (هی، ۲۰۰۶). مطالعات متعدد نشان دادند که ویروس هپاتیت C، UPR را القا می‌کند (که و چن، ۲۰۱۰؛ مهل و همکاران، ۲۰۱۲؛ شینوهارا، ۲۰۱۳؛ سر و همکاران، ۲۰۰۸؛ تاردیف^۲ و همکاران، ۲۰۰۲؛ ژنگ^۳ و همکاران، ۲۰۰۵). نکته مهم، تنظیم کاهشی انواع تعديل کننده‌های UPR (برای مثال، PERK، ATF6 و IRE1α، CHOP) و داروهای مسدود کننده UPR (برای مثال، سالوبرینال) انباشت وزیکول اتوفاژی القا شده با ویروس هپاتیت C را مهار می‌کنند (که و چن، ۲۰۱۰؛ شینوهارا و همکاران، ۲۰۱۳؛ سر و همکاران، ۲۰۰۸). این شواهد پیشنهاد می‌کند که ویروس هپاتیت C، UPR را القا می‌کند، که به نوبه خود سبب اتوفاژی می‌شود. این با پیوند عملکردی بین UPR و

¹ He

² Tardif

³ Zheng

فصل ۷: اتوفاژی: یک بازسازی کننده خانگی برای ویروس هپاتیت C^{۱۴۹}

القای اتوفاژی که قبلاً نشان داده شد، سازگار است (هی و کلیونسکی، ۲۰۰۹؛ کوروکو و همکاران، ۲۰۰۷؛ اوگاتا و همکاران، ۲۰۰۶؛ روشاپ^۱ و همکاران، ۲۰۱۰؛ ورفایلی^۲ و همکاران، ۲۰۱۰).

با این وجود، تکثیر ویروس هپاتیت C و انباست پروتئین ویروسی، همزمان با مهار UPR کاهش می‌یابد (که و چن، ۲۰۱۰؛ شینوهارا و همکاران، ۲۰۱۳؛ سر و همکاران، ۲۰۰۸). بنابراین مشخص نیست که آیا مکانیسم‌های جایگزین (برای مثال، قابل انتساب به سطوح بالای تکثیر ویروس هپاتیت C و محتوای پروتئین ویروسی و احتمالاً بی ارتباط به UPR هستند) می‌توانند اتوفاژی القا شده با ویروس هپاتیت C را کنترل کنند. به علاوه، مهل و همکاران، (۲۰۱۲) گزارش کردند که انباست LC3-II مقدم بر فعال سازی UPR است، که تنها در مرحله پایانی دوره عفونت ویروس هپاتیت C رخ می‌دهد. به علاوه، انباست وزیکول اتوفاژی در غیاب UPR قابل تشخیص (مهل و همکاران، ۲۰۱۲) در سلول‌هایی به شدت تحریک می‌شوند که در بردارنده یک رپلیکون زیرژنومی با قابلیت تکرار (SGR) هستند، ساختارهای ژنوم ویروس هپاتیت C که فقط پروتئین‌های غیر ساختاری ویروسی را رمزگذاری می‌کنند (فراریز و همکاران، ۲۰۱۰؛ مهل و همکاران، ۲۰۱۲؛ سر و همکاران، ۲۰۰۸، ۲۰۱۲). بنابراین، این مشاهدات پیشنهاد می‌کنند که یک یا چند پروتئین ویروسی غیر ساختاری می‌توانند در القای اتوفاژی، مستقل از UPR نقش داشته باشند.

مطابق با این تصور، چند گزارش نشان می‌دهد که اتوفاژی می‌تواند مستقیماً توسط برخی پروتئین‌های ویروس هپاتیت C القا شوند. ابتدا، بیان مجزای NS4B، یک پروتئین ویروسی درگیر در تشکیل کمپلکس تکثیر ویروس هپاتیت C (اگر و همکاران، ۲۰۰۲؛ الیزر و همکاران، ۲۰۰۴؛ کونن^۳ و همکاران، ۲۰۰۳)، اتوفاژی را تحریک می‌کند (سو و همکاران، ۲۰۱۱). جالب است که NS4B با هردو GTPase Rab5 مرتبط با اندوزوم اولیه و پروتئین اتوفاژی، VPS34 تعامل دارد (سو و همکاران، ۲۰۱۱). دوم، گرگوار^۴ و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کرد که بیان پروتئاز ویروسی NS3 القای انباست وزیکول اتوفاژی را بازگو می‌کند. در واقع، NS3 با پروتئین M از خانواده جی پی آزهای مربوط به ایمنی (IRGM) تعامل دارد (گرگوار و همکاران، ۲۰۱۱)، یک عامل مرتبط با اتوفاژی شناخته شده است تا میتوکندری را متمرکز کند و روی اتوفاژی تأثیر

¹ Rouschop

² Verfaillie

³ Konan

⁴ Gregoire

بگذارد (آرنولت^۱ و همکاران، ۲۰۱۱). در نهایت، بیان NS5A، احتمالاً با تنظیم افزایشی بیان BECN1 با یک مکانیسم ناشناخته اتوفاژی را تحریک می‌کند (شیرواستراوا و همکاران، ۲۰۱۲).

نکته مهم اینکه، اتوفاژی در زمان خیلی زود پس از عفونت فعال می‌شود، همانطور که با تشخیص LC3-II، در ۴ ساعت اولیه پس از عفونت ارزیابی شد، پیشنهاد می‌شود که حداقل ۲۰ ساعت قبل از بیان قابل تشخیص پروتئین‌های غیر ساختاری، (مهل و همکاران، ۲۰۱۲) یک جزء از ذرات ویروسی ورودی ممکن است در ابتدا اتوفاژی را القا کند. در این راستا، پیوندی بین مسیرهای ایمنی ذاتی پیشنهاد شده است که خصوصیات ساختاری ذرات ویروسی و القای اتوفاژی را رمز گشایی می‌کند (بررسی شده در ریچتا و فور^۲، ۲۰۱۳). برای مثال، حس گلیکوپروتئین ویروسی یا RNA تک رشته ای (ssRNA) توسط گیرنده‌های تشخیص الگو می‌تواند اتوفاژی را فعال کند (دلگادو و همکاران، ۲۰۰۸؛ ناکاموتو و همکاران، ۲۰۱۲؛ شی و کرل^۳، ۲۰۰۸). بنابراین، می‌توان تصور کرد که RNA ویروسی ورودی در ابتدا می‌تواند دستگاه اتوفاژی را تحریک کند، که به نوبه خود به شروع ترجمه و تکثیر RNA ویروسی ورودی کمک خواهد کرد (دروکس و همکاران، ۲۰۰۹). بنابراین تحریک اتوفاژی توسط ویروس ورودی، استقرار یک چرخه همانندسازی تولیدی را تسهیل می‌کند. در مرحله بعدی، بیان NS3، پاسخ ایمنی ذاتی را با جداسازی فاکتورهای سیگنال دهنده مهار می‌کند، فاکتورها شامل ایترفرون بتای القا کننده وفق دهنده حاوی دامنه TIR (TRIF) و IPS-1 محرک پروموتِر که به عنوان MAVS، VISA یا Cardif شناخته می‌شود، می‌باشند (فوی و همکاران، ۲۰۰۳؛ لی و همکاران، ۲۰۰۵؛ میلان و همکاران، ۲۰۰۵). در این مرحله، UPR و یا بیان NS5A، NS4B، NS3 تنها یا در ترکیب می‌تواند اتوفاژی را حفظ کند. مطالعات بیشتری نیاز است تا تعیین کند چگونه اجزای ویروسی به صورت پیاپی و یا با مشارکت هم، مسیر اتوفاژی را در جریان عفونت ویروس هپاتیت C تعديل می‌کنند.

بازسازی غشای پویا توسط اتوفاژی

یک ویژگی مشترک همه ویروس‌های RNA رشته مثبت، بازسازی غشاهای داخل سلولی است که چارچوب‌ها را ایجاد می‌کنند، جایی که دستگاه همانندسازی ویروس انباشته می‌شوند و ژنوم‌ها

¹ Arnoult

³ Shi and Kehrl

² Richetta and Faure

تکثیر می‌شوند و در نهایت جایی که پیوند ویریون انجام می‌شود. این ساختارهای غشایی می‌توانند به طور بالقوه هماهنگی مراحل مختلف چرخه تکثیر را با محدود کردن انتشار و فراهم کردن جهت گیری مناسب دستگاه تکثیر، تسهیل کنند. به علاوه، آن‌ها همچنین، ممکن است از RNA ویروسی در برابر تشخیص توسط حسگرهای ذاتی سیتوزولی محافظت کنند (بررسی شده در دن بون و الکوئیست^۱، ۲۰۱۰). اتوفاژی، به عنوان یک فرایند غشایی پویا برای کمک به استقرار کارخانه‌های تکثیر مرتبط با غشای درون سلولی برای ویروس‌های RNA پیشنهاد شده است. برای مثال، برخی کمپلکس‌های رونویسی / تکثیر RNA ویروسی نیدوویروس‌ها^۲ و روتاویروس‌ها^۳ بر روی وزیکول‌های دو غشایی (DMV) که شبیه به اتوفاگوزوم‌ها هستند و با LC تزئین شده‌اند، محکم می‌شوند (بررسی شده در دروکس و چیساری، ۲۰۱۰).

در مورد ویروس هپاتیت C، بازآرایی‌های غشا با ظاهری شبیه به شبکه غشایی توصیف شده است که به عنوان انباست سیتوپلاسمی وزیکول‌های غشایی بسیار ناهمگن تعریف شده که در یک ماتریس آمورف، تعییه شده‌اند (اگر و همکاران، ۲۰۰۲؛ گوسرت^۴ و همکاران، ۲۰۰۳). تحلیل اخیر معماری سه بعدی تغییرات غشا نشان می‌دهد که ویروس هپاتیت C در اوایل عفونت، DMV‌هایی را که به صورت برآمدگی‌های ER ظاهر می‌شوند، القا می‌کند (رومرو-بری^۵ و همکاران، ۲۰۱۲). بعدها، ویروس هپاتیت C علاوه بر این، وزیکول‌های چندغشایی را که احتمالاً نتیجه استرس سلولی و یادآور یک پاسخ اتوفاژی هستند، القا می‌کند (رومرو-بری و همکاران، ۲۰۱۲).

در حالی که فراریس و همکاران (۲۰۱۰)، DMV‌ها را در فراکسیون‌هایی حاوی ویروس هپاتیت C RNA و پروتئین‌هایی که ظاهرًا با LC3 در سلول‌های SGR ویروس هپاتیت C رسوب کردند، تحلیل میکروسکوپی کانفوکال سلول‌های آلدود به ویروس هپاتیت C شواهد کمی از هم بیانی بین پروتئین‌های ویروسی و LC3، یا درونزا یا به عنوان پروتئین همجوشی GFP بیان شده، را ارائه دادند (آیت گوگولته و همکاران، ۲۰۰۸؛ دروکس و همکاران، ۲۰۰۹؛ سر و همکاران، ۲۰۰۸؛ تانیدا و همکاران، ۲۰۰۹). به هر حال، وسوسه انگیز است که به جای دستگاه کامل، عوامل فردی مسیر اتوفاژی را حدس بزنیم، در همکاری نزدیک با پروتئین‌های ویروس هپاتیت

¹ den Boon and Ahlquist

⁴ Gosert

² nidovirus

⁵ Romero-Brey

³ rotavirus

C که تشکیل DMV‌ها را در سلول‌های آلوده به ویروس هپاتیت C القا می‌کند. این ادعا قبلًا در مورد ویروس هپاتیت موش (MHV) نشان داده شده است، که می‌تواند پروتئین‌های اتوفاژی و ساختارهایی را که شبیه به وزیکول‌های اتوفاژی هستند، مستقل از مسیر اتوفاژی معمولی به کار گیرد (رجیورای^۱ و همکاران، ۲۰۱۰). مطابق با این یافته که NS5A برای القای اتوفاژی کافی است (شريواستاوا و همکاران، ۲۰۱۲)، رومرو – بری و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که بیان فردی NS5A، NS5B و وزیکول‌های چندغشایی را تحریک می‌کند، پیشنهاد می‌کند که این پروتئین‌های ویروسی، نقش کلیدی در بازآرایی‌های غشایی بازی می‌کنند. به علاوه، NS4B، کمپلکسی را با Rab5 و VPS34 شکل می‌دهد (سو و همکاران، ۲۰۱۱) و پلیمراز RNA وابسته به NS5B RNA با ATG5 و LC3 در تعامل است (گووین و همکاران، ۲۰۱۰؛ سر و همکاران، ۲۰۱۲). جالب است که ATG5، تشکیل DMV‌ها را از طریق یک غشای هلالی شکل^۲ آغاز می‌کند و هم بیانی قوی آن با NS5B به طور موقتی محدود به نقاط اولیه عفونت است (گووین و همکاران، ۲۰۱۰). این نتایج با مشاهدات قبلی ثابت هستند، مشاهدات قبلی نشان داد که تنظیم کننده‌های اتوفاژی نیاز به آغاز ترجمه و تکثیر RNA ویروس هپاتیت C ویروسی ورودی در سلول‌های تازه آلوده شده دارند، اما پس از آن غیرضروری می‌شوند (دروکس و همکاران، ۲۰۰۹). مطالعات متعدد نشان می‌دهد که وزیکول‌های اتوفاژی تازه شکل گرفته، از ER نشأت می‌گیرند (اکس و همکاران، ۲۰۰۸؛ هایاشی - نیشینو و همکاران، ۲۰۰۹؛ ایتاکورا و میزوشیما، ۲۰۱۰؛ ماتسوناگا و همکاران، ۲۰۰۹؛ میزوشیما، ۲۰۱۰؛ پولسون و همکاران، ۲۰۱۰؛ یلا - آنتیلا و همکاران، ۲۰۰۹). با بازسازی غشاهای ER، پروتئین‌های اتوفاژی ممکن است یک پشتیبانی غشایی اولیه برای ترجمه/ تکثیر RNA ورودی، مقدم بر انباست پروتئین‌های ویروسی و قبل از استقرار تغییرات سلولی القا شده با ویروس هپاتیت C فراهم کنند (اگر و همکاران، ۲۰۰۲؛ گوسرت و همکاران، ۲۰۰۳؛ مرادپور و همکاران، ۲۰۰۷؛ رومرو- بری و همکاران، ۲۰۱۲). آزمایش این فرضیه برای کار آینده مورد نیاز است. در نهایت، می‌توان تصور کرد که ظاهر ترکیبات جدید غشایی بعداً در طول دوره عفونت (رومرو - بری و همکاران، ۲۰۱۲)، احتمالاً ناشی از تنش سلولی مانند اتوفاژی است، شاید مستقیماً در ساخت مکان تکثیر RNA ویروس هپاتیت C به خودی خود کمک نکند، اما در عوض می‌تواند با تعديل عملکرد(های) سلولی مانند پاسخ ایمنی ذاتی،

¹ Reggiori² crescent-shaped membrane

یا به طور متناوب با محدود کردن تنظیم اندامک‌های سلولی، به طور غیرمستقیم در تکثیر RNA ویروس هپاتیت C شرکت کند.

ارتباط متقابل اتوفاژی با پاسخ ایمنی ذاتی

مطالعات گذشته نشان دادند که پروتئین‌های اتوفاژی، تعدیل کننده‌های کلیدی پاسخ میزان ذاتی در برابر عفونت ویروسی با فعال سازی یا سرکوب القای ضد ویروسی مولکول‌های موجود در سلول‌های آلوده هستند (فور و لافونت^۱، ۲۰۱۳؛ جونای^۲ و همکاران، ۲۰۰۷؛ لی و همکاران، ۲۰۰۷؛ لی^۳ و همکاران، ۲۰۱۲؛ سایتو و اکیرا^۴، ۲۰۱۰؛ سایتو و همکاران، ۲۰۰۸، ۲۰۰۹؛ تال و همکاران، ۲۰۰۹). اسیدهای نوکلئیک ویروسی در سلول‌های آلوده شده، شناسایی شدند، باعث ایجاد یک پاسخ ضدویروسی می‌شوند که با تولید اینترفرون‌های نوع I مشخص می‌شوند (IFN‌ها)، ژن‌های تحریک شده با اینترفرون (ISG‌ها)، و سیتوکین‌های التهابی که جلوی گسترش ویروسی را می‌گیرند و پاسخ تطبیقی را تقویت می‌کنند (بررسی شده در کاوای و اکیرا، ۲۰۰۹). این به طور قابل توجهی، تشخیص سریع RNA‌ها را توسط گیرندهای سیتوسولیکی مانند گیرندهای شبِه RIG-I^۵ ژن I القایی رتینویک (RLR‌ها) و گیرندهای NOD مانند NLR (ها) و توسط گیرندهای شبِه Toll (TLR‌ها) که در بخش‌های لیزوژومی / اندوزومی سلول حضور دارند، را شامل می‌شود (بلاسیوس و بوتلر^۶، ۲۰۱۰؛ کاوای و اکیرا، ۲۰۰۹). همانطور که در بالا ذکر شد، چندین خط شواهد، این مفهوم را تأیید می‌کنند که اتوفاگوزوم‌ها در محل‌های تماس میتوکندری-ER تشکیل می‌شوند (هاماگاکی و همکاران، ۲۰۱۳؛ هایاشی و همکاران، ۲۰۰۹)، که همچنین چارچوب‌های تجمعی برای اجزای علامت دهنده القا شده با RIG-I^۷ ۲۰۱۱ (هورنر و همکاران، ۲۰۱۱). در واقع، RIG-I به کار گرفته می‌شوند و با وفق دهنده IPS0I^۸ مقیم MAM در ارتباط است و بدین ترتیب سیگنال‌های ضد ویروسی را انتقال می‌دهد (هارنر و همکاران، ۲۰۱۱). در مجموع، این نتایج پیشنهاد دادند که هم مسیرهای اتوفاژی و هم مسیرهای القا شده با RIG-I، به یک چارچوب خارج سلولی مشترک تلاقي می‌کنند. مطابق با این مشاهدات، جفت ATG5-ATG12^۹، تعامل RIG-I و IPS-1 را قطع می‌کند و بدین وسیله، تولید IFNα/β^{۱۰} ایجاد شده توسط RIG-I در سلول‌های آلوده به استوتماتیت تاولی سرکوب می‌شود

¹ Faure and Lafont

⁴ Saitoh and Akira

² Jounai

⁵ Blasius and Beutler

³ Lei

⁶ VSV

(جونای و همکاران، ۲۰۰۷). کارهای بعدی پیشنهاد شده است که میتوفاژی - فرایندی که میتوکندری را برای تخریب ا توفاژی هدف قرار می دهد- میتوکندری های ناکارآمد و یا سطوح گونه های اکسیژن فعال مرتبط (ROS) را جذب می کند (تال و همکاران، ۲۰۰۹). این محصولات سیگنال های RIG-I مانند را تقویت می کنند (تال و همکاران، ۲۰۰۹). مطابق با این گزارشات قبلی، تنظیم پایین ATG5 با بیان بیش از حد یک RIG-I جهش یافته دائمًا فعال به طور قابل توجهی سبب افزایش پروموتور IFN β شد (که و چن، ۲۰۱۰). کارهای قبلی مشخص کردند که بن مایه سیستیدین و اوریدین هموپلیمری (poly-U/UC) در مناطق غیر قابل ترجمه^۱ ژنوم ویروسی به عنوان RNA الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن ها- ویروس هپاتیت C که توسط ژن القاء اسید رتیونیک ۱ سازماندهی شده اند، به کار گرفته می شود تا بیان های نوع IFN و ISG را القا کند (سایتو و همکاران، ۲۰۰۸؛ اوزری و گرکه، ۲۰۰۹). بیان های IFN و ISG که توسط RNA الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن ها- ویروس هپاتیت C القا شده اند، در سلول های ناک داون^۲ LC3 و ATG5 بسیار تقویت می شوند (که و چن، ۲۰۱۰). شیرواستراوا و همکاران (۲۰۱۱) همچنین پیشنهاد کردند که BECN1 و ATG7، بیان IFN β و ISG را در هپاتوسیت های انسانی جاودانه آلوده به ویروس هپاتیت C را سرکوب می کنند. بعلاوه، استفاده از پروتئین شماره ۲ غشای مرتبط با لیزوژوم^۳ و سلول های تنظیم کاہشی Rab7، که برای بلوغ اوتوفاگوزوم، سودمند هستند، که و چن (۲۰۱۰) نشان دادند که بلوغ اوتوفاگوزوم به سرکوب سیگنال دهی ژن القاء اسید رتیونیک ۱^۴ که با الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن ها- ویروس هپاتیت C القا شده نیاز دارد. ویروس آنسفالیت ژاپنی پاسخ IFN β بالاتری را در سلول های فاقد پروتئین های ا توفاژی (یعنی ATG5 و ATG7) القا می کند (جین و همکاران، ۲۰۱۳)، که پیشنهاد می کند تنظیم کننده های ا توفاژی، در سرکوب سیگنال دهی ضد ویروسی ناشی از اعضای مختلف فلاوی ویریده نقش مهمی بازی می کند. در مجموع، این نتایج و مطالعات قبلی مشخص می کنند که پروتئین های ا توفاژی سیگنال دهی IFN القا شده توسط VSV را محدود می کند که پیشنهاد کرد سرکوب با واسطه ا توفاژی بیان IFN β و ISG به طیفی گسترده از لیگاندهای ژن القاء اسید رتیونیک ۱، انواع سلولی، و گونه های میزبان گسترش می یابد (جین و همکاران، ۲۰۱۳).

¹ 3'UTR² Uzri and Gehrke³ knockdown cells⁴ LAMP2⁵ RIG-I

جونای و همکاران، ۲۰۰۷؛ که و چن، ۲۰۱۰؛ شریوستاوا و همکاران، ۲۰۱۱؛ تال و همکاران، ۲۰۰۹).

با این وجود، مانند بسیاری از ویروس‌های RNA، ویروس هپاتیت C، استراتژی‌های متعددی را برای شکست القاء IFN نوع ۱ توسط هپاتوسیت‌های آلوده، به کار می‌گیرد (بیندر و همکاران، ۲۰۰۷؛ چنگ و همکاران، ۲۰۰۶؛ لیانگ و همکاران، ۲۰۰۸). از میان مکانیسم‌های بازدارنده ویروسی، توانایی کاملاً تعریف شده پروتئاز NS3-4A ویروس هپاتیت C برای متوقف کردن سیگنال دهی ناشی از گیرنده شبه-ژن القاء اسید رتیونیک ۱ توسط جداکردن ورق دهنده-IPS-1 است (فوی و همکاران، ۲۰۰۵؛ لی و همکاران، ۲۰۰۵؛ میلان و همکاران، ۲۰۰۵). ویروس هپاتیت C، همچنین، پاسخ القا شده با ژن القایی اسید رتیونیک ۱ را با واژگونی پاسخ فوری میزان کاهش می‌دهد، که منجر به تنظیم منفی از طریق ISG15 می‌شود (آرنو^۱ و همکاران، ۲۰۱۱). به علاوه، دیگران گزارش کردند که پروتئین NS4B ویروس هپاتیت C با تعامل بین محرك پروتئین ژن‌های اینترفرون (STING) و ISP-1^۲ و یا کیناز ۱ متصل به IKK/TANK پایین دست (TBK-1) تلاقی می‌کند، در نتیجه، از انتشار توالی ترارسانی سیگنال با واسطه ژن القایی اسید رتیونیک ۱ جلوگیری می‌کند (دینگ و همکاران، ۲۰۱۳؛ نیتا و همکاران، ۲۰۱۲). در توافق با این مشاهدات، عفونت ویروس هپاتیت C، خود، (یعنی، در غیاب بیان بیش از حد ژن القاء اسید رتیونیک ۱ و ترافرست^۳ الگوهای ملکولی مرتبط با پاتوژن ویروس هپاتیت C) بیان ISG و IFNβ را، حتی در سلول‌های با کمبود پروتئین اتوفاژی تحریک نمی‌کند (چنگ و همکاران، ۲۰۰۶؛ که و چن، ۲۰۱۰؛ سر و همکاران، ۲۰۱۲). نکته مهم این است که پروتئین‌های اتوفاژی همچنین برای انتشار ویروس هپاتیت C در رده‌های سلولی ساب کلونال Huh-7.5 و Huh-7.5.1 (گرگوار و همکاران، ۲۰۱۱؛ سر و همکاران، ۲۰۰۸؛ تانیدا و همکاران، ۲۰۰۹) مورد نیاز است که یک ژن القاء اسید رتیونیک ۱ اساسی را بیان نمی‌کند (سامپتر^۴ و همکاران، ۲۰۰۵). بنابراین، شواهد نشان می‌دهد که پروتئین‌های اتوفاژی احتمالاً برای کمک به گسترش ویروسی مستقل از تنظیم سیگنال دهی وابسته به ژن القاء اسید رتیونیک ۱ است و اینکه، میزان کاهش سیگنال دهی ژن القاء اسید رتیونیک ۱ توسط پروتئین‌های اتوفاژی برای تکثیر ویروس هپاتیت C القا شده در سلول‌هایی با نقصان پروتئین اتوفاژی، مبهم باقی می‌ماند. با این وجود، می‌توان

¹ Arnaud

² transduction

³ transfection

⁴ Sumpter

تصور کرد که پروتئین‌های اتوفاژی که واسطه سرکوب سیگنال دهی ژن القاء اسید رتیونیک ۱ هستند ممکن است در شروع عفونت ویروس هپاتیت C، قبل از بیان پروتئین‌های ویروسی، که این سیگنال ضدویروسی را خنثی می‌کند، نقش داشته باشدند. این فرضیه با این مشاهده که اتوفاژی تنها در شروع عفونت ویروس هپاتیت C مورد نیاز است، ثابت خواهد بود (دروکس و همکاران، ۲۰۰۹).

اتوفاژی و مرگ سلولی

مرگ برنامه ریزی شده سلولی^۱، خط دفاعی دیگری در برابر عفونت ویروسی می‌باشد؛ فعال سازی مسیرهای تنش خارج سلولی ممکن است باعث مرگ سلولی شود، همچنین برای محدود کردن تکثیر ویروسی به کار می‌رود (بررسی شده در باربر، ۲۰۰۱؛ گالوزی^۲ و همکاران، ۲۰۰۸). بسیاری از ویروس‌ها، استراتژی‌هایی را برای فرار یا تأخیر مرگ سلولی رشد می‌دهند؛ بیشتر به نقش مرگ سلولی به عنوان یک مکانیسم ضد ویروسی اشاره می‌کند (بررسی شده در کپ^۳ و همکاران، ۲۰۰۹). یک مطالعه جالب (ژوبرت و همکاران، ۲۰۱۲) نشان داد که سرکوب ژن‌های اتوفاژی در سلول‌های آلوده به ویروس چیکونگونیا منجر به مرگ سلولی درونی افزایش یافته، شدند، که در آن، فعالسازی Bak و Bax منجر به نفوذپذیری غشایی خارجی میتوکندری، از جمله، القاء تشکیل مرگ برنامه ریزی شده سلولی و فعالسازی کاسپاز^۴(کروم و همکاران، ۲۰۰۷)، و نیز مرگ سلولی خارجی، که توسط اولیگومر شدن پذیرنده مرگ و تقسیم کاسپاز^۵ (یا کاسپاز ۱۰) می‌شود (کوروکاوا و کورنبلوت، ۲۰۱۲؛ ویلسون و همکاران، ۲۰۰۹). به طور مدام، موش‌های هیپومورف ATG16L، که سطوح کاهش یافته اتوفاژی را نشان می‌دهد، افزایش مرگ و میر مرتبط با حساسیت زیاد به مرگ سلولی القا شده با CHIKV را نشان داد (ژوبرت و همکاران، ۲۰۱۲). به علاوه، مک‌لین و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که القای اتوفاژی توسط عفونت ویروس دنگی، از سلول‌ها در برابر مرگ سلولی ناشی از چندین عامل استرس زا محافظت کند، فنتوپیپی که توسط تنها بیان پروتئین ویروسی S4A تکرار می‌شود. همان طور که با افزایش سطوح کاسپاز^۶ و^۷ ۹ در هنگام عفونت سلولی در سلول‌های دارای کمبود اتوفاژی نشان داده

¹ Apoptosis

² Galluzzi

³ Kepp

⁴ caspase-9

فصل ۷: اتوفاژی: یک بازسازی کننده خانگی برای ویروس هپاتیت C

شده است، اتوفاژی به طور مشابه از سلول‌های آلوده به ویروس آنسفالیت ژاپنی در برابر مرگ سلولی محافظت می‌کند (جین و همکاران، ۲۰۱۳).

در همین راستا، شواهد نشان دادند که اتوفاژی ناشی از ویروس هپاتیت C ممکن است بر مرگ سلولی ناشی از تنش‌های ناشی از ویروس غلبه کند. در ابتدا، تنظیم کاہشی BECN1 حساسیت سلول‌های آلوده به ویروس هپاتیت C به مرگ سلولی آپوپتوتیک را افزایش می‌دهد، همانطور که با تقسیم افزایش یافته‌پلی (آدنوزین دی فسفات ریبوز) پلیمراز، و کاسپازهای ۳ و ۹ در این سلول‌های ناقص پس از عفونت نشان داده شد (شرييواستاوا و همکاران، ۲۰۱۱). دوم اینکه، سلول‌هایی که رپلیکون ویروس هپاتیت C از سویه con1 (از ژنوتیپ 1b) را بیان می‌کنند، البته نه از سویه JFH1 (ژنوتیپ 2a)، هنگامی که اتوفاژی با بیان بیش از حد یک جهش غیرفعال پروتئاز ATG4B (یعنی ATG4BC74A)، به خطر می‌افتد، حساسیت به مرگ سلولی را افزایش می‌دهد (تاگووا و همکاران، ۲۰۱۱). جالب است که به نظر می‌رسد، این فنوتیپ به یک اسیدشدگی ناقص اتوفاگوزومها در سلول‌های حامل رپلیکون con1 ویروس هپاتیت C (اما نه JFH1)، مربوط است که منجر به یک افزایش ترشح کاتپسین B نابالغ می‌شود (تاگووارا و همکاران، ۲۰۱۱). بنابراین، این دادها، مکانیسم‌های مهم، اگرچه سویه خاص ویروس، را برای عملکرد محافظتی در برابر تنش القایی ویروس که منجر به حساسیت مرگ سلولی می‌شود، مورد تأکید قرار می‌دهد.

حذف رسوبات و اندامک‌های غیرعادی با اتوفاژی: پیامدهایی برای آسیب کبدی مرتبط با هپاتیت C مزمن

اتوفاژی و متابولیسم لیپید

به علت اینکه تکثیر ویروسی یک فرایند انرژی بَر است، ویروس‌ها، استراتژی‌های متنوعی را برای تحریک متابولیسم سلولی ایجاد می‌کنند (بررسی شده در چوکاپالی^۱ و همکاران، ۲۰۱۲). مطالعه جالب و ساده‌ای از هیتن و راندال (۲۰۱۰) در ابتدا آشکار کرد که اتوفاژی، با تأمین انرژی برای سلول‌های آلوده گسترش ویروس دنگی را به طور مثبت تنظیم می‌کند. در واقع، استفاده از آزمایشات تکمیل سازی که در آن سلول‌هایی که اتوفاژی ناقص دارند با اسیدهای چرب خارجی تأمین می‌شوند، آنها مکانیسمی تعریف کردند که توسط آن اتوفاژی ناشی از ویروس،

¹ Chukkapalli

واسطه کاتابولیسم لیپیدی برای افزایش عرضه ATP و در نهایت تکثیر ویروسی است. جالب است که محققین دیگر نشان داده‌اند که اتوفاژی می‌تواند متابولیسم لیپید سلولی را با اصلاح محتوای قطرات چربی (LDها) تنظیم کند (سینگ و همکاران، ۲۰۰۹؛ ولیکاکات^۱ و همکاران، ۲۰۱۲)، که ذخایر تری گلیسیرید سلولی (TGها) و استرهای^۲ کلسترولی هستند (مارتین و پارتون، ۲۰۰۶). این فرایند سلولی که ماکرولیپوفاژی نام دارد، ممکن است پیامدهای مهمی برای بیماری هایی که با اختلالات تجمع بیش از حد لیپید مشخص شده است داشته باشد. در طی ماکرولیپوفاژی، اجزاء اتوفاژی با قطرات چربی(لیپید) در ارتباط هستند و دستگاه اتوفاژی، تحلیل LD را القا می‌کند (سینگ و همکاران، ۲۰۰۹؛ ولیکاکات و همکاران، ۲۰۱۲). در ارتباط با این یافته‌ها، هیتن و راندال (۲۰۱۰) بیشتر نشان دادند که اتوفاژی ناشی از ویروس دنگی، محتوای قطرات چربی را افزایش می‌دهد، بنابراین، پیشنهاد می‌کنند که قطرات چربی جذب شده توسط اتوفاژی، منبعی برای انرژی جهت پشتیبانی از تکثیر ویروسی هستند.

شواهد پیشنهاد می‌کنند، همانطور که در مطالعات پروتئومی^۳ و لیپیدومی نشان داده شده، ویروس هپاتیت C متابولیسم لیپید و سنتز کلسترول سلولی را کلاً تغییر می‌دهد (دیاموند و همکاران، ۲۰۱۰). در واقع، عفونت ویروس هپاتیت C با تغییرات متابولیک کمپلکس در ارتباط است که با افزایشی در فعالیت‌های کاتابولیکی و بیوسنتزی و تغییر مشخصات ترشح لیپوپروتئین مشخص شده است (بررسی شده در بلیزینگ و پچور^۴، ۲۰۱۳؛ چوکاپالی و همکاران، ۲۰۱۲؛ داؤ تای و همکاران، ۲۰۱۱). وسکوو و همکاران (۲۰۱۲) اخیراً نشان دادند که در نمونه برداری‌های کبد از بیماران آلوده، ارتباط معکوسی بین تغییر چرب^۵ میکرووزیکولی (یعنی با تجمع احتباس داخل سیتوپلاسمی کوچک لیپیدها در واکوئل‌ها) و سطوح اتوفاژی، همانطور که توسط نسبت LC3-II/-I، وجود دارد. مطالعات آزمایشگاهی آن‌ها بیشتر نشان داد که LC3 اغلب با رسوبات کلسترول غیراشباع خارج سلولی هم (یعنی، نواحی رنگ شده مثبت فیلیپین) و تا حدی، رسوبات لیپیدی خنثی (توسط رنگ BODIPY رنگ آمیزی شده است) بیان می‌شوند که احتمالاً نشان دهنده قطرات چربی است (وسکوو و همکاران، ۲۰۱۲). به علاوه، تنظیم کاهاشی BECN1 خصوصاً تجمع و انباست رسوبات کلسترول غیرashباع در سلول‌های آلوده به ویروس هپاتیت C تحریک

¹ Velikkakath⁴ Blaising and Pecheur² esters⁵ steatosis³ دانش بررسی ساختار و عملکرد پروتئین‌ها

فصل ۷: اتوفاژی: یک بازسازی کننده خانگی برای ویروس هپاتیت C

می‌کند (وسکوو و همکاران، ۲۰۱۲). این نتایج، برخلاف گزارش‌های قبلی که نشان می‌دهد اتوفاژی واسطه جذب اسید چرب خنثی (مانند تری گلیسیریدها) در طی فقر غذایی (سینگ و همکاران، ۲۰۰۹) یا پس از آلدگی ویروس دنگی (هیتن و راندال، ۲۰۱۰) است، نشان می‌دهند که اتوفاژی ناشی از ویروس هپاتیت C اساساً کلسترول غیر اشباع و تا حد کمتری، اسید چرب خنثی را جذب می‌کند (وسکوو و همکاران، ۲۰۱۲). این امر امکان پذیر است که این گزینش پذیری جالب، در مورد عفونتِ ویروس هپاتیت C، ممکن است پاسخ خاصی به انباستِ شدید کلسترولِ مربوط به افزایش لیپید خنثی متوسطِ ناشی از ویروس هپاتیت C باشد (وسکوو و همکاران، ۲۰۱۲). اقدامات آتی، اساس مولکولی چنین گزینش پذیری محموله ای را پس از اتوفاژی ناشی از ویروس هپاتیت C رمزگشایی خواهد کرد. همچنین، گسترش مطالعات لیپیدومی در سلول‌های آلدود به ویروس هپاتیت C که برای فرایند اتوفاژی ناکافی است، جالب خواهد بود.

تصور می‌شود که تجمع و خروج ویروس هپاتیت C در ارتباط نزدیکی با قطرات لیپید رخ می‌دهد و به تکامل حیات^۱ و مسیر ترشح لیپوپروتئین با چگالی بسیار پایین، بستگی دارد (بررسی شده در ایوانو و همکاران، ۲۰۱۳؛ لیندباك و رایس، ۲۰۱۳). این یافته‌ها با ارتباط ویریون‌های ویروس هپاتیت C با لیپیدها و آپولیپوپروتئین ها^۲ مطابقت دارند. این برهم کنش، خصوصیات فیزیکی ویریون‌ها و ترکیب آن‌ها، علاوه بر ترویج عفونت آن‌ها تغییر می‌دهد (بررسی شده در داؤ تای و همکاران، ۲۰۱۱). به علاوه، تکثیر ویروس هپاتیت C به شدت به متابولیسم لیپید میزبان، خصوصاً واسطه مسیر بیوسنتری-کلسترولی وابسته است (کاپادیا و چیساری، ۲۰۰۵؛ ونگ و همکاران، ۲۰۰۵؛ یه و همکاران، ۲۰۰۳). در نگاه اول، پیشنهاد این که جذب رسوب لیپید با واسطه اتوفاژی از قطرات چربی تأثیر مثبت مستقیمی روی گسترش ویروس هپاتیت C دارد، غیرمنطقی است. به هر حال، تغییر متابولیسم لیپید با واسطه اتوفاژی، به جلوگیری از انباستِ رسوب بیش از حد لیپید ناشی از ویروس هپاتیت C کمک می‌کند (وسکوو و همکاران، ۲۰۱۲) و در نتیجه، ممکن است جنبه مهمی از بیماری زایی^۳ را تنظیم کنند. در واقع، استئاتوز که یک مشخصه مشترک عفونت ویروس هپاتیت C است، کوفاکتور مهمی برای پیشرفت بیماری و فیروز در هپاتیت C مزمن است (بررسی شده در نگرو و کلمانت، ۲۰۰۹؛ نگرو و سانیال، ۲۰۰۹؛ یامانه و همکاران، ۲۰۱۲).

¹ biogenesis

² apolipoprotein

³ pathogenesis

میتوفاژی و پایداری ویروس هپاتیت C

جدا از رسوبات لیپیدی، هپاتیت C مزمن همچنین با آسیب کبدی دیگری از جمله، استرس اکسیداتیو، تجمع گونه‌های اکسیژن فعال^۱، و اختلال میتوکندریایی^۲ مرتبط است (بررسی شده در برالت^۳ و همکاران، ۲۰۱۳؛ ایوانو و همکاران، ۲۰۱۳؛ کورناغا^۴ و همکاران، ۲۰۰۵). میتوکندری‌های نا بهنجار برای بقای سلول مضر هستند و بنابراین، به پاکسازی سریع نیاز دارند (بررسی شده در کلونان و چوی^۵، ۲۰۱۲). کیم و همکاران (۲۰۱۳) اخیراً گزارش کردند که کترل کیفی میتوکندری‌ها توسط میتوفاژی، در مقاومت عفونت ویروس هپاتیت C نقش دارد. خصوصاً آنها نشان دادند که ویروس هپاتیت C، یوبیکویتین کردن و جابجایی به میتوکندری حسگر پارکین^۶ را القا می‌کند (کیم و همکاران، ۲۰۱۳)، یک لیگاز یوبیکویتین E3 که به وسیله کیناز ۱ فرضی ناشی از فسفاتاز و هومولوگ تنسین^۷ (PINK1) به کار گرفته می‌شود و به طور انتخابی در میتوکندری‌های واقطبیده^۸ تجمع می‌یابد (یول و نارنده، ۲۰۱۱). نکته مهم این است که در میتوکندری‌های واقطبیده^۸ تجمع می‌یابد (یول و نارنده، ۲۰۱۱). نکته مهم این است که PINK1 و Parkin محدود کننده میزان تکثیر ویروس هپاتیت C است که پیوند عملی بین اتوفاژی ناشی از ویروس هپاتیت C و مقاومت ویروسی را پیشنهاد می‌کند (کیم و همکاران، ۲۰۱۳). میتوفاژی ناشی از ویروس هپاتیت C احتمالاً سهمی در محدود کردن آسیب‌های میتوکندریایی دیده شده در بیماران مبتلا به عفونت مزمن دارد (بررسی شده در برالت و همکاران، ۲۰۱۳؛ ایوانو و همکاران، ۲۰۱۳؛ کورناغا و همکاران، ۲۰۰۵).

نتیجه گیری و جهت گیری‌های آینده

به طور خلاصه، ارتباط متقابل بین دستگاه اتوفاژی و ویروس هپاتیت C به عنوان ناحیه تحقیقاتی بسیار فعالی شکل گرفته است و همه مطالعات به اثبات این نکته ختم می‌شوند که ویروس هپاتیت C از پروتئین‌های اتوفاژی متعددی برای انتشار خود استفاده می‌کند (دروکس و همکاران، ۲۰۰۹؛ گرگوای و همکاران، ۲۰۱۱؛ گووین و همکاران، ۲۰۱۰؛ که و چن، ۲۰۱۰؛ میزوئی و همکاران، ۲۰۱۰؛ شریواستاوا و همکاران، ۲۰۱۱؛ سر و همکاران، ۲۰۱۳؛ تانیدا و همکاران،

^۱ ROS accumulation

^۵ Cloonan and Choi

^۲ mitochondrial dysfunction

⁶ Parkin

^۳ Brault

⁷ PTEN

^۴ Korenaga

⁸ depolarized

فصل ۷: اتوفاژی: یک بازسازی کننده خانگی برای ویروس هپاتیت C ۱۶۱

۲۰۰۹). از تجزیه و تحلیل بافت برداری^۱ کبد و آزمایشات در محیط آزمایشگاه نیز واضح است که ویروس هپاتیت C باعث تجمع و زیکول‌ها با ویژگی‌های مشخصه واکوئل‌های اتوفاژی در سلول‌های آلدود می‌شوند (آیت گوگولته و همکاران، ۲۰۰۸؛ چو و همکاران، ۲۰۱۱؛ دروکس و همکاران، ۲۰۰۹؛ فراریس و همکاران، ۲۰۱۰؛ گرگوای و همکاران، ۲۰۱۱؛ گووین و همکاران، ۲۰۱۰؛ که و چن، ۲۰۱۰؛ مهل و همکاران، ۲۰۱۲؛ رائوتو و همکاران، ۲۰۱۱؛ شینوهارا و همکاران، ۲۰۱۳؛ شریوستاوا و همکاران، ۲۰۱۲؛ سر و همکاران، ۲۰۰۸؛ سو و همکاران، ۲۰۱۱؛ تاگووا و همکاران، ۲۰۱۱؛ تانیدا و همکاران، ۲۰۰۹؛ وسکوو و همکاران، ۲۰۱۲). به تدریج در ک می‌شود که چگونه ویروس هپاتیت C، مسیر اتوفاژی را تنظیم می‌کند و چگونه از پروتئین‌های اتوفاژی برای انتشار عفونت استفاده می‌کند. علاوه بر عملکرد پروویروسی مستقیم فرضی دستگاه اتوفاژی، القای اتوفاژی انتخابی و یا خود پروتئین‌های اتوفاژی می‌توانند جنبه‌های مختلف فرایندهای سلولی را تعديل کنند تا پاسخ‌های میزبان آسیب پذیر و نامطلوب را تضعیف کنند و نادیده بگیرند. تنظیم پیشنهادی توسط اتوفاژی پاسخ ذاتی ضد ویروسی با علامت دهی ناشی از ژن القاء اسید رتیونیک ۱ (که و چن، ۲۰۴۰؛ شریوستاوا و همکاران، ۲۰۱۱)، حساسیت به مرگ سلولی (شریوستاوا و همکاران، ۲۰۱۱؛ تاگووا و همکاران، ۲۰۱۱)، یا متابولیسم لیپید (وسکوو و همکاران، ۲۰۱۲) همگی خصوصاً مکانیسم‌های جذابی برای بازسازی سلول به یک محیط بهینه برای تکثیر ویروس هپاتیت C، هستند. این مکانیسم‌ها ممکن است به طور همزمان یا متعاقب عمل کنند. از این رو، آن‌ها ممکن است در استقرار عفونت ویروس هپاتیت C مزمن در انسان‌ها درگیر باشند. برای منظم سازی و سامان دادن به درک پراکنده مان از نقش اتوفاژی در انتشار عفونت ویروس هپاتیت C، کار بیشتری مورد نیاز است.

به ویژه، چیزهای زیادی در مورد محتوای و زیکول‌های مشابه اتوفاگوزوم‌ها در سلول‌های آلدود به ویروس هپاتیت C باید یاد گرفته شود. اتوفاژی مدت زیادی است که به عنوان فرایند تخریب سیتوپلاسمی تصادفی^۲ در نظر گرفته شده است، اما شواهد اخیر پیشنهاد می‌کنند که اتوفاگوزوم‌ها می‌توانند زیرلایه‌ها را به شیوه انتخابی تخریب کنند. خصوصاً اینکه یوبیکویتین و یا پروتئین‌های ورق دهنده خاص می‌تواند گزینش پذیری را برای تخریب توسط اتوفاژی فراهم کند (کرفت^۳ و همکاران، ۲۰۱۰؛ میزوشیما و لوین، ۲۰۱۰). در حالی که برخی از شواهد پیشنهاد می‌کنند که

¹ biopsy

² random

³ Kraft

اتوفاژی منجر به تخریب پروتئین هایی با عمر طولانی می شود (سر و همکاران، ۲۰۰۸؛ تاگووا و همکاران، ۲۰۱۱)، یافته های دیگر از رشد مؤثر وزیکول های اتوفاژی در اتولیزوزوم های تجزیه کننده^۱ دفاع می کنند (که و چن، ۲۰۱۰؛ وسکوو و همکاران، ۲۰۱۲). این اختلاف ظاهری ممکن است تفاوت هایی را در جنبش شناسی^۲ و میزان تکثیر ویروس هپاتیت C و سطوح بیان پروتئین در آزمایشات از آزمایشگاه های مختلف را منعکس نماید، یا احتمال اینکه سلول های آلووده ممکن است حاوی زیرمجموعه های خاصی از وزیکول های اتوفاژی است که تنها مجموعه محدودی از محموله ها را ببلعد و تخریب کند. مطابق با این مفهوم اخیر، وسکوو و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که اتوفاژی ناشی از ویروس هپاتیت C رسوبات لیپیدی خاص را به طور انتخابی و بخش های دیگر را به طور تصادفی تقسیم می کند (وسکوو و همکاران، ۲۰۱۲).

این فرضیه که اتوفاژی ممکن است در تهیه غشاهای لازم برای ته نشین شدن کمپلکس های تکثیر ویروس هپاتیت C مفید باشد، از اهمیت یکسانی برخوردار است و هنوز مورد بحث است. این پیشنهاد ریشه در مشاهدات هم بیانی ها و برهمکنش های بین تنظیم کننده های اتوفاژی مشخص و برخی پروتئین های غیر ساختاری ویروس هپاتیت C دارد (فراریس و همکاران، ۲۰۱۰؛ گرگوای و همکاران، ۲۰۱۱؛ گووین و همکاران، ۲۰۱۰؛ سر و همکاران، ۲۰۱۲؛ سو و همکاران، ۲۰۱۱). در هر حال، بازسازی سه بُعدی وزیکول های ناشی از ویروس هپاتیت C، اخیراً آشکار کرد که بیشتر DMV ها به عنوان یک ساختار بسته، ظاهر شدند و تنها کسری از آن ها، منفاذی متصل به سیتوزول را نشان دادند (رومرو-بری و همکاران، ۲۰۱۲). همان طور که نویسنده گان پیشنهاد کردند، این مشاهدات اشاره می کنند که کمپلکس های تکثیر در سطح وزیکول ها حضور دارند یا متناوباً، تنها کسر کوچکی از DMV ها حاوی کمپلکس های تکثیر فعال در یک زمان معین هستند. به نظر می رسد که این مفهوم مهم است که در چه زمانی رمزگشایی صورت گرفته و اینکه آیا و چگونه دستگاه اتوفاژی، مستقیماً و فعالانه برای تکثیر ویروس هپاتیت C درگیرند یا آیا وزیکول های ناشی از اتوفاژی به عنوان یک پدیده هم آیند^۳ نامربوط به فعالیت رپلیکاز ویروس هپاتیت C ظاهر می شود.

از آنجایی که هویت اهداکننده گان غشایی را تعریف می کنیم که از آن ها، وزیکول های اتوفاژی در سلول های آلووده به ویروس هپاتیت C تشکیل می شوند، محتوای این وزیکول ها و اندازه ای

¹ degradative

² kinetics

³ epiphenomenon

فصل ۷: اتوفارزی: یک بازسازی کننده خانگی برای ویروس هپاتیت C

که آن‌ها به وزیکول‌های اتوفارزی متعارف شباخت یا تفاوت دارند، ما بهتر خواهیم فهمید که چگونه پروتئین‌های اتوفارزی می‌توانند همانندسازی و انتشار ویروس هپاتیت C را تنظیم کنند.

قدردانی

نویسنده‌گان از گلن راندال، ایون جیلاس^۱، و فرانسو لوبیک کاست^۲ برای بازخوانی نقادانه از نسخه خطی، و به همکاران بخاطر تشویق و کمک تشکر و قدردانی می‌کنند.

¹ Yvon Jaillais

² François-Loïc cosset

فصل ۸

تنظیم اتوفاژی برای درمان نوع ۱ ویروس نقص ایمنی انسانی

مقدمه

در حال حاضر حدود ۳۵ میلیون نفر در سراسر دنیا مبتلا به نوع ۱ ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) هستند. علیرغم پیشرفت‌های صورت گرفته در درمان ضد رترووویروسی، به ازای هر یک نفر که تحت درمان ترکیبی ضد رترووویروسی (cART) قرار می‌گیرد، دو نفر به تازگی آلوه می‌شوند. سالانه هنوز حدود ۱/۶ میلیون مرگ و میر و ۲/۳ میلیون مورد تاره مبتلا شده که ۲۶۰۰۰۰ مورد آن نوزادان هستند، گزارش می‌شود. علاوه بر این، اگرچه دمانس شدید با cART در حال حاضر غیرمعمول است، اختلال شناختی حرکتی جزئی (MCMD) همچنان یکی از تظاهرات مهم عفونت HIV در حدود ۳۰ درصد از افرادی است که با این ویروس زندگی می‌کنند.

علیرغم تلاش‌های بسیار برای تولید واکسن موثر برای HIV، تا به امروز هیچ واکسنی در اکثر دریافت‌کنندگان، محافظت ایجاد نکرده است. حتی اگر یک واکسن در پیشگیری از عفونت‌های جدید HIV موفق باشد، ممکن است در از بین بردن HIV در افرادی که قبلًا آلوه شده‌اند، مؤثر نباشد. بنابراین، استراتژی‌هایی که برای درمان افراد آلوه به HIV طراحی شده‌اند، بیشتر مورد نیاز هستند. این رویکردها را می‌توان به طور کلی به دو دسته تقسیم کرد: ۱) "درمان عملکردی"، که در آن پس از یک دوره درمانی محدود، بیماران می‌توانند ویروس را کنترل کنند و واپسی

پلاسما غیرقابل تشخیص بوده و ایمنی طبیعی در غیاب درمان حفظ می‌شود. و ۲) "ریشه کن کردن ویروس"، که در آن هیچ عفونت ویروسی در فرد باقی نمی‌ماند. موفقیت هر یک از این روبکردها، احتمالاً مستلزم فعال‌سازی ویروسی از مخازن نهفته، کشتن سلول‌های مخزن، محافظت موثر ضدترورویروسی در سلول‌های آلوده نشده و یا ناظارت کافی ایمونولوژیک برای خنثی کردن و کشتن ویروس‌های در گردش و سلول‌های آلوده است.

مکانیسم‌های متعددی باعث تداوم ویروس در افرادی که درمان ضدترورویروسی با سرکوب پایدار ویروسی دریافت می‌کنند می‌گردد. از جمله آنها، سلول‌های T در حال استراحت آلوده و ماکروفاژهای پنهان آلوده، تکثیر ویروس در سلول‌های تازه آلوده شده، و شکست پاسخ ایمنی میزبان در شناسایی و کشتن سلول‌های آلوده است. اینکه آیا HIV باعث عفونت تاخیری می‌شود یا اینکه باعث عفونت‌های راجعه‌ی low grade می‌شود، بحث برانگیز است. داده‌ها نشان می‌دهند که اگرچه ممکن است عفونت تاخیری در زیرجمعیت‌های سلولی رخ دهد، اما سرکوب پایدار ویروسی همچنان امکان تکثیر low grade ویروس را فراهم می‌کند. اگرچه تاکید زیادی بر روی سلول‌های CD4+ در حال استراحت به عنوان محل ذخیره‌ی HIV شده است، انواع سلول‌های دیگر، از جمله ماکروفاژهای سلولی میکروگلیال و آستروسیت‌های درون CNS نیز احتمالاً مکان‌های مهم تکثیر ویروسی در طول سرکوب cART هستند.

آزمایشگاه ما، بر روی پتانسیل تعديل کشتار درون سلولی HIV از طریق اتوفاژی، به عنوان روبکردن برای کنترل و ریشه کن کردن HIV در مخازن پایدار منمرکز شده است. سه نوع اتوفاژی وجود دارد: اتوفاژی با واسطه چاپرون، میکرواتوفاژی و ماکرواتوفاژی که مورد آخر، نشان دهنده فرآیند اتوفاژی معمولی است که نقش عمدۀ ای در حفظ هموستاز درون سلولی دارد. مشخصه ماکرواتوفاژی (که از این به بعد اتوفاژی نامیده می‌شود) وجود وزیکول دو غشایی است که اتوفاگوزوم نامیده می‌شود و مواد سیتوپلاسمی، از جمله اندامک‌های زیر سلولی مانند میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی را با یک محفظه غیر تخریبی می‌بلعد. سپس این اتوفاگوزوم‌ها، در امتداد میکروتوبول‌ها به سمت مرکز سازمان‌دهی میکروتوبول منتقل می‌شوند و به تزدیکی لیزوژوم‌ها می‌رسند. اتوفاگوزوم‌ها در نهایت با لیزوژوم‌ها ترکیب می‌شوند و اتولیزوجزوم‌ها را تشکیل می‌دهند. اتولیزوجزوم‌ها، امکان تخریب محموله اتوفاژیک را، از طریق هیدرولازهای اسیدی لیزوژوم و بازیافت متعاقب مواد مغذی و غشاها توسط سلول، فراهم می‌کنند.

فصل ۸: تنظیم اتوفازی برای درمان نوع ۱ ویروس نقص ایمنی انسانی ۳۰۰

اتوفازی علاوه بر نقش خود در بقا با تأمین مواد مغذی در هنگام استرس متابولیک یا هیپوکسیک، در محافظت از سلول‌ها در برابر استرس‌های مختلف از جمله داروها، سموم و پاتوژن‌های میکروبی نیز نقش دارد. با این حال، زمانی که اتوفازی گستردگی باشد یا به طور نامناسب فعال شود، می‌تواند به آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نوع I) کمک کند یا به عنوان یک مسیر مرگ سلولی جایگزین (مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نوع II یا مرگ سلولی اتوفازیک) عمل کند. در مرگ سلولی اتوفازیک، تخریب سلولی قبل از وقوع تعییرات هسته‌ای معمول آپوپتوز مشهود است. تجمع اتوفاگوزوم‌ها و پروتئین‌های اتوفازیک در یک سلول نشان دهنده شکست اتوفازی در نجات سلول از استرس توکسیک است. براساس آنچه در مورد اتوفازی غیرطبیعی شناخته شده است، ما در مغز افراد مبتلا به دمانس/آنسفالیت مرتبط با HIV پس از مرگشان، افزایش نشانگرهای اتوفازیک را مشاهده کرده ایم که نشان دهنده‌ی این است که نقايس شناختی مشاهده شده، ممکن است نتیجه اتوفازی نابجا باشد.

اتوفازی جزء مهمی از پاسخ ایمنی میزبان در برابر پاتوژن‌های میکروبی از جمله ویروس‌ها است و در تشخیص و پاکسازی آنها نقش دارد. محصولات تخریب اتوفازیک، بر روی MHC کلاس I و II به منظور نظارت بر ایمنی توسط سلول‌های CD4+ T و CD8+ نمایش داده می‌شوند. اتوفازی توسط بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ بالادست تنظیم می‌شود. این سیگنال‌ها مثل فاکتورهای رشد، گلوکز و اسیدهای آمینه، توسط فعالیت کینازی راپامایسین هدف پستانداران (MTOR) ادغام می‌شوند. MTOR از دو عضو مجزا تشکیل شده است: MTORC1 و MTORC2. MTORC1 رشد سلولی را از طریق اتوفازی و استفاده از ذخایر انرژی کنترل می‌کند و MTORC2 بقای سلولی و سازمان دهی اسکلت سلولی را از طریق تنظیم AKT1 و پروتئین کیناز C آلفا تنظیم می‌کند. مهار MTORC1، با محرومیت از مواد غذایی یا راپامایسین (که به عنوان سیروولیموس شناخته می‌شود)، باعث اتوفازی می‌شود و در بالادست کمپلکس کیناز ۱ فعال کننده اتوفازی (ULK1) unc51 است. در حالی که راپامایسین، یک کمپلکس سه تایی با پروتئین A1 متصل به (FKBP1A) FK506 و MTOR را تشکیل می‌دهد که منجر به مهار سیگنال دهی MTORC1 و القای اتوفازی می‌شود، MTORC2 مستقیماً توسط راپامایسین مهار نمی‌شود و فعالیت فاکتور رونویسی را کنترل می‌کند. از آنجایی که راپامایسین و آنالوگ‌های آن فقط تا حدی MTORC1 و MTORC2 را مهار می‌کنند،

مهارکننده‌های قوی‌تر ممکن است به طور مؤثرتری اتوفاژی راالقا کنند و منجر به کشتن HIV و ریشه‌کنی سلول‌های آلووده شوند.

اگرچه تحقیقات گسترده اهمیت آپوپتوز را به عنوان یک عامل مرگ سلولی مرتبط با عفونت HIV بررسی کرده اند، اما نقش اتوفاژی تا همین اواخر تا حد زیادی نادیده گرفته شده بود. به عنوان یک قانون کلی در عفونت ویروسی، تغییر در فرآیندهای سلولی به علت عفونت ویروسی، باعث تکثیر و گسترش ویروس می‌شود. در بررسی مطالعات منتشر شده، دانستن تمایز بین مطالعاتی که روی رده‌های سلولی موسوم به "پیوسته تغییر شکل دهنده" یا روی شبه ویروس انجام می‌شوند، از مطالعاتی که با استفاده از سلول‌های اولیه و روی ایزوله‌های HIV عفونی انجام می‌شوند، مهم است. سلول‌های تغییر شکل دهنده، تحت هموستاز اتوفاژیک متفاوتی نسبت به سلول‌های اولیه هستند و استفاده از آنها ممکن است به یافته‌هایی منجر شود که در ارزیابی سلول‌های اولیه تأیید نمی‌شوند. به طور مشابه، مطالعه‌ی یک دور تکثیر HIV، اگرچه در تشریح فرآیندهای مولکولی مفید است، اما ممکن است تصویر کاملی از سلول‌هایی که با ویروس با قابلیت تکثیر چند باره آلووده شده‌اند را ارائه نکند.

HIV باعث تخریب اتوفاژی جهت حفظ تکثیر خود می‌شود

از حدود بیش از ۳۵ ژن انسانی که در حال حاضر در اتوفاژی نقش دارند، حداقل ده ژن با تکثیر HIV مرتبط هستند. براس و همکاران (۲۰۰۸)، با استفاده از صفحه نمایش RNAi در مقیاس بزرگ برای شناسایی فاکتورهای مورد نیاز در میزبان برای تکثیر HIV، چهار ژن دخیل در هسته سازی و افزایش طول اتوفاگوزوم‌ها (ATG16L2، ATG12، MAP1LC3B، ATG7) و دو ژن درگیر در عملکرد لیزوژومی (CLN3 و LAPT M5) را شناسایی کردند. ایکلز و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که مهار PIK3R4، ATG4A، ATG5، یا ATG16 RNAi توسط RNAi منجر به مهار تکثیر HIV می‌شود. اگرچه آزمایش‌های فوق در رده‌های سلولی پیوسته انجام شد، آزمایش‌هایی با استفاده از RNAi در مونوسیت/ماکروفاژهای اولیه نیز، BECN1، ATG5 و ATG7 را به عنوان عامل مهم در تکثیر HIV شناسایی کردند. همراه با این یافته‌ها، اسپرت و همکاران نشان دادند که تجمع اتوفاگوزوم‌ها به طور اولیه در ماکروفاژهایی که به علت تماس مزمن با رده‌های سلولی آلووده، دچار عفونت شده اند، صورت می‌پذیرد. علاوه بر این، تصور می‌شود که تجمع HIV روی غشاهای اندوسیتی با آندوزوم‌های در حال بازیافت رخ می‌دهد. اتوفاژی همچنین ممکن است

در ایجاد Gag و تولید ویریون‌های نوپا دخیل باشد؛ زیرا پروتئین‌های مشتق از Gag در ماکروفاژها کلوکالیزه می‌شوند و با LC3B تعامل دارند و در غشاهای غنی‌شده با LC3B-II نیز وجود دارند.

HIV اتوفاژی را در طول عفونت اولیه غیر فعال می‌کند در حالی که اتوفاژی باعث غیر فعال شدن HIV می‌شود

اگرچه HIV ممکن است اتوفاژی را در مراحل اولیه عفونت تنظیم کند، این ویروس باید مراحل پایانی پرتوولیتیک ضد ویروسی و تخریبی اتوفاژی را به منظور جلوگیری از تخریب خود کنترل کند (شکل ۸,۱).

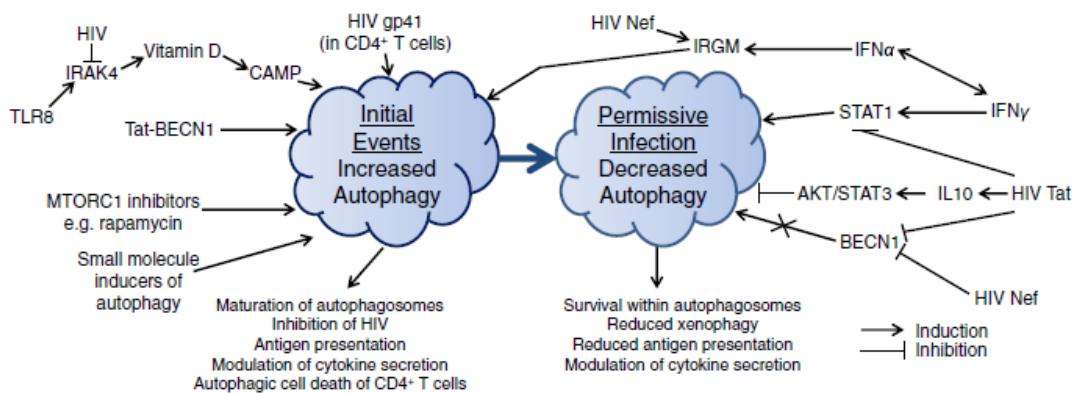
داده‌های آزمایشگاه ما و آزمایشگاه‌های دیگر نشان می‌دهد که HIV، مکانیسم‌هایی را برای مهار تخریب اتوفاژیک در سلول‌های CD4+ T و سلول‌های مونوسیت/ماکروفاژ ایجاد کرده است.

HIV با اتصال به Beclin 1، نقش عمدۀ ای در مهار مراحل پرتوولیتیک اتوفاژی ایفا می‌کند. به عنوان یک نکته قابل توجه، موتیف Nef 174DD، برای کاهش تنظیم CD4 و برهمکنش با دامنه V1 H⁺ ATPase واکوئولی، برای Nef به عنوان یک عامل بلوغ ضد اتوفاژیک عمل کند. علاوه بر این، HIV با کمبود Nef قادر به غلبه بر تخریب اتوفاژی نیست و با کارایی کمتری تکثیر می‌شود. Nef به آمینو اسیدهای ۲۶۷-۲۸۴ در حوزه‌ی ۱ Beclin متعلق می‌شود. این همان ناحیه‌ای است که برای Beclin 1 کافی است تا با اتصال به پروتئین ۱ پاتولوژیک گلژی (GAPR1)، همچنین GLI پاتولوژیک ۲ (GLIPR2)، یعنی همان پروتئینی که با اتصالات لیپیدی در سیتوزول مرتبط است، اتوفاژی را به طور منفی تنظیم کند.

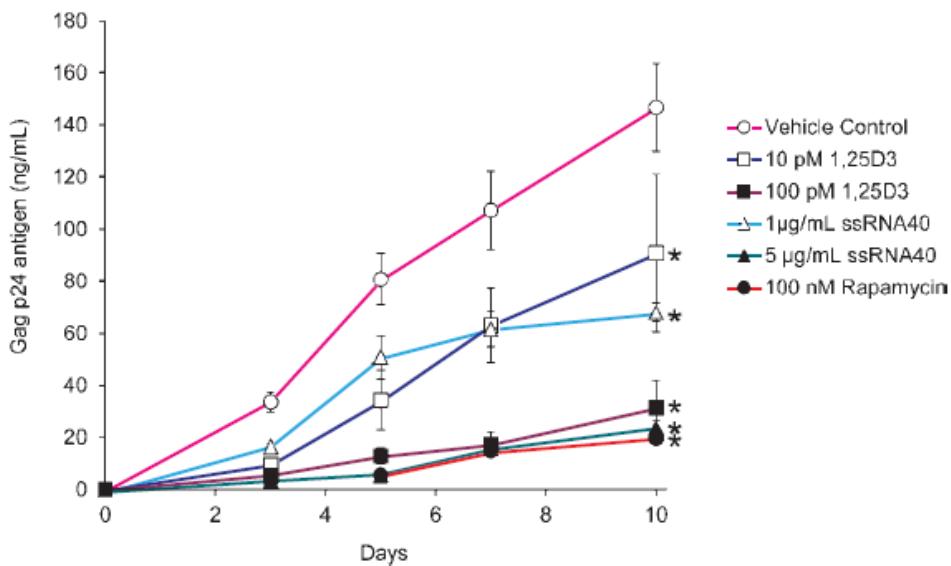
در طول عفونت سلول‌های CD4+ T HIV، تجمع اتوفاگوزوم با مهار اتوفاژی کاهش می‌یابد. با این حال، اتوفاژی هرگز به طور کامل متوقف نمی‌شود زیرا برای بقای سلول مورد نیاز است. نیاز به HIV برای کاهش اتوفاژی توسط یافته‌های آزمایشگاه ما حمایت می‌شود و محرک‌های اتوفاژی، از جمله گرسنگی اسید آمینه و راپامایسین، بر بلوک بلوغ فاگوزوم تحمیلی Nef غلبه کرده و منجر به مهار تکثیر ویروس می‌شوند (شکل ۸,۲، بخش صفحه را ببینید).

همچنین به نظر می‌رسد که Nef، نقش مهمی در تعدیل اتوفاژی، از طریق تعامل با خانواده GTPase M (IRGM) و همچنین Beclin 1 ایفا کند. چنین به نظر می‌رسد که IRGM یا

ارتولوگ آن IRGM1 دارای یک عملکرد پاتوژن است؛ زیرا نقش آنها در تنظیم میزان عفونت است. اتوفازی تنها در طول عفونت شناسایی شده است. به نظر می‌رسد IRGM نقش مهمی در کنترل ویروس‌های RNA دارد. در طول عفونت HIV، تعامل Nef-IRGM منجر به تجمع اتوفاغوزوم‌ها در ماکروفازها می‌شود. بنابراین، به نظر می‌رسد که پروتئین Nef از طریق فعل و انفعالات خود با IRGM و Beclin 1 می‌تواند تکثیر HIV را از طریق تنظیم اتوفازی به خوبی تنظیم کند.



شکل ۱.۸. تعدیل اتوفازی در طول عفونت HIV. در مراحل اولیه عفونت، اتصال HIV یا gp120 و سیگنال دهنده TLR8 باعث ایجاد اتوفازی برای تکثیر ویروس می‌شود. با این حال، در طول عفونت اولیه، اتوفازی از طریق تعامل ۱ Nef-Beclin ۱ و مهار اسیدی شدن اتوفاغوزوم کاهش می‌یابد که باعث تداوم ویروس و بقای سلولی می‌شود. اتوفازی را می‌توان از نظر دارویی در ماکروفازها توسط محرك‌های مختلف اتوفازی مانند مهارکننده‌های MTORC1، پپتید ۱ Tat-Beclin ۱، داروهایی که از طریق اینوزیتول ۵-۱،۴-۵ فسفات عمل می‌کنند، توسط آگونیست‌های TLR8 از طریق القای مسیر ویتامین D، توسط ویتامین ۱۰ با افزایش ترشح IL10 از طریق مهار فسفوربلاسیون STAT1 و با افزایش ترشح IL10 از اتوفازی جلوگیری می‌کند. پروتئین HIV از طریق تعامل با IRGM اتوفازی را افزایش می‌دهد و از طریق جداسازی ۱ Beclin از اتوفازی جلوگیری می‌کند. عفونت HIV سلول‌های CD4+ T، با القای اولیه اتوفازی مرتبط با فعالیت همچو شی پروتئین HIV gp41 همراه است.



شکل ۸،۲. القا کننده‌های مولکولی کوچک اتوفازی، تکثیر HIV را مهار می‌کند. ماکروفازها با ssRNA40 (یک لیگاند TLR8)، α1، ۲۵ دی هیدروکسی کوله کلسیفرول (D31، ۲۵) یا راپامایسین به مدت ۲۴ ساعت قبل از عفونت با HIVBa-L به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌ها شسته و با D31، ۲۵ ssRNA40 یا راپامایسین به مدت ۱۰ روز انکوبه شدند. انتشار خارج سلولی آنتی ژن HIV به سطح سلول در روزهای ۰، ۳، ۵، ۷ و ۱۰ توسط ELISA شناسایی شد.

اتوفازی ناشی از HIV در سلول‌های CD4+ T BYSTANDER منجر به مرگ سلولی می‌شود

عفونت HIV و پیشرفت به ایدز، با کاهش سلول‌های CD4+ T از طریق آپوپتوز سلول‌های اطراف غیر آلوده و کشنن مستقیم سلول‌های آلوده به HIV مشخص می‌شود. دیده شده که اتوفازی، در مرگ سلول‌های اطراف و غیر آلوده به HIV نقش دارد. پروتئین HIV Env از طریق مکانیسمی که شامل تجمع Beclin 1 و القای اتوفازی است، آپوپتوز را در سلول‌های CD4+ T و نورون‌های غیر آلوده القا می‌کند. در سلول‌های CD4+ T، این به فعالیت همجوشی پروتئین HIV gp41 بستگی دارد و مستقل از استفاده‌ی گیرنده‌های مشترک است. اینکه چگونه عملکرد همجوشی gp41 باعث اتوفازی در سلول‌های CD4+ T می‌شود اما در ماکروفازها نه، ناشناخته است.

تعدیل اتوفازی به عنوان مکانیزمی برای اختلالات عصبی مرتبط با HIV

مثال‌های متعددی از اتوفازی وجود دارد که نقش مهم آن را در اختلالات عصبی نشان می‌دهد. جهش‌های دینئین و دیناکتین در موش و انسان منجر به تخریب نورون حرکتی می‌شود. مهار عملکرد داینتین از همچو شی اتوفاگوزوم - لیزوژوم و پاکسازی توده‌های پروتئینی توسط اتوفازی جلوگیری می‌کند. مشخص شده است که اتوفازی نقش مهمی در بیماری‌های دژنراتیو CNS مانند آزاریم، هانتینگتون، پارکینسون و غیره دارد. حذف در DNA میتوکندری، با سندروم Kearns Sayre (KSS) و افتالموپلیٹری مزمن پیشرونده خارجی (CPEO) از طریق فعال شدن اتوفازی مرتبط است. کاهش سطح هانتینگتون محلول و تجمع یافته، از طریق القای اتوفازی توسط راپامایسین، به عنوان یک رویکرد درمانی برای پروتئینوپاتی‌های مختلف، امیدوار کننده است.

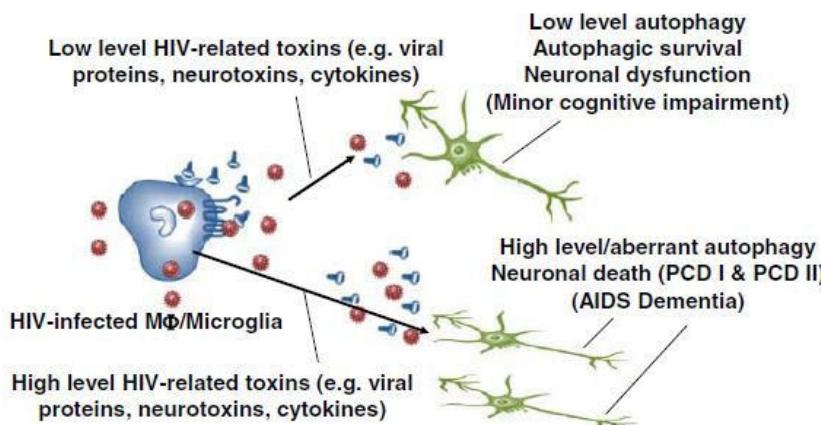
اگرچه HIV مستقیماً نورون‌ها را آلوده نمی‌کند، با اینحال عفونت ماکروفازها و میکروگلیا، همراه با آزاد شدن پروتئین‌های ویروسی و واسطه‌های التهابی، در اختلال عملکرد عصبی و آستروروسیتی نقش دارند و تصور می‌شود که عامل بیماری‌زایی زوال عقل (دمانس) مرتبط با HIV است. به دلیل ارتباط اتوفازی نابجا با اختلالات نورودژنراتیو، آزمایشگاه ما مغز افرادی را که با زوال عقل مرتبط با HIV و آنسفالیت (HIVE) می‌میرند، بررسی کرده است. یافته‌های ما، نشانگرهای افزایش یافته اتوفازی را در مغزهای HIVE، در مقایسه با مغز افراد آلوده به HIV بدون HIVE یا مغزهای کنترلی غیر آلوده به HIV شناسایی کرد. این یافته‌ها با اتوفازی نابجا توصیف شده در مدل SIV بیماری‌های CNS مطابقت دارد. همچنین در ناحیه cART، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد تجمع آمیلوئید ممکن است با داروهای ضد رترو ویروس بدتر شود. این یافته‌ها حاکی از آن است که نشانگرهای اتوفازی در مغز افرادی که با HIVE می‌میرند افزایش می‌یابد. افزایش تجمع بتا آمیلوئید با HAND (اختلال عصبی مرتبط با HIV) پیشنهاد می‌کند که افزایش پروتئین‌های اتوفازیک ممکن است نشان دهنده اتوفازی ناقص بدون تخریب آمیلوئید باشد. شکل ۸,۳ مدل فعلی ما را از چگونگی کمک اتوفازی به اختلال CNS مرتبط با HIV خلاصه می‌کند.

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که فاکتور رونویسی (TFEB)، به عنوان یک تنظیم کننده مرکزی بیوزنر اتوفاگوزوم و لیزوژوم عمل می‌کند و فعال شدن TFEB در طول عفونت HIV ممکن است به توضیح یافته‌های ما کمک کند. داده‌های اولیه ما نشان می‌دهد که عفونت HIV

فصل ۸: تنظیم اتوفازی برای درمان نوع ۱ ویروس نقص ایمنی انسانی

ماکروفاژها، با القای TFEB و تجمع اتوفاگوزوم‌ها و لیزوژوم‌ها همراه است. با این حال، در طول عفونت اولیه، ادغام اتوفاگوزوم‌ها با لیزوژوم‌ها مهار می‌شود که منجر به تجمع این پروتئین‌های اتوفازیک می‌شود. بنابراین، ما معتقدیم که یافته‌های ما در مغز HIV، منعکس کننده‌ی تجمع اتوفاگوزوم‌ها و لیزوژوم‌های مرتبط با اتوفازی معیوب است که می‌تواند منجر به تجمع β -آمیلوئید شود. این یافته‌ها از این فرضیه حمایت می‌کنند که اختلال در اتوفازی در طول عفونت HIV، در پاتوژنی عصبی ایدز مهم است.

داده‌هایی که از نقش اتوفازی در ایجاد و پیشرفت اختلال CNS مرتبط با HIV، همراه با کاهش مداوم عملکرد شناختی با وجود سرکوب cART در دسترس اند، بیشتر بر این احتمال تأکید می‌کند که تعديل اتوفازی ممکن است درمان‌های فعلی HIV برای ریشه کنی ویروس در CNS و همچنین سایر مخازن ویروسی را بهبود بخشد.



شکل ۸.۳. مدل اتوفازی در NeuroAIDS. عفونت HIV در ماکروفاژ‌ها / میکروگلیاها، منجر به مهار اتوفازی می‌شود که از حذف ویروس جلوگیری کرده و بقای سلول را تقویت می‌کند. با عفونت مولد مداوم، پروتئین‌های ویروسی، نوروتوکسین‌ها و سیتوکین‌ها آزاد می‌شود که منجر به القای اتوفازی در نورون‌های غیرآلوده‌ی اطراف می‌شود. با مقادیر متوسط سموم مرتبط با ویروس، سطوح اتوفازی القایی، منجر به بقای پایدار نورون می‌شود، اما عملکرد نورون را تغییر داده و منجر به اختلال شناختی می‌شود. با سطوح بالای محصولات سمی ناشی از ویروس، نورون‌ها به طور قابل توجهی، سطوح پروتئین‌های مرتبط با اتوفازی را با اختلال پیشرونده CNS و ایجاد زوال عقل مرتبط با HIV، افزایش می‌دهند. مواجهه مداوم با سطوح بالای نوروتوکسین‌ها، منجر به سطوح بسیار بالای پروتئین‌های اتوفازیک در نورون‌ها می‌شود که منجر به مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نوع ۱ (آپوپتوز) و نوع ۲ (اتوفازی) و NeuroAIDS پیشرفتنه می‌شود.

چگونه می‌توان از اتوفاژی برای کنترل و ریشه کن کردن HIV استفاده کرد؟

سلول‌ها می‌توانند از اتوفاژی در تعدادی از عملکردهای ضد ویروسی مختلف استفاده کنند. این موارد عبارتند از: کشنن مستقیم پاتوژن مهاجم (گاهی اوقات به عنوان بیگانه خواری شناخته می‌شود)، ارائه آنتی ژن‌های ویروسی درون زا به کمپلکس‌های اصلی سازگاری بافتی و متعاقب آن فعال سازی سیستم ایمنی تطبیقی و تشخیص پاتوژن‌های درون سلولی از طریق تحويل محصولات ویروسی به گیرنده‌های تشخیص الگوی اندوزومی (PRRs) (که مولکول‌های اصلی پاتوژن‌ها را که الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن (PAMPs) نامیده می‌شوند، شناسایی می‌کنند). مدولاسیون اتوفاژی در حال حاضر برای درمان سرطان، بیماری التهابی روده، لنفانژی اولیوماتوز، پروتئینوپاتی‌هایی مانند بیماری هانتینگتون و بیماری‌های عفونی از جمله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در حال بررسی است. آزمایشگاه ما بر روی پتانسیل تعديل اتوفاژی برای بهبود درمان HIV و عوارض مرتبط با HIV با هدف ریشه کنی HIV از میزبان آلوده تمرکز کرده است. ما معتقدیم که از آنجایی که اتوفاژی در سطح سلولی میزبان، برای بهبود کشتار داخل سلولی HIV تکثیر شونده و غیرتکثیر شونده در اندوزوم‌ها موثر است، این پتانسیل را دارد که در ترکیب با داروهای ضد رترووویروسی برای درمان بالقوه عفونت HIV استفاده شود. همچنین، از آنجایی که اتوفاژی یک فرآیند سلولی است، احتمال ایجاد مقاومت ویروسی کمتر است.

با استفاده از مدل ماکروفاژی عفونت اولیه HIV، ما نشان داده‌ایم که عواملی که باعث اتوفاژی می‌شوند، مانند مهارکننده MTORC1 راپامایسین، تکثیر HIV را مهار می‌کنند. کارآزمایی‌های اپیدمیولوژیک و بالینی متعدد نشان داده‌اند که افرادی که در معرض HIV قرار گرفته‌اند، در معرض افزایش خطر عفونت هستند و کمبود ویتامین D با پیشرفت سریع‌تر بیماری در افراد آلوده مرتبط است. علاوه بر این، نوزادانی که از زنان آلوده به HIV متولد می‌شوند، زمانی که مادران سطح ویتامین D پایینی دارند، در معرض خطر ابتلا به عفونت هستند. علاوه بر این، صرف نظر از عفونت HIV، نوزادانی که از زنان مبتلا به کمبود ویتامین D متولد می‌شوند، در معرض خطر بیشتری برای مرگ و میر در ۱۸ ماهگی نسبت به نوزادان متولد شده از زنان با ویتامین D نرمال هستند. این یافته‌ها با مطالعه اخیر ما مطابقت دارد که نشان می‌دهد واریانس ژنتیکی در گیرنده ویتامین D، با پیشرفت سریع‌تر بیماری HIV مرتبط است.

فصل ۸: تنظیم اتوفاژی برای درمان نوع ۱ ویروس نقص ایمنی انسانی ۱۷۵

HIV در اندوزوم‌های دیررس جمع می‌شود و با LC3B کلوکالیزه می‌شود. برای ارزیابی نقش بالقوه اتوفاژی در مهار ۲۵،α۱-دی هیدروکسی کوله کلسيفرون(1,25D3)، توزیع HIV و LC3B را بررسی کردیم. در غیاب تحریک Gag، D31،۲۵ HIV-1 را می‌توان با نشانگر اتوفاگوزومی LC3B کلوکالیزه یافت. با این حال، تقریباً هیچ کولوکالیزاسیونی با لیزوژوم‌های اسیدی شده مشاهده نمی‌شود. در مقابل، ما دریافته‌ایم که به دنبال درمان (1,25D3)، تعداد ذرات Gag کلوکالیزه شده با LC3B یا وزیکول‌های اسیدی شده به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. در آزمایش‌های بعدی که در آن مراحل متوالی در مسیر اتوفاژی را مسدود کردیم، دریافتنیم که القای اتوفاژی با واسطه (1,25D3) در ماکروفازها مسئول مهار تکثیر HIV است. علاوه بر این، ما دریافته‌ایم که در غلظت‌های مرتبط فیزیولوژیکی (1,25D3) یک مهار وابسته به دوز HIV وجود دارد. جالب توجه است که ما همان پاسخ دوز مرتبط با غلظت (1,25D3) را در مهار ماکروفازها آلوده به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مشاهده کرده‌ایم. علاوه بر این، هنگامی که ماکروفازها همزمان با HIV و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس آلوده می‌شوند، هر دو پاتوژن توسط (1,25D3) و سایر محرك‌های اتوفاژی مهار می‌شوند. مهار بستگی به القای اتوفاژی و بلوغ اتوفاگوزومی دارد.

در مطالعات بعدی که با همکاری آزمایشگاه دکتر بث لوین انجام شد، ما توانایی پیتید القاکننده اتوفاژی با قابلیت نفوذ سلولی موسوم به Tat – Beclin 1 را برای مهار HIV بررسی کردیم. پیتید 1 BECN1 از ناحیه Tat-Beclin 1 مشتق شده است که با HIV Nef تعامل دارد و در ناحیه اصلی HIV Tat کونتروگه می‌شود. ما دریافتنیم که این پیتید به طور قابل توجهی از تکثیر HIV در ماکروفازهای اولیه انسانی از طریق القای اتوفاژی جلوگیری می‌کند. این یافته‌ها پتانسیل ایجاد مولکول‌های کوچکی را که پروتئین‌های خاص مرتبط با اتوفاژی را هدف قرار می‌دهند تا در درمان و حذف احتمالی عفونت‌های ویروسی از جمله HIV مورد استفاده قرار گیرند، بر جسته می‌کند.

در مجموع، تحقیقات ما همراه با تحقیقات دیگر نشان می‌دهد که القاکننده‌های اتوفاژی تکثیر HIV را مهار می‌کنند و به عنوان درمان کمکی برای درمان HIV و عفونت‌های فرستطلبه مرتبط با آن، پتانسیل دارند. برای گسترش این رویکرد، ما معتقدیم که مدولاسیون اتوفاژی در هنگام در نظر گرفتن استراتژی درمانی برای HIV پتانسیل زیادی دارد. ریشه کنی آشکار HIV از یک بیمار آلوده به دنبال پیوند مغز استخوان از یک هموزیگوت CCR5Δ32، پتانسیل درمان

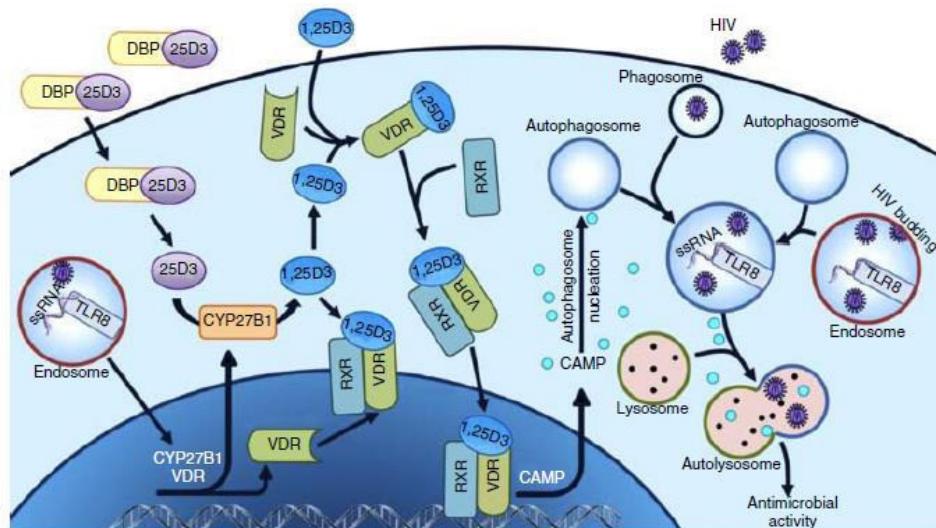
بیماران آلوده به HIV را دوباره برجسته می‌سازد. اینکه چه تعریفی برای درمان HIV باید بیان شود، بحث برانگیز است. اکثرًا موافقند که یک درمان موفق حداقل نیازمند بهبود دائمی بیماری در غیاب درمان ضد رتروویروسی است. استراتژی درمان بهینه منجر به حذف کامل ویروس از بدن با DNA و RNA ویروسی می‌شود که دیگر با سیستم ایمنی طبیعی مرتبط نیست. کارشناسان HIV همچنین پیشنهاد کرده‌اند که یک درمان عملکردی ممکن است قابل قبول باشد. در چنین سناریویی، ویروس ممکن است همچنان در میزان وجود داشته باشد. با این حال، شواهد پایداری مبنی بر عدم تکثیر ویروسی و سیستم ایمنی طبیعی بدون نیاز به درمان وجود دارد. استراتژی‌های درمانی متعددی از جمله فعال‌سازی مجدد ویروس در سلول‌های T در حال استراحت، مهندسی سلول‌ها برای ناتوانی در آلودگی، کشتن ویروس در سلول‌های در حال استراحت، اصلاح سلول‌ها برای جلوگیری از تکثیر درون سلولی ویروس و القای کنترل ایمنی ویروس، ارائه شده است. همچنین، یک استراتژی برای جلوگیری از فعال شدن مجدد ویروس از مخازن نهفته نیز بیان شده است. بررسی هر یک از این رویکردها از حوصله این فصل خارج است. با این حال، ما معتقدیم که القای اتوفاژی در بیماران در حین مصرف داروهای ضد رتروویروسی، این پتانسیل را دارد که نقش مهمی در بسیاری از این استراتژی‌ها ایفا کند.

اتوفاژی چگونه ممکن است در درمان HIV-1 نقش داشته باشد؟ در بیمار با ایمنی کاملاً سرکوب شده، القای اتوفاژی، پتانسیل ریشه‌کن کردن ویروس را از سلول‌های CD4+ و همچنین سایر مکان‌های احتمالی ماندگاری HIV، از جمله ماکروفازها و سلول‌های میکروگلیال در سیستم عصبی مرکزی دارد (شکل ۸,۵). به طور مشابه، القای بیش از حد اتوفاژی این پتانسیل را دارد که ترجیحاً سلول آلوده را از بین ببرد در حالی که در صورت انتشار ویروس عفونی از سلول آلوده در حال مرگ، محافظت بیشتری را به سلول‌های حساس غیرعفونی می‌افزاید. علاوه بر این، اتوفاژی نقش مهمی در ارائه آنتی ژن کلاس I و II MHC دارد. بنابراین، القای اتوفاژی می‌تواند پاسخ ایمنی میزان به ویروس را بهبود بخشد و در دستیابی به "درمان عملکردی"، اگر نه ریشه کنی ویروس، کمک کند. داروهای متعددی از جمله داروهایی که قبلاً توسط FDA تأیید شده است و همچنین داروهایی که در حال حاضر در حال آزمایش‌های بالینی برای سایر بیماری‌های هدفمند هستند، پتانسیل این را دارند که در توسعه یک استراتژی درمانی مفید باشند. اینها شامل مهارکننده‌های MTOR، مهارکننده‌های PI3K و مهارکننده‌های هیستون داستیلاز هستند.

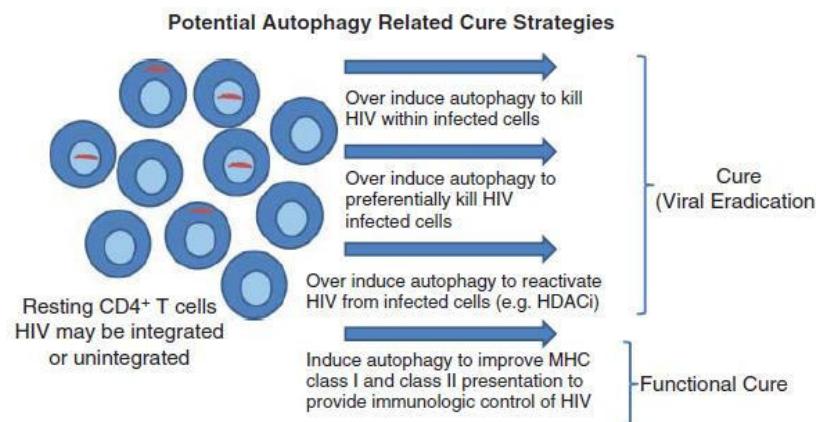
فصل ۸: تنظیم اتوفاژی برای درمان نوع ۱ ویروس نقص ایمنی انسانی ۱۷۷

آزمایشگاه ما در حال حاضر در حال ارزیابی پتانسیل این دسته از داروها و همچنین سایر داروها برای استفاده از پتانسیل آنها در استراتژی درمانی HIV است.

به طور خلاصه، تحقیقات ما و سایرین، اتوفاژی را به عنوان یک مکانیسم مهم درگیر با تکثیر و پاتوژن HIV معرفی کرده است. اگرچه HIV در ابتدا اتوفاژی را برای افزایش تکثیر آن القا می‌کند، در طول عفونت اولیه، ویروس اتوفاژی را کاهش می‌دهد تا بقای سلولی را تقویت کند و از تخریب اتوفاگوزومی جلوگیری کند. القای اتوفاژی از تکثیر HIV جلوگیری می‌کند. با توجه به نقش اصلی اتوفاژی در عفونت و بقای HIV، مدولاسیون اتوفاژی، پتانسیل زیادی برای کمک به کنترل و ریشه‌کنی بعدی HIV از افراد آلوده به ویروس دارد. آزمایشات بالینی برای اثبات سودمندی این رویکرد، ضروری خواهد بود.



شکل ۸.۴. نقش ویتامین D، اتوفاژی و CAMP در اندوزوم‌های HIV. رشد HIV با واسطه TLR8 در مهار HIV نیز از طریق فاگوسیتوز وارد می‌شود. این فاگوزوم‌ها با اتوفاگوزوم‌هایی که در آنها TLR8 وجود دارد، ترکیب می‌شوند. ژنوم HIV ssRNA را می‌شناسد که بیان سیتوکروم P450، خانواده ۲۷، زیرخانواده B، پلی پپتید ۱ (CYP27B1) و گیرنده ویتامین (VDR) D (1,25D3) را برمی‌انگیزد. CYP27B1 ۱α، CYP27B1 ۱β، ۱,25D3 غیر فعال را به (1,25D3) فعال، هیدروکسیله می‌کند. (1,25D3) بیان CAMP را القا می‌کند، احتمالاً از طریق اتصال VDR، که با گیرنده رتینوئید X (RXR) هترودیمریزه می‌شود و به طور مستقیم، رونویسی را با اتصال به عنصر پاسخ ویتامین (VDRE) D توالی واقع در بالادرست ژن CAMP تنظیم می‌کند. بیان CAMP هم برای بیوژن اتوفاگوزومی و هم فاگولیزوژوم مورد نیاز است، که منجر به کشتن پاتوژن‌های میکروبی از طریق اتوفاژی می‌شود.



شکل ۸,۵. استراتژی‌های درمانی بالقوه مرتبط با اتوفاژی. چندین استراتژی بالقوه درمان HIV می‌تواند از القای بیش از حد اتوفاژی استفاده کند. از جمله: کشتن HIV در سلول آلووده، (ترجیحاً کشتن سلول آلووده در حالی که سلول‌های غیر آلووده را حفظ می‌کند) فعال سازی مجدد HIV از سلول‌های آلووده و بهبود ارائه MHC کلاس I و کلاس II برای دستیابی به یک درمان عملکردی.

فصل ۹

اتوفاژی در سلول عفونی: بینش هایی از باکتری های بیماری زا

مقدمه

اتوفاژی که در ابتدا به عنوان یک فرآیند تخریبی و غیرانتخابی در پاسخ به محدودیت‌های مختلف مواد مغذی کشف شد، یک فرآیند بسیار انتخابی برای تخریب پاتوژن‌های درون سلولی هم هست. در نتیجه، اتوفاژی به عنوان یک جزء حیاتی از ایمنی خودگردان سلولی در نظر گرفته می‌شود. از سوی دیگر، برخی از پاتوژن‌های باکتریایی، مکانیسم‌هایی را برای جلوگیری یا دستکاری اتوفاژی به نفع خود در طول عفونت ایجاد کرده‌اند. بنابراین، برای بهره‌برداری از اتوفاژی برای درمان‌های بالینی، درک کامل تعاملات اتوفاژی – باکتری در داخل بدن حیاتی خواهد بود.

اتوفاژی – تعاملات باکتریایی

مطالعات اخیر با استفاده از سالمونلا، مایکوباكتریا، لژیونلا، لیستریا و شیگلا، برهمکنش‌های جدید اتوفاژی – باکتریایی را برجسته کرده‌اند و نشان می‌دهند که در پاسخ به تهاجم باکتری، اتوفاژی می‌تواند نقش گسترده‌تری در میانجی گری نتیجه بیماری، نسبت به انتقال باکتری به لیزوژوم داشته باشد. در اینجا، ما بر روی این الگوهای باکتریایی تمکن می‌کنیم تا بینش‌های

جديد و شواهد in vivo برای نقش حياتي اتوفاژي در دفاع ميزبان در برابر عفونت باكتريائي را ارائه دهيم.

سالمونلا تيفي موريوم

سالمونلا انتريكا سروتipe تيفي موريوم (*S. Typhimurium*) يك باكتري گرم منفي مهاجم است که مسئول عفونتهای غذایی است. پس از جذب فاگوسیتی، سالمونلا با بیوژنر طبیعی فاگولیزوزومها تداخل می‌کند. این باكتري بیشتر در داخل يك واکوئل حاوی سالمونلا (SCV) تکثیر می‌شوند، در حالی که برخی از باكتريها (۲۵٪ آنها) می‌توانند سیتوزولی شوند. توانایی سالمونلا در ایجاد SCV مخصوص خود و فرار به سیتوزول، آن را به مدلی آموزنده برای مطالعه اتوفاژی – تعاملات باكتريائي تبدیل کرده است.

مطالعات اولیه با استفاده از سالمونلا، ارتباط بین عفونت و اتوفاژی انتخابی را نشان می‌دهند و نقش مهمی را برای اتوفاژی انتخابی در محدودیت تکثیر سالمونلا در سیتوزول برجسته کرده‌اند. به طور خاص، پروتئین‌های گیرنده اتوفاژی p62 (SQSTM1، sequestosome1) و OPTN (optineurin) اعضای یک کلاس جدید از (پروتئین نقطه هسته ای، ۵۲ کیلو دالتون) و (PRRs) هستند. این پروتئین‌ها که به عنوان گیرنده‌های شبه گیرنده‌های تشخيص الگو (SLRs) شناخته می‌شوند، سوبسترای یوبی‌کوئیتین شده مرتبط با باكتري‌ها را تشخيص می‌دهند، به اعضای خانواده ATG8 (LC3s یا GABARAPs) متصل می‌شوند و میکروب‌ها را برای تخریب لیزوژومی مورد هدف قرار می‌دهند. با این حال، اتوفاژی با واسطه p62 همیشه ضد باكتري نیست و در برخی موارد می‌تواند تکثیر سالمونلا سیتوزولی را افزایش دهد. اگرچه منبع یوبی‌کوئیتین‌اسیوون زمینه ای برای اتوفاژی ضد سالمونلا مبهم باقی مانده است، در مطالعات اخیر نشان داده شده که LRSAM1 یک لیگاز E3 برای اتوفاژی وابسته به یوبی‌کوئیتین سالمونلا است. تولید گونه‌های نیتروژن و اکسیژن که ۳'-نیترو‌گوانوزین ۵'-monoفسفات حلقوی (nitro-cGMP-8) تولید می‌کند، می‌تواند سطح باكتري‌ها را تغییر دهد و Ubiquitination را هدایت کند. جالب توجه است که سالمونلا می‌تواند با اثر یوبی‌کوئیتین‌اسیوون مقابله کند و اتوفاژی را مهار کند. سالمونلا با بیان SseL deubiquitinase، به عنوان عامل سیستم ترشحی نوع III، می‌تواند اتوفاژی انتخابی ساختارهای یوبی

کوئیتینه سیتوزوولی را مهار کند که منجر به عفونت، کاهش شار اتوفاژیک و ترویج تکثیر باکتری می شود.

تهاجم سالمونلا همچنین می تواند مسیر اتوفاژی را قبل از فرار سیتوزوولی ایجاد کند. درگیر شدن گیرنده های شبه toll (TLR) و تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS) برای به کار گیری دستگاه اتوفاژی به فاگوزومها و برای تحويل باکتری به لیزوژوم ضروری است. پس از آسیب به غشای فاگوزومی، گیرنده خطر 8 Galectin NDP52 توسط شناسایی می شود که ترجیحاً به LC3C از خانواده ATG8 متصل می شود و از فرار سیتوزوولی و تکثیر باکتری جلوگیری می کند. پروتئین های خانواده ATG8 که برای ازدیاد طول و بسته شدن غشای اتوفاگوزومی حیاتی هستند، در ابتدا به عنوان پروتئین های اضافی در نظر گرفته می شوند. با این حال، تعامل ترجیحی NDP52-LC3C ممکن است منعکس کننده یک لایه مهم از ویژگی زیرینایی اتوفاژی باکتریایی باشد. تشخیص آسیب غشایی ناشی از سالمونلا ممکن است به سیگنال دهنده ای اسیل گلیسرول (DAG) نیز نیاز داشته باشد که اتوفاژی و پاکسازی پاتوژن را فعال می کند. آسیب غشای میزبان توسط سالمونلا همچنین گرسنگی اسید آمینه ای درون سلولی را فعال می کند که خود محرك ثابت اتوفاژی است. گرسنگی اسید آمینه ای را می توان یک پاسخ ایمنی جدید به باکتری های داخل سلولی در نظر گرفت، اما تحقیقات بیشتری برای درک کامل نقش وضعیت تعذیه سلول میزبان بر بقای پاتوژن مورد نیاز است.

در موافقت با شواهد به دست آمده در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از سلول های بافتی کشت داده شده، شواهدی مبنی بر نقش حیاتی اتوفاژی در دفاع میزبان در برابر عفونت سالمونلا در داخل بدن، با استفاده از چندین مدل حیوانی اثبات شده است (قسمت ۹.۱). اولین نشانه ای محافظت ژن های اتوفاژی در برابر عفونت *S. Typhimurium* با استفاده از دو ارگانیسم مدل ژن های مربوط به اتوفاژی (ATG)، به دفاع ضد باکتریایی میزبان در داخل بدن کمک کردند. پارکین لیگاز یوبیکوئیتین، یک لیگاز E3 است که برای اولین بار برای ترویج اتوفاژی میتوکندری (به عنوان مثال میتوفاژی) نشان داده شد. مطالعات اخیر که نقش حفاظت شده تکاملی پارکین را در اتوفاژی باکتری ها نشان می دهند، مشخص کرد که *C. elegans* و مگس سرکه با کمبود پارکین به سالمونلا حساس هستند. موس ها با حذف اختصاصی سلول های اپیتلیال روده از ATG5، (پروتئینی حیاتی برای افزایش طول اتوفاگوزوم) نقش مهم اتوفاژی باکتریایی در

سلول‌های اپیتلیال روده در داخل بدن را نشان دادند. به طور قابل توجهی، موش‌های دارای کمبود Atg5 در مقایسه با موش‌های کنترلی، انتشار سالمونلایی بیشتری در مکان‌های خارج روده‌ای داشتند. نتایج مشابهی با استفاده از موش‌های فاقد ATG16L1، (پروتئینی که برای تشکیل فاگوفور لازم است و با بیماری کرون مرتبط است) به دست آمد. این مطالعات با هم نشان می‌دهند که اتوفاژی سلول‌های اپیتلیال روده برای محافظت در برابر تهاجم بافتی توسط سالمونلا ضروری است.

Box 9.1 Animal models used to study bacterial autophagy *in vivo*

Animal models used to study bacterial autophagy *in vivo* include *Dictyostelium discoideum* (amoeba), *Caenorhabditis elegans* (nematode), *Drosophila melanogaster* (fruit fly), *Danio rerio* (zebrafish) and *Mus musculus* (mouse).

The first *in vivo* report of autophagy in host defence came from *Listeria* infection of *Drosophila*, and autophagy was shown to control bacterial infection (Yano et al., 2008). In agreement with this, model organisms *Dictyostelium*, *C. elegans* and zebrafish revealed a critical role for autophagy in resistance to *Salmonella* (Jia et al., 2009), *Legionella* (Tung et al., 2010), *Shigella* (Mostowy et al., 2013), and *Mycobacterium marinum* (van der Vaart et al., 2014). Studies of bacterial autophagy using mice have been difficult because knockout of the murine core autophagy machinery is embryonic lethal (Mizushima and Komatsu, 2011). However, several conditional autophagy-deficient mice are now available, and these strains have significantly contributed to the infection field. Atg5-deficient mice have been infected with *M. tuberculosis* (Castillo et al., 2012; Watson et al., 2012) and *Salmonella* (Benjamin et al., 2013); Atg7-deficient mice have been infected with *M. bovis* BCG (Bonilla et al., 2013); and Atg16L-deficient mice have been infected with *Salmonella* (Conway et al., 2013), uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) (Wang et al., 2012a), and *Citrobacter rodentium* (Marchiando et al., 2013). Strikingly, the impact of autophagy depends on the pathogen under investigation. In the case of mycobacteria and *Salmonella*, it is clear that autophagy restricts bacterial replication *in vivo* (Benjamin et al., 2013; Bonilla et al., 2013; Castillo et al., 2012; Conway et al., 2013; Watson et al., 2012). By contrast, analysis of UPEC and *C. rodentium* indicates that autophagy deficiency confers host protection *in vivo* against infection (Marchiando et al., 2013; Wang et al., 2012a). How UPEC and *C. rodentium* may co-opt ATG16L1 and avoid autophagic degradation remains to be fully determined.

قسمت ۹.۱ مدل‌های حیوانی مورد استفاده برای مطالعه اتوفاژی باکتریایی در داخل بدن مدل‌های حیوانی مورد استفاده برای مطالعه اتوفاژی باکتریایی در داخل بدن شامل *Caenorhabditis elegans* (آمپا)، *Dictyostelium discoideum* (آمبا)، *Danio rerio* (گورخر ماهی) و *Mus musculus* (موس).

فصل ۹: اتوفاژی در سلول عفونی: بینش هایی از باکتری‌های بیماری‌زا

اولین گزارش in vivo از اتوفاژی در دفاع میزبان از عفونت لیستریا مگس سرکه بود و اتوفاژی برای کنترل عفونت باکتریایی نشان داده شد. در تایید این مورد، ارگانیسم‌های مدل *C. elegans*, *Dictyostelium* و گورخرماهی نقش مهمی را برای اتوفاژی در مقاومت به سالمونلا، لژیونلا، شیگلا و مایکوباکتریوم مارینوم نشان دادند. مطالعات اتوفاژی باکتریایی با استفاده از موش دشوار بوده است، زیرا حذف دستگاه اتوفاژی در هسته سلوی موش کشنده است. با این حال، چندین موش با کمبود اتوفاژی در حال حاضر در دسترس هستند، و این گونه‌ها به طور قابل توجهی در زمینه عفونت کمک کرده‌اند. موش‌های فاقد Atg5 به *M. tuberculosis* و *Salmonella* آلوده شده‌اند. موش‌های دارای کمبود Atg7 با *M. bovis* BCG آلوده شده‌اند. و موش‌های فاقد Atg16L به سالمونلا، اشرشیا کولی اروپاتوژنیک (UPEC) و سینتروباکتر رودنتیوم آلوده شده‌اند. به طور قابل توجهی، تأثیر اتوفاژی، به پاتوژن مورد بررسی بستگی دارد. در مورد مایکوباکتریوم‌ها و سالمونلاها، واضح است که اتوفاژی تکثیر باکتری‌ها را در داخل بدن محدود می‌کند. در مقابل، تجزیه و تحلیل *C. rodentium* و UPEC نشان می‌دهد که کمبود اتوفاژی، حفاظت میزبان را در داخل بدن در برابر عفونت ایجاد می‌کند. اینکه چگونه UPEC و *C. rodentium* ممکن است ATG16L1 را انتخاب کنند و از تخریب اتوفاژیک جلوگیری کنند، هنوز به طور کامل مشخص نشده است.

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، عامل ایجاد کننده سل انسانی، به خوبی شناخته شده است و با متوقف کردن بلوغ فاگوزومی در ماکروفاژها زنده می‌ماند و تکثیر می‌شود. از سوی دیگر، چندین مطالعه نشان داده‌اند که وقتی اتوفاژی برای فاگوزوم‌ها به کار گرفته می‌شود، می‌تواند تکثیر مایکوباکتریوم را محدود کرده و باعث تخریب باکتری شود. برای این فرآیند، یوبی کوئیتیناسیون، p62 و فسفوریلاسیون 26 p توسط کیناز متصل به (TBK1) ضروری است. تصور می‌شود که جذب پروتئین‌های ریبوزومی با واسطه یوبیکوئیتن و p62 از سیتوزول، خواص ضد میکروبی را به اتوفاگولیزوزوم‌های مایکوباکتریایی می‌دهد (یعنی فاگوزوم‌هایی که توسط یک غشای دوگانه با احاطه شده‌اند). ویتامین D همچنین برای فعال سازی اتوفاژی، بلوغ فاگوزوم‌ها و فعالیت ضد میکروبی در برابر *M. tuberculosis* مورد نیاز است.

اینکه چگونه فاگوزوم‌های حامل *M. tuberculosis* توسط اتوفاژی شناسایی می‌شوند، به طور کامل توضیح داده نشده است. ESAT-6، پروتئین اصلی ترشح شده از طریق سیستم ترشح ESX-1/Nou VII این باکتری، برای تشکیل منافذ و فعال سازی اتوفاژی حیاتی است. با این حال، ESAT-6، همراه با سایر عوامل باکتریایی، می‌تواند شار اتوفاژیک را مسدود کند. اگرچه نقش دقیق ESAT-6 در اتوفاژی هنوز مشخص نشده است، اتوفاژی می‌تواند در مایکوباكتریوم توبرکلوزیس، DNA را هدف قرار دهد که توسط ESX-1 به سیتوزول منتقل شده است. باکتری شناسایی شده توسط STING (محرك ژن‌های اینترفرون (IFN) منجر به ubiquitination جذب p62 و NDP52 و باعث تخریب *M. tuberculosis* می‌شود. پارکین همچنین باعث تخریب اتوفاژیک *M. tuberculosis* می‌شود. اینکه آیا پارکین باکتری‌ها، بقایای غشای آسیب دیده یا میتوکندری‌های جذب شده برای فاگوزوم مایکوباكتریایی را تشخیص می‌دهد یا خیر، شایسته بررسی است. نابودی LRSAM1 (یک لیگاز یوبیکوئیتین که در یوبیکوئیتیناسیون سالمونلا)، هیچ تاثیری بر یوبی کوئیتیناسیون *M. tuberculosis* توسط پارکین نداشت و این موضوع، نقش‌های متفاوتی را برای هر یک از این لیگازهای یوبیکوئیتین پیشنهاد می‌کند.

در شرایط آزمایشگاهی، اتوفاژی به وضوح به عنوان یک فرآیند ایمنی ذاتی در برابر *M. tuberculosis* عمل می‌کند. نقش آن در داخل بدن به تازگی مورد بررسی قرار گرفته است (قسمت ۹,۱). موش‌های دارای کمبود Atg5 بسیار مستعد ابتلا به عفونت *M. tuberculosis* هستند. این موضوع نشان می‌دهد که (۱) تحويل اتوفاژیک *M. tuberculosis* به لیزوزوم به محدودیت باکتریایی کمک می‌کند و (۲) اتوفاژی می‌تواند با سرکوب پاسخ التهابی به عفونت تأثیرات بیشتری در دفاع میزبان داشته باشد. نقش دیگر اتوفاژی در کنترل عفونت مایکوباكتریایی با استفاده از موش‌هایی، با حذف اختصاصی میلوقیتی ATG7 (آنزیم فعال کننده کونژوگاسیون ATG8) شناخته شد. علاوه بر پاکسازی مایکوباكتری‌های داخل سلولی، اتوفاژی همچنین می‌تواند فاگوسیتوز *M. tuberculosis* را با تعديل بیان گیرنده‌ها و گلیکوپروتئین‌های گذرنده که به عنوان PRR عمل می‌کنند، تنظیم کند. در توافق با اتوفاژی که عامل اصلی تعیین کننده مقاومت میزبان در برابر عفونت *M. tuberculosis* in vivo است، هم مگس سرکه و هم موش‌های دارای کمبود پارکین حساسیت بیشتری نسبت به عفونت مایکوباكتریایی دارند.

لژیونلا نوموفیلا

لژیونلا یک پاتوژن باکتریایی گرم منفی است که به طور طبیعی در محیط های آبی کلونیزه می شود و همچنین می تواند ریه های انسان را نیز آلوده کند. در داخل ماکروفازهای انسانی، فاگوژوم های حاوی *L. pneumophila* با وزیکول هایی از شبکه آندوپلاسمی (ER) مرتبط می شوند تا واکوئل های حاوی لژیونلا (LCVs) تولید شوند که باعث تکثیر باکتریایی می شود. در ماکروفازهای موش های A/J که به دلیل کمبود گیرنده NOD مانند Naip5 (NLR) نسبت به عفونت آسیب پذیر هستند، لژیونلا شروع به تکثیر در LCV های مشتق از ER می کند. تعامل بین اتوفاژی و *L. pneumophila* داخل سلولی برای اولین بار توسط مطالعات مورفولوژیکی ماکروفازهای A/J آلوده بررسی شد و نشان داد LCVs توسط غشای دو گانه ER محدود می شوند، در با ATG7 و LC3 کلوکالیزه می شوند و به آرامی نشانگرهای لیزوژومی را به دست می آورند. در مقابل، در ماکروفازهای موش های C57BL/6 که به عفونت مقاوم هستند، واکوئل های لژیونلا به طور موقت با ATG7 و LC3 مرتبط می شوند و به راحتی با لیزوژومها ترکیب می شوند. علاوه بر این، در مقایسه با سلول هایی که فاقد پروتئین های C57BL/6 نیز Naip5 NLR یا pro-NLRC4 یا caspase-1 هستند، ماکروفازهای نوع IV این باکتری ارائه می دهند. مشابه اتوفاژی سریع و قوی که با مقاومت ماکروفازهای موش مرتبط است، اتوفاژی، تکثیر *L. pneumophila* را در *Dictyostelium amoeba* محدود می کند.

لژیونلا، از T4SS خود برای دستکاری مسیرهای میزبان استفاده می کند. در این راستا که مسیر اتوفاژی به تشکیل LCV کمک می کند، عوامل متعدد *Rab1* *L. pneumophila* T4SS فعالیت (یک GTPase) که باعث افزایش بیوژنز اتوفاگوزمها می شود) را دستکاری می کند. علاوه بر این، مطالعات بیوشیمیایی اخیر پیش بینی می کند که لژیونلا از تأثیر T4SS RavZ خود برای مهار بلوغ LCV شبیه اتوفاگوزم استفاده می کند. به طور خاص، RavZ به عنوان یک سیستین پروتئاز عمل می کند که پروتئین های ATG8 متصل به فسفاتیدیل اتانول آمین (PE) را، در غشاها اتوفاگوزوم و در شرایط آزمایشگاهی جدا می کند. RavZ با غیرفعال سازی برگشت ناپذیر پروتئین های ATG8، اتوفاژی را مهار می کند و اولین نمونه از یک عامل باکتریایی است که مستقیماً دستگاه اتوفاژی را دستکاری می کند. برای تعیین نقش دقیق اتوفاژی در طول عفونت

لژیونلا در ریه، نیازمند بررسی بیشتر، با استفاده از مدل‌های حیوانی مقاوم و غیر مقاوم به این عفونت هستیم.

لیستریا مونوستیتوژن

لیستریا مونوستیتوژن یک باکتری گرم مثبت است که زندگی درون سلولی آن به طور گستردۀ مورد مطالعه قرار گرفته است. پس از تهاجم به سلول‌های میزبان، لیستریا، با بیان سیتوتوکسین منفذساز لیستریولیزین (LLO) O از فاگوزوم خود فرار می‌کند. سپس باکتری‌های سیتوزولی، با پلیمریزاسیون دم‌های اکتین از طریق بیان ActA، (پروتئینی سطحی که کمپلکس Arp2/3 را فعال می‌کند) تحرک می‌یابند. لیستریا در سیتوزول می‌تواند با بیان InlK، ActA و فسفولیپازهای PlcA و PlcB از آتوفاژی جلوگیری کند. علاوه بر پلیمریزاسیون دم اکتین، ActA از ubiquitination و جذب p62 و NDP52 به لیستریا جلوگیری می‌کند (قسمت ۹.۲). شناسایی آتوفاژیک لیستریا توسط InlK (یک پروتئین سطحی باکتریایی که فقط در داخل بدن بیان می‌شود و پروتئین اصلی ریبونوکلئوذرات سلولی vaults را جذب می‌کند) جلوگیری می‌شود. PlcA و PlcB می‌توانند با کاهش سطوح سلولی فسفاتیدیل ۳-فسفات (PI3P) از هدف قرار داده شدن باکتری‌های سیتوزولی توسط آتوفاژی جلوگیری کنند و در نتیجه شار آتوفاژیک و پاکسازی باکتری را کاهش دهند.

Box 9.2 Autophagy–cytoskeleton interactions revealed by bacterial pathogens

Interactions between autophagy and the four components of the cytoskeleton (actin, microtubules, intermediate filaments, septins) are poorly understood. Detailed study of cytoskeleton manipulation by bacterial pathogens promises to reveal new insights into autophagy–cytoskeleton interactions, as well as unexpected links between autophagy and the cytoskeleton in uninfected host cells.

فصل ۹: اتوفازی در سلول عفونی: بینش هایی از باکتری های بیماری زا

۱۸۷

- Proteins involved in actin-based motility have been linked to autophagy. In the case of *Listeria*, the polymerization of actin by ActA inhibits bacterial destruction by autophagy (Mostowy et al., 2011; Yoshikawa et al., 2009). By contrast, in the case of *Shigella*, the polymerization of actin by IcsA/N-WASP is required for bacterial autophagy (Mostowy et al., 2010, 2011). These observations suggest that *Listeria* and *Shigella* are recognized by different autophagy pathways, and the precise role of actin in autophagy differs between pathways.
- Microtubules enable vesicle trafficking required for autophagy (Monastyrskaya et al., 2009) and are also targeted by some bacterial pathogens to manipulate cellular processes (Radhakrishnan and Splitter, 2012; Yoshida and Sasakawa, 2003). Examples include destabilization of the microtubule cytoskeleton by *Shigella* equipped with VirA (Yoshida et al., 2006) or stabilization of the microtubule cytoskeleton by *Salmonella* using the T3SS effector SifA (Brumell et al., 2002). It is likely that pathogen interference with microtubules has a profound impact on autophagy, although this hypothesis has yet to be tested directly.
- In a noninfection setting, the intermediate filament vimentin has been shown to suppress autophagy by interacting with ATG6 (Beclin 1), a protein crucial for autophagy initiation (Wang et al., 2012b). It is tempting to speculate that pathogens such as *Chlamydia trachomatis* that manipulate intermediate filaments for intracellular survival (Kumar and Valdivia, 2008) can also manipulate autophagy.
- Experiments with *Shigella* and *M. marinum* have shown that septins form cage-like structures and target bacteria to autophagy (Mostowy et al., 2010, 2011, 2013). Although the precise role of septins in autophagy remains to be determined, studies have clearly demonstrated that septins scaffold the autophagy machinery around actin-polymerizing bacteria (Figure 9.1, in the Plate Section). Whether bacterial pathogens can exploit septin assembly to counteract autophagy is not yet known.

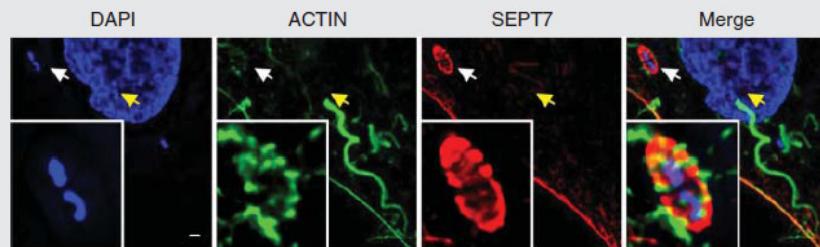


Figure 9.1. Immunofluorescence microscopy of HeLa cells infected with *Shigella*, highlighting the fact that cytosolic *Shigella* can form actin tails or recruit septin cages. DAPI (blue), F-actin (green), and SEPT7 are shown (red). Note the *Shigella*-actin tail (yellow arrow) and the *Shigella*-septin cage (white arrow and inset image). Scale bar, 2 μ m. Adapted from Mostowy, S. Autophagy and bacterial clearance: a not so clear picture. *Cell Microbiol* 15, 395–402. Copyright © 2013, John Wiley & Sons, Inc. (see Plate Section).

باکس ۹,۲ اتوفازی – تعاملات اسکلت سلولی توسط پاتوژن های باکتریایی آشکار شد. فعل و انفعالات بین اتوفازی و چهار جزء اسکلت سلولی (اکتین، میکروتوبول ها، رشته های میانی، سپتین ها) به خوبی درک نشده است. مطالعه دقیق دستکاری اسکلت سلولی توسط پاتوژن های باکتریایی نوید می دهد که بینش های جدیدی را در مورد اتوفازی – فعل و انفعالات اسکلت سلولی و همچنین پیوندهای غیرمنتظره بین اتوفازی و اسکلت سلولی در سلول های میزبان آلوده نشده، به دست دهد.

پروتئین‌های دخیل در تحرک مبتنی بر اکتین با اتوفاژی مرتبط هستند. در مورد لیستریا، پلیمریزاسیون اکتین توسط ActA از تخریب باکتری توسط اتوفاژی جلوگیری می‌کند. در مقابل، در مورد شیگلا، پلیمریزاسیون اکتین توسط IcsA/N-WASP برای اتوفاژی باکتریایی مورد نیاز است. این مشاهدات نشان می‌دهد که لیستریا و شیگلا توسط مسیرهای اتوفاژی مختلف شناسایی می‌شوند و نقش دقیق اکتین در اتوفاژی بین مسیرها متفاوت است.

میکروتوبول‌ها نقل و انتقال وزیکول مورد نیاز برای اتوفاژی را امکان پذیر می‌کنند و همچنین توسط برخی از عوامل بیماری زای باکتریایی برای دستکاری فرآیندهای سلولی هدف قرار می‌گیرند. به عنوان مثال، می‌توان به بی‌ثباتی اسکلت سلولی میکروتوبول توسط *Shigella* مجهز به VirA یا تثبیت اسکلت سلولی میکروتوبول توسط سالمونلا با استفاده از عامل T3SS اشاره کرد. این احتمال وجود دارد که تداخل پاتوژن با میکروتوبول‌ها تأثیر عمیقی بر اتوفاژی داشته باشد؛ اگرچه این فرضیه هنوز مستقیماً آزمایش نشده است.

در یک محیط غیرعفونی، نشان داده شده است که ویمینتین رشته میانی در تعامل با ATG6 (پروتئینی که برای شروع اتوفاژی حیاتی است) اتوفاژی را سرکوب می‌کند. حدس زده می‌شود که پاتوژن‌هایی مانند کلامیدیا تراکوماتیس که رشته‌های میانی را برای بقای درون سلولی دستکاری می‌کنند، می‌توانند اتوفاژی را نیز دستکاری کنند.

آزمایشات با *M. marinum* و *Shigella* نشان داده است که سپتین‌ها، ساختارهای قفس مانندی را تشکیل داده و باکتری‌ها را برای اتوفاژی هدف قرار می‌دهند. اگرچه نقش دقیق سپتین‌ها در اتوفاژی هنوز مشخص نشده است، مطالعات به وضوح نشان داده‌اند که سپتین‌ها، دستگاه اتوفاژی را به حالت داربستی در اطراف باکتری‌های پلیمریزه کننده‌ی اکتین می‌کشند. هنوز مشخص نیست که آیا پاتوژن‌های باکتریایی می‌توانند از مجموعه سپتین برای مقابله با اتوفاژی استفاده کنند یا خیر.

در مقایسه با تکثیر سیتوزولی، *L. monocytogenes* با سرعت کمتری در داخل واکوئل‌های ماکروفاز، به نام فاگوزوم‌های جادار حاوی لیستریا یا SLAP تکثیر می‌شود. تشکیل SLAP از طریق مسیر فاگوسیتوز مرتبط با LC3 رخ می‌دهد و به فعالیت LLO، برای آسیب رساندن به غشاء و مهار همچوشه با لیزوروم نیاز دارد. اگرچه اجزای اتوفاژی LC3 و NDP52، p62 و آسیب غشایی ناشی از LLO را تشخیص می‌دهند، اما کار روی ماکروفازهای مشتق از مغز استخوان

فصل ۹: اتوفاژی در سلول عفونی: بیش هایی از باکتری های بیماری زا ۱۸۹

نشان می دهد که اتوفاژی ناشی از پارگی واکوئل های فاگوزومی با واسطه LLO ممکن است تکثیر لیستریا را کنترل نکند. در مقابل، آزمایش ها با استفاده از مگس سرکه نشان داده اند که اتوفاژی وابسته به LLO، که توسط PRR PGRP-LE ایجاد می شود، می تواند تکثیر لیستریا را در داخل بدن کنترل کند. در تایید این موضوع، سویه های دارای کمبود پارکین از مگس سرکه و موش ها به شدت مستعد ابتلا به عفونت لیستریا هستند. در آینده، برای درک کامل پیامدهای اتوفاژی - فعل و انفعالات لیستریا در داخل بدن، مطالعات بیشتری از جمله آزمایش گونه های نوع وحشی در مقابل گونه های جهش یافته لیستریا (به عنوان مثال Δhly که قادر LLO است، $\Delta inlK$ و / یا $\Delta actA$ هستند) مورد نیاز است.

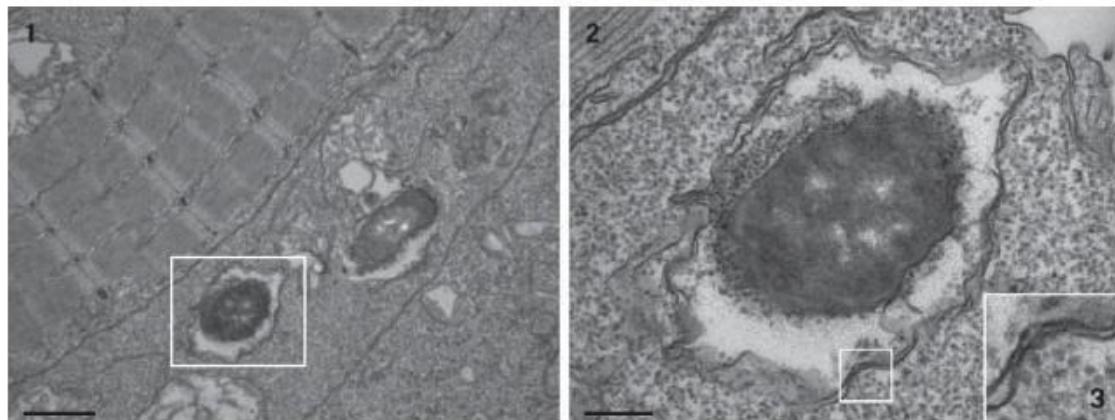
شیگلا فلکسneri

شیگلا فلکسneri، یک باکتری انترپاتوژن مهاجم گرم منفی است که باعث التهاب و اسهال می شود. روند عفونی شیگلا در سطح سلولی به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است و شبیه لیستریا است. پس از تهاجم به سلول های میزبان، شیگلا از واکوئل درونی خود می گریزد و دم های اکتین را برای تحرک، پلیمریزه می کند. در محل ورود شیگلا، PRR ها، NOD1 و NOD2 با ATG16L1 در زیر غشای پلاسمایی جذب می شوند و ATG16L1 می تواند پاسخ های التهابی ناشی از NOD را سرکوب کند. علاوه بر این، بقایای غشای تولید شده توسط شیگلا، توسط گیرنده های اتوفاژی p62، NBR1 و NDP52 (که به کنترل سیگنال های التهابی کمک می کند) یوبی کوئیتینه شده و شناسایی می شوند. مستقل از یوبیکوئیتین، آسیب وزیکول توسط شیگلا همچنین می تواند اتوفاژی را از طریق مسیر اتوفاژی Galectin 8-NDP52-LC3C فعال کند. بنابراین آسیب غشاء می تواند باعث اتوفاژی شود و سلول میزبان را نسبت به تهاجم شیگلا آگاه کند. مطالعات بیشتری برای تعیین اینکه آیا القای اتوفاژی توسط آسیب غشایی باعث تخریب باکتری می شود یا خیر، مورد نیاز است.

در سیتوزول، شیگلا از پروتئین IcsA بیان شده در سطح خود برای جذب میزبان N-WASP و Fc عال کردن کمپلکس Arp2/3 برای تشکیل دم های اکتین برای تحرک استفاده می کند. با این حال، اتوفاژی با شناسایی ATG5 IcsA آغاز می شود. علاوه بر این، TECPR1، پروتئین حاوی دامنه تکتونین، به ATG5 متصل می شود و همچوشی اتوفاگوزوم - لیزوژوم را تقویت می کند. تحرک مبتنی بر اکتین و فرار اتوفاژی نیز توسط سپتین ها محدود می شود. این پروتئین های

متصل شونده به گوانوزین تری فسفات (GTP) به رشته‌های اکتین ناشی از IcsA وارد می‌شوند و با اجزای اتوفاژی (به عنوان مثال: یوبی‌کوئیتین، گیرنده‌های اتوفاژی p62، NDP52 و LC3) همکاری می‌کنند تا ساختارهای قفسی شکلی را تشکیل دهنند که اکتین-باکتریوم پلیمریزه کننده را به دام می‌اندازند. همچنین روی شیگلای داخل سلولی لوکالیزه می‌شود که نشان می‌دهد که LRSAM1 در هدف قرار دادن این باکتری‌ها برای اتوفاژی نقش دارد. به عنوان یک اقدام متقابل برای جلوگیری از اتوفاژی، شیگلا می‌تواند عوامل IcsB و T3SS VirA را بیان کند. IcsB به طور رقابتی به IcsA متصل می‌شود و از جذب ATG5، TECPR1 و سپتین GTPase شده و عملکرد Rab1 باعث فعالیت پروتئین فعال کننده GTPase را برای مهار اتوفاژی دستکاری می‌کند.

روی هم رفته، محدودیت اتوفاژیک شیگلا، نیاز به اتصال ubiquitination، ATG5 - TECPR1 گیرنده‌های اتوفاژی متعدد و بازآرایی‌های اسکلت سلولی (یعنی پلیمریزاسیون اکتین و مونتاژ سپتین) دارد و با پروتئین‌های VirA و IcsB مقابله می‌کند. یک مسئله برجسته، توضیح درست اهمیت و هماهنگی این مولکول‌ها و فرآیندهای سلولی در داخل بدن است. با این حال، در هیچ مدل موش طبیعی عفونت شیگلا وجود ندارد. با استفاده از مدل عفونت گورخرماهی (*Danio rerio*)، نشان داده شده که *S. flexneri* داخل سلولی می‌تواند به سیتوزول فرار کند، سپتین را جذب کند و برای اتوفاژی در داخل بدن هدف قرار گیرد (شکل ۹.۲). در لاروهای گورخرماهی آلوده به شیگلا، اختلال اتوفاژی، با کاهش p62 یا استفاده از راپامایسین برای مهار mTOR (هدف پستانداران راپامایسین، سرکوبگر اتوفاژی)، بقای میزان را به طور قابل توجهی کاهش داده و بار باکتری را افزایش می‌دهد. این نتایج گورخرماهی را به عنوان یک مدل جدید برای مطالعه ایمنی ذاتی در برابر شیگلا و اتوفاژی را به عنوان یک مکانیسم ضد باکتری در داخل بدن نشان می‌دهند (قسمت ۹.۱).



شکل ۹،۲. شیگلای سیتوزولی در داخل بدن در اتوفاگوزوم‌ها جدا می‌شوند. لارو گورخر در عضله دم با GFP-Shigella آلوده شدند و برای میکروسکوپ الکترونی ثابت شدند. پانل ۲، یک ناحیه گسترش یافته از ناحیه ای باکس شده در پانل ۱ است که یک باکتری جداگانه اتوفاگوزوم را نشان می‌دهد. پانل داخلی ۳، یک ناحیه منبسط شده از ناحیه باکس شده در پانل ۲ است که یک غشای دوتایی را نشان می‌دهد که مشخصه اتوفاگوزوم‌ها است. نوار مقیاس، ۱ میکرومتر (پانل ۱) یا $0.25\text{ }\mu\text{m}$ میکرومتر (پانل ۲). برگرفته از S. Mostowy و پاکسازی باکتریایی: تصویری نه چندان واضح.

مايكوباكteriyom مارينوم

مايكوباكteriyom مارينوم، پاتوژن طبیعی ماهی‌ها است که به طور گسترده به عنوان یک مدل جایگزین برای مطالعه پاتوژن انسانی *M. tuberculosis* استفاده می‌شود. مانند *M. marinum* در ماکروفاژها با جلوگیری از همچوشهای فاگولیزوزوم زنده می‌ماند. نشان داده شده که فاگوزوم‌های حاوی *M. marinum* LC3 را جذب می‌کنند و این جذب، به فعالیت سیستم ترشح ESX-1 بستگی دارد. هنگامی که اتوفاژی توسط راپامایسین تحریک می‌شود، افزایش جذب LC3 به درون فاگوزوم حاوی *M. marinum* و افزایش تحويل باکتری به لیزوزوم وجود دارد. بنابراین، اتوفاژی در توافق با مطالعات *M. tuberculosis*, باعث تخریب *M. marinum* فاگوزومی می‌شود.

سکونت در محفظه واکوئولی این باکتری، گاهی اوقات بسیار گذرا است؛ زیرا *M. marinum* می‌تواند به سیتوزول فرار کند و (برخلاف سایر مايكوباكتری‌ها) تحرک مبتنی بر اکتین را آغاز کند. در سیتوزول، *M. marinum* را می‌توان با یوبیکوئیتین مرتبط دانست و در داخل محفظه‌های غشایی با برخی از ویژگی‌های اتوفاگوزوم‌ها مشاهده می‌شود (یعنی غشای دوگانه دارند اما

ATG5 و LC3 شناسایی نمی‌شوند). ترکیبی از بقایای غشای میزبان و دیواره‌های سلولی *M. marinum* مجاور باکتری‌های سیتوزولی، به حالت ubiquitinated ubiquitininated است. با این حال، نقش آتوفاژی در پاسخ به این ساختارها در همه جا به خوبی درک نشده است. مشابه لیستریا و شیگلا، که دمهای اکتنی را پلیمریزه می‌کنند، از *M. marinum* ubiquitination و تشخیص آتوفاژیک جلوگیری می‌کند.

مدل عفونت *M. marinum* – گورخرماهی به عنوان یک میزبان طبیعی – می‌تواند درک عمیق از آتوفاژی باکتری در سطوح مولکولی، سلولی و کل ارگانیسم را ارائه دهد. اخیراً با استفاده از لارو گورخرماهی نشان داده شد که *M. marinum* برای آتوفاژی در داخل بدن مورد هدف قرار می‌گیرد. علاوه بر این، نقش حیاتی آتوفاژی در کنترل *M. marinum* در داخل بدن با استفاده از گورخرماهی نشان داده شده است. مگس‌های جهش یافته پارکین به طور قابل توجهی طول عمر کمتری پس از عفونت با *M. marinum* دارند. این مطالعات نقش حفظ شده تکاملی آتوفاژی را در ایمنی ذاتی، نسبت به عفونت مایکروب‌باکتریایی نشان می‌دهد.

نتیجه گیری

سالمونلا، مایکروب‌باکتریا، لژیونلا، لیستریا و شیگلا به طور مستقل به عنوان الگوهایی برای مطالعه آتوفاژی باکتریایی پدید آمده‌اند. در مجموع، این مطالعات نشان می‌دهد که باکتری‌هایی که به طور موقت در معرض سیتوزول میزبان قرار می‌گیرند (به عنوان مثال، سالمونلا و *M. tuberculosis*) با آتوفاژی پاک می‌شوند؛ در حالی که باکتری‌هایی که برای تکثیر و گسترش سلول به سلول، به سیتوزول میزبان دسترسی دارند (مانند لیستریا، شیگلا، و ... *M. marinum*) مکانیسم‌هایی را برای جلوگیری از تشخیص توسط آتوفاژی تکامل داده‌اند. با این حال، تمایز ممکن است خیلی سخت باشد؛ زیرا شواهد نشان می‌دهد که سایر باکتری‌های بیماری‌زای واکوئولی مجهر به سیستم‌های ترشح تخصصی که پروتئین‌های مؤثر را به سیتوزول منتقل می‌کنند (مثلاً لژیونلا)، بلوغ آتوفاگوزومی را برای ایجاد همانندسازی دستکاری می‌کنند.

آیا می‌توان از آتوفاژی باکتریایی برای درمان‌های بالینی استفاده کرد؟ واضح است که تحقیقات بیشتری برای پاسخ به این سوال مورد نیاز است و یک مسئله اصلی، اعتبار سنجدی رویدادهای مولکولی و سلولی است که در شرایط آزمایشگاهی و در طی عفونت باکتریایی در داخل بدن با استفاده از مدل‌های حیوانی مربوطه، مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرند (قسمت ۹، ۱). زمینه

فصل ۹: اتوفاژی در سلول عفونی: بیش هایی از باکتری های بیماری زا

گسترده تحقیقاتی در حال حاضر در اتوفاژی و عفونت نهفته در دست بررسی است، و باید انتظار داشت که مطالعات آینده نشان دهد که چگونه اتوفاژی ناشی شده از طیف گسترده ای از پاتوژن ها، کلید کنترل عفونت است.

فصل ۱۰

پروتئین‌های Rab در اتوفازی: مدل استرپتوکوس

مقدمه

اتوفازی، یک فرآیند تخریب درون سلولی است که به طور تکاملی حفظ شده است و در آن محتویات سیتوپلاسمی شامل اندامک‌های غشایی توسط یک اتوفاگوزوم دو غشایی هضم می‌شود. اتوفاگوزوم با لیزوزوم‌ها ترکیب می‌شود و مواد داخل واکوئل را تجزیه می‌کند. در سلول‌های پستانداران، اتوفازی مواد مغذی را در شرایط گرسنگی تامین می‌کند و همچنین با تجزیه انتخابی پروتئین‌های انباسته، اندامک‌های آسیب دیده و میکروب‌های مهاجم، از بدن در برابر بیماری‌های انسانی محافظت می‌کند. بنابراین اتوفازی برای فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف مانند سازگاری با گرسنگی، کنترل کیفی پروتئین‌ها و اندامک‌های درون سلولی، رشد جنینی، حذف میکروب‌های داخل سلولی و جلوگیری از تخریب عصبی و تشکیل تومور مهم است. با این حال، خصوصیات دینامیکی دقیق غشاء و مکانیسم‌های تنظیمی درگیر، به طور کامل درک نشده است. به طور خاص، پروتئین‌های Rab و SNARE (گیرنده‌های پروتئین حساس به فاکتور N-ethylmaleimide محلول) در حمل و نقل غشای وزیکولار نقش دارند. اینکه آیا این پروتئین‌ها برای بلوغ اتوفاگوزوم‌ها مهم هستند یا خیر، موضوع بررسی فعلی است.

Rab GTPase

به طور کلی، رویدادهای نقل و انتقال غشایی درون سلولی شامل یک سری مراحل است: (۱) جوانه زدن وزیکول از غشای دهنده، (۲) هدف قرار دادن وزیکول در غشای پذیرنده، (۳) اتصال

وزیکول به غشای هدف و (۴) ادغام وزیکول با غشای هدف. پروتئین‌های Rab برای تنظیم این فرآیندها ضروری هستند. Rab GTPase‌ها بزرگترین خانواده GTPase‌های کوچک را تشکیل می‌دهند و بیش از ۶۰ عضو آنها، در انسان شناسایی شده است. پروتئین‌های Rab در غشاها و وزیکول‌های داخل سلولی متمایز قرار می‌گیرند؛ جایی که به عنوان سوئیچ‌های مولکولی عمل می‌کنند که به طور متناوب بین دو حالت ساختاری تغییر می‌کنند: شکل «روشن» متعلق به GDP و شکل «خاموش» وابسته به GTP.

اگرچه پروتئین‌های اتوفاژی ATG نیز در بیوسنتز و نقل و انتقال غشایی نقش دارند، رابطه بین سیستم اتوفاژیک و Rab‌ها به طور کامل درک نشده است. در طی اتوفاژی، وزیکول‌های اتوفاژیک تازه سنتز شده با لیزوژوم‌ها از طریق Rab7 ترکیب می‌شوند که نشان می‌دهد که حداقل این مرحله همچوشی تحت کنترل تنظیم‌کننده‌های Rab است. با این حال، این مشاهدات، در گیری سایر پروتئین‌های Rab را نیز رد نمی‌کند؛ زیرا بیوسنتز و نقل و انتقال غشایی فرآیندهایی فراگیر هستند. بنابراین، برای درک مکانیسم مولکولی بیوژنز و بلوغ اتوفاگوزوم، شناسایی پروتئین‌های Rab که این مسیر سلولی را تنظیم می‌کنند، مهم است.

نقش Rab GTPase در اتوفاژی ناشی از گرسنگی سلولی

Rab1 (معروف به Ypt1p در مخمر) نقل و انتقال بین شبکه آندوپلاسمی (ER) و مجموعه گلزاری را تنظیم می‌کند؛ فرآیندی که به عنوان انتقال گلزاری شناخته می‌شود. اخیراً گزارش شده است که Rab1 نیز در اتوفاژی نقش دارد. Rab1، Ypt1 در پستانداران، دارای دو ایزوفرم مرتبط به هم است، Rab1A و Rab1B. زوپینو و همکاران (۲۰۱۰) جهش فعال نوع غالب Rab1B را در ساختارهای اتوفاژیک مشاهده کردند. کولوکالیزاسیون Rab1B با پروتئین اتوفاگوزومی LC3 پس از گرسنگی و درمان با بافیلومایسین A1 افزایش یافت. این امر، باعث تجمع اتوفاگوزوم‌ها از طریق مسدود کردن همچوشی آنها با لیزوژوم‌ها می‌شود. بیان بیش از حد Rab1B باعث افزایش تعداد اتوفاگوزوم‌ها شد، در حالی که حذف Rab1B آنها را کاهش داد. Atg11 اخیراً به عنوان عامل مخمر پروتئین Ypt1 Rab1 شناسایی شده است و کمپلکس Atg11 - برای مونتاژ ساختار پیش اتوفاگوزومی ضروری است. همچنین به نظر می‌رسد که Rab1 در اتوفاژی پراکسیزومی نقش داشته باشد.

فصل ۱۰: پروتئین‌های Rab در اتوفازی: مدل استرپتوکوکوس ۳۰۰

Rab‌های ساکن گلزاری در فرآیند اتوفازی متعارف سلول‌های پستانداران نقش دارند. Rab24، که عملکرد آن در نقل و انتقال اگزوسیتیک معمولی به خوبی درک شده است، در غشاء قرار می‌گیرد و در ناحیه دور از هسته متتمرکز می‌شود که تا حدی با ER و Golgi همپوشانی دارد. کاهش مواد مغذی باعث کولوکالیزه شدن Rab24 به LC3 می‌شود و باعث ایجاد تغییر قابل توجهی در الگوی سلولی Rab24 می‌شود که به وزیکول‌های کوچک حلقه‌ای شکل و برخی ساختارهای N-ethylmaleimide یک مهار کننده انتقال وزیکولی، و توسط ورتمانین، یک مهارکننده فسفوئینوزیتید ۳-کیناز مشاهده کرد. علاوه بر این، به نظر می‌رسد که بیان بیش از حد Rab24، تعداد واکوئل‌های LC3 مثبت را افزایش می‌دهد. بنابراین، Rab24، احتمالاً در بیوسنتز غشا و همچو شی غشاء در طول تشکیل اتوفاغوزوم عملکرد دارد. Rab33A و Rab33B، دو پروتئین Rab مرتبط با گلزاری هستند که درجه بالایی از همسانی را نشان می‌دهند. Rab33A به طور خاص در مغز بیان می‌شود؛ در حالی که Rab33B در همه جا بیان می‌شود. این پروتئین‌های Rab در تنظیم نقل و انتقال درون گلزاری و نقل و انتقال رتروگراد ER - Golgi نقش دارند. هر دوی Rab33A و Rab33B با ATG16L تعامل دارند و حذف Rab33A و Rab33B تعداد پروتئین اتوفازی ATG16L را افزایش می‌دهد. جهش فعال غالب Rab33B، لیپیداسیون LC3 را حتی در شرایط غنی از مواد مغذی افزایش می‌دهد. ایتو و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی در سلول‌های پستانداران نشان دادند که OATL1، یک پروتئین فعال کننده (GAP) GTPase (GAP) Rab33B را هدف قرار می‌دهد و اتوفازی را تنظیم می‌کند. OATL1 از طریق برهمنکش مستقیم با Atg8، با همولوگ LC3، به غشای جداسازی و اتوفاغوزوم‌ها متصل می‌شود و در ادغام بین اتوفاغوزوم‌ها و لیزوژوم‌ها نقش دارد. از آنجا که Rab33B به طور خاص با Atg16L تعامل دارد، نقش آن در اتوفازی ممکن است از نقش Rab24 و سایر پروتئین‌های Rab متمایز باشد.

تصور می‌شود که Rab7 در مراحل پایانی بلوغ اتوفاغوزوم نقش دارد. آزمایش‌های شکست ژنتیکی نشان داده‌اند که اگرچه GTPase برای بلوغ اولیه اتوفاغوزوم‌های اولیه تا واکوئل‌های اتوفازیک دیررس لازم نیست، اما Rab7 در بلوغ نهایی واکوئل‌های اتوفازیک دیررس شرکت می‌کند. در یک مطالعه مشخص شد که FYCO1 با Rab7 تعامل دارد و بخش‌های اتوفاغوزومی و اندوژومی-لیزوژومی را می‌پوشاند. FYCO1 توسط Rab7 به غشاء جذب می‌شود. دامنه آن با فسفاتیدیل ۳-فسفات (PI3P) تعامل دارد و کمپلکس FYVE - Rab7 انتقال

میکروتوبول و انتقال واکوئل‌های آتوفاژیک را به سمت انتهایی هدایت می‌کند. هنگامی که بیان FYCO1 از بین می‌رود، نقطه‌های آتوفاگوزومی مثبت LC3 در ناحیه دور هسته‌ای تجمع می‌یابند که نشان می‌دهد که انتقال آن‌ها مهار می‌شود. بنابراین Rab7 ممکن است از طریق فاکتور FYCO1 برای ارتقای انتقال مبتنی بر میکروتوبول و ادغام نهایی آتوفاگوزوم‌ها با لیزوژوم‌ها عمل کند.

Rab11 و TBC1D14، اخیراً به عنوان عاملی برای تنظیم آتوفاژی ناشی از گرسنگی سلولی گزارش شده‌اند. Rab11 برای تشکیل آتوفاگوزوم مورد نیاز است. بیان بیش از حد TBC1D14 باعث می‌شود که آندوزوم‌های بازیافتی ULK1 مثبت، توبول‌هایی تشکیل دهنده که عملکرد آنها را مختل کرده و از تشکیل آتوفاگوزوم جلوگیری می‌کند. علیرغم این واقعیت که TBC1D14 یک GAP برای Rab11 نیست، TBC1D14 می‌تواند باعث اتصال Rab11 فعال شده شود و از دست دادن Rab11 از توبول‌اسیون آندوزوم‌های بازیافتی ناشی از TBC1D14 جلوگیری می‌کند. بر این اساس، انتقال وزیکولی وابسته به Rab11 و TBC1D14 از آندوزوم‌ها ممکن است به آتوفاژی ناشی از گرسنگی سلولی کمک کرده و آن را تنظیم کند.

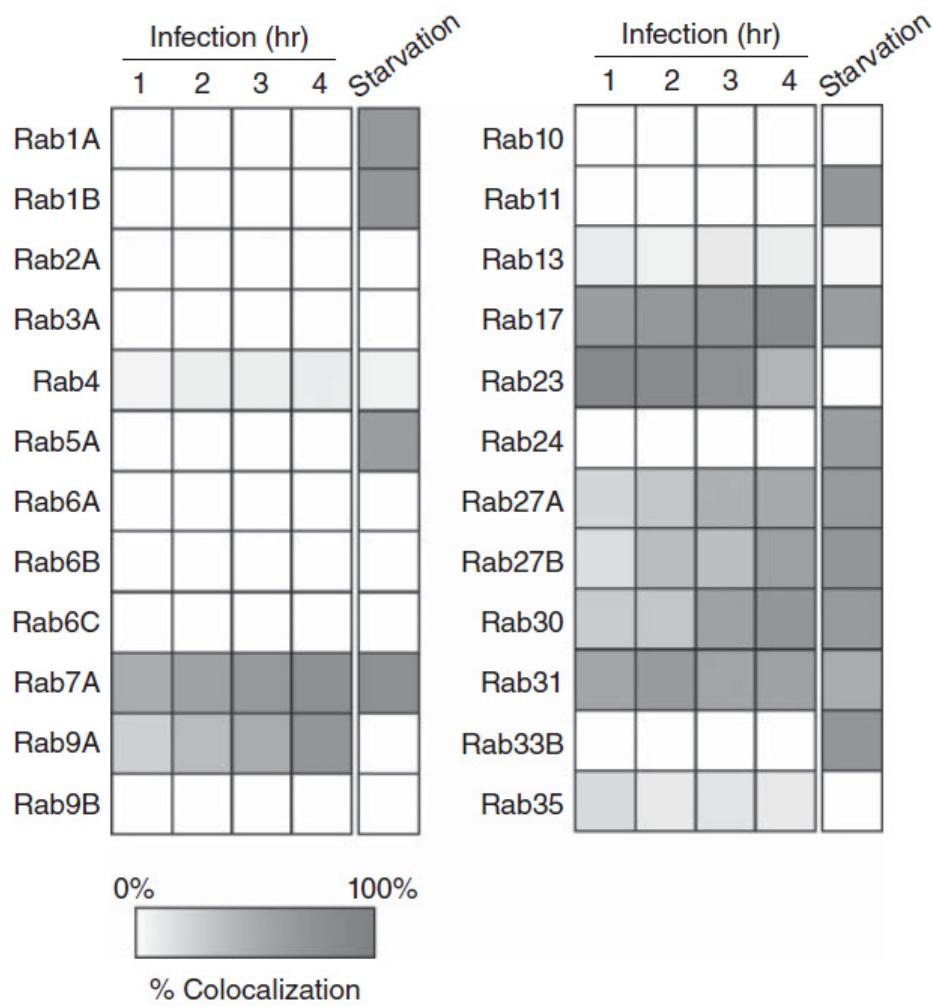
لکولایزه شدن Rab در آتوفاژی ناشی از عفونت استرپتوکوکی

آتوفاژی تا حدی، با هدف قرار دادن تعدادی از پاتوژن‌های داخل سلولی، به هر دو پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی کمک می‌کند. به عنوان مثال، استرپتوکوک گروه A (*Streptococcus pyogenes*) به عنوان یک پاتوژن مهم انسانی، می‌تواند از طریق مسیر اندوسیتی به چندین نوع سلول یوکاریوتی حمله کند. برای فرار از مسیر تخریب اندوزومی - لیزوژومی، GAS، از آندوزوم‌ها به سیتوپلاسم، با ترشح استرپتولیزین O (که یک سم منفذ ساز وابسته به کلسترول است) خارج می‌شود. پس از فرار به داخل سیتوزول، GAS برای تخریب سریع توسط مکانیسم‌های آتوفاژیک هدف قرار می‌گیرد. قطر آتوفاگوزوم متعارف ناشی از گرسنگی $0.5 / 0.1$ میکرومتر است، در حالی که واکوئل‌های آتوفاگوزوم مانند حاوی GAS (GcAVs)، به اندازه $10 \mu\text{m}$ میکرومتر می‌رسد. FNBP1L همچنین برای آتوفاژی پاتوژن داخل سلولی سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم ضروری است. در مقابل، به نظر می‌رسد که FNBP1L، برای آتوفاژی ناشی از گرسنگی یا راپامایسین، غیرقابل مصرف باشد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که سیستم‌های تنظیم‌کننده

فصل ۱۰: پروتئین‌های Rab در اتوفازی: مدل استرپتوکوکوس

اتوفازیک متمایز و خاصی وجود دارد که برای دفاع در برابر GAS و سایر میکروب‌های عفونی سازگار شده‌اند.

ما در طول گرسنگی و عفونت GAS، نواحی لکولیزه شده‌ی تعدادی از پروتئین‌های Rab، از جمله Rabهای اتوفازیک متعارف و سایر Rabها را بررسی کرده‌ایم. اگرچه LC3 مثبت کلوکالیزه می‌شوند، هیچ یک از این پروتئین‌ها در GcAV ها، در هیچ نقطه زمانی ۱ تا ۴ ساعته پس از عفونت، مشاهده نمی‌شوند. (مدت زمان فرآیند تشکیل GcAV (شکل ۱۰،۱)). در مقابل، با Rab31، Rab30، Rab27B، Rab27A، Rab23، Rab17، Rab9A، EmGFP-Rab7A، Rab17، Rab7A، GcAVها همسو می‌شوند (شکل ۱۰،۱). در میان این پروتئین‌های Rab، Rab31، Rab27B، Rab27A، و Rab30 نیز با نقطه‌های LC3 مثبت ناشی از گرسنگی کلوکالیزه می‌شوند، که نشان می‌دهد Rab23 و Rab9A، مختص اتوفازی ناشی از GAS هستند. بنابراین، پروتئین‌های Rab که در طول عفونت GAS با LC3 کلوکالیزه می‌شوند، از پروتئین‌های دخیل در اتوفازی ناشی از گرسنگی متمایز هستند.



شکل ۱. اتوفایزیشن پروتئین Rab به اتوفاگوزوم‌ها در طول گرسنگی یا عفونت GAS. سلول‌های HeLa بیان کننده mCherry-LC3 و EmGFP-Rabs برای زمان‌های مشخص شده با GAS آلوده شدند یا با محیط گرسنگی به مدت ۱ ساعت کشت داده شدند و ثابت شدند. بازده کولوکالیزاسیون به عنوان درصد تعداد کل GcAV‌ها یا نقاط LC3 مثبت محاسبه شد.

دخالت Rab7 در شکل گیری اولیه GcAV

در اتوفایزی متعارف، Rab7 برای تشکیل اتوفاگوزوم ضروری است و از طرفی، وجود GTPase برای همچوشی بین اتوفاگوزوم و لیزوژوم ضروری است. با این حال، ما دریافتیم که Rab7 برای تشکیل اولیه GcAV‌های کوچک مورد نیاز است. در ابتدا یک GcAV کوچک با LC3 مثبت، زنجیره‌های استرپتوکوکی را جدا می‌کند و سپس این زنجیره‌ها، با یک GcAV منفرد و بزرگ ادغام می‌شوند. به نظر می‌رسد که Rab7 در فاز اولیه تشکیل GcAV عمل می‌کند، زیرا تعداد

فصل ۱۰: پروتئین‌های Rab در اتوفازی: مدل استرپتوکوکوس

ساختارهای کوچک GcAV مثبت LC3، با حذف Rab7 یا بیان بیش از حد یک شکل غالب منفی از Rab7، کاهش یافت. Rab7 ممکن است برای تولید غشاهای جداسازی در طول عفونت GAS ضروری باشد. همانطور که توسط تجزیه و تحلیل میکروسکوپی الکترونی دیده می‌شود، ساختارهای prefusion، در سلول‌هایی که یک جهش غالب منفی Rab7 را بیان می‌کند تجمع نمی‌یابند. بنابراین، اگرچه Rab7 برای تشکیل اتوفاغوزوم‌های متعارف ضروری است، به نظر می‌رسد که GTPase به پاسخ اتوفازیک به عفونت GAS کمک می‌کند.

نیاز به Rab23 برای تشکیل GcAV

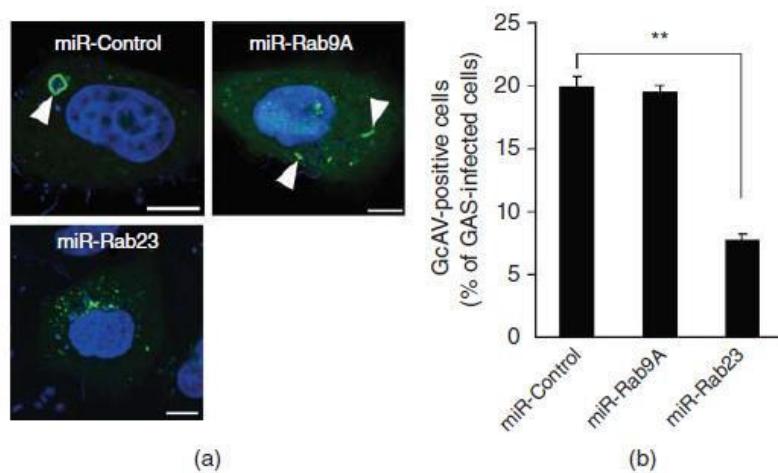
Rab23، یک تنظیم کننده منفی شناخته شده سیگنال دهی است. یک مورفوژن ترشح شده که رشد اندام‌های متعدد را در طول جنین زایی کنترل می‌کند. Rab23 همچنین به همجوشی فاگوزوم – لیزوژوم کمک می‌کند. با این حال، لوکالیزه کردن Rab23 به واکوئل‌های LC3 مثبت، یک مشاهده جدید است.

فرآیند تشکیل GcAV را می‌توان به سه مرحله تقسیم کرد: تشکیل غشای جداسازی، اتوفاغوزوم و اتوفاغولیزوژوم. گیر انداختن GAS خارج شده در سیتوپلاسم توسط غشای جداسازی که یک غشای دوتایی هلالی شکل است صورت می‌گیرد. غشای جداسازی دراز می‌شود تا GAS را به طور کامل احاطه کند و سپس تبدیل به یک واکوئل دو غشایی بسته به نام اتوفاغوزوم می‌شود که در نهایت با یک لیزوژوم ترکیب می‌شود و اتوفاغولیزوژوم را تشکیل می‌دهد.

برای شناسایی مرحله‌های GcAV که در آن Rab23 در طول عفونت GAS عمل می‌کند، لوکالیزه شدن آن با LC3 و ATG5 بررسی کردیم. LC3 به طور مداوم، GcAV‌ها را علامت گذاری می‌کند. ATG5 را می‌توان به عنوان نشانگر غشای جداسازی استفاده کرد، زیرا این پروتئین به طور خاص، در سطح خارجی غشاهای جداسازی موضعی می‌شود و سپس با تشکیل کامل اتوفاغوزوم از غشاء جدا می‌شود. از آنجایی که LAMP1 یک نشانگر لیزوژومی است، GcAV LAMP1 مثبت، اتوفاغولیزوژوم است. ما دریافتیم که EmGFP-Rab23 اغلب با ATG5 مثبت colocalize می‌شود؛ که این موضوع نشان می‌دهد که Rab23 به غشای جداسازی که در ابتدا حاوی GAS است کمک می‌کند. EmGFP-Rab23 همچنین ۳ ساعت پس از عفونت در GcAV‌های ATG5 منفی پیدا شد. این موضوع هم نمایان می‌کند که Rab23 هم در غشای جداسازی و هم در اتوفاغوزوم حضور دارد. با این حال، اکثر GcAV‌های

LAMP1 مثبت، Rab23 منفی بودند که Rab23 را در مراحل اولیه تشکیل GcAV دخیل می‌کنند.

برای روشن شدن نقش Rab23 در تشکیل GcAV، بیان آن را کاهش دادیم و سپس اثرات آن را بررسی کردیم. هنگامی که بیان Rab23 مهار شد، کارایی تشکیل سلول‌های نگهدارنده GcAV بیش از ۵۰ درصد کاهش یافت. تعداد سلول‌های GAS مرتبط با ATG5 نیز کاهش یافت (شکل ۲). جالب توجه است که سلول‌های Rab23 دارای نقاط مثبت LC3/ATG5 بیشتری نسبت به سلول‌های کنترل هستند. علاوه بر این، اگرچه تنها چند نقطه LC3 مثبت در سلول‌های کنترل نشده و Rab23-knockdown مشاهده شد، اما عفونت GAS، تعداد نقاط LC3 مثبت را افزایش می‌دهد. نتیجه می‌گیریم که Rab23 به تعامل بین GAS داخل سلولی و ساختارهای شبیه پیش ساز GcAV کمک می‌کند که احتمالاً اتوفاگوزوم‌ها را تشکیل می‌دهند.

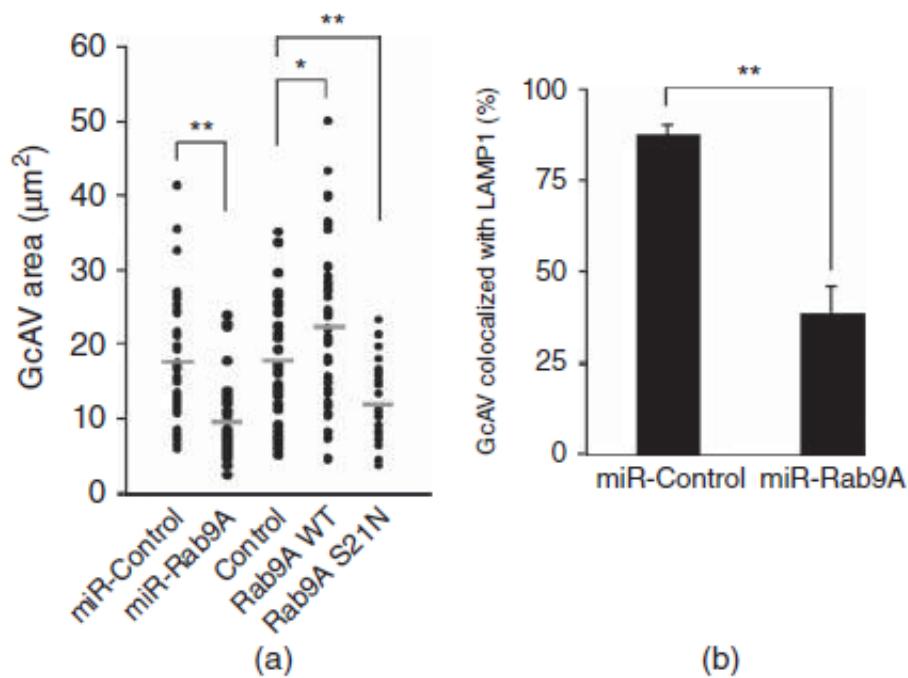


شکل ۲. ۱۰.۲ Rab23 برای تشکیل GcAV مورد نیاز است. پانل (a): تصاویر میکروسکوپی کانفوکال از GcAV در سلول‌های -Rab9A -Rab23-knockdown یا miR-knockdown. سلول‌های HeLa ترانسفکت شده با وکتورهای EmGFP - LC3 و miR-knockdown به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. Rab23 با GAS در MOI 100 آلوده شدند و پس از ۴ ساعت ثابت شدند. DNA سلولی و باکتریایی با DAPI رنگ آمیزی شد. نوک پیکان GcAV را نشان می‌دهد. میله‌ها، ۱۰ میکرومتر پانل (b): اثر شکست Rab23 و Rab9A بر بازده تشکیل GcAV. میزان تشکیل سلول‌های GcAV مثبت به عنوان نسبت سلول‌های GcAV مثبت به سلول‌های آلوده به GAS از تصاویر میکروسکوپی کانفوکال محاسبه شد. داده‌های نشان داده شده، نشان دهنده نتایج برای بیش از ۲۰۰ سلول آلوده و هر درصد، نشان دهنده میانگین $5 \pm 0,05$ SD سه آزمایش مستقل است.

تسهیل رشد GcAV و همجوشی لیزوژومی توسط Rab9A

Rab9A به اندوزوم‌های دیررس لوکالیزه می‌شود و انتقال رتروگراد از آندوزوم‌های دیررس به شبکه ترانس گلژی را تنظیم می‌کند. ما کولوکالیزه شدن LC3 با Rab9A را در طول عفونت GAS بررسی کردیم و دریافتیم که Rab9A ترجیحاً در مرحله آخر (۳ تا ۴ ساعت پس از عفونت) به GcAVs لوکالیزه می‌شود. اگرچه ما نتوانستیم غشاهای Rab9A-Rab9A-Mثبت/ATG5-Mثبت را پیدا کنیم، Rab9A اغلب با GcAVs LAMP1 مثبت colocalized می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که Rab9A پس از بلوغ اتوفاغومی به GcAVs وارد می‌شود. پس از نابودی Rab9A، اگرچه کارایی تشکیل GcAV تغییر نمی‌کند، اما تعداد GcAV‌های LAMP1 مثبت به طور قابل توجهی کمتر از سلول‌های کنترل است. بعلاوه، GcAV‌های مشاهده شده در سلول‌های Rab9A-ناک داون یا در سلول‌هایی که جهش غالب منفی Rab9A را بیان می‌کنند، کوچکتر از سلول‌های کنترل بودند (شکل ۱۰، ۳).

مشاهده شد که تعداد GcAVs در هر سلول به دنبال نابودی Rab9A افزایش یافته است و این نشان می‌دهد که Rab9A، واسطه همجوشی هموتیپی GcAV‌ها است. کاهش بیان Rab9A یا Rab23 نیز تخریب GAS داخل سلولی را مختل می‌کند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که Rab23 نقش مهمی در اتوفازی GAS دارند.



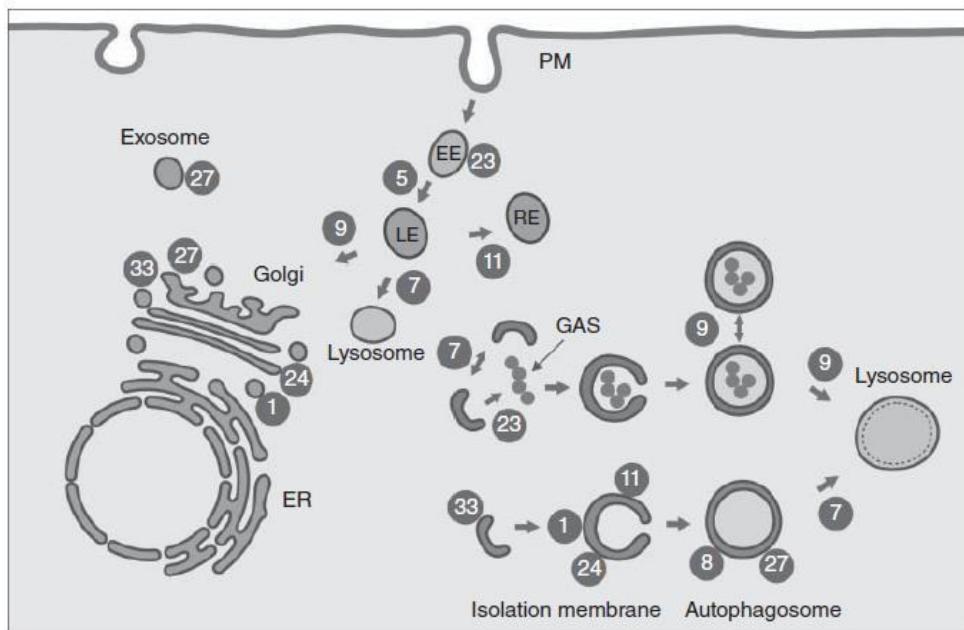
شکل ۳. ۱۰. Rab9A در رشد GcAV و همچو شی با لیزو زوم ها نقش دارد. پانل (الف): اثر فعالیت Rab9A بر اندازه GcAVs. نواحی GcAVs با استفاده از نرم افزار ImageJ اندازه گیری شد. $**P < 0.01$, $*P < 0.05$, $n = 40$ GcAV. پانل (ب): همچو شی لیزو زومی GcAV ها به Rab9A نیاز دارد. فرکانس تشکیل GcAV LAMP1 مثبت به عنوان نسبت GcAV های LAMP1 مثبت به کل GcAV ها از تصاویر میکروسکوپی کانفوکال محاسبه شد. داده های نشان داده شده، نشان دهنده نتایج برای بیش از ۵۰ GcAV است، و هر درصد، نشان دهنده میانگین \pm SD سه آزمایش مستقل است.

نتیجه گیری و دیدگاه

هم لوکالیزیشن Rab به غشا های هدف خاص و هم چرخه های فعال سازی آنها به شدت تنظیم می شود. سوئیچ های بسیار دقیق GTPase، سیستم پیچیده انتقال غشا های درون سلولی را کنترل می کنند. گزارش شده است که تعدادی از پروتئین های Rab به فرآیندهای اتوفاژی کمک می کنند. با این حال، اکثر مطالعات به اتوفاژی ناشی از گرسنگی محدود می شوند. فقط چند مطالعه نقش پروتئین Rab را در انواع دیگر اتوفاژی بررسی کرده اند. این امکان وجود دارد که بسیاری از اجزای Rab در اشکال مختلف اتوفاژی مشترک باشند. در واقع، مطالعات اولیه نشان داد که Rab1 هم در اتوفاژی ناشی از گرسنگی و هم در اتوفاژی ناشی از عفونت باکتریایی نقش دارد. با این حال، اخیراً نشان دادیم که گروه متفاوتی از اعضای Rab در مقایسه با اتوفاژی

فصل ۱۰: پروتئین‌های Rab در اتوفازی: مدل استرپتوکوکوس ۲۰۵

متعارف، در اتوفازی در طول عفونت GAS نقش دارند (شکل‌های ۱۰, ۱ و ۱۰, ۴). به عنوان مثال، Rab23 و Rab9A، Rab7 و Rab24، Rab11، Rab5، Rab33B و GcaV هستند. در مقابل، آنها از گرسنگی نقش دارند و در آنها آسوده، لوکالیزه نمی‌شوند.



شکل ۱۰, ۴. مدل پیشنهادی برای ارتباط Rab در اتوفازی در طول گرسنگی و عفونت GAS. این مدل عملکرد پروتئین‌های مختلف Rab (دایره‌های شماره‌دار) را در فرآیند اتوفازی در طول گرسنگی و عفونت GAS نشان می‌دهد. Rab7 برای تشکیل GcaV مورد نیاز است و واسطه همچوشی بین GAS و GcaV است. هدف قرار دادن اتوفاغوزوم‌های در حال توسعه را برای حمله به تشکیل GAS و GcaV تنظیم می‌کند. همچوشی هموتیبی بین GAS و با لیزوژوم‌ها را تسهیل می‌کند. PM، غشای پلاسمایی؛ EE، آندوزوم اولیه؛ LE، آندوزوم دیررس؛ RE، بازیافت آندوزوم.

عمل Rab7 در مراحل اولیه اتوفازی نیز مختص عفونت GAS است. اگرچه اتوفازی ضد باکتری دارای مکانیسم‌های اساسی مشترک با اتوفازی ناشی از گرسنگی است، (مانند وابستگی به ATG5 و درگیری پروتئین‌های SNARE) با اینحال، پروتئین‌های Rab که اتوفازی ضد باکتریایی را تنظیم می‌کنند ممکن است تا حد زیادی از آنهاستی که در طول اتوفازی ناشی از گرسنگی عمل می‌کنند متمایز باشند.

یکی از تفاوت‌های کلیدی بین اتوفاژی ضد باکتری و اتوفاژی ناشی از گرسنگی، ویژگی cargo است و احتمالاً برخی از مولکول‌های تشخیص GAS در این تمایز دخیل هستند. در واقع، نتایج کنونی ما نشان می‌دهد که Rab23 در این مرحله شناسایی نقش دارد. Rab23 برای توسعه اتوفاگوزوم‌های GcaVs به کار گرفته شده است. نابودی Rab23 تعداد سلول‌های GAS و GcaV مرتبط با ATG5 را کاهش داده، که نشان می‌دهد Rab23 برای تشکیل GcaV مورد نیاز است. بنابراین، ما فرض می‌کنیم که Rab23 در تعامل بین GAS داخل سلولی و ساختارهای شبه پیش‌ساز GcaV که احتمالاً اتوفاگوزوم‌ها را تشکیل می‌دهند، دخیل است.

ویژگی دیگری که GcaV‌ها را از اتوفاگوم‌های ناشی از گرسنگی متمایز می‌کند اندازه نسبتاً بزرگ آنها است. هنگامی که Rab7 به همجوشی غشاها جداسازی کمک می‌کند، GcaV‌ها بزرگ می‌شوند. GcaV‌ها همچنین می‌توانند حتی پس از بلوغ اتوفاگوزوم‌مال، از طریق اعمال گسترش یابند که نشان می‌دهد که این GTPase، همچوشهی هموتیبی GcaV‌های Rab9A کوچک را تحريك می‌کند. با این حال، قابل توجه است که GcAV‌های کوچکتر در سلول‌های Rab9A هنوز بزرگتر از اتوفاگوزوم‌های ناشی از گرسنگی هستند.

در یک مطالعه نشان داده شده که Rab9A در طول ماکرواتوفاژی مستقل از ATG5 نقش دارد. بر اساس این گزارش، اتوفاگوزوم‌های جایگزین به روشهای وابسته به فعالیت Rab9A GTPase از طریق ادغام غشاها جداسازی شده با وزیکول‌های حاصل از شبکه ترانس گلثری و اندوزوم‌ها تولید می‌شوند. GcaV‌ها با اتوفاگوزوم‌های جایگزین متفاوت هستند، زیرا تشکیل GcaV وابسته به ATG5 است و GcaV‌ها واکوئل‌های LC3 مثبت هستند. با این وجود، GcAV‌ها همچنین ممکن است از وزیکول‌های مشتق شده از شبکه ترانس گلثری و اندوزوم‌ها، برای گسترش توسط مکانیسم وابسته به Rab9A استفاده کنند. به طور خاص، GcaV‌ها ممکن است با اندوزوم‌ها ترکیب شوند و SNARE‌های اندوزومی را در طول فرآیند همچوشهی به دست آورند. برای دستیابی به اندازه‌ای عظیم، GcaV‌ها به مقدار زیادی از اجزای غشاها نیاز دارند. بنابراین، تشکیل این واکوئل‌های پاتوژن ممکن است نه تنها از دستگاه اتوفاژیک متعارف، بلکه از سیستم تشکیل اتوفاگوزوم Rab9A نیز بهره برداری کند.

هنوز مشخص نیست که چرا پروتئین‌های Rab اتوفاژیک متعارف در اتوفاژی، هنگام عفونت GAS دخالت ندارند. یک توضیح این است که منشاء غشاها جداسازی متفاوت است. مکان‌های

فصل ۱۰: پروتئین‌های Rab در اتوفاژی: مدل استرپتوکوکوس ۲۰۷

مونتاژ اتوفاگوزومی متعددی از جمله ER، Golgi، اندوزومها و میتوکندری توصیف شده‌اند. به نظر می‌رسد محل اولیه تولید اتوفاگوزوم‌ها، امگازوم‌ها، نوعی محفظه‌های نقطه گذاری مرتبط با ER هستند که با PI3P و "پروتئین حاوی دو دامنه FYVE پروتئین ۱" غنی شده‌اند. با این حال، ناشناخته است که آیا اتوفاگوزوم‌های ضد باکتری از امگازوم‌ها منشا می‌گیرند یا خیر. توضیح احتمالی دیگر برای نیاز به پروتئین‌های Rab متمایز این است که باکتری‌ها، مکانیسم‌هایی را برای مهار Rab‌های اتوفاژیک متعارف ایجاد کرده‌اند. به نوبه خود، سلول‌های میزبان با به کارگیری پروتئین‌های Rab اضافی برای جذب پاتوژن‌ها توسط فرآیندهای اتوفاژیک جایگزین، با عفونت باکتریایی سازگار شدند. در واقع، تعدادی از پاتوژن‌های درون سلولی پروتئین‌های خاصی را در خود جای داده‌اند که با پروتئین‌های اتوفاژی تعامل یا تقلید می‌کنند تا عملکرد آنها را دستکاری یا قطع کنند. به عنوان مثال، پروتئین عامل SidM/DrrA لژیونلا پنوموفیلا، GTPase Rab1 کوچک را از طریق فاکتور تبادل نوکلئوتید گوانین و فعالیت AMPylation خود به شکل فعال ایجاد می‌کند. SifA، یک پروتئین مؤثر از *S. enterica*, نقل و انتقال رتروگراد وابسته به Rab9 گیرنده‌های مانوز-۶-فسفات را زیر و رو می‌کند. در نتیجه عملکرد لیزوژوم را با اتصال به هدف سلول میزبان خود SKIP/PLEKHM2 کاهش می‌دهد. بررسی بیشتر پروتئین‌های Rab و برهمکنش‌های آن‌ها با واکوئل‌های پاتوژن، نوید افزایش دانش مکانیسم‌های مولکولی اتوفاژی را می‌دهد.

برای شناسایی آداتورهای اتوفاژی بالقوه، Popovic و همکاران (۲۰۱۲) اخیراً تجزیه و تحلیل جامعی انجام دادند. آنها ۱۴ نوع GAP Rab حاوی دامنه TBC را شناسایی کردند که مستقیماً به اصلاح کننده‌های LC3 (ATG8) متصل می‌شوند و با غشاها اتوفاژی LC3 ثابت در سلول‌ها کلوکالیزه می‌شوند. جالب توجه است که اگرچه این ۱۴ پروتئین TBC با اصلاح کننده‌های ATG8 برهمکنش داشتند، تنها چهار پروتئین با MAP1LC3B در سلول‌های HeLa کلوکالیزه شدند. TBC Rab GAPs ممکن است عملکرد اضافی برای تنظیم مسیرهای مختلف نقل و انتقال وزیکولی داشته باشد و این مسیرها را در اتوفاژی به شیوه‌ای خاص به بخش‌های سلولی خاص مرتبط کند.

اتوفاژی توسط یک ماشین سلولی بسیار حفاظت شده کنترل می‌شود که میانجی فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف از جمله ایمنی در برابر پاتوژن‌های داخل سلولی است. در اینجا ما این واقعیت را بررسی کردیم که پروتئین‌های Rab در مراحل متمایز بیوژن اتوفاگوزوم عمل می‌کنند.

علاوه بر این، ما اعضای متمایز خانواده پروتئین Rab را داریم که برخی آتوفاژی ناشی از گرسنگی را تنظیم می‌کنند و برخی نیز، آتوفاژی ضد باکتریایی را تنظیم می‌کنند. به طور خاص، پروتئین‌های Rab-Rab9A و Rab23 تنظیم کننده GcAV برای آتوفاژی ناشی از گرسنگی هستند. مطالعات بیشتر در مورد بررسی آتوفاژی در حین عفونت توسط GAS و سایر باکتری‌ها، دانش مکانیسم‌هایی را که سرنوشت سلول میزبان توسط پاتوژن‌های باکتریایی را تعیین می‌کند، گسترش خواهد داد.

فصل ۱۱

کنترل عفونت هلیکوباکتر پیلوری با اتوفاژی

هلیکوباکتر پیلوری

هلیکوباکتر پیلوری، یک باکتری گرم منفی و میکروآئروفیل است که معمولاً به عنوان یکی از موفق ترین پاتوژن‌های انسانی در تمام دوران در نظر گرفته می‌شود. این باکتری به طور انتخابی، اپیتنیوم معده‌ی تقریباً نیمی از جمعیت جهان را درگیر کرده است. شواهد فعلی نشان می‌دهد که انسان‌ها حداقل ۸۸۰۰۰ تا ۱۱۶۰۰۰ سال است که به هلیکوباکتر پیلوری مبتلا هستند. عفونت با هلیکوباکتر پیلوری معمولاً در اوایل دوران کودکی ایجاد می‌شود و در صورت عدم درمان می‌تواند در تمام طول عمر میزبان ادامه یابد. اعتقاد بر این است که تماس فرد به فرد راه اصلی انتقال است. شیوع عفونت هلیکوباکتر پیلوری بسته به موقعیت جغرافیایی متفاوت است اما در کشورهای در حال توسعه بیشتر است. در کانادا و ایالات متحده، شیوع هلیکوباکتر پیلوری در جمعیت افراد بالغ، ۳۰ درصد تخمین زده می‌شود؛ در حالی که در بسیاری از کشورهای کمتر توسعه یافته بیش از ۸۰ درصد جمعیت درگیر هستند.

از زمان معرفی اولیه این باکتری توسط مارشال و وارن در سال ۱۹۸۳، هلیکوباکتر پیلوری به عنوان عامل ایجاد کننده گاستریت مزن، بیماری زخم معده، لنفوم بافت لنفوئیدی مرتبط با مخاط معده (MALT) و سرطان معده شناخته شده است. آژانس بین المللی تحقیقات سرطان (IARC) این باکتری را با عنوان سرطان زای کلاس I معرفی کرده است. در واقع، اکنون عفونت با هلیکوباکتر پیلوری به عنوان مهم ترین عامل خطر برای ایجاد سرطان معده پذیرفته شده

است. برآوردهای فعلی نشان می‌دهد که حداقل ۷۵ درصد از آدنوکارسینوم معده را می‌توان به عفونت هلیکوباکتر پیلوری نسبت داد. اکثر افراد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری بدون علامت باقی می‌مانند؛ اگرچه تقریباً همه دارای درجه خاصی از التهاب معده هستند. از افراد آلوده، تقریباً ۱۰ تا ۱۵ درصد به بیماری زخم معده و ۱ تا ۳ درصد به سرطان معده مبتلا می‌شوند. پیشرفت‌های اخیر در پاتوژنز هلیکوباکتر پیلوری نشان می‌دهد که نقش این باکتری در بیماری معده چند وجهی است و تحت تأثیر عوامل میزبان، باکتریایی و محیطی قرار دارد. با توجه به اینکه سرطان معده چهارمین سرطان شایع و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان است، بار سلامتی قابل توجهی برای جامعه ایجاد می‌کند. بنابراین، درک اینکه چگونه هلیکوباکتر پیلوری، معده را آلوده کرده و باعث سرطان‌زایی در معده می‌شود، برای توسعه استراتژی‌های درمانی ضروری است.

معده انسان تا مدت‌ها استریل در نظر گرفته می‌شد؛ زیرا این محیط برای بقا و رشد میکرووارگانیسم‌ها بسیار کشنده تلقی می‌شد. با این حال، شناسایی هلیکوباکتر پیلوری در معده افراد مبتلا به گاستریت و زخم پیتیک این تصور غلط را تغییر داد. اکنون مشخص شده است که معده می‌تواند توسط باکتری‌های مختلف کلونیزه شود.

هلیکوباکتر پیلوری گونه غالب میکروبیوم معده در افراد آلوده است. در داخل معده، اکثر هلیکوباکتر پیلوری در داخل مخاط یا در تماس مستقیم با اپیتلیوم قرار دارد. با این حال، زیر مجموعه‌ای از باکتری‌ها می‌توانند به سلول‌های اپیتلیال معده، ماکروفازها و سلول‌های دندریتیک (DCs) حمله کرده و زنده بمانند.

هلیکوباکتر پیلوری استراتژی‌هایی را برای بقا و تداوم، با توجه به وضعیت اکولوژیکی منحصر به فرد خود انتخاب کرده است. کلونیزاسیون اولیه، نیاز به فرار سریع از مجرای اسیدی دارد که توسط یک لایه ضخیم موکوس (که از سلول‌های پوششی معده در برابر اسید معده محافظت می‌کند) ممانعت می‌شود. هلیکوباکتر پیلوری، اوره آز تولید می‌کند؛ آنزیمی که از طریق هیدرولیز اوره، آمونیاک تولید می‌کند. تولید آمونیاک، PH موضعی را افزایش می‌دهد و علاوه بر ایجاد مقاومت اسیدی، مخاط معده را از قوام ژل مانند، به محلولی ویسکوالاستیک که باکتری‌ها می‌توانند از طریق آن شنا کنند، تبدیل می‌کند. بیان UreI، یک کانال اوره وابسته به pH، به باکتری اجازه می‌دهد تا اوره را از محیط جذب کند تا این فرآیند تسهیل شود. هلیکوباکتر پیلوری همچنین دارای تازک‌های چرخشی است که برای کلونیزاسیون حیاتی هستند و باکتری را قادر

۲۱۱: کنترل عفونت هلیکو باکتریپیلوری با اتوفاژی

می‌سازد از مجرای معده به سمت محل نظر خود در اپیتلیوم مخاطی شنا کند. جهت گیری فضایی صحیح برای حرکت مناسب تازک مورد نیاز است و این امر از طریق یک سیستم کموتاکسی که بر شیب pH ترانس موکوسی متکی است به دست می‌آید. همچنین تصور می‌شود که شکل مارپیچ منحصر بفرد هلیکو باکتر پیلوری، باعث افزایش تحرک و تسهیل فرار از مجرای معده، از طریق مکانیسم "درب باز کن" می‌شود. (یعنی شکل این باکتری شبیه به درب بازکن‌های چوب پنبه‌ای است که نمایی مارپیچ دارند.)

تعدادی از عوامل تعیین کننده بیماری زایی دیگر، به بقا و تداوم هلیکو باکتر پیلوری کمک می‌کنند. ژن مرتبط با سیتو توکسین (CagA) و سیتو توکسین واکوئل کننده (VacA) دو مورد از بهترین فاکتورهای حدت مورد مطالعه هستند که هر دو، به شدت با بیماری معده مرتبط هستند. ژن cagA در گروه بیماریزایی cag قرار دارد که سیستم ترشح نوع IV (T4SS) را کد می‌کند. ژن T4SS، CagA را به سیتوپلاسم سلول میزبان آلوده تزریق می‌کند؛ جایی که می‌تواند توسط کینازهای Src و Abl در موتیف‌های مشخص Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) فسفریله شود. هم CagA فسفریله شده و هم غیر فسفریله، تعدادی از پاسخ‌های مختلف را در میزبان ایجاد می‌کنند. مسیرهای سیگنال دهی تغییر یافته توسط CagA فسفریله، تغییرات مورفولوژیکی مرتبط با پراکندگی و طویل شدن سلول را ایجاد می‌کند که به آن "اثر مرغ مگس خوار" می‌گویند. CagA غیر فسفریله در پاسخ‌های پیش التهابی و میتوژنیک، اختلال در اتصالات سلول به سلول و از دست دادن قطبیت سلولی نقش دارد.

فاکتور اصلی بیماریزای دیگر یعنی VacA، یک سم ترشحی و منفذ ساز است که در کانال‌های غشایی انتخابی "کلریدی" جمع می‌شود. تمام سویه‌های هلیکو باکتر پیلوری دارای ژن vacA هستند. با این حال، تنوع توالی قابل توجهی در بین سویه‌ها وجود دارد که با تفاوت در سمتی سلولی مرتبط است. ژن را می‌توان به چهار ناحیه تقسیم کرد: ناحیه توالی سیگنال (منطقه s)، ناحیه میانی (منطقه i)، منطقه میانی (منطقه m) و منطقه انتقال دهنده خودکار. بخش‌های چندشکلی در هر یک از مناطق -s-، -i- و -m- ژن شناسایی شده است. در حالی که هنوز ارتباط انواع i-region با بیماری معده به خوبی مشخص نشده است، نسخه آللی VacA به شدت با سرطان معده و فنوتیپ‌های VacA شدید مرتبط است. خود سم، چند منظوره است و باعث ایجاد اثرات مختلف بر روی سلول میزبان می‌شود. قابل توجه ترین پیامد عفونت VacA در شرایط آزمایشگاهی، تشکیل واکوئل‌های بزرگ درون سلولی است که نام خود را از آن گرفته

است. در داخل سلول، بخشی از VacA به سمت میتوکندری مورد هدف قرار می‌گیرد؛ جایی که باعث دپلاریزاسیون غشاء، نفوذپذیری غشای خارجی، تکه تکه شدن و آزادسازی سیتوکروم C می‌شود. اعتقاد بر این است که این اثرات ایجاد شده روی عملکرد میتوکندری، به مرگ سلولی در سلول‌های اپیتلیال معده کمک می‌کند. این سم همچنین سیگنال‌های پیش التهابی را بر می‌انگیزد و اثراتی بر سلول‌های ایمنی دارد. اخیراً نشان داده شده است که VacA، مسیر اتوفاژی سلول‌های میزبان آلوده را تعديل می‌کند. تعديل اتوفاژی برای بقا، تداوم و پاتوژنر هلیکوبکتر پیلوری مهم است که در بخش‌های بعدی این فصل مورد بحث قرار می‌گیرد.

TABLE 11.1 Major *H. pylori* virulence determinants

Factor	Role	Description/Function	Reference
Lipopolysaccharide	Evasion of host immune system, colonization	Mimics carbohydrate structures found on gastric epithelial cells by incorporating Lewis antigens into its O-antigen chain Interacts with DCs to downregulate inflammatory response	Simoons-Smit et al., 1996; Bergman et al., 2004; Moran, 2008; Skoglund et al., 2009
Flagella	Colonization, motility	Multiple rotating flagella equip bacterium to swim through the gastric mucosa Essential for colonization in several animal models	Eaton et al., 1996; Ottmann and Lowenthal, 2002
Urease	Acid resistance, colonization	Elevates local pH by production of ammonia through hydrolysis of urea pH elevation alters the physicochemical properties of gastric mucus to enable the bacterium to swim through it	Sudebotham et al., 2003; Celi et al., 2007, 2009
UreI	Acid resistance, colonization	pH-dependent urea channel Permits uptake of urea from the environment for the production of ammonia by urease	Bury-Moné et al., 2001a, 2001b; Rektorscheck et al., 2000
NpaA	Oxidative stress management	Activates neutrophils Protects bacterium against oxidative stress Stimulates production of reactive oxygen intermediates in the host	Evans et al., 1995; Cooksey et al., 2003; Brisslent et al., 2005; Wang et al., 2006
BabA	Colonization, adhesion	Outer membrane protein Binds fucosylated Lewis ^B antigens expressed on gastric epithelial cells and in mucus layer Potentiates activity of the T4SS	Iiver et al., 1998; Ishijima et al., 2011
SabA	Colonization, adhesion	Outer membrane protein Binds sialyl-Lewis ^X antigen expressed on gastric epithelial cells Activates neutrophils	Mahdavi et al., 2002; Umeno et al., 2005

(continued overleaf)

TABLE 11.1 (*continued*)

Factor	Role	Description/Function	Reference
OipA	Inflammation, colonization, adhesion	Outer membrane protein Involved in attachment to epithelial cells Involved in mucosal inflammation and induction of IL-1, IL-8, IL-17, TNF- α Upregulates expression of matrix metalloproteinase 1 Activates Akt signaling and inhibits glycogen synthase kinase 3 β Activates β -catenin resulting in opening of cell–cell junctions and proliferation Duodenal ulcer-promoting gene Involved in IL-8 production	Yamaoka et al., 2000, 2004; Wu et al., 2006; Franco et al., 2008; Tabassam et al., 2008, 2009; Sugimoto et al., 2009
DupA	Inflammation	Delivered to host via Cag T4SS Phosphorylated Cag A activates eukaryotic tyrosine phosphatase (SHP-2), which activates ERK1/2, Crk adaptor, and C-terminal Src kinase Induces “hummingbird” morphological changes in host	Higashi et al., 2002; Amieva et al., 2003; Churin et al., 2003; Brandt et al., 2005; Murata-Kamiya et al., 2007; Saadat et al., 2007; Suzuki et al., 2009; Umehara et al., 2009
CagA	Inflammation	Nonphosphorylated Cag A interacts with E-cadherin, c-Met, phospholipase C- γ , Grb2, and the kinase partitioning-defective 1b/microtubule affinity-regulating kinase 2 (PAR 1b/ MARK2) Involved in recruitment of the junctional adhesion molecule (JAM) and the tight junction protein zona occludens-1 (ZO-1) to areas of bacterial contact Activates β -catenin and initiates proinflammatory and mitogenic responses, disruption of cell–cell junctions, and loss of polarity	

γ -Glutamyl transpeptidase	Evasion of host immune system, in inflammation	Involved in production of glutamine Induces IL-8 production Interferes with DC maturation and contributes to DC tolerization Inhibits proliferation of gastric cells and T cells Induces apoptosis	Rimbara et al., 2013; Oertli et al., 2013; Shibayama et al., 2003; Schmees et al., 2007
Peptidoglycan	Inflammation, cell shape, colonization	Delivered to host via Cag T4SS or outer-membrane vesicles Modified by specific enzymes to reduce cross-linking and promote helical shape, which facilitates colonization Interacts with host intracellular pattern recognition molecule, Nod1 Stimulates activation of NF- κ B-dependent and type I interferon-dependent proinflammatory responses in the host	Viala et al., 2004; Bonis et al., 2010; Sycuro et al., 2010, 2012; Kaparakis et al., 2010; Waranabe et al., 2010
VacA	Colonization	Chloride-selective pore-forming toxin Induces vacuolation, mitochondrial dysfunction (depolarization, fragmentation, cytochrome C release), autophagy and cell death Stimulates proinflammatory cytokines Activates p38, Erk1/2, ATF-2, and Gαt1 pathways Disrupts cell-cell epithelial barriers and macrophage maturation Inhibits activation and proliferation of T and B cells	Terebizznik et al., 2009; Chu et al., 2010; Wang et al., 2009, 2010; Zheng and Jones, 2003; Torres et al., 2007; Boncristiano et al., 2003; Gebert et al., 2003; Sundrud et al., 2004; Fujikawa et al., 2003; Nakayama et al., 2004; Hisatsune et al., 2007, 2008; Supajatura et al., 2002; Sun et al., 2006; Kim et al., 2007; Takeshima et al., 2009; Galmiche et al., 2000; Willhite et al., 2003; Willhite and Blanke, 2004; Ashktorab et al., 2004; Yamasaki et al., 2006; Jain et al., 2011; Jones et al., 1997; Kuck et al., 2001; Cover et al., 2003; Radin et al., 2011

هليکوباكتر پيلوري و فرار از پاسخ های ايماني ميزبان

علي الرغم وجود پاسخ التهابي که باعث گاستریت مزمن می شود، عفونت مادام العمر باقی می ماند و اين نشان می دهد که هليکوباكتر پيلوري مکانیسم هايي را برای فرار يا براندازی پاسخ ايماني ميزبان ايجاد کرده است. علاوه بر اين، عفونت هليکوباكتر پيلوري يك عامل اصلی در ايجاد سرطان معده است که بر توانايی های تعديل کننده ايماني پاتوژن تأکيد دارد.

پاسخ ايماني ميزبان به هليکوباكتر پيلوري را می توان به يك پاسخ ذاتي و يك پاسخ تطبيقی تقسيم کرد. سیستم ايماني ذاتي به طور کلی يك واکنش غير اختصاصي و فوري به اجزاي باكتريائي نشان می دهد که هدف آن، از بين بردن و پاکسازی باكتري است. سلول هاي اپيتيلial و ايماني ذاتي، اجزاي ميكروبی حفاظت شده را که الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن (PAMPs) ناميده می شوند، از طريق درگيري با گيرنده های تشخيص الگو (PRR) شناسايی می کنند. چهار دسته مجزا از PRRها وجود دارد که هر کدام از نظر ويژگی، لوکاليزاسيون درون سلولی و جفت شدن با عوامل پايین دستی متفاوت هستند. هليکوباكتر پيلوري از شناخته شدن توسط چندين نوع PRR که در تشخيص پاتوژن های گرم منفی مهم هستند، فرار می کند.

Toll-like receptors (TLR)ها که روی سطح غشای پلاسمایي قرار دارند يا در اندوزومها قرار دارند، عفونت را با اتصال کلاس های مختلف PAMPها تشخيص می دهند. به اين ترتيب، پاتوژن ها مکانیسم هايي را برای جلوگيري از فعال شدن TLR ايجاد کرده اند. ليپopolی ساکارید هليکوباكتر پيلوري (LPS)، طوری اصلاح شده است که از نظر بيولويزیکی هزار برابر ضعيف از LPS اشريشيا کلی است و پاسخ التهابي در سلول هاي اپيتيلial ايجاد نمی کند. پس از عفونت با هليکوباكتر پيلوري، TLR2 و TLR5 سيگنال دهندي فاكتور هسته ای (NF-kB) را القا می کنند که منجر به توليد اينترلوكين ۸ (IL-8) می شود که يك واسطه مهم در به کار گيری لنفوسيت ها و نوتروفيل ها است. اگرچه فلاژلين ممکن است TLR5 را تحريك کند، مطالعات نشان می دهد که رده های سلولی اپيتيلial پاسخ دهنده به فلاژلين، فلاژلين هليکوباكتر پيلوري لوکاليزه يا نوترکيب را تشخيص نمی دهند. مطالعه اى توسط Gewirtz و همكاران. (۲۰۰۴) گزارش کرد که جزء ساختاري تاژک اوليه هليکوباكتر پيلوري آزاد نمی شود و در مقایسه با فلاژلين سالمونلا تيفی موريوم، ذاتاً توان التهابي کمتری دارد که دو مکانیسم متمایز را نشان می دهد که توسط آن هليکوباكتر پيلوري از شناسايی شدن توسط TLR5 فرار می کند.

۲۱۷ فصل ۱۱: کنترل عفونت هلیکوباتریپلوری با اتوفاژی

TLR9 عمدتاً موتیف‌های CpG غیر متیله را که DNA باکتری‌ها و ویروس‌ها را دارد، تشخیص می‌دهد. با این حال، هلیکوباتر پیلوری احتمالاً به دلیل نرخ بالای متیلاسیون DNA آن، از تشخیص توسط TLR9 فرار می‌کند. این مکانیسم‌ها برای فرار از ایمنی ناشی از TLR به توانایی هلیکوباتر پیلوری برای تداوم و ایجاد بیماری در معده میزبان خود برای مدت طولانی کمک می‌کنند.

(NLRs) Node-like receptors طیف وسیعی از PAMP‌ها را شناسایی می‌کنند و همچنین در سنجش الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب ناشی از میزبان (DAMPs) که به دنبال تهاجم، به هموستاز بافت منتشر می‌شوند، بسیار مهم هستند. NLR‌ها به دو دسته کلی تقسیم می‌شوند: Nod1/Nod2 متابولیت‌ها را تشخیص می‌دهند و رونویسی NF-kB را فعال می‌کنند در حالی که سایر NLR‌ها تجمع التهابی را بیشتر می‌کنند. هلیکوباتر پیلوری سیگنانال‌دهی Nod1 را در سلول‌های اپیتلیال به روی مستقل از تهاجم تحریک می‌کند و به T4SS باکتریایی نیاز دارد. اگرچه این مکانیسم هنوز به طور کامل تعریف نشده است، T4SS تحويل داخل سلولی آگونیست meso-DAP حاوی Nod1 را تسهیل می‌کند.

هلیکوباتر پیلوری همچنین حاوی لیگاندهای دسته سوم PRR‌ها یعنی گیرندهای لکتین نوع C است. هلیکوباتر پیلوری دارای لیگاندهای فوکوزیله است که به اعضای خانواده CLR DC-SIGN متصل می‌شود در حالی که پاتوژن‌هایی مانند مایکوباتریوم توبرکلوزیس و HIV لیگاندهای DC-SIGN مانوزیله را بیان می‌کنند که سیگنانال‌دهی پایین دستی پیش التهابی DC-SIGN برای سرکوب سیگنانالینگ پیش التهابی جدا کند. به طور خلاصه، هلیکوباتر پیلوری، از القای یک پاسخ پیش التهابی قوی و پاکسازی، از طریق فرار از تشخیص داده شدن توسط ایمنی ذاتی سه کلاس مختلف PRR، جلوگیری می‌کند.

سیستم ایمنی اکتسابی، یک پاسخ ایمنی دقیق، هدفمند و با تاخیر نسبت به آنتی‌ژن‌های خاص دارد. پاسخ ایمنی اکتسابی (تطبیقی) شامل به کار گیری، فعال سازی و تکثیر انواع مختلف سلول‌های ایمنی است. بیان متفاوت مولکول‌های چسبندگی خاص، کموکاین‌ها و سیتوکین‌ها، مکان و زمان برهمکنش‌های بین سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن (APCs) و لنفوسيت‌هایی مانند سلول‌های T و B را تنظیم می‌کنند.

DCها یکی از قوی ترین انواع APC‌ها در سیستم ایمنی هستند. نقش اصلی آنها شروع پاسخ ایمنی تطبیقی با شناسایی، پردازش و ارائه آنتی ژن به سلول‌های عامل برای فعال شدن است. DCها در مخاط معده افراد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری یافت می‌شوند که در لامینا پروپریا ساکن هستند. DCها برجستگی‌های طولانی را از طریق اتصالات اپی تلیال - آپیکال (که مستقیماً هلیکوباکتر پیلوری را جذب می‌کنند) گسترش می‌دهند. هلیکوباکتر پیلوری با DCها تعامل می‌کند تا بلوغ و فعال شدن این سلول‌های ایمنی را آغاز کند که پس از آن، این سلول‌ها سیتوکین‌های مهمی تولید می‌کنند. بلوغ DC، مستلزم تنظیم مولکول‌های سطح سلولی مانند CD40، CD80 و MHC کلاس II است. این مولکول‌های سطح سلولی، بخشی از سیناپس ایمونولوژیک را تشکیل می‌دهند که وقتی به وجود می‌آیند که DC‌های بالغ، پیتیدهای آنتی ژنی را برای تمایز بیشتر و فعال‌سازی پاسخ ایمنی تطبیقی به سلول‌های T ارائه می‌کنند. شواهد اخیر نشان می‌دهد که عفونت هلیکوباکتر پیلوری ممکن است بلوغ DC را تعدیل کند. یک مطالعه نشان داد که در DC‌های مشتق از مغز استخوان آلوده به هلیکوباکتر پیلوری، مولکول‌های MHC کلاس II در واکوئل‌های حاوی هلیکوباکتر پیلوری لوکالیزه شدند و به سطح سلول منتقل نشدند. عفونت هلیکوباکتر پیلوری نه تنها بیان اینترفرون- γ (IFN- γ) و MHC کلاس II، بلکه بیان CD80 و CD86 را نیز مهار می‌کند و بر بلوغ DC تأثیر می‌گذارد. بنابراین، یک الگوی غیر طبیعی بلوغ DC، می‌تواند منجر به التهاب موضعی از طریق تولید سایتوکین‌های التهابی و فعال‌سازی نامناسب سلول‌های T از طریق القای پاسخ‌های نامتعادل Th-1/Th-2 شود.

هلیکوباکتر پیلوری بیان دندرتیکی سیتوکین‌های مختلف از جمله IL-6، IL-8، IL-10 و IL-12 را تحریک می‌کند. بیان این سیتوکین‌ها توسط DC‌ها در پاسخ به هلیکوباکتر پیلوری تا حدی توسط آنتی ژن‌های DC-SIGN و لوئیس در LPS تعديل می‌شود. مطالعه‌ای توسط برگمن و همکاران. نشان داد که DC‌های انکوبه شده با سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری آنتی ژن منفی لوئیس، IL-6 بیشتر و IL-10 کمتری در مقایسه با DC‌های انکوبه شده با هلیکوباکتر پیلوری آنتی ژن مثبت لوئیس بیان می‌کنند. از آنجایی که IL-10 به طور کلی پاسخ التهابی را کاهش می‌دهد، برهمکنش بین هلیکوباکتر پیلوری، LPS و DC-SIGN ممکن است به سرکوب سیگنالینگ پیش التهابی کمک کنند.

عفونت هلیکوباکتر پیلوری منجر به پاسخ ایمنی میزان از نوع غالب TH1 می‌شود که با القای ژن‌های IFN- γ و مرتبط با IFN مشخص می‌شود. پاسخ ایمنی غالب TH1 منجر به افزایش

۲۱۹ فصل ۱۱: کنترل عفونت هلیکوپاتر پیلوئی با اتوفاژی

سطح سیتوکین‌های پیش التهابی IL-12، IL-18 و فاکتور نکروز بافتی α -TNF (TNF) می‌شود. با این حال، هر دو فاکتور VacA و γ -گلوتامیل ترانس پپتیداز از هلیکوپاتر پیلوئی، بر فعالیت سلول‌های T (به طور غیر مستقیم و با ترویج ترجیحی تمایز سلول‌های T ساده به سلول‌های Treg) تأثیر می‌گذارند.

سلول‌های Treg سلول‌های T تنظیم‌کننده ایمنی هستند که از تکثیر و فعال‌سازی سلول‌های ایمنی، از جمله APCs و سایر سلول‌های T موثر جلوگیری می‌کنند. سلول‌های Treg به طور موثری پاسخ ایمنی را از طریق مکانیسم‌های تماس مستقیم و غیرمستقیم سرکوب می‌کنند. بنابراین، سلول‌های Treg نقش حیاتی در پیشگیری از بیماری خودایمنی و خاموش کردن پاسخ ایمنی پس از ریشه‌کنی پاتوژن ایفا می‌کنند. هلیکوپاتر پیلوئی دارای اثرات تعدیل کننده ایمنی است که ترجیحاً تمایز سلول‌های Treg را تقویت می‌کند و در نتیجه سیستم ایمنی میزبان را قبل از ریشه‌کنی آن سرکوب می‌کند. تمایز سلول‌های Treg نیاز به تعامل مستقیم سلول‌های T ساده با سلول‌های DC ای دارد که قبلاً در معرض هلیکوپاتر پیلوئی قرار گرفته‌اند. DC‌هایی که قبلاً در معرض هلیکوپاتر پیلوئی قرار گرفته‌اند، ترجیحاً سلول‌های Treg را متمایز می‌کنند و قادر به القای پاسخ‌های سلول T مؤثر از نوع TH1 و TH17، چه در داخل بدن و چه در شرایط آزمایشگاهی نیستند. این سلول‌های Treg القایی، سیتوکین‌های سرکوب‌کننده ایمنی مانند فاکتور رشد تبدیل‌کننده β -TGF (TGF- β) و IL-10 را برای مهار سلول‌های ایمنی مختلف تولید می‌کنند. به طور خلاصه، هلیکوپاتر پیلوئی، مکانیسم‌های مختلفی را برای فرار از پاسخ‌های ایمنی میزبان، به منظور ترویج عفونت مزمن ایجاد کرده است.

اتوفاژی

شواهد فعلی نشان می‌دهد که مسیر اتوفاژی، تنظیم کننده مهم پاسخ‌های ایمنی میزبان است و نقش کلیدی در کنترل عفونت ایفا می‌کند. اتوفاژی، یک فرآیند سلولی کاتابولیک حفظ شده تکاملی است که توسط آن، محتواهای سیتوپلاسمی برای تجزیه به لیزوزوم‌ها تحویل داده می‌شود. در شرایط عادی، اتوفاژی با از بین بردن پروتئین‌های بیش از حد یا غیر ضروری و اندامک‌های آسیب دیده یا قدیمی، هموستان را حفظ می‌کند. مسیر اتوفاژی به بسیاری از مسیرهای پاسخ سلولی، از جمله مسیرهای پاسخ‌های ایمنی، التهابی و کنترل سرطان متصل است. یک رابطه متقابل پیچیده بین اتوفاژی و سیستم ایمنی وجود دارد که در آن هر دو قادر به القا و سرکوب

یکدیگر هستند. نقص در اتوفاژی ممکن است زمینه ساز پاتوژن بسیاری از بیماری‌ها و پاسخ‌های التهابی باشد.

اتوفاژی توسط مکانیسم‌های پیچیده زیادی تنظیم می‌شود و توسط مسیرهای مولکولی مختلفی که به طور کامل مشخص نشده‌اند، کنترل می‌شود. فرآیند اتوفاژی را می‌توان به چند مرحله مجزا تقسیم کرد؛ از جمله‌ی آنها فرآیندهای القا، هسته سازی و طویل شدن فاگوفور، تکمیل اتوفاگوزوم، بلوغ/همجوشی وزیکول با لیزوژوم و در نهایت تخریب محموله‌اند. در طی اتوفاژی، محتويات سیتوپلاسمی، توسط ساختارهای دو غشایی به نام اتوفاگوزوم‌ها در بر گرفته می‌شود. اتوفاگوزوم‌ها با لیزوژوم‌ها ترکیب می‌شوند که در آن هیدرولازهای اسیدی، ماکرومولکول‌های بزرگ را به اجزای اصلی خود تجزیه می‌کنند.

مسیر اتوفاژی به سیگنال‌های ورودی مختلف مانند مواد مغذی، فاکتورهای رشد، هورمون‌ها، هیپوکسی و تجمع پروتئین‌های بد تا شده یا آسیب‌دیده پاسخ می‌دهد. بسیاری از این سیگنال‌ها در سطح کمپلکس هدف راپامایسین پستانداران (mTORC) همگرا می‌شوند. mTORC، تعدادی از فرآیندهای سلولی از جمله رشد سلولی، تکثیر، سنتز پروتئین و اتوفاژی را تنظیم می‌کند. شروع اتوفاژی نیازمند مهار mTORC است که در اثر شرایطی مانند گرسنگی، کاهش فاکتور رشد و عفونت ایجاد می‌شود. مهار mTORC باعث فعال شدن پایین دست ULK1/2 می‌شود که و بستر mTOR را تشکیل می‌دهند که کمپلکس ULK نامیده می‌شود. کمپلکس ULK از سیتوزول، به شبکه آندوبلاسمی (ER) منتقل می‌شود. ارتباط کمپلکس ULK با ER، یک کمپلکس فسفاتیدیل ۳-کیناز (PI3K) مخصوص اتوفاژی اختصاصی ER را فعال می‌کند که از Beclin 1، PIK3R4، PIK3C3 و ATG13 RB1CC1 را فسفریله می‌کند. پروتئین‌های بعدی ATG13 و ATG14 در شرایط غنی از مواد مغذی مهار می‌شود. Beclin 1 متصل می‌شود؛ در حالی که گرسنگی باعث اتوفاژی از طریق جداسازی Beclin 1 از BCL2 می‌شود.

انتخاب و تحويل محموله به ساختار اتوفاگوزومی، هنوز به طور کامل مشخص نیست. با این حال، پیشنهاد شده است که لیگاندهای موجود در سطح محموله، توسط یک گیرنده (به عنوان مثال، p62) در سیتوزول یا به طور مستقیم یا مرتبط با یوبیکویتین، قبل از شناسایی، توسط

فصل ۱۱: کنترل عفونت هلیکو باکتریالوری با اتوفاژی ۲۲۱

گیرنده اتصال به یوبیکوئیتین تشخیص داده شوند. گیرنده متصل به لیگاند، سپس با داربستی تعامل می‌کند که محموله را در مجاورت فاگوفور می‌آورد.

به دنبال القای اتوفاژی، دو سیستم کونژوگه شبه یوبیکوئیتین، برای بیوژنز اتوفاگوزوم ضروری است. این سیستم‌ها وظیفه انساط، شکل دهی و آب بندی غشا را بر عهده دارند. کمپلکسی متشکل از ATG5، ATG12 و ATG16L1 به غشای خارجی فاگوفور نوپا کونژوگه شده است و برای بلوغ اتوفاگوزوم مورد نیاز است. این کمپلکس وظیفه شکل دادن به غشاء را بر عهده دارد و به عنوان لیگاز E3 عمل می‌کند تا امکان تکمیل واکنش کونژوگاسیون دوم را فراهم کند. دومین فرآیند کونژوگاسیون شبه یوبیکوئیتین، شامل لیپیداسیون زنجیره سبک ۳ (LC3) مرتبط با میکروتوبول است. از طریق یک سری واکنش، LC3 به فسفاتیدیل اتانول آمین (PE) در غشای اتوفاگوزوم برای تولید LC3-II کونژوگه می‌شود. LC3-II مرتبط با غشای اتوفاگوزومی باقی می‌ماند و تنها پس از ادغام با لیزوژوم تجزیه می‌شود. از آنجایی که LC3-II مستقیماً به غشای اتوفاگوزوم متصل می‌شود ولی LC3-I سیتوزولی است، LC3-II یک شاخص ارزشمند اتوفاژی است.

در طول بلوغ، اتوفاگوزوم با لیزوژوم‌های اسیدی ترکیب می‌شود و اتلیزوزوم‌ها را تشکیل می‌دهد. لیزوژوم‌های خودکار حاوی پروتئازهای لیزوژومی هستند که محموله‌های جدا شده را تجزیه می‌کنند. این مراحل با هم شامل شار اتوفاژیک (یک جریان درون سلولی پیوسته از تشکیل اتوفاگوزوم تا جداسازی و تخریب محموله) و رهاسازی نهایی مولکول‌های تجزیه شده به داخل سیتوزول است.

بیگانه خواری، شکل خاصی از اتوفاژی است که پاتوژن‌های داخل سلولی را به عنوان هدف قرار می‌دهد و سهم مهمی در پاسخ ایمنی ذاتی و تطبیقی به عفونت دارد. به طور کلی، القای اتوفاژی توسط باکتری‌های بیماری زا توسط عوامل بیماریزا یا اجزای باکتریایی ایجاد می‌شود. در طول عفونت، سه پیامد به دنبال اتوفاژی ناشی از باکتری ممکن است. اول اینکه: اتوفاژی می‌تواند رشد باکتری را محدود کند، همانطور که در سالمونلا انتریکا و *M. tuberculosis* مشاهده شد. باکتری‌ها توسط اتوفاگوزوم‌ها غرق شده و ریشه کن می‌شوند. دوم اینکه: برخی از باکتری‌ها می‌توانند از تخریب اتوفاژیک فرار کنند؛ همانطور که توسط *Listeria* و *Shigella flexneri* و *monocytogenes* نشان داده شده است. سوم اینکه: برخی از باکتری‌ها، مانند استافیلوکوکوس

اورئوس و آنапلاسما فاگوسیتوفیلوم، قادر به تکثیر در داخل اتوفاگوزوم‌ها هستند. هر یک از این پیامدها می‌تواند در طول عفونت هلیکوباکتر پیلوری به شیوه‌ای وابسته به زمینه رخ دهنده و مطالعات مربوطه در زیر به تفصیل در این مورد بحث می‌کند.

عفونت حاد هلیکوباکتر پیلوری: القای اتوفاژی در سلول‌های اپیتلیال معده

چندین گروه، القای اتوفاژی توسط هلیکوباکتر پیلوری را توصیف کرده‌اند. نشانه اولیه برهمکنش بین اتوفاژی و هلیکوباکتر پیلوری، از مطالعات توصیف واکوئل‌هایی با خواص مشابه اتوفاگوزوم‌ها، در سلول‌های تیمار شده با مایع رویی کشت از باکتری VacA+ نشات گرفته است. VacACTION برای القای اتوفاژی در سلول‌های اپیتلیال معده انسان لازم و کافی است.

دانش ما در مورد مکانیسم اتوفاژی ناشی از VacA هنوز محدود است؛ اگرچه برخی جزئیات در حال آشکار شدن هستند. یک پیشرفت مهم، کشف این نکته بود که پروتئین-1 مرتبط با گیرنده لیپوپروتئین با چگالی کم (LRP1)، یک پروتئین غشایی در سطحی، در درونی سازی و فعالیت‌های پایین دست VacA نقش دارد. یاهیرو و همکاران نشان دادند که خاموش شدن siRNA LRP1 در سلول‌های اپیتلیال معده، از درونی شدن سم جلوگیری کرده و اتوفاژی را سرکوب می‌کند. این اثر مختص LRP1 بود زیرا میزان اتوفاژی در سلول‌های ترانسفکت شده با siRNA، در برابر سایر گیرنده‌های VacA، RPTP α ، RPTP β و فیبرونکتین بدون تغییر بود.

مهارکننده اتوفاژی اختصاصی PI3K، ۳-متیل آدنین، اتوفاژی ناشی از VacA را مهار نکرده، و همچنین بکلین ۱ را مهار نمی‌کند. این یافته‌ها به سادگی نشان می‌دهد که اتوفاژی ناشی از VacA از مسیر PI3K کلاس III متعارف (شامل هسته سازی اتوفاگوزوم توسط کمپلکس PI3K با Beclin1) پیروی نمی‌کند. با توجه به ظرفیت سم برای آسیب رساندن به میتوکندری، یک احتمال جالب این است که در پاسخ به VacA، میزان اتوفاژی را برای حذف میتوکندری‌های آسیب دیده (میتوفاژی) ایجاد می‌کند. علاوه بر این، با یافته‌های Yahiro و همکارانش (۲۰۱۲)، مکانیسم‌های مستقل PI3K/Beclin 1 غیر متعارف برای القای میتوفاژی توصیف شده است. با این حال، این نویسنده‌گان قادر به تشخیص کلوكالیزاسیون بین میتوکندری و اتوفاگوزوم در سلول‌های تحت درمان با VacA نبودند؛ که نشان می‌دهد که میتوکندری‌های آسیب دیده، محرك اتوفاژی با واسطه VacA نیستند. کاهش سطح ATP در سلول‌های تحت درمان با VacA گزارش شده است که احتمالاً به دلیل تأثیر آن بر میتوکندری است. بنابراین، تفسیر جالب

فصل ۱۱: کنترل عفونت هلیکوباتریپلوری با اتوفاژی

دیگر این است که VacA از طریق فعال سازی پروتئین کیناز فعال شده با آدنوزین مونوفسفات (AMP) اتوفاژی را القا می‌کند که با کاهش نسبت ATP/AMP سلولی تحریک می‌شود.

یک احتمال جایگزین این است که VacA از طریق آسیب به غشاهای میزبان و/یا اندوزوم‌ها باعث افزایش اتوفاژی شود. سایر پاتوژن‌های داخل سلولی و سموم تشکیل دهنده منفذ، سیگنال‌های پیش اتوفاژیک و پاسخ‌های استرسی مانند گرسنگی را در سلول‌های آلوده تحریک می‌کنند. فرض بر این است که این اثرات، از طریق توانایی پاتوژن برای سوراخ کردن غشاهای میزبان رخ می‌دهند. با این حال، این فرضیه هنوز مورد بررسی قرار نگرفته است.

علاوه بر LRP1، مطالعات اخیر، از نقش گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در اتوفاژی ناشی از VacA پشتیبانی می‌کند. درمان سلول‌های اپیتلیال معده با s1m1 VacA سمی (نه نسخه‌های s1m2 یا s2m2 VacA) به طور قابل توجهی، ROS را همراه با افزایش اتوفاژی افزایش داد. افزایش ROS را می‌توان به کاهش سطح سلولی گلوتاتیون توسط مکانیسم هنوز ناشناخته VacA نسبت داد. در واقع، قرار گرفتن سلول‌ها در معرض N-استیل سیستئین (آنتی اکسیدانی) که منبع گلوتاتیون درون سلولی را دوباره پر می‌کند) از اتوفاژی ناشی از VacA جلوگیری می‌کند. در مقابل، ترکیباتی که ROS اختصاصی میتوکندری را مهار می‌کنند، هیچ تأثیری نداشتند و از یافته‌های Yahirō و همکارانش حمایت می‌کنند. (که نشان می‌دهد میتوکندری، در القای اتوفاژی توسط VacA دخالت ندارد) با این حال، داده‌ها از مدلی پشتیبانی می‌کنند که در آن افزایش ROS سلولی، یک نیاز مکانیکی مهم برای القای اتوفاژی است.

رویدادهای سیگنال دهی مرتبط با اتوفاژی ناشی از VacA نیز به خوبی تعریف نشده‌اند. داده‌ها نشان می‌دهند که مسیر متعارف PI3K/Beclin-1 در این امر، درگیر نیست؛ در حالی که Tsugawa و همکاران. (۲۰۱۲) نشان می‌دهند که p53 نقش دارد. پس از عفونت سلول‌های اپیتلیال معده با +VacA هلیکوباتر پیلوری، بیان p53 به طور معنی داری کاهش می‌یابد؛ پدیده ای که با القای اتوفاژی در رده‌های سلولی متعدد مرتبط است.

داده‌های در حال ظهور نشان می‌دهند که تأثیر اتوفاژی بر پاتوژنر پیچیده است و ممکن است عملکردهای مختلفی را در مراحل مختلف عفونت انجام دهد. به عنوان یک مکانیسم کلی از ایمنی ذاتی، سلول‌ها از اتوفاژی برای حذف پاتوژن‌ها و سموم مهاجم استفاده می‌کنند. در طول عفونت حاد با هلیکوباتر پیلوری، به نظر می‌رسد این استراتژی اعمال می‌شود. استراتژی فوق،

با بقای داخل سلولی بیشتر باکتری ها، در فیبروبلاستهای جنینی موش دارای نقص اتوفاژی (-Atg5) منطبق است. چو و همکارانش از طریق استفاده از سنجش های حفاظتی جنتامايسین و میکروسکوپ الکترونی، شواهدی ارائه کردند که در سلول های اپیتلیال معده، وزیکول های اتوفاژیک ممکن است یک محفظه درون سلولی ایجاد کنند که در آن هلیکوباکتر پیلوری می تواند تکثیر شود. با این حال، پس از افزایش اولیه، عملکرد باکتری های داخل سلولی در زمان های بعدی عفونت کاهش یافت. هلیکوباکتر پیلوری حاوی اتوفاگوزوم، با لیزوژوم ها ترکیب شده و محتویات آنها را تخریب می کند. در مطالعه دیگری، بقای درون سلولی هلیکوباکتر پیلوری در سلول های اپیتلیال معده، تحت درمان با فعال کننده های اتوفاژی (راپامایسین و گرسنگی) کاهش یافت و در سلول های تحت درمان با مهار کننده اتوفاژی ۳-متیل آدنین افزایش یافت. این موضوع، از ظرفیت اتوفاژی برای محدود کردن بقای داخل سلولی هلیکوباکتر پیلوری پشتیبانی می کند.

از نظر مکانیکی، اتوفاژی ممکن است از طریق تنظیم VacA داخل سلولی به حذف هلیکوباکتر پیلوری مهاجم نیز کمک کند. پس از عفونت، هلیکوباکتر پیلوری داخل سلولی، در داخل سیتوپلاسم، واکوئل های بزرگ ناشی از VacA یا اتوفاگوزوم ها یافت می شوند. اگرچه برای تهاجم ضروری به نظر نمی رسد، اما VacA با افزایش درونی سازی و بقای درون سلولی همراه است؛ این امر احتمالاً از طریق توانایی آن در ایجاد واکوئل های محافظتی صورت می گیرد که در آن باکتری ها می توانند ساکن شده و تکثیر شوند.

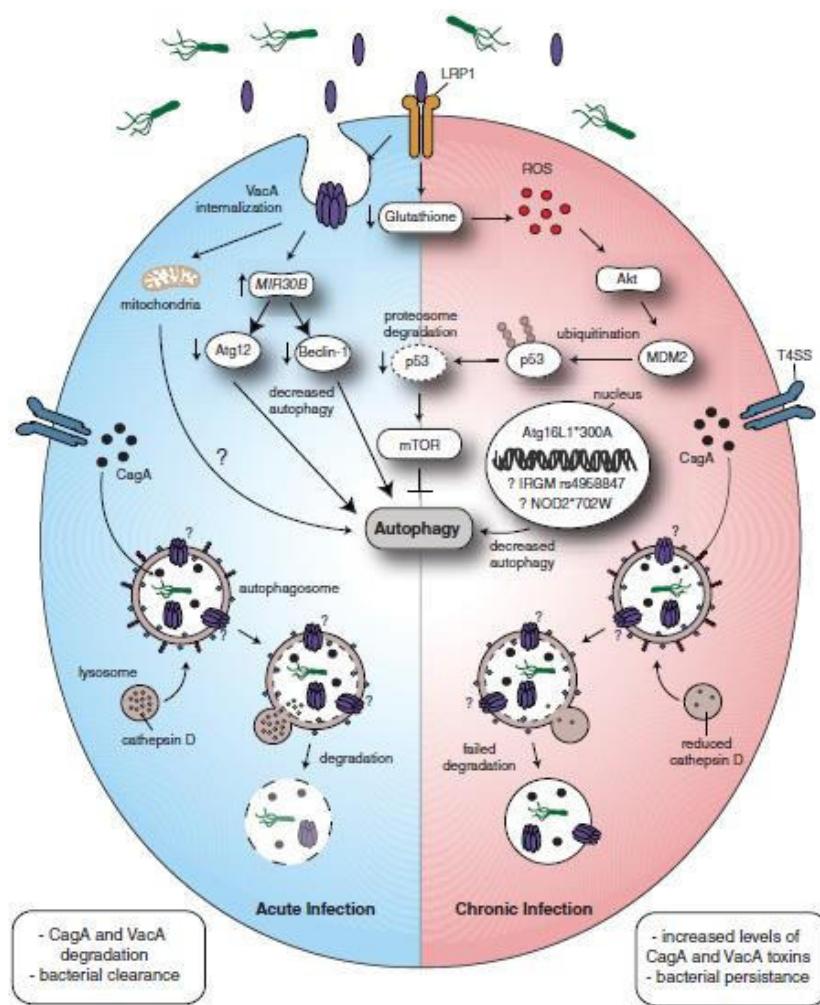
در سلول های اپیتلیال معده، واضح است که اتوفاژی، VacA داخل سلولی را تخریب می کند. پس از جذب و حذف بعدی سم خارج سلولی، سطح VacA داخل سلولی در طول زمان کاهش می یابد و این در حالیست که سطوح VacA در سلول های معیوب در اتوفاژی، به دلیل از بین رفتن ATG12 نسبتاً بدون تغییر باقی می ماند. پس از ۲۴ ساعت، واکوئل های بزرگ، دیگر در سلول های کنترلی (در مقایسه با سلول های ناک داون ATG12) قابل مشاهده نبودند، که نشان می دهد تقریباً تمام VacA از طریق اتوفاژی تخریب شده است. علاوه بر این، در مراحل اولیه عفونت، اندازه واکوئل های بزرگ در سلول های دارای کمبود اتوفاژی در مقایسه با گروه کنترل، به طور قابل توجهی بیشتر بود. این موضوع، منطبق با حضور VacA بیشتر، برای ترویج بیوژنر واکوئلی بود. در نهایت این داده ها نشان می دهند که اتوفاژی، ممکن است به عنوان دفاع میزبان

۲۲۵ **فصل ۱۱: کنترل عفونت هلیکوباکتر پیلوری با اتوفاژی**

برای کاهش آسیب ناشی از سم و استرس مرتبط با واکوئلاسیون بیش از حد عمل کند؛ در حالی که بقا و تکثیر هلیکوباکتر پیلوری مهاجم را از طریق حذف لانه‌های داخل سلولی محدود می‌کند.

علاوه بر نقش اتوفاژی در تخریب VacA درونی شده، این مکانیسم در تنظیم CagA داخل سلولی نیز نقش دارد. تسوگاوا و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که پس از عفونت و حذف هلیکوباکتر پیلوری خارج سلولی، CagA داخل سلولی در سلول‌های اپیتلیال معده کاهش یافت. تخریب CagA را می‌توان به طور خاص به اتوفاژی نسبت داد؛ زیرا سطوح CagA تحت تأثیر مهارکننده‌های پروتئاز قرار نمی‌گیرد اما پس از درمان با مهارکننده‌های اتوفاژی افزایش می‌یابد. این یافته، توسط میکروسکوپ الکترونی تایید شد؛ زمانی که CagA نشاندار شده با immunogold را در داخل اتوفاگوزوم‌های سلول‌های بیان‌کننده CagA (که در آن اتوفاژی ایجاد شده بود) شناسایی نمود. علاوه بر این، القای اتوفاژی برای تخریب CagA کاملاً ضروری است و به حضور s1m1 VacA سمی وابسته است. سلول‌های تحت درمان با اشکال s1m2 یا s2m2 که اتوفاژی را القا نمی‌کنند، سطوح CagA بدون تغییری دارند. علاوه بر این، نابودی گیرنده اتوفاژی VacA (یعنی LRP1)، از تخریب CagA جلوگیری می‌کند.

به طور کلی، به نظر می‌رسد که القای اتوفاژی در طول عفونت حاد با VacA+ *H. pylori* برای میزبان مفید باشد (شکل ۱۱.۱). طی این پروسه، سطح سم VacA و CagA کاهش یافته و اثرات نامطلوب آنها نیز کاهش می‌یابد. علاوه بر این، باکتری‌های مهاجم به طور مستقیم، از طریق تخریب در اتوفاگولیزوم‌ها و به طور غیرمستقیم، از طریق حذف VacA پاک می‌شوند که به نوبه خود، از تشکیل محفظه‌های داخل سلولی که در آنها پاتوژن می‌تواند ساکن شده و تکثیر و پنهان شود، جلوگیری می‌کند. با این حال مانند بسیاری از پاتوژن‌ها، هلیکوباکتر پیلوری استراتژی‌هایی را برای براندازی مسیر اتوفاژی میزبان ابداع کرده است. این استراتژی‌ها، علاوه بر فاکتورهای مربوط به میزبان که مانع اتوفاژی می‌شوند، در زمینه عفونت مزمن نیز اهمیت ویژه‌ای دارند.



شکل ۱۱.۱ مدل اتوفاژی با واسطه هلیکوباتر پیلوری. در طول عفونت، VacA از طریق اتصال با LRP1 درونی می‌شود. درونی سازی VacA از طریق کاهش سطح درون سلولی گلوتاتیون، ROS را افزایش می‌دهد. افزایش ROS باعث فعال‌سازی Akt می‌شود که MDM2 را فعال می‌کند تا p53 را یوبی کوئینتینه کند و به آن سیگنال mTOR را سرکوب می‌کند که باعث القای می‌دهد که توسط پروتئوزوم تجزیه شود. سطوح کاهش یافته p53 باعث دیگری باعث اتوفاژی شود. یک اتوفاژی می‌شود. VacA همچنین ممکن است از طریق مکانیسم‌های ناشناخته دیگری باعث اتوفاژی شود. یک احتمال این است که سم، باعث میتوفاژی به منظور از بین بردن میتوکندری‌های آسیب دیده شود. عفونت با MIR30B را تحریک می‌کند که مستقیماً بیان ATG12 و Beclin 1 را برای سرکوب اتوفاژی VacA همچنین بیان ATG16L1*300A را تحریک می‌کند. منجر به اتوفاژی کمتر هدف قرار داده و کاهش می‌دهد. زنتیک میزبان، مانند پلی‌مورفیسم CagA، منجر به اتوفاژی در پاسخ به عفونت هلیکوباتر پیلوری می‌شود. در طول عفونت حاد، اتوفاژی ناشی از VacA منجر به تخریب D نیستند و ظرفیت تخریب آنها کاهش می‌یابد. در نتیجه، VacA، CagA، و هلیکوباتر پیلوری داخل سلولی باقی می‌مانند و محیطی را ایجاد می‌کنند که ممکن است به نفع سرطان زایی باشد.

عفونت مزمن هلیکوباکتر پیلوری: سرکوب اتوفاژی در سلول‌های اپیتلیال معده

هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند با فرمان دادن به دستگاه اتوفاژی و استفاده از آن به عنوان یک میانجی همانندسازی، از پاسخ‌های ایمنی میزبان فرار کند. راجو و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که قرار گرفتن طولانی مدت سلول‌های اپیتلیال معده AGS با مایع رویی کشت‌های VacA+ که H. pylori منجر به تجمع اتوفاگوزوم‌های معیوب (با هیدرولیز ناقص پروتئین) می‌شود. در سلول‌های AGS تیمار شده با مایع رویی کشت هلیکوباکتر پیلوری +VacA، در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، کاهش در سطوح کاتپسین D (CTSD) (یک پروتئاز لیزوزومی جدایی ناپذیر در اتوفاگولیزوزوم‌ها) دیده شد. بلوغ pro-CTSD به شکل فعال پروتئولیتیکی آن، نیازمند یک محیط اسیدی است که تیپیکال آندوزوم‌ها و لیزوزوم‌ها است. ساتین و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که کاهش مقدار CTSD بالغ در سلول‌های HeLa تیمار شده با VacA، به دلیل خنثی‌سازی جزئی VacA در pH اسیدی بخش‌های آندوزومی و لیزوزومی روی می‌دهد. در مقابل، گروه‌های دیگر گزارش کردند که اسیدی شدن لیزوزومی در سلول‌های AGS تیمار شده با VacA تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد. بنابراین، مکانیسمی که بوسیله آن، اتوفاگوزوم‌های متاثر از VacA فاقد CTSD هستند، هنوز حل نشده است. در نهایت، مهار تخریب توسط اتوفاگولیزوزوم‌ها به بقای داخل سلولی و تکثیر هلیکوباکتر پیلوری کمک می‌کند.

تجمع p62 در طول عفونت طولانی مدت TVacA بر توانایی هلیکوباکتر پیلوری برای متوقف کردن بلوغ اتوفاگوزوم موثر است. p62 یک پروتئین داربست اتصال دهنده به یوبیکوئیتین است که توسط اتوفاژی از طریق ارتباط مستقیم با LC3 تجزیه می‌شود. بنابراین، انتظار می‌رود که کمبود آن در اتوفاژی، منجر به تجمع p62 شود. تشکیل دانه‌های p62 در سلول‌های AGS تیمار شده با مایع رویی کشت VacA+ هلیکوباکتر پیلوری، در مقایسه با سلول‌های تیمار شده با مایع رویی کشت VacA-، به طور قابل توجهی افزایش یافت. علاوه بر این، بیان p62 در نمونه‌برداری‌های معده از بیماران آلوده به سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری که فرم s1m1 سمی VacA را بیان می‌کنند، در مقایسه با بیماران آلوده به سویه‌های مرتبط با اشکال غیر سمی VacA افزایش یافت. این یافته‌ها لایه دیگری از شواهد را خاطر نشان می‌کنند که نشان می‌دهد قرار گرفتن مزمن در معرض VacA+ H. pylori تجزیه اتوفاژیک را مختل کرده و به پاتوژن اجازه می‌دهد که در میزبان زنده بماند.

مکانیسم‌های دیگری که توسط آن هلیکوباکتر پیلوری از پاکسازی اتوفاژیک فرار می‌کند اخیراً شناسایی شده‌اند. تانگ و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که بیان یک نوع microRNA موسوم به MIR30B، در طول عفونت هلیکوباکتر پیلوری، در رده‌های سلولی اپیتلیال معده انسان و بافت مخاطی معده افزایش یافته است. این بیان microRNA برای عفونت هلیکوباکتر پیلوری منحصربه‌فرد بوده زیرا سایر پاتوژن‌ها مانند سویه‌های E. coli DH5α و H7: O157: H7 یا تعديل کننده‌های اتوفاژی (راپامایسین و ۳-متیل آدنین) بر سطوح MIR30B تأثیری نداشتند. تانگ و همکاران با استفاده از تقییدها و مهار کننده‌های MIR30B نشان دادند که در طی عفونت هلیکوباکتر پیلوری، سلولهای AGS اتوفاژی سلول میزبان را کاهش دادند که این امر، با کاهش تبدیل LC3-I به LC3-II مشهود است. ابزارهای هدف بیوانفورماتیک پیش‌بینی کردند که ATG12 و Beclin 1 اهداف مستقیم MIR30B هستند. این مشاهدات در نمونه‌های بافت معده انسان که برای هلیکوباکتر پیلوری مثبت بودند، اثبات شد؛ زیرا سطوح ATG12، MIR30B، با یا ۱ Beclin 1 نسبت معکوس داشت.

هلیکوباکتر پیلوری و القای اتوفاژی در سلول‌های ایمنی

علاوه بر دستکاری اتوفاژی در سلول‌های اپیتلیال معده، هلیکوباکتر پیلوری باعث ایجاد اتوفاژی در ماکروفازها و DC‌ها می‌شود. عفونت هلیکوباکتر پیلوری سلول‌های THP-1 مونوцитی انسانی (اما نه سلول‌های RAW 264.7 ماکروفاز موش) باعث اتوفاژی به شیوه‌ای وابسته به فشار می‌شود. علاوه بر این، در سلول‌های THP-1، مهار اتوفاژی توسط ۳-متیل آدنین باعث افزایش بقای باکتری می‌شود در حالی که راپامایسین بقای باکتری را کاهش می‌دهد. این موضوع نشان می‌دهد که اتوفاژی، عفونت داخل سلولی توسط هلیکوباکتر پیلوری را در این رده سلولی محدود می‌کند. به طور خاص، در ۱۲ ساعت پس از عفونت، LC3-II با واکوئل‌های حاوی هلیکوباکتر پیلوری colocalized می‌شود و با افزایش ۵ تا ۱۰ برابری، در واحد تشکیل کلنی هلیکوباکتر پیلوری (CFU) در ارتباط است. این نتایج نشان می‌دهد که هلیکوباکتر پیلوری قبل از پاکسازی در اتوفاگوزوم‌ها تکثیر می‌شود. با توجه به نقش مهم DC‌ها در تنظیم پاسخ ایمنی اکتسابی، تکثیر هلیکوباکتر پیلوری در DC‌ها نه تنها جایگاهی برای ماندگاری آن فراهم کرده، بلکه پیامدهایی برای سیستم ایمنی میزبان نیز دارد.

فصل ۱۱: کنترل عفونت هلیکوباکتر پیلوئی با اتوفاژی ۲۲۹

جالب توجه است که هم در ماکروفاژهای انسان و هم در DC‌های مشتق از مغز استخوان موش، باکتری‌های جهش یافته cagA و vacA- سریع‌تر از همتایان نوع وحشی خود پاک شدند. این موضوع، برخلاف سلول‌های اپیتلیال معده است که CagA غیرقابل مصرف بود. این یافته‌ها نقش VacA و CagA را در بقای داخل سلولی هلیکوباکتر پیلوئی در فاگوسیت‌های اولیه نشان می‌دهد. نیازهای متفاوت برای سموم گزارش شده در این مطالعات ممکن است نشان دهنده تفاوت در کینتیک اتوفاژی، در انواع سلول‌های فاگوسیتی در مقابل غیرفاگوسیتی باشد. علاوه بر این، به نظر می‌رسد که افزایش بقای هلیکوباکتر پیلوئی، در سلول‌های اپیتلیال معده تحت درمان با ۳-متیل آدنین، با ادعاهای Yahirō و همکارانش مبنی بر اینکه این مهار کننده بر اتوفاژی ناشی از VacA در یک رد سلولی سرطان معده تأثیری ندارد، تناقض دارد.

ژنتیک میزان موثر بر پاکسازی اتوفاژیک هلیکوباکتر پیلوئی

یک پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در زن ATG16L1، به عنوان عامل خطر برای بیماری کرون (یک اختلال التهابی روده که با عفونت هلیکوباکتر پیلوئی نیز مرتبط است) شناسایی شده است. پروتئین ATG16L1 بخشی از یک سیستم کونزوگه شبیه یوبیکوئیتین است که برای تشکیل اتوفاگوزوم ضروری است. تصور می‌شود که نوع اسیب زننده ATG16L1 T300A، مانع جذب و پاکسازی باکتری در طول اتوفاژی می‌شود. راجو و همکاران (۲۰۱۲) دریافتند که پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی مربوط به ATG16L1 در T300A، با کاهش اتوفاژی در پاسخ به VacA در طول عفونت هلیکوباکتر پیلوئی همراه است. پاسخ اتوفاژیک به VacA در مونوسیت‌های خون محیطی (PBMCs) افراد دارای آلل خطر A³⁰⁰، در مقایسه با PBMC‌های الوده حامل آلل طبیعی T³⁰⁰، به طور قابل توجهی دارای نقص است. در یک مطالعه جمعیتی روی گروه‌های قفقازی، افراد هموزیگوت برای آلل خطر A³⁰⁰ در مقایسه با آن‌هایی که هموزیگوت با آلل T³⁰⁰ طبیعی داشتند، حساسیت بیشتری نسبت به عفونت توسط سویه‌های هلیکوباکتر پیلوئی که شکل s1m1 VacA را بیان می‌کنند، نشان دادند. این نتایج نشان می‌دهد که افراد دارای آلل ATG16L1*300A به دلیل اختلال اتوفاژی، حساسیت بیشتری نسبت به عفونت هلیکوباکتر پیلوئی دارند.

یک PRR درون سلولی یوکاریوتی است که مورامیل دی پیتید باکتریایی را تشخیص می‌دهد و گزارش شده است که دستگاه اتوفاژی را به عمل وا می‌دارد. تراواسوس و همکاران

(۲۰۱۰) نشان دادند که Nod2 با ATG16L1 در نقطه ورود میزبان *S. flexneri* تعامل دارد؛ محلی که به عنوان یک حسگر و عامل هسته‌زا، برای به کارگیری دستگاه اتوفاژی با هدف جداسازی باکتری‌های داخل سلولی در اتوفاگوزوم‌ها عمل می‌کند. Nod2 واسطه فعال‌سازی NF-kB تحریک شده با هلیکوباکتر پیلوری در سلول‌های میزبان آلوود است؛ در حالی که نوع R702W Nod2 مرتبط با بیماری کرون نمی‌تواند واسطه‌ی این پاسخ باشد. علاوه بر این، جهش R702W به شدت با افزایش خطر ابتلا به لنفوم MALT معده مرتبط است. برای بررسی اینکه آیا جهش Nod2 در طول عفونت هلیکوباکتر پیلوری بر اتوفاژی نیز تأثیر می‌گذارد یا خیر، مطالعات بیشتری لازم است.

ژن IRGM (GTPase M) مرتبط با ایمنی پروتئینی را کد می‌کند که برای فعال کردن اتوفاژی در پاسخ به عفونت باکتریایی مهم است. IRGM در پاکسازی باکتریایی با واسطه اتوفاژی *S. Typhimurium* و *M. tuberculosis* نقش دارد. Burada و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که پلی مورفیسم IRGM Rs4958847 با افزایش حساسیت به سرطان معده مرتبط است که التهاب مزمن ناشی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری در آن نقش مهمی دارد. برای تعیین اینکه آیا افراد ناقل پلی‌مورفیسم IRGM Rs4958847، القای اتوفاژی را در طول عفونت هلیکوباکتر پیلوری تغییر داده‌اند یا خیر و اینکه آیا این موضوع بر بیماری معده ناشی از هلیکوباکتر پیلوری تأثیر می‌گذارد یا خیر، مطالعات آینده ضروری خواهد بود.

هلیکوباکتر پیلوری در اتوفاژی مختل و سرطان معده

مطالعات متعددی ارتباط بین CagA، VacA و ایجاد سرطان معده را نشان داده‌اند. تصور می‌شد که CagA در مراحل اولیه سرطان‌زاوی معده نقش دارد؛ زیرا فقط در مخاط معده بیماران دارای هلیکوباکتر پیلوری که مبتلا به گاستریت آترووفیک بودند، تشخیص داده می‌شد، اما در مخاط معده بیماران مبتلا به متاپلازی روده یا سرطان مشاهده نشد. با این حال، مطالعه اخیر توسط Tsugawa و همکاران. (۲۰۱۲) ارتباط مولکولی CagA را در سرطان‌زاوی معده، از طریق سرکوب اتوفاژی نشان می‌دهد. تجمع CagA داخل سلولی، به سلول‌هایی با اتوفاژی سرکوب شده محدود می‌شود. در مطالعه آنها، CagA داخل سلولی، به طور خاص در سلول‌های سرطان معده انسانی بیان کننده CD44v9، تجمع می‌یابد. این سلول‌های سرطانی معده بیان کننده CD44v9 به دلیل مقاومتشان در برابر ROS (با افزایش سنتز گلوتاتیون از طریق افزایش جذب

فصل ۱۱: کنترل عفونت هلیکوباکتر پیلوئی با اتوفاژی ۲۳۱

سیستین) اتوفاژی را سرکوب می‌کنند. پس از مهار شیمیایی جذب سیستین، سطوح CagA داخل سلولی به صورت وابسته به دوز کاهش می‌یابد. بنابراین، CagA به طور خاص، با فرار از اتوفاژی ناشی از ROS، در سلول‌های بیان کننده CD44v9 تجمع می‌یابد. جالب توجه است که عفونت هلیکوباکتر پیلوئی ممکن است از طریق ایجاد التهاب مزمن، باعث بیان CD44v9 در اپیتلیوم طبیعی معده شود. تداوم CagA در سلول‌ها می‌تواند یک مکانیسم احتمالی برای ایجاد سرطان معده باشد.

اتوفاژی با پاکسازی بسترهاي سلولی و اندامک‌های آسیب دیده ای که محصولات ژنوتوکسیک تولید می‌کنند، هموستاز را حفظ می‌کند. سرطان معده، با اختلال در مسیرهای ترمیم DNA و بی ثباتی ژنتیکی در DNA هسته ای و میتوکندریایی همراه است. سلول‌های دارای اتوفاژی مختل شده با VacA، قادر به تخریب پروتئین‌های با نیمه عمر طولانی نیستند و به دلیل تجمع میتوکندری‌های آسیب دیده، ROS را افزایش می‌دهند. به نوبه خود، افزایش سطح ROS منجر به آسیب DNA می‌شود و ممکن است سرطان زایی را در طول عفونت هلیکوباکتر پیلوئی افزایش دهد.

افزایش سطح p62 نیز در سرطان معده دخیل است، زیرا این جزء اتوفاژی به فعال شدن فاکتور هسته ای پاسخگو به استرس یعنی فاکتور مرتبط با اریتروئید ۲ (NRF2) کمک می‌کند. این فاکتور رونویسی بیان ژن‌های سمزدایی ROS را تنظیم می‌کند و توسط KEAP1 (پروتئین ۱ مرتبط با ECH) حاوی یوپیکوئتین لیگاز، بی‌ثبات می‌شود. بوومینو و همکاران (۲۰۱۲) تأثیر پروتئین‌های هلیکوباکتر پیلوئی را بر مسیر NRF2 - KEAP1 مطالعه کردند و دریافتند که CagA و پروتئین شوک حرارتی (HspB) (اما نه VacA) بیان ژن KEAP1 را افزایش می‌دهند؛ در حالی که بیان ژن NRF2 را کاهش می‌دهند. بنابراین، اختلال در گرددش p62 به دلیل اختلال در بلوغ اتوفاگوزوم با واسطه VacA می‌تواند مکانیسم‌های پاسخ آنتی‌اکسیدانی سلول میزبان که وابسته به NRF2 است را مختل کند. در نتیجه یک محیط تقویت‌کننده ایجاد تومور ایجاد می‌کند.

درمان هلیکوباکتر پیلوئی: آیا اتوفاژی یک مدعی است؟

در دهه گذشته، ریشه کنی هلیکوباکتر پیلوئی، به دلیل پتانسیل آن در پیشگیری از سرطان معده توجه گسترده ای را به خود جلب کرده است. با این حال، در مواجهه رو به رشد مقاومت ضد

میکروبی، انجام این کار به طور فزاینده‌ای دشوار شده است. علاوه بر این، چندین گروه پیشنهاد کرده‌اند که هلیکوباکتر پیلوری ممکن است نقش محافظتی در بیماری التهابی روده، آسم و بیماری ریفلaks معده داشته باشد و این سوال را مطرح می‌کنند که آیا درمان ریشه کنی در همه موارد مناسب است یا خیر. با این وجود، چهارمین دستورالعمل اجماع ماستریخت/فلورانس بیان می‌کند که درمان ریشه کنی در پیشگیری از سرطان معده، اگر قبل از ایجاد ضایعات پرہنپلاستیک انجام شود، مؤثر است. این نتیجه گیری توسط داده‌های متاآنالیز تایید می‌شود که نشان می‌دهد ریشه کنی هلیکوباکتر پیلوری، خطر ابتلا به سرطان معده را کاهش می‌دهد. علاوه بر این، در مدل ژربیل مغولی سرطان معده، ریشه کنی عفونت هلیکوباکتر پیلوری، به طور قابل توجهی سرطان زایی معده را به ویژه در مراحل اولیه عفونت کاهش داد. یافته‌های مشابهی با استفاده از مدل موش هلیکوباکتر فلیس گزارش شد.

تعدادی از رژیم‌های درمانی در حال حاضر برای ریشه کنی هلیکوباکتر پیلوری استفاده می‌شود. با این حال، مقاومت آنتی بیوتیکی عامل اصلی شکست درمان و کاهش میزان ریشه کنی هلیکوباکتر پیلوری است. شیوع مقاومت‌های مختلف آنتی بیوتیکی بر اساس موقعیت جغرافیایی، متفاوت است که با مصرف عمومی آنتی بیوتیک‌ها توسط مردم ارتباط دارد. داده‌های متاآنالیز شامل مطالعات بین سال‌های ۱۹۹۳ و ۲۰۰۹ نشان می‌دهد که مقاومت هلیکوباکتر پیلوری به آنتی بیوتیک‌های مختلف افزایش جهانی داشته است. مکانیسم‌های مقاوم اغلب از طریق جهش‌های کروموزومی به دست می‌آیند. وو و همکاران (۲۰۱۲) و بویانوا و میتوف (۲۰۱۰) خلاصه ای از سازگاری هلیکوباکتر پیلوری را با آنتی بیوتیک‌های رایج در درمان ریشه کنی ارائه دادند.

با توجه به کاهش موفقیت ریشه کنی، رویکردهای جدید و جایگزین برای بهبود اثربخشی درمان در حال بررسی است. یک احتمال جالب این است که عفونت هلیکوباکتر پیلوری ممکن است از طریق تعديل اتوفاژی کنترل شود. همانطور که قبلاً بحث شد، القای اتوفاژی در طول فاز حاد عفونت هلیکوباکتر پیلوری باعث افزایش حذف پاتوژن مهاجم در شرایط آزمایشگاهی شد. با توجه به این، جالب است که حدس بزنیم که فعال کننده‌های دارویی اتوفاژی، ممکن است در درمان هلیکوباکتر پیلوری مفید باشند؛ به ویژه برای از بین بردن باکتری‌های داخل سلولیکه توسط آنتی بیوتیک‌ها قابل دسترسی نیستند. در واقع، چو و همکارانش نشان دادند که رشد درون سلولی هلیکوباکتر پیلوری، فرار پاتوژن از کشتار توسط آنتی بیوتیک‌های خارج سلولی مانند

فصل ۱۱: کنترل عفونت هلیکوباکتر پیلوری با اتوفاژی ۲۳۳

آموکسی سیلین یا جنتامايسین را تسهیل می‌کند. آنتی بیوتیک‌های نفوذپذیر سلولی، مانند کلاریتروومایسین یا مترونیدازول، همچنان قادر به مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری داخل سلولی بودند؛ البته با دوزی بسیار بالاتر.

یانگ و همکارانش شواهدی در حمایت از مدولاسیون اتوفاژی برای درمان هلیکوباکتر پیلوری ارائه کردند. درمان ترکیبی سلول‌های اپیتلیال معده با کاتچین‌ها و اسید سیالیک باعث تحریک بیان ۱ Beclin و افزایش اتوفاژی وابسته به ۱ در سلول‌های آلوده به هلیکوباکتر پیلوری شد. هنگامی که کاتچین‌ها و اسید سیالیک حذف شدند، ۱ در سلول‌های آلوده به هلیکوباکتر پیلوری کاهش یافت و در نتیجه اتوفاژی سرکوب شد. مشاهدات با یک سری مطالعات *in vivo* گسترش یافت که در آنها، پیش درمانی موش با کاتچین و اسید سیالیک، به طور کامل از کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری جلوگیری کرد. در مقابل، تمام موش‌ها در گروه‌های کنترلی که مکمل دریافت نکرده بودند کلونیزه شدند. علاوه بر این، پس از درمان موش‌های کلونیزه شده با مکمل‌های کاتچین و اسید سیالیک، بار باکتریایی را کاهش داد و تا ۶۰ درصد از عفونت‌های هلیکوباکتر پیلوری را ریشه کن کرد. بعداً، همان گروه، یک استراتژی درمانی بهینه را تعیین کرده و نشان داد که هلیکوباکتر پیلوری را می‌توان در ۹۵ درصد موش‌های آلوده از بین برد. القای اتوفاژی توسط کاتچین/سیالیک اسید برای کمک به موفقیت ریشه کنی پیشنهاد شد. با این حال، مطالعات بیشتری برای تأیید نقش اتوفاژی در این فرآیند ضروری خواهد بود.

به استثنای کاتچین/سیالیک اسید، هنوز پتانسیل فعال کننده‌های دارویی اتوفاژی برای ریشه کن کردن هلیکوباکتر پیلوری در مدل‌های حیوانی مورد بررسی قرار نگرفته‌اند. با این حال، بررسی سایر پاتوژن‌های مهاجم نشان می‌دهد که این مفهوم قابل بررسی است. به عنوان مثال، دو داروی ضد مایکوبکتریال مورد استفاده بالینی، ایزوپیازید و پیرازینامید، اتوفاژی و بلوغ فاگوزومی را در سلول‌های آلوده به *M. tuberculosis* ترویج می‌کنند. در یک مدل عفونت مگس سرکه، از بین بردن اجزای ضروری اتوفاژی، بقای مگس‌ها را کاهش داد. علاوه بر این، مگس‌های جهش یافته *-Atg7* در پاسخ خود به داروها معیوب بودند که نشان می‌دهد اتوفاژی جزء مکانیسم ضد میکروبی آنها است.

سایر فعال کننده‌های اتوفاژی، مانند ویتامین D، بقای *M. tuberculosis* داخل سلولی را در شرایط آزمایشگاهی مهار می‌کنند و از این ایده حمایت می‌کنند که اتوفاژی می‌تواند برای مبارزه

با عفونت پاتوژن دستکاری شود. نمونه‌های دیگری که بر نقش اتوفاژی حاصل از فارماکولوژی، در پاکسازی باکتریایی تاکید می‌کنند عبارتند از *S. enterica serovar* و *Francisella tularensis* و *Salmonella typhimurium*. با این حال، باید توجه دقیقی به عوارض احتمالی ناشی از اتوفاژی در درمان هلیکوباکتر پیلوری داشت. مهمتر از همه، در طول عفونت مزمن، پاتوژن‌ها بلوغ اتوفاگوزوم را مختل می‌کنند؛ در نتیجه یک محفظه درون سلولی ایجاد می‌کنند که در آن باکتری‌ها می‌توانند پنهان شده، تکثیر شوند و از آنتی بیوتیک‌ها فرار کنند. در این زمینه، فعال شدن اتوفاژی در واقع می‌تواند عفونت پایدار را ترویج کند و مهار اتوفاژی ممکن است ضروری تر باشد. با این حال، ممکن است اتوفاژی قوی، برای غلبه بر بلوغ اتوفاگوزوم مختل شده توسط هلیکوباکتر پیلوری و تسهیل پاکسازی باکتری موثر باشد. در نهایت، مطالعات *in vitro* و *in vivo* نیز، برای آزمایش اینکه آیا فعالسازی یا مهار اتوفاژی در درمان عفونت هلیکوباکتر پیلوری مفید است یا خیر، ضروری خواهد بود. بیشوف و همکاران (۲۰۱۲) یک مرور کلی از تعديل کننده‌های اتوفاژی دارویی شناخته شده ارائه دادند که بسیاری از آنها می‌توانند به منظور شناخت کارایی شان در درمان هلیکوباکتر پیلوری، آزموده شوند.

اظهارات پایانی

هلیکوباکتر پیلوری یکی از موفق‌ترین پاتوژن‌های انسانی در تمام دوران‌ها است. موفقیت آن را می‌توان تا حدی به توانایی آن در استعمار محیط خشن معده انسان و ظرفیت آن در ایجاد یک محافظ درون سلولی نسبت داد. این باکتری همچنین استراتژی‌های متعددی برای فرار از سیستم ایمنی میزبان ابداع کرده است. مطالعات اخیر نشان داده است که اتوفاژی جزء جدایی ناپذیر پاتوژن‌ز هلیکوباکتر پیلوری است. با این حال، تعامل بین اتوفاژی و هلیکوباکتر پیلوری پیچیده است و شواهد فعلی نشان می‌دهد که عملکردهای متفاوتی در مراحل مختلف عفونت وجود دارد (شکل ۱۱.۱). عفونت حاد، اتوفاژی را به روشه وابسته به VacA تحریک می‌کند تا سم و باکتری را پاکسازی کند. با این حال، در طول عفونت مزمن، هلیکوباکتر پیلوری دستگاه اتوفاژی میزبان را غصب می‌کند و از این مسیر برای بقای خود استفاده می‌کند. اگرچه یک استراتژی مشابه برای سایر پاتوژن‌های داخل سلولی گزارش شده است، اما مکانیسمی که طی آن هلیکوباکتر پیلوری این عمل را انجام می‌دهد منحصر به فرد است. جزئیات بیوشیمیایی در حال حاضر نامشخص است اما می‌دانیم که این باکتری از نقل و انتقال هیدرولازهای مهم به

۲۳۵ **فصل ۱۱: کنترل عفونت هلیکوباکترپیلوری با اتوفاژی**

اتوفاگولیزوزوم جلوگیری کرده و در نتیجه از تخریب خود نیز جلوگیری می‌کند. با توجه به نقش پاتوژن در سرطان زایی معده و برای جلوگیری از بیماری، پیشگیری یا ریشه کنی عفونت هلیکوباکتر پیلوری توصیه می‌شود. با این حال، فقدان یک واکسن موثر و رشد مقاومت آنتی بیوتیکی، نیاز به درمان‌های جایگزین را ضروری می‌کند. ارتباط بین اتوفاژی و بقای درون سلولی هلیکوباکتر پیلوری نشان می‌دهد که عوامل تعديل کننده اتوفاژی می‌توانند یک راه درمانی ارزشمند باشند.

فصل ۱۲

برهمکنش‌های بین سالمونلا و سیستم اتوفاژی

مقدمه

مهره داران از طریق عمل هم افزایی ایمنی ذاتی و تطبیقی که از طریق سلول‌های ایمنی تخصصی تحریک می‌شوند، از خودشان در برابر تهدید باکتریایی دفاع می‌کنند. سلول‌های ایمنی حرفه‌ای که در بدن گشته زنی می‌کنند و پاتوژن‌ها را قورت می‌دهند، به وضوح به محافظت خود از خطرات ذاتی ناشی از پاتوژن‌ها نیاز دارند. یک مکانیسم ایمنی که در یک سلول منفرد برای ایجاد حفاظت، فعالیت می‌کند، بعنوان ایمنی سلولی مستقل شناخته می‌شود. جالب است که چنین مکانیسم‌هایی محدود به سلول‌های ایمنی نیستند اما می‌توانند از سلول‌های غیر ایمن محافظت کنند. ما با استفاده از عفونت سالمونلا انتریکای^۱ سلول‌های پستانداران بعنوان یک سیستم آزمایشی، اتوفاژی را بعنوان مانع میزبان در برابر عفونت مورد بحث قرار می‌دهیم.

زندگی سالمونلا درون میزبان

آلودگی انسان‌ها و دیگر حیوانات توسط سالمونلا انتریکا، یک مسئولیت اقتصادی و بهداشتی جهانی را نشان می‌دهد (کرامپ^۲ و همکاران، ۲۰۰۴؛ مایوویچ^۳ و همکاران، ۲۰۱۰). بیش از ۲۵۰۰ سروتیپ سالمونلا انتریکا شناسایی شده‌اند؛ در نتیجه بیماری، اینها خصوصیات گسترش و واگیر،

¹ *Salmonella enterica*

³ Majowicz

² Crump

میزبان و تغییرات متفاوتی دارند. آلدگی توسط سالمونلا انتریکا سروتیپ تیفی^۱ یا پاراتیفی، که ضرورتاً محدود به انسان‌ها و پستانداران بالاتر هستند، در نتیجه عفونت، منجر به تب تیفوئید می‌شود. در مقابل، سروتیپ‌های دیگر، مانند سالمونلا تیفی موریوم^۲، معمولاً به دنبال مصرف تخم مرغ، طیور یا محصولات لبنی آلدده، سبب آماس شکم^۳ (سمومیت غذایی) خود - محدود‌کننده می‌شوند.

به دنبال مصرف دهانی، سالمونلا انتریکا از طریق دستگاه گوارش که در آن تعداد کمی از باکتری‌ها در روده کوچک مستقرند. برای هر دو نوع سالمونلا انتریکای تیفوئیدی و غیر تیفوئیدی، محل‌های اصلی تهاجم سلول - میزبان، سلول‌های چین دار اپیتیال هستند که پلاک پی‌یر^۴ را می‌پوشانند. اینها محل‌های ندول‌های لنفاوی سازمان یافته‌ای هستند که حاوی انواع مختلفی از سلول‌های ایمنی از جمله ماکروفازها، سلول‌های دندربیتی، لنفوسيت B و لنفوسيت T هستند. به دنبال تهاجم پلاک پی‌یر، سالمونلا تیفی می‌تواند به کبد، طحال، و ارگان‌های دیگر پخش شود. در مقابل، آلدگی‌های سالمونلا انتریکای غیر تیفوئیدی، معمولاً در دستگاه گوارش انسان‌های دارای ایمنی کارآمد، وجود دارد. در هر حال، در افراد دارای نقص ایمنی، سالمونلا انتریکا می‌تواند سبب عفونت‌های شدید جریان خون شود.^۵ این موضوع، مشکل اصلی در آفریقای سیاه^۶ را نشان می‌دهد (اوکورو و همکاران، ۲۰۱۲). توانایی تکثیر در سلول‌های میزبان، از جمله سلول‌های اپی تلیال روده و ماکروفازها، مشخصه پاتوژنی کلیدی همه سروتیپ‌های سالمونلا انتریکا می‌باشد.

بقای سالمونلا در زیستگاه داخل سلولی سخت

فرایند فاگوسیتوz و شناسایی باکتریایی، از طریق پذیرنده‌های تشخیص الگو (PRRها)، چندین مکانیسم ایمنی میزبان را آغاز می‌کند. پاسخ‌های سلول خودگردان شامل فعالسازی انفجار تنفسی با واسطه گیرنده پذیرنده گاما FcγR است که دنبال جذب میکرووارگانیسم‌های اپسونیزه شده (آندرهیل و ازینسکی^۷، ۲۰۰۲؛ کارون و هال، ۱۹۹۸)، کاهش مواد مغذی درون واکوئل، و رشد آن در یک فاگولیزوزوم است. درونی سازی باکتریایی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن

¹ Typhi

⁵ Okoro

² S. Typhimurium

⁶ Sub-Saharan Africa

³ gastroenteritis

⁷ Underhill and Ozinsky

⁴ Peyer's patche

فصل ۱۲: برهمکنش‌های بین سالمونلا و سیستم اتوفاژی ^{۳۰۰} ۲۳۹

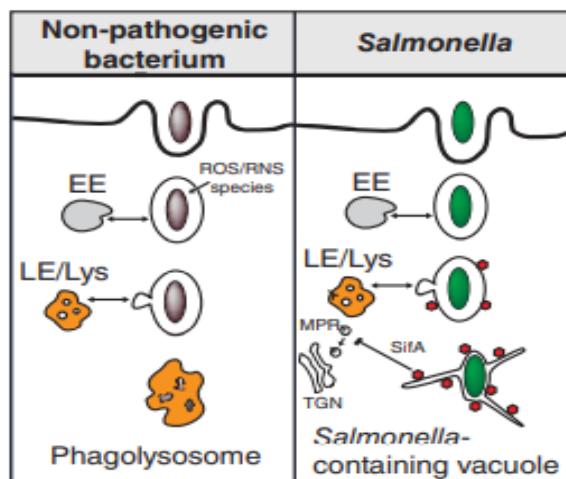
میتوکندری، بلوغ فاگوزوم و فعالیت ضد میکروبی، همگی از طریق علامت دهی باوسطه پذیرنده Toll-like افزایش می‌یابد (بلندر و مدژیوف^۱، ۲۰۰۴؛ وست و همکاران، ۲۰۱۱). عملکرد هماهنگ این مکانیسم‌های دفاعی باکتری‌های غیر بیماری زا را به دنبال فاگوسیتوز از بین می‌برد (شکل ۱۲,۱). تولید سیتوکین و کموکاین القا شده با TLR، پاسخ‌های ایمنی تطبیقی را آغاز می‌کند (بررسی شده توسط باکالا^۲ و همکاران، ۲۰۰۹). برخلاف باکتری غیر پاتوژنی، سه سیستم بیماری زای اصلی، سالمونلا انتریکا را قادر می‌سازد تا مقاومت کند، مکانیسم‌های دفاعی میزبان سلول خودگردان را واژگون سازد یا از آن اجتناب کند، که تکثیر در ماکروفاژها و انواع دیگر سلول میزبان را قادر می‌سازد (شکل ۱۲,۱).

در پاسخ به محرومیت مواد مغذی، اسیدی شدن، و حضور پیتیدهای ضد باکتری در واکوئل‌های درون سلولی، سیتوزول دو سیستم ویرولانس سالمونلا القا می‌شوند. جزیره ۲ بیماری زایی سالمونلا (SPI-2) یک سیستم ترشح نوع ۳ (T3SS) را کدگذاری می‌کند که تقریباً ۳۰ پروتئین مؤثر را به سیتوزول و غشای سلول میزبان می‌رساند (فیگوریا و هولدن^۳، ۲۰۱۲). انتقال مستقیم واکنش پذیرهای باکتریایی به سلول میزبان با واسطه سیستم ترشحی انجام می‌شود که از طریق پوشش سلولی باکتریایی خارج می‌شود و تصور می‌شود به منافذ ترانسلوکون تشکیل شده در غشای واکوئل مرتبط است. عملکرد هماهنگ واکنش پذیرها منجر به یک واکوئل غیرمتعارف می‌شود (سالمونلای حاوی واکوئل-SCV) که محیطی را فراهم می‌کند که در آن تکثیر سالمونلا می‌تواند رخ دهد. عملکردهای واکنش پذیرها، تنظیم ترکیب غشای واکوئل و داینامیک، بازسازی اسکلت سلولی میزبان، و تداخل با علامت دهی ایمنی و مکانیسم‌های کشنده باکتری مستقل سلولی را شامل می‌شود. برای مثال، تداخل با سیستم اندولیزوزومی، منجر به حضور گلیکوپروتئین‌های غشای لیزوژومی مانند LAMP1 (پروتئین ۱ غشای مرتبط با لیزوژم) در SCV می‌شود. به هر حال، واکنش پذیر Sifa SPI-2 T3SS با تغییر مسیر پروتئازهای لیزوژومی به خارج از سلول، از رشد و توسعه SCV در یک فاگولیزوزوم بالغ جلوگیری می‌کند (مک گورتی و همکاران، ۲۰۱۲). جالب است که عملکردهای بیوشیمیایی اکثر واکنش پذیرها هنوز مبهم باقی می‌ماند (فیگوریا و هولدن، ۲۰۱۲).

¹ Blander and Medzhitov

² Baccala

³ Figueira and Holden



شکل ۱۲.۱ علاوه بر SPI-2 T3SS، تنظیم کننده PhoP/Q، بیان داخل واکوئلی زیر مجموعه بزرگی از پروتئین‌های ویروولانس^۱ را القا می‌کند. برخی از اینها، لیپوپلی ساکارید باکتریایی را تغییر می‌دهند (LPS)، درنتیجه، از سالمونلا در برابر پیتیدهای ضد باکتری محافظت می‌کنند، درحالی که دیگران، سازگاری با Mg^{2+} کم و محیط اسیدی فاگوزوم را تضمین می‌کنند و از استرس اکسیداتیو نیز محافظت می‌کنند (گرویسمن، ۲۰۰۱؛ پراست^۲ و همکاران، ۲۰۰۷؛ تو و همکاران، ۲۰۰۶). جای تعجب نیست که سویه‌های باکتریایی قادر SPI-2 T3SS یا PhoP/Q، نقایص ویروولانس قوی را باشد کم یا بدون رشد درون سلولی نشان می‌دهند (هولدن، ۲۰۰۲؛ هالین^۳ و همکاران، ۲۰۱۰؛ تامپسون و همکاران، ۲۰۱۱).

علاوه بر ورود سلول‌ها بعنوان نتیجه فاگوسیتوز، سالمونلا استفاده از SPI-1 T3SS می‌تواند هم به سلول‌های فاگوسیتی و هم غیر فاگوسیتی هجوم ببرد. این ارگان، مجموعه‌ای از واکنش پذیرهای باکتریایی را در سراسر غشای پلاسمایی منتقل می‌کند که با عوامل ترشح شده توسط باکتری‌های خارج سلولی متفاوت است. در مجموع، واکنش پذیرهای SPI-1 T3SS، پلیمریزاسیون اکتین، بهم ریختگی غشا، و جذب باکتریایی را القا می‌کنند (گالان، ۲۰۰۱؛ مک گی و همکاران، ۲۰۰۹). بعلاوه، آنها به تغییر SCV کمک می‌کنند تا همچو شی لیزوژومی قبل از کاربردی شدن SPI-2 T3SS کاربردی شود (هرناندز و همکاران، ۲۰۰۴؛ باکووسکی^۴ و همکاران، ۲۰۱۰).

¹ virulence proteins

² Groisman,

³ Prost

⁴ Helaine

⁵ Bakowski

مدل‌هایی برای مطالعه عفونت سالمونلا

گونه‌های مشخصی از موش همخون، میزبان‌های طبیعی سالمونلا تیفی موریوم هستند. این حیوانات، برای ارائه مدل بسیار پرکاربردی از بیماری سیستمیک که به تیفوئید شباخت دارد (کارت و کالینز، ۱۹۷۴)، و نیز مدل انترولولیتیس (آماس روده) که اخیراً توسعه یافته، در حیوانات تحت درمان با استرپتومایسین، مورد بهره برداری قرار گرفته‌اند (هافلمایر و هارت^۱، ۲۰۰۵). یک مزیت اضافی مدل‌های موشی بیماری سالمونلا این است که هم میزبان و هم باکتری را می‌توان با یک سهولت نسبی از لحاظ ژنتیکی دستکاری کرد (کارلینز^۲، ۲۰۰۷؛ اسکارنز^۳ و همکاران، ۲۰۱۱).

بسیاری از آزمایشگاه‌ها نیز سالمونلا تیفی موریوم را با استفاده از مدل‌های کشت بافت در محیط آزمایشگاه، اغلب با رده‌های سلولی اپی تلیال انسانی مانند سلول‌های Hela بررسی می‌کنند. اگرچه، سلول‌های کشت بافت، سیستم عالی ای برای مطالعه جنبه‌های بیوشیمیایی و بیولوژیکی سلولی تبادلاتِ سلولی سالمونلا، تکثیر و پاسخهای هسته ای فراهم می‌کنند، این سیستم‌ها هرگز به طور کامل محیط و پاسخ میزبان پیچیده ای را برای عفونتی که در داخل سلول رخ می‌دهد، ارائه نمی‌کند. برای مثال، یک جنبه ضروری از پاسخِ ذاتی میزبان، فعالسازی ارتباط بین انواع مختلف سلولی مانند ماکروفاژها، سلول‌های دندریت، سلول‌های T و سلول‌های کشنده طبیعی را شامل می‌شود. این برهمنکن‌ها و پاسخ‌ها که در زمان و مکان، تا حد زیادی هماهنگ هستند، انتقال سلولی را در بر می‌گیرد، و هم داخل بافت‌های مختلف و هم بین بافت‌ها اتفاق می‌افتد. بنابراین، کار بعدی که از مدل‌های موشی عفونت استفاده می‌کند، بسیار ارزشمند هستند، حتی اگر عفونت انسانی را کاملاً تکرار نکند.

مدل‌های دیگری برای بررسی عفونت‌های سالمونلا در میزبان‌های زنده ایجاد شده‌اند. برای مثال، مطالعات کمی، عفونت‌های سالمونلایی کرم الگانس^۴ و آمیب^۳ *Dictyostelium discoideum* را مورد تحلیل قرار داده‌اند. در هر دوی این مدل‌ها، سالمونلا، تکثیر افزایش یافته را در غیاب اتوفاژی نشان داد و در نهایت میزبان آلووده را کشت.

¹ Hapfelmeier and Hardt

² Karlinsey

³ Skarnes

⁴ *Caenorhabditis elegans*

مکانیسم‌های اتوفاژی سالمونلا

سالمونلا هدف اتوفاژی ضد باکتری است

بسیاری از پروتئین‌های ویرولانس سالمونلا، واکوئل را به محیطی مناسب برای تکثیر تغییر می‌دهد که به وضوح نشان می‌دهد که سالمونلا، یک پاتوژن سازگار با واکوئل است. به هر حال، نتیجهٔ تهاجم با واسطه SPI-1 T3SS این است که یک زیرمجموعهٔ کوچک اما بالقوه مهم باکتری‌ها، غشای واکوئلی خود را پاره می‌کنند و وارد سیتوزول سلول می‌بازان می‌شوند. در اینجا، سالمونلا را می‌توان برای تخریب اتوفاژیک یا تکثیر ماهرانه در این محیط غنی از مواد مغذی، هدف قرار داد.

سویه‌های سالمونلا که فاقد SPI-1 هستند را در صورتی می‌توان به طور مصنوعی القا کرد تا وارد سلول‌های اپی تلیال شوند که آ«ها پروتئین تهاجم یرسینیا (Inv) را بیان کنند. چنین سویه‌هایی، اهداف قابل توجهی برای اتوفاژی ضد باکتری نیستند (بیرمنگام و برومُل^۱، ۲۰۰۶). بنابراین، پارگی غشای واکوئلی، نتیجهٔ SPI-1 T3SS است و آسیب فاگوزوم می‌تواند اتوفاژی ضد باکتری را آغاز کند. مشخص نیست که چگونه فرایند تهاجم SPI-1 T3SS، یکپارچگی تناسب غشاها و واکوئلی را مختل می‌کند. احتمال دارد که منافذ ترانس لوکون که در غشای پلاسمایی شکل گرفته‌اند، پس از تهاجم کاملاً ترمیم نمی‌شوند و اینها به نوعی غشا را بی ثبات می‌کنند. در واقع، پاتوژن باکتریایی سیتوزولی لیستریا مونوسیتوژنز، را با استفاده از لیستریولیزین O توکسین تشکیل دهندهٔ منافذ، واکوئل خود را پاره می‌کند (تیلنی و پورتنوی^۲، ۱۹۸۹؛ بیلکی^۳ و همکاران، ۱۹۹۰)، و این آسیب غشا می‌تواند اتوفاژی ضد باکتری را القا کند (مایر-مورس^۴ و همکاران، ۱۹۹۰). در حمایت از این مفهوم که آسیب غشا بعنوان علامتی برای القای اتوفاژی عمل می‌کند، واکوئل‌های سترون شدهٔ حاوی دانه که با شناساگرهای ترافرست^۵ به سلول‌ها وارد می‌شوند، می‌توانند نشانگرهای اتوفاژی را پس از پارگی واکوئل به دست آورند (کوبایاشی و همکاران، ۲۰۱۰).

¹ Birmingham and Brumell

⁴ Meyer-Morse

² Tilney and Portnoy

⁵ transfection

³ Bielecki

تحقیقات اولیه که نشان می‌دهد سالمونلا می‌تواند در معرض اتوفاژی قرار گیرد، بر روی تحلیل تکثیر سالمونلا در سلول‌های فاقد دستگاه اتوفاژی مرکزی تمرکز کرد که عنوان پروتئین‌های مرتبط با اتوفاژی (ATG) تعریف شدند که برای کلیه فرایندهای اتوفاژی ضروری هستند. برای مثال، سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش (MEF) که فاقد ATG5، (برمینگام و همکاران، ۲۰۰۶)، ATG16L (سایته^۱ و همکاران، ۲۰۰۸)، ATG7، ATG3 (کاگیاما و همکاران، ۲۰۱۱) هستند، ارتباط سالمونلا با نشانگر LC3 اتوفاژی را به شدت کاهش دادند (کابیا و همکاران، ۲۰۰۰) و منجر به افزایش تعداد سالمونلا شد. سایر پروتئین‌های مرتبط با اتوفاژی، مانند Barkor (سان و همکاران، ۲۰۰۸)، Fip200 و ATG9L1 (کاگیاما و همکاران، ۲۰۱۱) نیز برای محدود کردن رشد سالمونلا از طریق اتوفاژی ضد باکتری مورد نیازند. علاوه بر این پروتئین‌های ATG، عوامل دیگری مشخص شده‌اند که خاص اتوفاژی ضد باکتری هستند. برای مثال، FNBP1L، یک پروتئین تعاملی ATG3 است که برای اتوفاژی سالمونلا مورد نیاز است اما برای اتوفاژی ناشی از گرسنگی یا راپامایسین بکار نمی‌رود (هوئت^۲ و همکاران، ۲۰۰۹).

مطالعاتی که در بالا شرح داده شد، در رده‌های سلولی اپی تلیال یا فیبروبلاست در موش، تحت شرایطی هدایت راحت‌تر هستند. باکتری‌های سیتوزوکی از طریق ارتباط افزایش یافته سالمونلا با یوبی کوئیتین که زیرمجموعه‌ای از باکتری‌های سیتوزوکی را در یک روکش محکم احاطه کرده است (پرین و همکاران، ۲۰۰۴)، و نیز ارتباط کاهش یافته سالمونلای داخل سلولی با LAMP1، یک نشانگر غشای SCV نشان داده شدند (برمینگام و همکاران، ۲۰۰۶).

القای اتوفاژی ضد باکتری

طی فرایند اتوفاژی، ترکیبات سیتوزوکی هدفمند با ایجاد اتوفاگوزوم برای تخریب در اتوفاگولیزوزوم‌ها، جدا و احاطه می‌شوند. در مورد اتوفاژی ضد باکتری، سالمونلای سیتوزوکی محموله‌ای را ارائه می‌کند که باید برای جذب اتوفاژیک از طریق سیگنال‌های "مرا بخورید" برچسب گذاری شوند. سپس، گیرنده‌های اتوفاژی بعنوان یک پل عمل می‌کنند که سیگنال‌های مختلف "مرا بخورید" را تشخیص می‌دهند و فاگوفور تشکیل دهنده را به سمت محموله هدایت می‌کنند. بنابراین، یک خصوصیت مهم گیرنده‌های اتوفاژی، توانایی آنها در اتصال همزمان سیگنال "مرا بخورید"، که محموله را علامت‌گذاری می‌کند، و LC3 که در فاگوفور تشکیل دهنده

¹ Saitoh

² Huett

قرار دارد، می‌باشد. هدف قرار دادن فاگوفور تشکیل دهنده به یک محمولة خاص، از تخریب اتوفاژی غیر ضروری بخشهای سیتوزولی سلول میزبان جلوگیری می‌کند.

در حالیکه سیگنال‌های "مرا بخورید" عمل می‌کنند تا اتوفاگوفور تشکیل دهنده را به محمولة باکتریایی هدایت کنند، القای اتوفاژی، همچنین نیازمند فعالسازی هماهنگ کمپلکس‌های متعدد قبل یا همزمان با این مرحله می‌باشد. این کمپلکس‌ها با یکدیگر دستگاه مرکزی ای را می‌سازند که برای اتوفاژی نیاز است. این مراحل برای اتوفاژی ناشی از گرسنگی شامل موارد ذیل است:

۱- فعالسازی کمپلکس کیناز ULK (Unc-51 like) حاوی ATG13, ULK1/2, ATG101 (پروتئین ۲۰۰ kD تعاملی خانواده کیناز چسبندگی موضعی) و

۲- بکارگیری سایر پروتئین‌های ATG برای آغاز هسته زایی^۱ فاگوفور دو غشایی، که به فعالسازی کمپلکس ۳-کیناز فسفاتیدیل اینوزیتول کلاس ۳ نیاز دارد که شامل VPS34, p150, Beclin1 و Barkor (ATG14) مخمر

۳- دو سیستم جفتی شبه یوبی کوئیتین در ساخت، انتشار و تکمیل فاگوفور نقش دارند: اعضای خانواده LC3، که ۶ ارتولوگ انسانی وجود دارد LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP, GABARAPL1 و GABARAPL2 که با فسفاتیدیل اتانول امین (PE) جفت می‌شوند، در حالیکه ATG12 به ATG5 متصل می‌شود تا کمپلکسی با ATG16 تشکیل دهد.

۴- ATG9L1 (ATG9a) یا ATG9 نیز نامیده می‌شود، تنها پروتئین غشایی چند پوشه‌ای است که تا کنون شناسایی شده است، عملکردها، حداقل در بخش، برای به کار گیری غشا در طی ساخت اتوفاگوزوم (یاماکاتو و همکاران، ۲۰۱۲).

اگرچه اجزاء دقیق دستگاه اتوفاژی مرکزی مورد نیاز برای فعالسازی اتوفاژی ضد باکتری مشخص نشده است، این حقیقت که چند پروتئین از هر یک از کمپلکس‌های بسیار مهم مورد نیاز است، پیشنهاد می‌کند که درجه بالایی از محافظت وجود دارد.

بکارگیری سلسله مراتبی پروتئین‌های مختلف ATG برای واکوئل باکتریایی را نشان داده است که شروع هماهنگ کمپلکس‌های اتوفاژی مرکزی در طول اتوفاژی ضد باکتری مورد نیاز است. برای مثال، ATG9L1 مورد نیاز برای تولید غشایی مجزا در طول اتوفاژی ضد باکتری، مستقل

¹ nucleation

فصل ۱۲: برهمنش‌های بین سالمونلا و سیستم اتوفازی

از LC3 و قبل از آن بکار گرفته می‌شود (کاگایاما و همکاران، ۲۰۱۱). جالب اینجاست که در MEF‌ها را حذف می‌کنند، GFP-LC3 هنوز در زیرمجموعه‌ای از واکوئل‌هایی شناسایی می‌شوند که حاوی سالمونلا هستند، اما این اندامک‌ها، به جای یک غشای دوگانه عادی، یک غشای منفرد دارند. تحت شرایطِ خالی از ATG9L1، رشد سالمونلای داخل سلولی محدود نیست که نشانده‌نده این است که بکارگیری LC3 برای سالمونلا برای محدود کردن تکثیر سالمونلا در غیابِ ساخت غشای مجازی وابسته به ATG9L1، مؤثر نیست (کاگایاما و همکاران، ۲۰۱۱).

اتوفازی ضد باکتری به فعالیت متابولیکِ سلول مرتبط است، الگویی که بیشتر از این مفهوم حمایت می‌کند که القای دستگاه اتوفازی هسته‌ای مورد نیاز است. به طور طبیعی، در سلول‌های پر از متابولیسم (شرایط کشت مواد مغذیِ فراوان)، فعالیت کمپلکس کیناز ۱/۲ ULK1/2، توسط کمپلکس کیناز نقطهٔ کنترل متابولیک mTORC1 (هدف پستانداران کمپلکس ۱ را پامایسین)، یک تنظیم کنندهٔ منفی قویِ القای اتوفازی، تنظیم می‌شود. به دنبالِ محرومیتِ مواد مغذی، که توسط کمپلکس mTORC1 حس می‌شود، مجموعهٔ پیش آغاز متنشکل از ULK1/2، ATG13 و FIP200 رها شد (کیم و همکاران، ۲۰۱۱). جالب است که آلدگی با سالمونلا باعث ایجاد حالت اولیهٔ گرسنگی آمینو اسید داخل سلولی می‌شود که مهار اتوفازی با واسطهٔ mTOR را رها می‌کند (تاتولی و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین محتمل است که رهاسازی و فعالسازی کمپلکس mTORC1 منجر به فعالسازی اتوفازی ضد باکتری می‌شود. رهاسازی مهار ULK1/2 کیناز از سالمونلا (که منجر به اتوفازی القا شده می‌شود) به آسیب غشا نیاز دارد که باعث تفکیک mTOR از اندوزوم / لیزوژوم‌های دیررس مثبت LAMP2 می‌شود (تاتولی و همکاران، ۲۰۱۲). قابل توجه است که به نظر می‌رسد آسیب غشا به عنوان یک علامت برای تنظیم هردو دستگاه اتوفازی اصلی (از طریق مهار mTOR) و نیز برای هدایت دستگاه اتوفازی خاص به سمتِ واکوئل پاره شده و محتوای آن عمل می‌کند (در ذیل با جزئیات توضیح داده شده است).

علامت دهی از طریق گیرنده‌های تشخیص الگو (PRRها) می‌تواند اتوفازی ضد باکتری را نیز تحریک کند. برای مثال، NOD1 و NOD2، گیرنده‌های سیتوزولی که پتیدوگلیکان‌های باکتریایی را شناسایی می‌کنند، می‌توانند ATG16L را به محل ورود باکتری در غشای پلاسمای بکار گیرند (تراواسوس و همکاران، ۲۰۱۰). بعلاوه، گیرندهٔ پتیدوگلیکان دیگر، PRGP-LE،

می‌تواند لیستریا را در سلول‌های *Drosophila* به روشی وابسته به Atg5 محدود کند (یانو و همکاران، ۲۰۰۸).

در حالیکه شکل لیپید شده LC3 به طور کلاسیک به عنوان یک نشانگر ساخت اتوفاگوزوم استفاده می‌شود (کبایا و همکاران، ۲۰۰۰)، این بخش اتوفاژی می‌تواند در ساختارهای تک غشایی و همینطور تحت شرایطی که ساخت دو غشایی از بین می‌رود (برای مثال Atg9L1، سلول‌ها را از کار می‌اندازد (کاگیاما و همکاران، ۲۰۱۱) یا در طی فرایند فاگوسیتوز مرتبط با LAP (LAP)) می‌تواند یافت شوند LAP توسط جفت LC3 به دنبال تشخیص میکروبهای با واسطه گیرنده، برای یک غشای منفرد مشخص می‌شود (شکل ۱۲,۲ و کادر ۱۲,۱). برای مثال، LC3 را می‌توان برای فاگوزوم‌های حاوی باکتری خیلی زود بعد از جذب پاتوژن بکار گرفت (شکل ۱۲,۲). این می‌تواند از طریق TLR (سنچوان^۱ و همکاران، ۲۰۰۷، ۲۰۰۹؛ زو و همکاران، ۲۰۰۷) یا علامت دهی گیرنده Fcγ به روش وابسته به اکسیداز NOX2 NADPH (هوانگ و همکاران، ۲۰۰۹) رخ دهد. وابستگی به گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) برای بکارگیری LC3 برای فاگوزوم، جالب است، همانطور که نشان می‌دهد گیرنده Fcγ برای فعال کردن مکانیسم‌های کشتن غیر اکسیداتیو و اکسیداتیو، مؤثر است. مکانیسمی که با آن ROS می‌تواند LAP آغاز شود در حال حاضر نامشخص است، اما ROS تولید شده توسط میتوکندری از طریق تنظیم احتمالی ATG4 به اتوفاژی ناشی از گرسنگی مرتبط است (شرز-شیوال^۲ و همکاران، ۲۰۰۷).

سیگنال‌های مرا بخورید برای اتوفاژی ضد باکتری

همانطور که در بالا به آن اشاره شد، سیگنال‌های مرا بخور خاص شناسایی شده‌اند که به دنبال پارگی غشای واکوئلی تشکیل اتوفاگوزوم‌ها را به محموله هدایت می‌کند. این سیگنال‌های مرا بخورید توسط گیرنده‌های اتوفاژی رمزگشایی می‌شوند. در مورد اتوفاژی ضد باکتری، سه گیرنده اتوفاژی غیر تکراری به نام p62, NDP52 و اپتینورین^۳ مشخص شده‌اند (فوچیتا^۴ و همکاران، ۲۰۱۳).

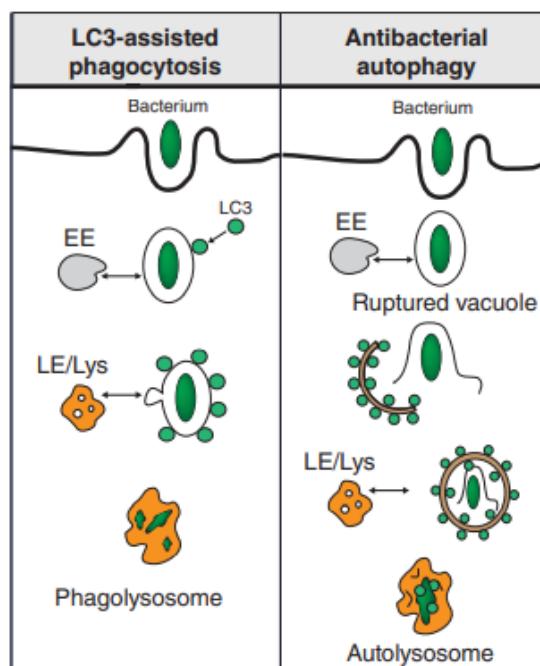
¹ Sanjua⁴ⁿ

² Scherz-Shouval

³ Optineurin

⁴ Fujita

۱۲: برهمکنش‌های بین سالمونلا و سیستم اتوفاژی ۲۴۷



شکل ۱۲.۲

Box 12.1 LC3-Assisted Phagocytosis (LAP)

- Proceeds independently of the preinitiation complex ULK1 / ATG13 / FIP200
- Requires some core components such as: Beclin 1, ATG5, and ATG7
- Triggered by receptor-mediated detection
- LC3 is conjugated to the single-membrane phagophore

کادر ۱۲.۱

اولین سیگنال مرا بخور که برای اتوفاژی ضد باکتری شناسایی می‌شود، تشکیل یک روکش یوبی کوئیتین متراکم مشابه با یوبی کوئیتیناسیون توده‌های پروتئینی بود که اتوفاگوزوم‌ها را به باکتری‌هایی که در معرض سیتوزول قرار گرفته‌اند هدف قرار می‌دهد (پرین و همکاران، ۲۰۰۴؛ برمنگام و همکاران، ۲۰۰۶). فرایند روکش کردن یوبی کوئیتین هنوز نسبتاً مشخص نشده است. به هر حال، دو لیگاز یوبی کوئیتین E3 دخیل در اتوفاژی سالمونلا، شناسایی شده‌اند. پیشنهاد می‌شود که LRSAM1 (هوئت و همکاران، ۲۰۱۲) و Parkin (مانزانیلو^۱ و همکاران، ۲۰۱۳) واسطه ساخت زنجیره‌های یوبی کوئیتین در باکتری‌های سیتوزولی هستند. در غیاب هر یک از

^۱ Manzanillo

لیگازها، افزایش بار باکتریال مشاهده شد. در هر حال، سیگنالی که لیگازهای E3 را فعال می‌کند و آنها را به سمت باکتری‌های سیتوزولی / باقی مانده‌های سیتوزولی هدف قرار می‌دهد، هنوز مشخص نیست. بعلاوه، هویتِ هدف (هدفهای) پلی‌یوبی کوئیتین شده، در انتظار بررسی بیشتر است. با توجه به این مشاهدات که اندوزوم‌های حاوی دانه می‌توانند پس از پارگی با یوبی کوئیتین پوشانده شوند، حداقل یک هدف باید از منشاء میزبان باشد (فوجیتا و همکاران، ۲۰۱۳). در هر حال، این تفسیر، احتمال وجود اهداف باکتریایی را رد نمی‌کند.

پس از کشف مسیر وابسته به یوبی کوئیتین، مسیر ثانویه بکارگیری LC3 شناسایی شد که به دی‌اسیل گلیسرول پیام رسان^۱ دوم لیپید (DAG) وابسته است (شاه نظری و همکاران، ۲۰۱۰). اوج DAG، که در یک زیرجمعیت از SCV‌ها در ۴۵ دقیقه بعد از تهاجم دیده شد برای اتوفاژی مؤثر سالمونلا نیاز بود، همانطور که با استفاده از LC3 عنوان یک نشانگر تجزیه و تحلیل شد. به هر حال، باید مشخص شود اگر آسیب‌غشای SCV، مسیر DAG را تحریک می‌کند و اینکه چگونه این می‌تواند تبدیل با واسطه PAP (فسفاتیدیک اسید فسفاتاز) را از فسفاتیدیک اسید به آغاز کند DAG.

جالب است که مسیرهای وابسته به DAG و یوبی کوئیتین برای بکارگیری LC3 با اوج گرفتن زودتر DAG در طول عفونت و اغلب در سالمونلای یوبی کوئیتین-منفی، مستقل به نظر می‌رسند. این نشان می‌دهد که سیگنال فعال کننده DAG می‌تواند سیگنال زودتر القا کننده اتوفاژی را قبل از انتشار سالمونلا در سیتوزول حس کند. در حمایت از سیگنال‌های مرا بخور وابسته به یوبی کوئیتین و DAG که به طور مستقل عمل می‌کنند، تخلیه p62 (یکی از گیرنده‌های اتوفاژی متصل به یوبی کوئیتین) در زمینه اختلال DAG منجر به یک مهار افزایشی اتوفاژی ضد باکتری شد (شاه نظری و همکاران، ۲۰۱۰).

سومین جایگزین مرا بخور شناسایی شده است که به وسیله آن گیرنده خطرناک، گالکتین-۸، پارگی واکوئل‌ها را مستقیماً تشخیص می‌دهد (ترستون و همکاران، ۲۰۱۲). گالکتین‌ها، خانواده ای از لکتین‌های متصل به گالاکتوسید بتا هستند که در سیتوزول سلول‌ها قبل از ترشح آنها وجود دارند. گالکتین-۸ برای واکوئل‌های پاره شده از طریق اتصال به گلیکوکونزروگه‌ها بکار گرفته می‌شود، که در اصل در غشای پلاسمای سلول میزبان قرار دارد، که با از دست دادن

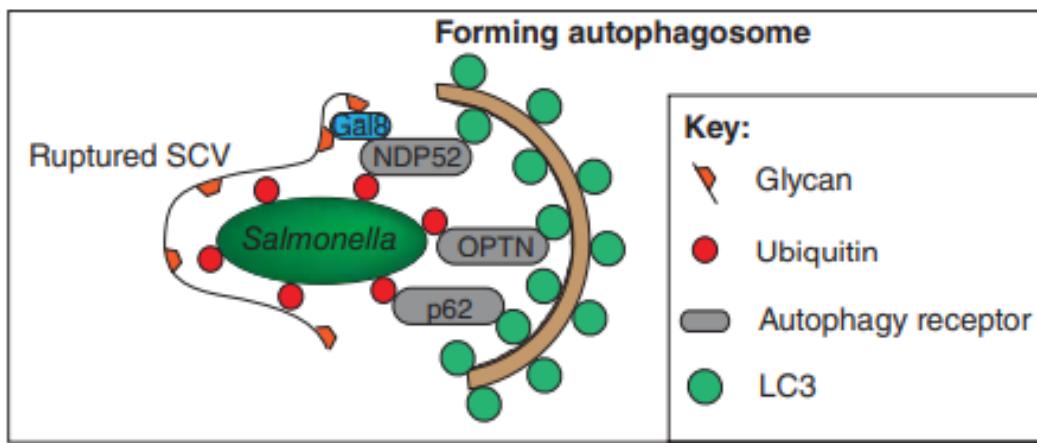
^۱ galectin-8

یکپارچگی غشا، در معرض سیتوزول قرار می‌گیرد. تشخیص سیگنال ناشی از میزان به گالکتین-۸ امکان بررسی یکپارچگی سیستم اندولیزوژومی برای آسیب ناشی از پاتوژن و سترون را می‌دهد. این خصوصیت، گالکتین-۸ را بعنوان یک گیرنده خطر طبقه بندی می‌کند تا گیرنده تشخیص الگو. NDP52، تنها گیرنده اتوفازی شناخته شده ای است که می‌تواند این سیگنال را بخور را رمزگشایی کند (ترستون و همکاران، ۲۰۱۲)، که NDP52 را بعنوان اولین گیرنده اتوفازی برای پاسخ به دو سیگنال مختلف را بخور تشخیص می‌دهد.

گیرنده‌های اتوفازی خصوصیت محمولة را ارائه می‌دهد

برخلاف مسیر DAG، سیگنال را بخور یوبی کوئیتین توسعه گیرنده‌های p62، p62 و اپتینورین مشخص می‌شود، پروتئین هایی که می‌توانند به یوبی کوئیتین و LC3 به طور همزمان متصل شوند (ترستون و همکاران، ۲۰۰۹؛ ژنگ و همکاران، ۲۰۱۱؛ ویلد و همکاران، ۲۰۱۱) (شکل ۱۲,۳). به این ترتیب، تصور می‌شود که گیرنده‌های اتوفازی محمولة باکتریایی را به فاگوفور تشکیل شده متصل می‌کنند. همانطور که NDP52 می‌تواند به دو سیگنال را بخورید پاسخ دهد، تعیین موقعیت NDP52 به سالمونلا در وهله اول از طریق بکارگیری گالکتین-۸ رخ می‌دهد، بعداً به سیگنال ناشی از یوبی کوئیتین واپسی می‌شود (ترستون و همکاران، ۲۰۱۲). خصوصیت دیگر NDP52، اتصال خاص آن به تنها یکی از ۶ ارتوЛОگ انسانی MxmR-Atg8- LC3C می‌باشد. در مقابل، p62 و اپتینورین به هر ۶ ارتولوگ Atg8 متصل می‌شود. این مشاهده NDP52 را بعنوان یک جزء اصلی اتوفازی ضد باکتری در داخل سلول‌های انسانی مورد تأکید قرار می‌دهد. پس از تخلیه NDP52 یا LC3C، باقیمانده ارتولوگ‌های Atg8، اتوفازی ضدباکتری (ضد باکتری) مؤثر را حمایت نمی‌کند (فون موهلین^۱ و همکاران، ۲۰۱۲).

¹ von Muhlinen



شکل ۱۲.۳

همچنین شایان ذکر است، در حالی که به نظر می‌رسد NDP52 فقط در ضد باکتری عمل می‌کند، p62 همچنین می‌تواند توده‌های پروتئینی یوبی کوئیتین شده را به اتوفاگوزوم‌ها وارد کند. بر خلاف این پروتئین‌ها، گیرنده اتوفازی دیگر، NBR1، با وجود توانایی آن در اتصال به پلی یوبی کوئیتین، نیاز به محدود کردن افزایش سالمونلا ندارد (زنگ و همکاران، ۲۰۰۹). بنابراین، به نظر می‌رسد که گیرنده‌های مختلف اتوفازی، سیگنال‌های با واسطه یوبیکوئیتین مختلف را تشخیص می‌دهد و سطح بالای خصوصیت در سیستم موجود است. این ایده با این مشاهده حمایت می‌شود که NDP52 و p62 میکروارگانیسم‌های انفرادی را در سالمونلای روکش شده با یوبی کوئیتین شکل می‌دهد (سما^۱ و همکاران، ۲۰۱۱). یک ویژگی متمایز اپتینورین این است که میل اتصال LC3 آن توسط TBK1 تنظیم می‌شود (کیناز ۱ متصل به)، کینازی که برای محدود کردن تکثیر سالمونلا مورد نیاز است (رادکه^۲ و همکاران، ۲۰۰۷). به این ترتیب، اتوفازی ضد باکتری احتمالاً توسط سلول از طریق فسفوریلاسیون اپتینورین با واسطه TBK1 به خوبی تنظیم می‌شود (ویلد و همکاران، ۲۰۱۱). درک نقش‌های ضروری NDP52، p62 و اپتینورین در اتوفازی ضدباکتریایی، حوزه جذاب کار آینده خواهد بود.

¹ Cemma² Radtke

اتوفازی سالمونلا درون تنی

اکثر مطالعات در مورد اتوفازی سالمونلا با استفاده از سلول‌های اپی تلیال کشت شده انجام شده است. بنابراین، تعیین اینکه اتوفازی، مکانیسم مؤثری برای محدودیت رشد سالمونلا در طول دوره عفونت درون سلولی است، از اهمیت بالایی برخوردار است. در موش‌های معمولی و عاری از میکروب که از راه دهان آلوده شده‌اند دریافت شد که سالمونلا با ساختارهای LC3 مثبت در سلول‌های اپیتلیال روده کوچک، به ویژه در ایلئوم^۱ مرتبط است (بنجامین و همکاران، ۲۰۱۳). مشخص شد که در ۲۴ ساعت پس از تلقیح، تا ۴۰ درصد از سالمونلای نوع وحشی LC3 مثبت بود، در حالیکه آن باکتری‌های غیرتهاجمی (SPI-1 T3SS غیرفعال) مثبت نبودند. میکروسکوپ الکترونی، مشخصه دوغشایی اتوفاگوزوم‌های اطراف سالمونلا را نشان داد. میکروسکوپی الکترون، خصوصیتِ دوغشایی اتوفاگوزوم‌های اطراف سالمونلا را نشان داد. این نشان دهنده اتوفازی ضدباکتریایی متعارف، به جای LAP به دنبال پارگی غشای واکوئی وابسته به SPI-1 T3SS است.

اهمیت اتوفازی ضد باکتری به دنبال عفونت سالمونلا، همچنین در موش‌هایی مطالعه شده است که روده آنها فاقد بیان Atg5 بود (بنجامین و همکاران، ۲۰۱۳). در راستای اتوفازی ضد باکتری که از میزبان در برابر پاتوژن‌های مهاجم حفاظت می‌کند، این موش‌ها، کمبود کلی نقاط LC3 مثبت و تعداد بیشتری از سالمونلا را در طحال و کبد نشان می‌دهند (که بیان Atg5 لغو نشده بود). این داده‌ها پیشنهاد می‌کنند که با کنترل تکثیر سالمونلا در روده، اتوفازی انتشار سالمونلا را در سراسر میزبان محدود می‌کند (بنجامین و همکاران، ۲۰۱۳). این تفسیر بیشتر با کار بر روی موش‌های فاقد بیان Atg16L1 در سلول‌های اپی تلیال روده حمایت می‌شد، که همچنین فقدان هم بیانی LC3 با سالمونلا و نیز افزایش حساسیت به عفونت را نشان داد (کان وی^۲ و همکاران، ۲۰۱۳).

^۱ بخش انتهایی روده کوچک

^۲ Conway

اقدامات ضد باکتریایی

آیا سالمونلا می‌تواند با اتوفاژی مقابله کند؟

اگر اتوفاژی یک مکانیسم مستقل سلولی واقعی را برای محدود کردن سالمونلای سیتوزولی فراهم کند، پس می‌توان فرض کرد که سالمونلا می‌تواند مکانیسم هایی را برای مقابله با این مسیر تخریب ایجاد کند. دو مشاهده از این مفهوم حمایت می‌کنند. اولین مشاهده اینست که چهار ساعت پس از مصرف یوبی کوئیتین، سیگنال‌های مرا بخور، باکتری‌های بیشتری را نسبت به گیرنده‌های اتوفاژی علامت می‌گذارند، که نشان می‌دهد یک زیرجمعیتی از باکتریها به طور مؤثری، هدف اتوفاژی قرار نگرفته‌اند (برمینگام و همکاران، ۲۰۰۶). دومین مشاهده اینست که به دنبال SPI-1 تهاجم وابسته به T3SS از سلول‌های اپی تلیال دارای اتوفاژی، تعداد زیادی از باکتری‌های سیتوزولی (بیشتر از ۵۰ باکتری / سلول) را می‌توان در بخش کوچکی از سلول‌های میزبان با میکروسکوپ الکترونی و فلورسانس شناسایی کرد (بیوزن^۱ و همکاران، ۲۰۰۲؛ بروم^۲ و همکاران، ۲۰۰۲). چنین باکتری‌هایی می‌توانند اکثربیت باکتری‌های داخل سلولی را بوسیله ارزیابی‌های واحد تشکیل کلنی^۳(CFU)، حتی اگر آنها تنها از ۱۰ تا ۲۰٪ سالمونلایی نشأت گرفته‌اند که واکوئل‌های آنها را پاره کرد (ملک کله^۴ و همکاران، ۲۰۱۲). این الگوی رشد می‌تواند ایده را بدهد که سیتوزول سلول اپی تلیال، برای تکثیر سالمونلا، عموماً مجاز است. به هر حال، تعداد سلول‌هایی که تکثیر بیش از حد باکتری سیتوزولی را نشان میدهند، بالغه اتوفاژی به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (زنگ و همکاران، ۲۰۰۹؛ ترستون و همکاران، ۲۰۰۹). این مشاهدات می‌توانند ناکارآمدی ذاتی اتوفاژی در ردودهای کشت شده یا مهار میکروبی خاص یا اجتناب از اتوفاژی را منعکس کند.

مکانیسم‌های اجتناب اتوفاژی بالقوه

مکانیسم‌های متعددی گزارش شده است که باکتری‌های داخل سلولی را قادر می‌سازد تا از تخریب اتوفاژیک اجتناب کند. برای مثال، گزارش شده است برخی توکسین‌های میکروبی، سطوح AMP حلقوی (cAMP) را افزایش می‌دهند تا اتوفاژی از جمله اتوفاژی ضد باکتری را

¹ Beuzon

² Brumell

³ colony

⁴ Malik-Kale

مهار کنند (شاه نظری و همکاران، ۲۰۱۱) جالب است که عفونت سالمونلا همچنین سبب افزایش cAMP در بافت‌های روده ای می‌شود، اما بررسی نشده است که آیا این پیام رسان دوم می‌تواند اتوفاژی ضد باکتری را تعدیل نماید (پترسون و همکاران، ۱۹۸۳).

شیگلا^۱ و لیستریا، حداقل تا حدی هردو با پوشاندن سیگنال‌های ناشی از اتوفاژی، مانع اتوفاژی ضد باکتری می‌شوند (اوگاوا و همکاران، ۲۰۰۵؛ یوشیکاوا و همکاران، ۲۰۰۹). برای مثال، IcsB ای پروتئین شیگلا، ATG5 را علامتگذاری می‌کند، و شیگلا ای IcsB فاقد IcsB، هدفگیری افزایشی به اتوفاگوزوم‌ها را متحمل می‌شود. به طور مشابه، پروتئین ActA لیستریا، باکتری‌ها را از سیستم یوبی کوئیتین و از اینرو از اتوفاژی باواسطه یوبی کوئیتین پنهان می‌کند. تا به امروز، شواهدی برای وجود چنین مکانیسم‌های اجتناب از اتوفاژی در سالمونلا دیده نشده است. با این وجود، تعداد قابل توجهی از یوبی کوئیتین‌های روکش شده اما سالمونلای LC3 منفی در ۴ ساعت پس از تهاجم یافت شدند (برمینگام و همکاران، ۲۰۰۶). بر این اساس، احتمال دارد که سالمونلا، اتوفاژی با واسطه گیرنده باکتری‌های نشانگذاری شده توسط یوبی کوئیتین را از طریق یک مکانیسم نامشخص، مهار کند.

SseL توده‌های پروتئینی مورد هدف اتوفاژی را از بین می‌برد

در حالیکه شواهد مکانیسمی کمی وجود دارد که نشان می‌دهد سالمونلا با اتوفاژی خاص ضدباکتری مقابله می‌کند، تداخل با سایر فرایندهای اتوفاژی گزارش شده است. تحويل واکنش دهنده‌های SPI-2 T3SS، موجب تجمع و انباست توده‌های سیتوزولی متراکمی، شبیه به ساختارهای القایی شبه آگرزو (ALIIs) القا شده با LPS، در مجاورت میکروکلنی‌های SCV می‌شود (مسکیتا^۲ و همکاران، ۲۰۱۲). این توده‌ها حاوی یوبی کوئیتین، گیرنده اتوفاژی p62، و اجزاء دستگاه اتوفاژی هستند. در طی عفونت، همانطور که با تبدیل LC3-I به LC3-II اندازه گیری شد، انتقال SseL، یک یوبی کوئیتیناز^۳، منجر به کاهش این توده‌های یوبیکوئیتین مثبت و همچنین ساخت اتوفاگوزوم‌ها می‌شود (مسکیتا و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین، وقتی توده‌های سیتوزولی هدف قرار می‌گیرد، SseL پروتئین متصل به p62 را در توده‌ها یوبیکوئیتین می‌کند و حضورشان را از سلول پنهان می‌کند.

¹ Shigella

² Mesquita

³ deubiquitinase

بنابراین، توجه به این نکته جالب است که در حالیکه عفونت سالمونلا می‌تواند اتوفاژی را از طریق SipB، LPS و ترشح واکنش پذیر با واسطه SPI-2 القا کند، پاتوژن نیز جریان اتوفاژیک را نیز کاهش می‌دهد. عمل SseL تکثیر سالمونلا را در ماکروفاژها (مسکیتا و همکاران، ۲۰۱۲) و موش (رایتکونن^۱ و همکاران، ۲۰۰۷) ممکن می‌سازد. به هر حال، اینکه بازده باکتریایی افزایش یافته، به دلیل اصلاح SseL از توده‌های مرتبط با SCV است، هنوز مشخص نیست. یک فرضیه اینست که توده‌های پروتئینی بوبی کوئیتین شده، با p62، موجب تحويل پیش سازهای پیتید خد میکروبی به SCV، به دنبال همچو شی با اتوفاگولیزوژومها می‌شوند. مکانیسم مشابهی برای کنترل مایکروبیک توبرکلوزیس^۲ پیشنهاد شد است (پونپواک و همکاران، ۲۰۱۰)، که در آن پردازش پروتئولیتیک^۳ ریبوزومی و مقدار پروتئین‌های سیتوزولی بوبیکیتین شده در اتوفاگوزوم‌ها، پیتیدهای خدمیکروبی قوی تولید می‌کنند.

آیا سالمونلا، اتوفاژی ضد باکتری انتخابی را مهار می‌کند؟

دستکاری وابسته به SseL اتوفاژی ناشی از سالمونلا، با تکیه بر القای اندام‌های ترشحی-SPI-2 که ۲-۴ ساعت بعد از جذب باکتری رخ می‌دهد، نسبتاً دیر است. به هر حال، دستگاه اتوفاژی اصلی، در سلول‌های آلدود بسیار زودتر از ۲ ساعت، یا از طریق علامت دهنده PRP یا اتوفاژی ناشی از گرسنگی تنظیم شده است. به دنبال پارگی SCV، محرومیت مواد مغذی نایابدار، سرکوبی اتوفاژی را توسط حسگر مواد غذایی mTOR را کاهش می‌دهد (تاتولی و همکاران، ۲۰۱۲a، ۲۰۱۲b). از آنجایی که اوچ سالمونلای LC3 مثبت، همزمان اتفاق می‌افتد، فقدان مهار mTOR به نظر می‌رسد اتوفاژی سالمونلا را تحریک می‌کند. به هر حال، با ۳-۴ ساعت پس از mTOR حمله، mTOR در غشاهای LAMP2 مثبت، مجدداً متتمرکز می‌کند، که می‌تواند اتوفاژی را دوباره مهار کند. این ظهور mTOR در واکوئل‌ها، ممکن است این مورد را توضیح دهد که چرا در ۴ ساعت پس از حمله، درصد قابل توجهی از سالمونلای سیتوزولی، خالی از LC3 می‌باشد (برمنگام و همکاران، ۲۰۰۶). در حمایت از این ایده، درمان با رایامایسین، که سبب القای اتوفاژی پیوسته می‌شود، که منجر به افزایش قابل توجهی در درصد سالمونلای LC3 مثبت در ۲، ۳، و ۴ ساعت پس از حمله می‌شود. در حالیکه احتمال دارد که سالمونلا به طور فعال،

¹ Rytkonen

² Mycobacterium tuberculosis

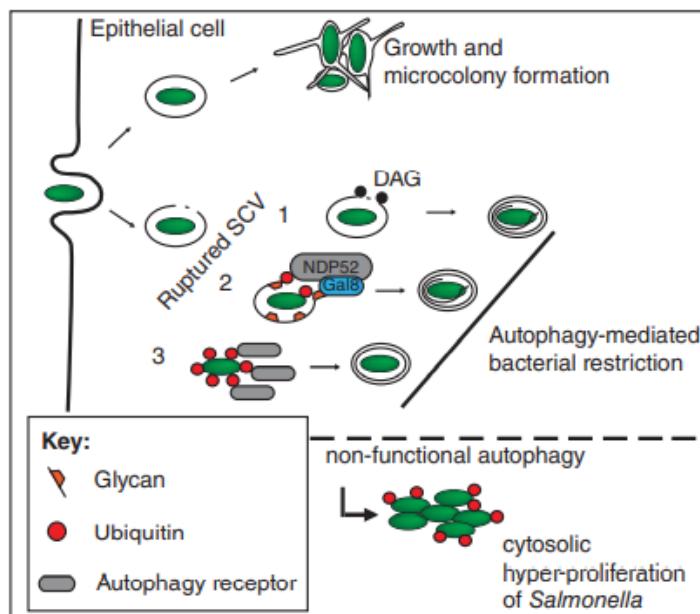
³ proteolytic

فصل ۱۲: برهمکنش‌های بین سالمونلا و سیستم اتوفازی ۳۰۰

را دستکاری کند تا اتوفازی ضد باکتری را ۴ ساعت پس از حمله، کاهش دهد، هیچ مشارکتی به وسیله سالمونلای SPI-2 T3SS برای هنجارسازی فعالیت mTOR شناسایی شده است (تاتولی و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین، احتمال بیشتری وجود دارد که mTOR به دنبال عدم وجود آسیب غشایی دوباره، مجدداً فعال شود.

چشم اندازها

در طول ۱۰۰ سال گذشته، سالمونلا ثابت کرده است که ابزار جالب و همه کاره ای برای مطالعه اتوفازی ضدباکتری میباشد. دانشی تکوین یافته است که این فرایند خودگردان سلولی، مسیر دفاعی مهمی است که با محصور کردن باکتری هایی که واکوئل های خود را پاره کرده اند، به حفظ عقیمی سیتوزول سلول میزبان کمک می کند (در شکل ۱۲,۴ خلاصه شده است). بعلاوه، اتوفازی می تواند به پاکسازی پاتوژن با واسطهٔ فاگوزومی از طریق LAP کمک کند.



شکل ۱۲,۴

خصوصیات کلیدی اتوفازی، شامل استفاده از سیگنال‌های مرا بخور است که سالمونلا را در واکوئل‌های پاره شده برای جذب اتوفازی یا از طریق گالکتین-۸ یا یوبیکیتین، علامتگذاری می‌کند. سپس، گیرنده‌های اتوفازی تخصصی، سیگنال‌های مرا بخور را تشخیص می‌دهد در حالیکه، به طور همزمان، به LC3 متصل می‌شود، ساخت اتوفاگوزوم را برای محموله هدایت

می‌کند. بعلاوه، شواهدی وجود دارد که دستگاه اتوفاژی اصلی بکار گرفته می‌شود و توسط مکانیسم‌های مستقل، مانند از طریق گرسنگی آمینو اسید پایدار فعال می‌شود. در حالیکه فرض می‌شود که سرانجام، اتوفاژی ضد باکتریایی، پس از همچوشهای لیزوزوم- اتوفاگوزوم باکتری‌ها را می‌کشد، کشنده استقیم در اتوفاگوزوم‌های بالغ هنوز نشان داده نشده است. مشاهده ای که اتوفاژی ضدباکتریایی، تکثیر سالمونلا را در سلول‌های اپی تلیال کشت شده در مدت زمان کوتاهی محدود می‌کند، احتمالاً به علت تفکیک پاتوژن دور از منابع سیتوزولی است که آنرا قادر می‌سازد به خوبی تکثیر شود. اینکه سالمونلا می‌تواند اتوفاگوزوم‌ها را در آنها دستکاری و تکثیر کند، مشخص نیست.

قوی ترین شاهد دال بر مهار اتوفاژی توسط سالمونلا، شناسایی SseL دیوبیکوئیتیناز است که به نظر می‌رسد جریان اتوفاژیک را کاهش می‌دهد و به تکثیر باکتریایی کمک می‌کند، اما مکانیسم چگونگی وقوع آن، مشخص نیست. گمان می‌شود که سالمونلا به طور فعال اتوفاژی ضدباکتریایی خاص را از باکتری سیتوزولی روکش شده توسط یوبی کوئیتین جلوگیری می‌کند، با توجه به اینکه پاتوژن‌های کمی، با LC3 در زمانهای بعدی پس از تهاجم هم بیانی دارند. در هر حال، تا به امروز، هیچ سالمونلای بالغی توصیف نشده است که اتوفاژی افزایش یافته این باکتری‌های روکش شده با یوبی کوئیتین را نشان دهند.

در نتیجه، در حالیکه برخی از مولکولهای کلیدی درگیر در فرایندهای اتوفاژی ضد سالمونلا شناسایی شده اند، هنوز چیزهای زیادی در مورد درک فعالسازی گیرنده، بکارگیری، ویژگی، و پیامدهای فیزیولوژیکی اتوفاژی طی عفونت باقی می‌ماند.

فصل ۱۳

عوامل میزبان که اتوفاژی را بعنوان دفاع در برابر توکسوبلاسمای گوندی بکار می‌گیرند

مقدمه

توکسوبلاسمای گوندی یک انگل^۱ تک یاخته^۲ داخل سلولی است که تقریباً یک سوم جمعیت انسان در سراسر جهان را آلوده می‌کند. آلودگی توکسوبلاسمای گوندی، معمولاً بدون علامت است. به هر حال، توکسوبلاسمای گوندی از اهمیت بالینی برخوردار است زیرا سبب ایجاد انسفالیت در افراد دارای نقص ایمنی و رتینوکوروئیدیت^۳ در افراد دارای ایمنی قابل قبول^۴ و بیماران دارای ضعف سیستم ایمنی می‌شود. توکسوبلاسمای گوندی همچنین می‌تواند سبب آلودگی مادرزادی شود که ممکن است منجر به بیماری مغزی^۵ و چشمی^۶ شود.

انگل به سه شکل وجود دارد: ۱- تاکی زوئیت، که شکل مهاجم غیر جنسی است که می‌تواند تقریباً هر سلول هسته دار میزبان را آلوده کند؛ ۲- کیست بافتی (حاوی برادی زوئیت‌ها)، که در بافت‌های میزبان‌های آلوده در طی فاز مزمم غفونت باقی می‌ماند؛ و ۳- اواویست (حاوی اسپرروزوئیت)، که در روده گربه‌ها (میزبان قطعی) در طول چرخه جنسی انگل تولید می‌شود. بلع کیست‌های بافتی یا اواویست‌ها، به دنبال رهاسازی به لومین روده ای برادیزوئیت‌ها یا

¹ parasite

⁴ immunocompetent

² protozoan

⁵ cerebral

³ retinochoroiditis

⁶ ocular

اسپوروزوئیت به ترتیب، حمله به سلول‌های اپی تلیال، تبدیل به تاکی زوئیت و انتشار در سراسر بدن از طریق خون و اندام‌های لنفاویک، رخ می‌دهد. توسعه ایمنی با واسطه سلولی با تبدیل به کیست‌های بافتی همراه است که می‌توان آنرا در همه ارگان‌ها یافت اما به آسانی در عضلات میوکارد، اسکلتی، و صاف و سیستم عصبی مرکزی مشاهده می‌شوند. به نظر می‌رسد کیست‌های بافتی تا پایان عمر در میزبان آلووده باقی می‌مانند. فعالسازی مجدد آلوودگی مزمن (نهفته) منجر به ساخت تاکی زوئیت در بافت‌ها می‌شود. بنابراین، تاکی زوئیت‌ها در طی مرحله حاد عفونت یا در طولِ فعال شدنِ مجدد عفونتِ مزمن یافت می‌شوند.

ایمنی با واسطه سلولی، نقش اساسی در مقاومت در برابر توکسوپلاسمای گوندی دارد. IL-12 که عمدتاً توسط سلول‌های دندربیتی تولید می‌شود، سببِ ترشح IFN-γ در سلول‌های T و NK می‌شود، سایتوکاینی که در طول فازهای عفونتِ مزمن و حاد، برای مقاومت در برابر انگل اساسی است (دنکرز و گازینلی^۱، ۱۹۹۸؛ گازینلی و همکاران، ۱۹۹۳، ۱۹۹۴؛ لیو و همکاران، ۲۰۰۶؛ سوزوکی و همکاران، ۱۹۸۸، ۱۹۸۹؛ یاپ و همکاران، ۲۰۰۰). TNF-α، NOS2 و IL-6، همچنین کلیدی برای مقاومت در برابر توکسوپلاسموسیس در مغز و چشم هستند، مهمترین اندام‌هایی که در طولِ مدتِ بیماری تحت تأثیر قرار می‌گیرند (دکرت-شلوتر^۲ و همکاران، ۱۹۹۸؛ گازینلی و همکاران، ۱۹۹۳، ۱۹۹۴؛ شارتون-کرستن^۳ و همکاران، ۱۹۹۷؛ یاپ و همکاران، ۱۹۹۸). به نظر می‌رسد که ایمنی مزاجی (همورال) در هماهنگی با ایمنی با واسطه سلولی برای محافظت در برابر انگل عمل می‌کند (سابلز^۴ و همکاران، ۲۰۰۰).

CD40، تخریب لیزوژومی و آتوفاژی توکسوپلاسمای گوندی

تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسمای گوندی، با ماندن در محفظه ای به نامِ واکوئل پارازیتوفور در سلول‌های میزبان زنده می‌مانند. این ساختار، در طی فرایند تهاجم فعالِ سلول‌های میزبان تشکیل می‌شوند. تهاجم به ترشح پروتئینهایی از میکرونیمها و راپتری‌ها وابسته است، اندامک‌های تخصصی که در انتهایِ آپیکال (رأس) انگل وجود دارند (کرادرز و بوتروید^۵، ۲۰۰۷). پروتئین‌های میکرونیمالِ توکسوپلاسمای گوندی ترشح شده (MICها) بر روی غشای سطح انگل بیان می‌شوند و با گیرنده‌های سلول میزبان تعامل دارند (کرادرز و تاملی، ۲۰۰۸). ارتباط بین MIC‌های

¹ Denkers and Gazzinelli

⁴ Sayles

² Deckert-Schluter

⁵ Carruthers and Boothroyd

³ Scharton-Kersten

فصل ۱۳: عوامل میزبان که اتوفاژی را بعنوان دفاع در برابر توکسوبلاسمای گوندی بکار می‌گیرند^{۱۰۰}

تراغشایی به متور اکتین- میوزین (گلیدئوزوم) انگل همراه با اتصال گیرنده سلول میزبان توسط MICها به ارگانیسم اجازه نفوذ به سلولهای میزبان را می‌دهد (سیبلی، ۲۰۱۱؛ سولداتی- فار، ۲۰۰۸). به دنبال رهاسازی MICها، راپتری‌ها، پروتئین‌های گردن راپتری ترشح می‌کنند که برای ساخت پیوند متحرک، ضروری است (بستربو و همکاران، ۲۰۱۱؛ بوتروید و دوبریمس، ۲۰۰۸). پیوند متحرک، انگل را به سلول میزبان متصل می‌کند در حالیکه انگل به آن نفوذ می‌کند. به نظر می‌رسد، پیوند متحرک به عنوان غربالی عمل می‌کند که از ورود پروتئین‌های تragashayi نوع ۱ میزبان به غشایی جلوگیری می‌کند که احاطه انگل در زمان نفوذ آن به سلول میزبان را شروع می‌کند (بستربو^۲ و همکاران، ۲۰۱۱؛ موردو و همکاران، ۱۹۹۹). واکوئل پارازیتوفور که پس از تهاجم انگل تشکیل می‌شود، ساختارهای اندوسیتی میزبان را بکار می‌گیرد که به فضای واکوئل، کامل و دست نخورده تحويل داده می‌شوند (کاپنزا^۳ و همکاران، ۲۰۰۶). به هر حال، رهاسازی و انتشار محتواهای اندوزومی به فضای واکوئل وجود ندارد. به هر حال، به نظر می‌رسد که نقصان پروتئین‌های تragashayi نوع ۱ میزبان، در غشای واکوئل پارازیتوفوری، عدم حضور همچوشه واکوئل- لیزوژومی را توضیح می‌دهد (موردو و همکاران، ۱۹۹۹). از آنجایی که توکسوبلاسمای گوندی نمی‌تواند در محیط لیزوژومی مقاومت کند، ماهیت غیر همچوشه واکوئل پارازیتوفور برای بقای انگل ضروری است. به هر حال، علامت دهی CD40 باعث همچوشه واکوئل پارازیتوفور با لیزوژوم‌ها می‌شود، فرایندی که به دستگاه اتوفاژی وابسته است.

CD40، عضوی از خانواده بزرگ گیرنده TNF است که به طور مداوم در پاتوژن‌های حاضر در سلول‌ها و در سلول‌های غیرخونساز مختلف بیان می‌شود (ون کوتن^۴ و بانچرو^۵، ۲۰۰۰). CD154، لیگاند طبیعی آن عمدتاً روی سلول‌های T CD4⁺ فعال شده و نیز در پلاکت‌های فعال شده و نیز در پلاسمایا بعنوان یک پروتئین حلال، بیان می‌شود (گراف و همکاران، ۱۹۹۵؛ هن و همکاران، ۱۹۹۸؛ ون کوتن و بانچرو، ۲۰۰۰). بعلاوه، HSP70 و پروتئین متصل به C4b می‌توانند بعنوان لیگاند برای CD40 عمل کنند (برودر و همکاران، ۲۰۰۳؛ ونگ و همکاران، ۲۰۰۱). شناسایی اینکه سندروم هایپر IgM وابسته به X نقص ایمنی مادرزادی (X-HIM) ناشی از فقدان CD154 عملکردی است که شواهدی دال بر ارتباط بالینی مسیر CD40-CD154 ارائه می‌کند

¹ Soldati-Favre

⁴ Coppens

² Dubremetz

⁵ van Kooten

³ Besteiro

⁶ Banchereau

(اروفو و همکاران، ۱۹۹۳). مطالعات روی بیمارانی با X-HIM و در موشها آشکار کرد که برهمنکنش^۱ بین CD40 و CD154، برای مقاومت در برابر پاتوژن‌های مختلف از جمله توکسoplasmoma گوندی، ضروری است (لوی و همکاران، ۱۹۹۷؛ پورتیلو و همکاران، ۲۰۱۰؛ ریچمن و همکاران، ۲۰۰۰؛ سباستی^۲ و همکاران، ۱۹۹۹). نقش این مسیر، بویژه برای کنترل توکسoplasmoma گوندی در مغز و چشم مهم است. موشهای CD40^{-/-} و CD154^{-/-}، به انسفالیت توکسoplasmic و توکسoplasmous چشمی، حساس هستند (پورتیلو و همکاران، ۲۰۱۰؛ ریچمن و همکاران، ۲۰۰۰). علاوه بر بیماران مبتلا به X-HIM، CD40-CD154 ممکن است ارتباط بالینی با سایر گروههای بیمارانی داشته باشد که به توکسoplasmous چشمی و یا مغزی حساسند، از جمله، نوزادان و بیماران با AIDS، از آنجایی که نوزادان، اختلال^۳ بیان CD154 در سلولهای T⁺ CD4⁺ و سطوح کاهش یافته CD40 در سلولهای دندربیتی (کائور^۴ و همکاران، ۲۰۰۷؛ نونویاما^۳ و همکاران، ۱۹۹۵) را نشان می‌دهند، القای CD154 می‌تواند در سلولهای T⁺ CD4⁺ از بیماران آلوده به HIV-1 مختل شود (سباستی و همکاران، ۲۰۰۱؛ ژنگ و همکاران، ۲۰۰۴).

اگرچه مسیر CD40-CD154، پاسخ سیتوکین نوع Th1 را در برابر توکسoplasmoma گوندی در شرایط آزمایشگاهی در انسان‌ها و در داخل بدن در موش‌ها افزایش می‌دهد (ریچمن و همکاران، ۲۰۰۰؛ سباستی و همکاران، ۱۹۹۹)، این احتمال وجود دارد که این مسیر تا حدی با القای فعالیت ضد توکسoplasmoma گوندی ناشی از اتصال CD40 در سلولهای میزبان حفاظت شود (پورتیلو و همکاران، ۲۰۱۰؛ ریچمن و همکاران، ۲۰۰۰) ماکروفازها و میکروگلیاهای، واسطه‌های مهم مقاومت در برابر توکسoplasmoma گوندی هستند (دکرت و همکاران، ۲۰۰۶؛ گازینلی و همکاران، ۱۹۹۳). این سلولها علاوه بر سلولهای T در تراوشات التهابی در طی توکسoplasmous حضور دارند (گازینلی و همکاران، ۱۹۹۴؛ شلاتر و همکاران، ۱۹۹۱). سلولهای T⁺ CD4⁺ فعال شده با توکسoplasmoma گوندی^۴ CD154⁺ و نیز CD154 نوترکیب و mAb ضد CD40 اگنوستیک باعث فعالیت توکسoplasmasidai در ماکروفازها و میکروگلیاهای می‌شود، حتی اگر اتصال CD40، در سلولهای آلوده با توکسoplasmoma گوندی رخ دهد (اندراده^۴ و همکاران، ۲۰۰۶؛ پورتیلو و همکاران، ۲۰۱۰). کشنن انگل ناشی از CD40 به IFN-γ یا مولکولهای مؤثر پایین دست^۴ IFN-γ مانند NOS2 یا جی تی پی آزهای مرتبط با ایمنی (IRGها) نیاز ندارد (اندراده و همکاران، ۲۰۰۳).

¹ Subauste² Kaur³ Nonoyama⁴ Andrade

فصل ۱۳: عوامل میزبان که اتوفاژی را بعنوان دفاع در برابر توکسوبلاسمای گوندی بکار می‌گیرند^۱

۲۰۰۵؛ سباستی و وسین دارپ،^۲ و مسیر اکسیداتیو یا گرسنگی برای تریپتوفان واسطه آن نیست (اندراده و همکاران، ۲۰۰۵).

CD40 سبب همجوشی واکوئل‌های پارازیتوفور با لیزوژوم‌ها می‌شود که بوسیله هم بیانی با رنگ اسیدوتروپیک Lysotracker Red با این واکوئل‌ها و تجمع واکوئل‌ها ارزیابی شود (اندراده و همکاران، ۲۰۰۶؛ پورتفیلو و همکاران، ۲۰۱۰؛ سباستی و همکاران، ۲۰۰۷). آنتقال واکوئل پارازیتوفور به محفظه ای که با لیزوژوم‌ها همجوشی دارد، با استفاده از انگل‌های ترازیخته ای تأیید می‌شود که یک پروتئین فلورسنت را برای گرانول‌های متراکم هدف قرار می‌دهد (طرح پیشنهادی توکسوبلاسمای گوندی - ترشحی). تشکیل واکوئل‌های پارازیتوفور، ترشح محتویات گرانول‌های متراکم را به لومن واکوئل را شامل می‌شود (کاروتز و سیلی، ۱۹۹۷). تحریک CD40 سبب تجمع اطراف بخش‌های حاوی انگل می‌شود که طرح پیشنهادی را در لومن خود بیان می‌کند که نشان می‌دهد این بخشها، برخلاف فاگوزوم‌ها که حاوی انگل هستند، واکوئل‌های پارازیتوفور می‌باشند (اندراده و همکاران، ۲۰۰۶). بعلاوه، واکوئل‌های پارازیتوفوری از پیش ساخته شده، هنوز با لیزوژوم‌ها / اندوزوم‌های اخیر همجوشی دارند، حتی اگر CD40 ۱۸ ساعت پس از آلدگی درگیر باشد (اندراده و همکاران، ۲۰۰۶). CD40، کشنن توکسوبلاسمای گوندی را از طریق همجوشی واکوئل-لیزوژوم القا می‌کند، زیرا مهار فارماکولوژی آنزیم‌های لیزوژومی، واکوئلی، فسفواینوزیتید ۳-کیناز (PI3K)، بیان یک جهش منفی غالب و نیز شکست کلاس ۳ فسفواینوزیتید ۳-کیناز (VPS34)، کشنن توکسوبلاسمای گوندی Rab7 را لغو می‌کند (اندراده و همکاران، ۲۰۰۶؛ پورتفیلو و همکاران، ۲۰۱۰).

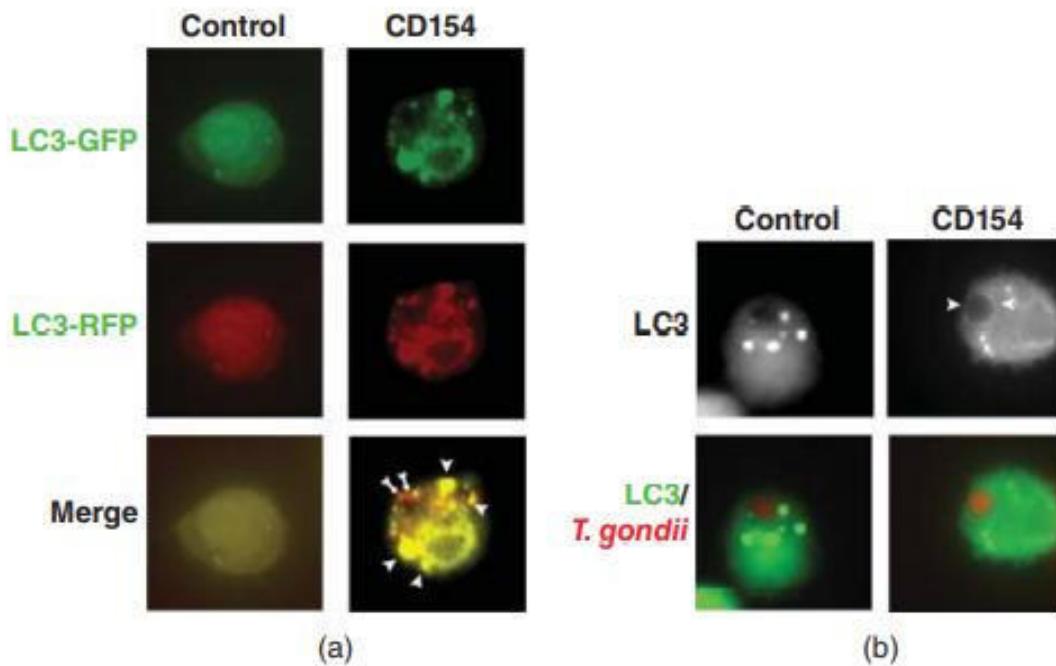
چندین رده از شواهد، نقش اتوفاژی در واسطه گری همجوشی واکوئل - لیزوژوم ناشی از CD40 حمایت می‌کنند. تحریک CD40 ماکروفازها / میکروگلیاهای، جریان اتوفاژی را در این سلول‌ها افزایش می‌دهد (او گولا^۳ و همکاران، ۲۰۱۳) (شکل ۱۳,۱) را در بخش Plate (شکل ۱۳,۱). لیگاند پوشی CD40 در سلول‌های آلدده به توکسوبلاسمای گوندی سبب بکارگیری LC3 اطراف انگل می‌شود که مقدم بر بکارگیری LAMP-1 می‌باشد (اندراده و همکاران، ۲۰۰۶) (شکل ۱۳,۱). بعلاوه، شکست Beclin 1, ATG7 و ATG7 مانع از همجوشی لیزوژوم- واکوئل و کشنن توکسوبلاسمای گوندی در ماکروفازها / میکروگلیاهای فعال شده با CD40 می‌شود (اندراده و همکاران، ۲۰۰۶).

¹ ; Subauste and Wessendarp

² RFP

³ Ogolla

پورتفیلو و همکاران، ۲۰۱۰). بنابراین، این مطالعات نشان می‌دهند که اتوفاژی می‌تواند توسط CD40 تحریک شود تا مسیر توکسولاسما گوندی را به محفظه لیزوژومی که منجر به کشننگ انگل می‌شود، تغییر دهد.



۱۳,۱

توکسولاسما گوندی، هم سلول‌های خونساز و هم غیر خونساز را آلوده می‌کند. احتمالاً کنترل مؤثر انگل نیاز به فعالسازی مکانیسم‌های مقاومت در هر دو بخش سلولی دارد. CD40 نه تنها در سلول‌های ارائه دهنده آنتی ژن بلکه در سلول‌های مختلف غیر خونساز مانند سلول‌های اندوتیال، سلول‌های اپی تلیال، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های ماهیچه‌ای صاف عروق، کراتینوسیت‌ها، و نورون‌های خاص نیز بیان می‌شود (هالنباگ^۱ و همکاران، ۱۹۹۵). درگیری CD40 در سلول‌های اندوتیال و سلول‌های اپی تلیال رنگدانه‌ای شبکیه‌ای، منجر به کشننگ توکسولاسما گوندی می‌شود (ون گرول^۲ و همکاران، ۲۰۱۳). مشابه ماکروفاژها (اوگولا و همکاران، ۲۰۱۳)، تحریک CD40 در سلول‌های اپیتیلیال رنگدانه شبکیه‌ای، جریان اتوفاژی را افزایش می‌دهد که منجر به بکارگیری LC3 اطراف انگل می‌شود و منجر به همجوشی لیزوژومی – واکوئلی و تخریب لیزوژومی انگل وابسته به پروتئین‌های Beclin 1 و ATG7 اتوفاژی می‌شوند (ون گرول

¹ Hollenbaugh² Van Grol

فصل ۱۳: عوامل میزبان که اتوفاژی را بعنوان دفاع در برابر توکسوپلاسمای گوندی بکار می‌گیرند^{۲۶۳}

و همکاران، ۲۰۱۳). این مطالعات با هم، نشان دادند که CD40 فعالیت توکسوپلاسمای گوندی را در سلول‌های غیر خونساز مختلف وابسته به پروتئین‌های دستگاه اتوفاژی القا می‌کند.

وقایع پایین دست CD40 در گیر در تحریک اتوفاژی

سطح بیان ۱ Beclin به فعالیت اتوفاژیکی متصل شده است (لیانگ و همکاران، ۱۹۹۹؛ کیو و همکاران، ۲۰۰۳). تحریک CD40 سبب افزایش سریع در بیان پروتئین ۱ Beclin در ماکروفاژها / میکروگلیاهای سلول‌های اندوتیال می‌شود (پورتفیلو و همکاران، ۲۰۱۲؛ ون گرول و همکاران، ۲۰۱۳). به نظر می‌رسد زمانی که ۱ Beclin در میکروگلیاهای ماکروفاژها از موش‌های B6 آلوده به توکسوپلاسمای گوندی، بالاتر از مقدار آن در میکروگلیاهای ماکروفاژها از موشهای CD40^{-/-} آلوده شده است. بیان این اثر در داخل بدن نیز رخ می‌دهد (پورتفیلو و همکاران، ۲۰۱۰). تغییرات نسبتاً کمی در بیان ۱ Beclin، فعالیت ضد توکسوپلاسمای گوندی ناشی از CD40 را تعدیل می‌کند، از این‌رو بیان بیش از حد ناشی از پلاسمید ۱ Beclin، کشنن انگل را در سطوح پایین میانگین سیگنال دهنده توکسوپلاسمای گوندی بهبود می‌بخشد در حالیکه شکست نسبی ۱ Beclin، باعث از بین رفتن مرگ توکسوپلاسمای گوندی ناشی از CD40 می‌شود (پورتفیلو و همکاران، ۲۰۱۰). CD40، Beclin ۱، CD40 را تنظیم افزایشی می‌کند و باعث کشنن توکسوپلاسمای گوندی توسط کاهش سطوح پروتئین p21، مولکولی که ۱ Beclin را تخریب می‌کند، می‌شود (فوجیوارا و همکاران، ۲۰۰۸). ممکن است که علامت دهنده CD40 اثرات اضافی بر روی ۱ Beclin داشته باشد، مانند فعالسازی فعالیت اتوفاژیک این پروتئین همانطور که در مدل‌های دیگر گزارش شد (پاتینگر^۱ و همکاران، ۲۰۰۵؛ شای و کرل^۲، ۲۰۱۰).

دُم سیتوپلاسمی CD40، فاقد سیگنال‌ها و فعالیت کاتالیزوری ذاتی از طریق توانایی آنها در جذب عوامل مرتبط با گیرنده TNF (ها) می‌باشد (بیشاپ، ۲۰۰۴؛ چانگ و همکاران، ۲۰۰۲). دامنه‌های غشایی - دیستال CD40 مستقیماً به TRAF2 و TRAF3 متصل می‌شوند (TRAF3 علامت دهنده CD40 را مهار می‌کند). در حالیکه، TRAF6 به دامنه غشایی پروگزیمال متفاوتی متصل می‌شود (بیشاپ، ۲۰۰۴؛ چانگ و همکاران، ۲۰۰۲). کشنن اتوفاژیک ناشی از توکسوپلاسمای گوندی در ماکروفاژها، منحصرأ به محل اتصال TRAF6 از CD40 وابسته است (اندراده و همکاران، ۲۰۰۵؛ سوباستی و همکاران، ۲۰۰۷). محل اتصال TRAF6، نقش

¹ Pattingre

² Shi and Kehrl

دوگانه ای در این فرایند بازی می‌کند: تولید اتوکراین^۱ TNF- α (موکوندان و همکاران، ۲۰۰۵) و سیگنال‌های TRAF6 پایین دست CD40 را افزایش می‌دهد تا با TNF- α برای افزایش کشنن پاتوژن وابسته به اتوفازی همکاری کند (اندراده و همکاران، ۲۰۰۵؛ سوباستی و همکاران، ۲۰۰۷). در حالی که تولید اتوکراین TNF- α مورد نیاز است (اندراده و همکاران، ۲۰۰۳)، TNF- α به تنها‌یی برای القای فعالیت توکسپلاسمای گوندی در ماکروفاژها کافی نیست (اندراده و همکاران، ۲۰۰۵)، که نشان می‌دهد القای این فعالیت، به هم افزایی^۲ بین تولید TNF- α ناشی از CD40-TRAF6 و سیگنال‌های اضافی پایین دست TRAF6 نیاز دارد (اندراده و همکاران، ۲۰۰۶؛ سوباستی و همکاران، ۲۰۰۷).

عملکردهای PKR بعنوان پیوندی بین علامت دهی CD40-TRAF و تحریک اتوفازی و کشنن اتوفازیک توکسپلاسمای گوندی است. PKR، یک سرین – ترئونین کیناز^۳ است که به خوبی برای عملکرد آن در اینمی ضد ویروسی مشخص می‌شود (گارسیا و همکاران، ۲۰۰۶؛ ویلیامز، ۲۰۰۱). در سطوح پایین بعنوان مونومرهای غیرفعال در سیتوپلاسمی سلول‌های پستانداران حضور دارد (گارسیا و همکاران، ۲۰۰۶؛ ویلیامز، ۲۰۰۱). PKR شامل دامنه کینازی (KD) و دو جفت دامنه متصل به dsRBD (dsRNA) است که فعالیت کیناز را تنظیم می‌کند (گارسیا و همکاران، ۲۰۰۶؛ ویلیامز، ۲۰۰۱). در شرایط استراحت، dsRBD با KD که مولکول را در یک شکل بسته و غیر فعال نگه می‌دارد، تعامل دارد (ناندوری و همکاران، ۱۹۹۸). اتصال dsRNA به dsRBD منجر به یک تغییر ساختاری می‌شود که اعتقاد بر اینست که تغییر KD را از اثر خودبازدارنده dsRBD رها می‌سازد، که امکان این را به PKR می‌دهد که دیمر و اتوفسفریله شود و در نتیجه فعال شود (ناندوری و همکاران، ۱۹۹۸).

موس‌های PKR^{-/-}، حساسیت بیشتری به توکسپلاسموز مغزی و چشمی نشان می‌دهند (در ذیل ببینید). بعلاوه، PKR برای القای فعالیت ضد توکسپلاسمای گوندی در ماکروفاژها / ماکروگلیاهای در پاسخ به لیگاند پوشی CD40 مورد نیاز است، اما برای فعالیت ضد انگلی ناشی از IFN- γ / TNF- α در این سلول‌ها غیر قابل استفاده است (اوگولا و همکاران، ۲۰۱۳). PKR برای تحریک جریان اتوفازی، تجمع LC3 اطراف توکسپلاسمای گوندی، همچوشی واکوئلی – لیزوژومی، و کشنن انگل در ماکروفاژها / ماکروگلیاهای فعال شده با CD40 مورد نیاز است.

¹ autocrine

² synergy

³ serine/threonine kinase

فصل ۱۳: عوامل میزبان که اتوفاژی را بعنوان دفاع در برابر توکسوپلاسمای گوندی بکار می‌گیرند ۲۶۵

(اوگولا و همکاران، ۲۰۱۳) PKR، اتوفاژی ناشی از گرسنگی را کنترل می‌کند (تالوسی و همکاران، ۲۰۰۲) و اتوفاژی را در پاسخ به عفونت HSV-1 تعدل می‌کند (تالوسی و همکاران، ۲۰۰۶). این یافته‌ها، PKR را بعنوان یک واسطهٔ فعالیتِ ضد میکروبی و تقویت کنندهٔ محافظت در برابر بیماری ناشی از یک پاتوژن غیر ویروسی شناسایی کرد و PKR را بعنوان پیوند بین علامت دهی CD40-TRAF و تحریکِ مسیر اتوفاژی قرار داد.

CD40 سبب فسفوریلاسیون PKR می‌شود، اثری که منحصرأً توسط محل اتصال TRAF6 CD40 واسطه می‌شود (اوگولا و همکاران، ۲۰۱۳). به هر حال، برهمکنش بین CD40-TRAF6 و PKR، احتمالاً از طریق TRAF2 غیرمستقیم است زیرا PKR، یک دامنهٔ متصل TRAF6 قابل شناسایی ندارد، TRAF6 با TRAF2 رسوب همزمان دارد و TRAF2 با PKR پس از لیگاند پوشی CD40 رسوب همزمان دارد، کمبود TRAF2، رسوب همزمان TRAF6-PKR و نیز فسفوریلاسیون PKR القا شده بوسیلهٔ لیگاند پوشی CD40 را مهار می‌کند (اوگولا و همکاران، ۲۰۱۳). برهمکنش TRAF2-PKR در موشهای، به احتمال زیاد در سطح dsRBD II زیردامنهٔ PKR رخ می‌دهد. اتصال TRAF2 به زیردامنهٔ dsRBD II بطور بالقوه می‌تواند منجر به یک ترکیبٍ PKR باز (فعال) شود با توجه به اینکه برهمکنش dsRBD-KD را در شکلی بسته (غیرفعال) نگه می‌دارد.

ارتباط اتوفاژی طی عفونت توکسوپلاسمای گوندی در داخل بدن

گزارش شده است که برای حفاظتِ داخل تنی وابسته به γ -IFN در برابر توکسوپلاسمای گوندی، Atg5 مورد نیاز است. به هر حال، به نظر نمی‌رسد که این اثر محافظتی با واسطهٔ تخریب اتوفاژیک انگل باشد (در زیر ببینید). مطالعاتِ داخل تنی، از اهمیت اتوفاژی برای کنترل توکسوپلاسمای گوندی در چشم و مغز حمایت می‌کند. نه تنها موشهای CD40^{+/−} بلکه موشهای BECN1^{+/−} با کمبود اتوفاژی و موشهایی با کمبود پروتئین اتوفاژی ATG7 نیز که میکروگلیا / ماکروفازها را هدف قرار دادند (موش‌های Atg7^{fl/fl}-Lyz-Cre) به توکسوپلاسموز چشمی و مغزی حساسند (پورتیلو و همکاران، ۲۰۰۰) (شکل ۱۳.۲، در بخش Plate). حساسیت به توکسوپلاسموز علیرغم تولید بدون اختلال اینمنی سلولی ضد توکسوپلاسمای گوندی T، تنظیم افزایشی γ -IFN، TNF- α و NOS2 در مغز و چشم و نیز حفظِ فعالیتِ ضد توکسوپلاسمای گوندی میکروگلیا / ماکروفاز ناشی از γ -IFN رخ می‌دهد (پورتیلو و همکاران، ۲۰۱۰). ماکروفاز /

میکروگلیا از موش‌های $BECN1^{+/+}$ و موش‌های $Atg7^{flox/flox}$ -Lyz-Cre، کشنن ناقص توکسوپلاسمای گوندی را در پاسخ به تحریک CD40 نشان می‌دهند (پورتیلو و همکاران، ۲۰۱۰). مشابه موش‌هایی که در پروتئین‌های اتوفاژی نقش دارند، موش‌های $PKR^{-/-}$ آلدود شده با توکسوپلاسمای گوندی، بار انگلی بالاتر و ^۱هیستوپاتولوژی بدتر شده در مغز و چشم را در مقایسه با کنترل‌های نوع وحشی، نشان می‌دهند (اوگولا و همکاران، ۲۰۱۳). حساسیت به توکسوپلاسموز، به دلیل بیان ناقص $IL-6$ در مغز و شبکیه چشم، تفاوت در بیان $IL-10$ در این اندام‌ها، یا نقش‌های مادرزادی در القای سلول‌های T واکنش پذیر به توکسوپلاسمای گوندی، پاسخ سیتوکین نوع ۱ سیستمی، بیان مولکول‌های مؤثر پایین دست γ -IFN ($Irgm3$ و اکسید نیتریک)، یا ایمنی هومورال نیست (اوگولا و همکاران، ۲۰۱۳).

دلیل اخیر نشان می‌دهد که $CD40$ و γ -IFN، مکانیسم‌های مؤثر ضدمیکروبی متفاوتی را در برابر توکسوپلاسمای گوندی فعال می‌کند. این احتمال وجود دارد که این مولکول‌ها نه تنها در محیط آزمایشگاهی (اندراده و همکاران، ۲۰۰۳) بلکه در داخل بدن نیز برای افزایش کنترل انگل همکاری می‌کند. به هر حال، کشنن اتوفاژیک ناشی از $CD40$ توکسوپلاسمای گوندی می‌تواند در غیاب γ -IFN اتفاق بیفتد و احتمالاً تحت تنظیمات متفاوتی از فعالیت ضدتوکسوپلاسمای گوندی ناشی از γ -IFN است. برخلاف نقش اساسی γ -IFN در محافظت در برابر توکسوپلاسمای گوندی، انگل، اثرات این سیتوکین را با دستکاری سیگنال دهی سلول میزان (کمپ^۲ و همکاران، ۲۰۱۳) و احتمالاً با القای تولید سیتوکین‌ها در داخل بدن که می‌تواند γ -IFN (شلاتر و همکاران، ۱۹۹۸) را خنثی کند، مختل می‌کند. این ممکن است نقش محافظتی اتوفاژی $CD40$ را در میزان‌هایی که γ -IFN را بیان می‌کنند، توضیح دهد.

ATG5 و IFN- γ در عفونت توکسوپلاسمای گوندی

IFN- γ برای مختل کردن غشای واکوئل پارازیتوفور و محروم کردن توکسوپلاسمای گوندی از جایگاه حیاتی آن برای بقای انگل، به ATG5 نیاز دارد (ژائو و همکاران، ۲۰۰۸). در ابتدا مشخص شد که اختلال واکوئل با واسطه γ -IFN، توسط القا و بکارگیری IRG‌های متصل به GTP برای غشای واکوئل پارازیتوفور ایجاد می‌شود (خامینتس^۳ و همکاران، ۲۰۱۰؛ لینگ و همکاران، ۲۰۰۶؛

¹ histopathology

² Kemp

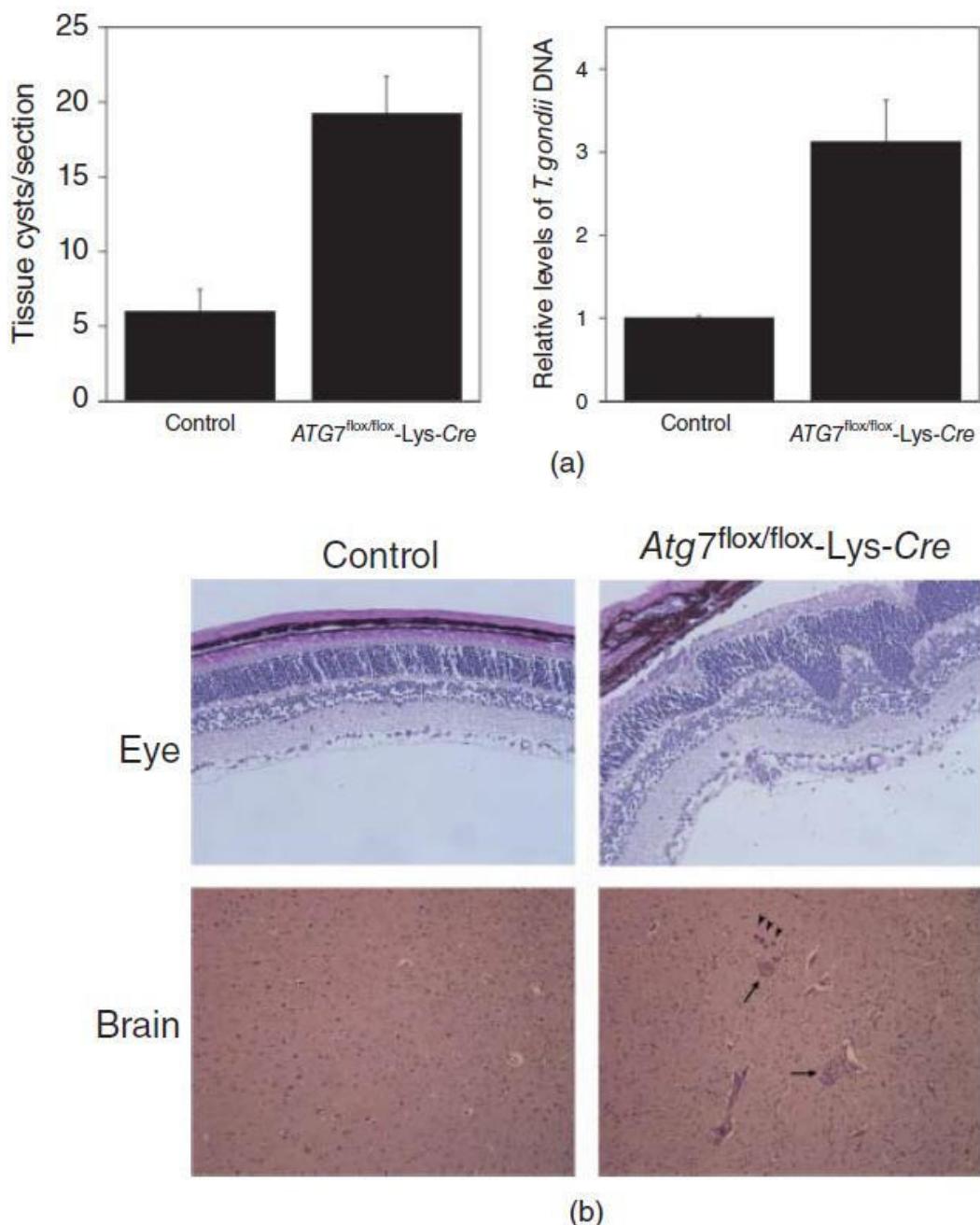
³ Khaminets

فصل ۱۳: عوامل میزبان که اتوفاژی را بعنوان دفاع در برابر توکسوپلاسمای گوندی بکار می‌گیرند

مارتنز و همکاران، ۲۰۰۵؛ ژائو و همکاران، ۲۰۰۸، ۲۰۰۹). IRG‌ها برای محافظت در برابر توکسوپلاسمای گوندی در موش‌ها در داخل بدن، ضروری است (کولازو^۱ و همکاران، ۲۰۰۱؛ تیلور و همکاران، ۲۰۰۰). به هر حال، اکثریت قریب به اتفاق IRG در انسان بیان نمی‌شود (Bekpen^۲ و همکاران، ۲۰۰۵) و شاهدی دال بر نقش آنها در محافظت در برابر توکسوپلاسمای گوندی در سلول‌های انسان وجود ندارد.

¹ Collazo

² Bekpen



شکل ۱۳.۲

کشن توکسoplasmagondii در سلول‌های موش فعال شده با γ -IFN به بکارگیری مشارکتی و بارگذاری Irgm2 در غشای واکوئل پارازیتوفور وابسته است (خامیتس و همکاران، ۲۰۱۰؛ لینگ و همکاران، ۲۰۰۶؛ مارتزن و همکاران، ۲۰۰۵؛ ژائو و همکاران، ۲۰۰۸، ۲۰۰۹). به دنبال آن وزیکولاسیون و پارگی غشاء و به دنبال آن مرگ انگل

فصل ۱۳: عوامل میزبان که اتوفاژی را بعنوان دفاع در برابر توکسوپلاسمای گوندی بکار می‌گیرند ^{۲۶۹}

رخ می‌دهد (مارتنز و همکاران، ۲۰۰۵؛ ژائو و همکاران، ۲۰۰۸، ۲۰۰۹). اعضاء زیر خانواده GMS (Irgm2, Irgm3, Irgm1) موقعیت داخل سلولی اعضاء زیرخانواده GKS (Irg6a, Irg6b) را تنظیم می‌کنند (هان^۱ و همکاران، ۲۰۰۸). در سلول‌های موش، بکارگیری IRG با واسطه IFN می‌تواند توسط پروتئین‌های رابتی ROP18 و ROP5 توکسوپلاسمای گوندی پلی مورفیک، تنظیم منفی شود. این پروتئین‌ها در سیتوپلاسم سلول میزبان در نقطه ورود انگل، ترشح می‌شوند (کاروتز و سبیلی، ۱۹۹۷). کیناز سرین – ترئوین – ROP18 و Irgb6 فسفوریله می‌کند، استاینفلد^۲ و مانع بکارگیری آنها در غشای واکوئل پارازیتوفور می‌شود (فتترس و همکاران، ۲۰۱۰؛ استاینفلد^۳ و همکاران، ۲۰۱۰). گزارش شده است که کیناز ساختگی ROP5 با تسهیل اثرات ROP18 بر روی فسفوریلاسیون IRG عمل می‌کند (بنکه^۴ و همکاران، ۲۰۱۲؛ فلکنشتاین^۵ و همکاران، ۲۰۱۲). در مقابل، گروه دیگری گزارش کردند که ROP5 مستقیماً با اولیگومر شدن^۶ Irga6 تعامل دارد و از آن جلوگیری می‌کند (نیدلمن و همکاران، ۲۰۱۲). صرف نظر از مکانیسم عمل ROP5، به نظر می‌رسد ثابت شده است که ROP18 و ROP5 با هم همکاری می‌کنند، زیرا انگل‌ها به بیان ROP18 و ژنهای هم ردیف^۷ ROP5 بیماری زا به منظور ایجاد اختلال در بکارگیری IRG برای غشای واکوئل پارازیتوفور، نیاز دارند (نیدلمن و همکاران، ۲۰۱۲). در تضاد مشخصی با سلول‌های موشی، ROP18 و ROP5، حداقل اثر بر کشتار توکسوپلاسمای گوندی ناشی از γ-IFN در سلول‌های انسانی (نیدلمن و همکاران، ۲۰۱۲)، مطابق با بیان بسیار محدود IRG‌ها در انسان دارد.

اخیراً گزارش شده است که پروتئین‌های متصل به گوانیلات p65 (p65-GBP)، یکی دیگر از خانواده‌های ژنی القایی γ-IFN، در محافظت داخل بدنی در برابر توکسوپلاسمای گوندی در موش‌ها، واسطه هستند (دگراندی و همکاران، ۲۰۱۳؛ سلک و همکاران، ۲۰۱۳؛ یاماموتو و همکاران، ۲۰۱۲). GBP‌ها بر خلاف IRG‌ها به طور گسترده در پستانداران بیان می‌شوند. Gbp‌ها اطراف واکوئل پارازیتوفور ماکروفازهای موش و فیربولاستهای آلوده شده با سویه‌های حساس توکسوپلاسمای گوندی، قرار می‌گیرند (دگراندی و همکاران، ۲۰۱۳؛ سلک و همکاران، ۲۰۱۳). کنترل رشد انگل در سلول‌های تحت درمان با γ-IFN به GBP‌ها وابسته است (دگراندی و همکاران، ۲۰۱۳؛ سلک و همکاران، ۲۰۱۳). اگرچه، به نظر نمی‌رسد که بکارگیری Gbp1 به

¹ Hunn

⁴ Behnke

² Steinfeldt

⁵ oligomerization

³ Behnke

⁶ alleles

IRGها وابسته نباشد (سلک و همکاران، ۲۰۱۳)، GBPها ممکن است در پیوند با IRGها برای پاکسازی توکسوپلاسمای گوندی عمل کنند، زیرا به نظر می‌رسد تجمع GBPها در واکوئل پارازیتوفور، سبب افزایش حفظ IRGها می‌شود (سلک و همکاران، ۲۰۱۳؛ ياماموتو و همکاران، ۲۰۱۲).

ماکروفاژها و فیبروبلاست‌های موش با نقصان Atg5، فعالیت ضد توکسوپلاسمای گوندی ناقص را پس از درمان γ -IFN نشان می‌دهد (کانن-ویزمن و هوارد، ۲۰۰۷؛ ژائو و همکاران، ۲۰۰۸). ساختارهای حاکی از اتوفاگوزومها در اطراف انگل در ماکروفاژهای درمان شده با γ -IFN گزارش شده است، که احتمالاً بعنوان پاسخی برای حضور ساختارهای تغییر یافته (غشاها) پارازیتوفور مختل شده و تاکی زوئیت‌های معده شده) در سلول میزبان باشند (لينگ و همکاران، ۲۰۰۶). به هر حال، شاهدی دال بر تحریک کشتار توکسوپلاسمای گوندی توسط γ -IFN از طریق تحریب انگل با واسطه اتوفاگوزوم وجود ندارد (مارتنز و همکاران، ۲۰۰۵؛ ژائو و همکاران، ۲۰۰۸)، و شکست Beclin 1، ATG7 VPS34 یا ATG1، در عوض، ATG5 برای عملکرد خاص IRGها و GBPها مورد نیاز است. ATG5 در عوض، ATG5 برای عملکرد خاص IRGها و GBPها مورد نیاز است (خامینتس و همکاران، ۲۰۱۰؛ سلک و همکاران، ۲۰۱۳؛ ژائو و همکاران، ۲۰۰۸). ATG5 نه تنها برای القای فعالیت ضد توکسوپلاسمای گوندی وابسته به γ -IFN، بلکه برای محافظت داخل بدن نیز مورد نیاز است، زیرا موش‌هایی که در ATG5 در فاگوسیت‌ها نقص دارند (Atg5^{flox/flox}-Lyz-Cre)، در طول فاز حاد عفونت، می‌میرند (ژائو و همکاران، ۲۰۰۸).

مشخص نیست که چگونه ATG5، عملکرد IRGها و GBPها را کنترل می‌کند. در غیاب ATG5، توده‌های سیتوپلاسمی بزرگ Irga6 و Irgb تشکیل می‌شوند و حداقل در یک شکل فعال شده متصل به GTP می‌باشد (خامینتس و همکاران، ۲۰۱۰؛ ژائو و همکاران، ۲۰۰۸). بعلاوه، کمبود ATG5 سبب توده‌های سیتوپلاسمی Gbp1 و Gbp2 می‌شود که با Irga6

¹ Konen-Waisman and Howard

² DN Rab7

فصل ۱۳: عوامل میزبان که اتوفاژی را بعنوان دفاع در برابر توکسوبلاسمای گوندی بکار می‌گیرند ^{۲۷۱}

هم بیانی دارد (سلک و همکاران، ۲۰۱۳؛ تراور و همکاران، ۲۰۱۱). توده‌های سیتوپلاسمی IRGها و GBPها ممکن است با p62، LC3 و به LAMP-1 مربوط باشد (خامیتس و همکاران، ۲۰۱۰؛ سلک و همکاران، ۲۰۱۳؛ تراور و همکاران، ۲۰۱۱؛ ژائو و همکاران، ۲۰۰۸). سرنخ‌هایی در مورد اینکه چگونه ATG5 عملکرد IRG را تنظیم می‌کند، ممکن است از مشاهده آن نقص Irgm1 و یا Irgm1 بیاید که همچنین سبب ایجاد توده‌های سیتوپلاسمی Gbp2، Irgb6، Irgb6 و Irgm1 می‌شود (هنری و همکاران، ۲۰۰۹؛ تراور و همکاران، ۲۰۱۱). عدم حضور این IRG‌های تنظیم کننده به اتصال GTP توسط Irgb6 و Irga6، تجمع آنها و عدم توانای آنها در انتقال به واکوئل پارازیتوفور را منجر می‌شود (هان و همکاران، ۲۰۰۸). نقش تنظیم کننده IRG‌ها بر روی GBPها کمتر شناخته شده است اما به نظر می‌رسد که این IRG‌ها ممکن است برای شیوه غیرمستقیم تنظیم شوند (تراور و همکاران، ۲۰۱۱). بنابراین، ممکن است که ATG5 برای تغییرات نوکلئوتیدی عادی در GKS زیر خانواده در غشای محفظه‌های سیتوپلاسمی، ضروری باشد (خامیتس و همکاران، ۲۰۱۰). توده‌های IRG/GBP ممکن است برای تحریب اتوفاژیک مورد هدف قرار گیرند اما شاید انباسته شدن بیشتر، به دلیل عدم حضور ATG5 باشد. همچنین احتمال دارد که کمبود ATG5 نتواند توده‌های کثتابیده را که باعث فعالسازی IRG/GBP نامناسب می‌شوند، حذف کند (سلک و همکاران، ۲۰۱۳).

اتوفاژی ممکن است هومئوستازی سلول‌های CD4⁺ را طی عفونت توکسوبلاسمای گوندی تنظیم کند. بیان Irgm1 برای بقای سلول‌های CD4⁺ در موش‌های آلوده با توکسوبلاسمای گوندی ضروری است (فنگ^۱ و همکاران، ۲۰۰۸). اثر محافظتی Irgm1 احتمالاً از طریق مهار مرگ اتوفاژی ناشی از γ-IFN اتفاق می‌افتد (فنگ و همکاران، ۲۰۰۸). بنابراین، تنظیم منفی اتوفاژی، ممکن است از سلول‌های CD4⁺ فعال شده در برابر مرگ با واسطه γ-IFN حفاظت نماید.

¹ Feng

توکسوپلاسما گوندی، علامت دهی سلول میزبان را برای مهار اتوفاژی بوسیله ساختارهای LC3⁺ دستکاری و ماهیت غیر همجوشی واکوئل پارازیتوفور را حفظ می کند

در طول مراحل اولیه پس از عفونت توکسوپلاسما گوندی، ساختارهای LC3⁺ بزرگ و سطوح LC3 II آسیب ندیده، در سلول‌های آلوده، آشکار شدند. بعلاوه، در ۲۴ ساعت پس از آلودگی توکسوپلاسما گوندی، سطوح LC3 II افزایش می‌یابد و سبب تجمع و انباست LC3 حاوی وزیکول‌ها، در اطراف واکوئل پارازیتوفور، می‌شود (ونگ و همکاران، ۲۰۰۹). رشد انگل در سلول‌هایی با کمبود ATG5، ناقص است که نشان می‌دهد توکسوپلاسما گوندی از اتوفاژی سلول میزبان برای دسترسی به مواد مغذی استفاده می‌کند (ونگ و همکاران، ۲۰۰۹). این حقیقت که اتوفاژی در سلول‌های میزبان آلوده اتفاق می‌افتد، این امکان را افزایش می‌دهد که توکسوپلاسما گوندی، استراتژی‌هایی را برای جلوگیری از هدف قرار دادن اتوفاژیک واکوئل پارازیتوفور و حفظ ماهیت غیر همجوش آن ایجاد می‌کند. چنین یافته‌ای مطابق با ماهیت بسیار موفق توکسوپلاسما گوندی است، پاتوزنی که از حذف از میزبان که منجر به عفونت مزمن (در طول عمر) می‌شود، اجتناب می‌کند. در واقع، برای حفظ ماهیت غیرهمجوش واکوئل سیتوفور، به فعالسازی ناشی از توکسوپلاسما گوندی در سلول‌های میزبان گیرنده عامل رشد اپیدرمال (EGFR) و مولکول پایین دست آن Akt، نیاز است (مونیز-فیسیانو^۱ و همکاران، ۲۰۱۴). شکست EGFR یا Akt و نیز مهار داروئی این مولکول‌ها، باعث هدف قرار دادن انگل توسط ساختارهای LC3⁺، همجوشی لیزوژومی- واکوئلی، تخریب لیزوژومی، و کشتن انگل‌هایی می‌شود که به Beclin 1 و ATG7 وابسته هستند (مونیز- فلیسیانو و همکاران، ۲۰۱۴). ارتباط با این یافته‌ها، این حقیقت است که تهاجم سلول میزبان توسط توکسوپلاسما گوندی، به ترشح پروتئین‌های میکرونمال^۲ انگل (MIC‌ها) با قابلیت فعالسازی چنین گیرنده‌هایی نیاز دارد (کاروتز، ۲۰۰۲). پروتئین‌های میکرونمال انگل بعنوان کمپلکس‌های چندپروتئینی وجود دارند، که مهم ترین آنها MIC1/4/6, MIC3/8, MIC2/M2AP با ترکیبی از پروتئین میکرونمال TgAMA1 با پروتئین‌های گردن راپتری RON2/RON4/RON6/RON8 می‌باشد (سرید^۳ و همکاران، ۲۰۰۵).

¹ Muniz-Feliciano

² micronemal

³ Cerede

فصل ۱۳: عوامل میزبان که اتوفاژی را بعنوان دفاع در برابر توکسوبلاسمای گوندی بکار می‌گیرند^۱

هوین و کاروتز^۱، ۲۰۰۶؛ شینر^۲ و همکاران، ۲۰۱۰). MIC3، MIC6 و MIC8 با هومولوژی چند دامنه برای EGF دارند (میسنر و همکاران، ۲۰۰۲). MICها با دامنه‌های شبه-EGF احتمالاً برای فعالسازی اولیه EGFR کمک می‌کنند، زیرا انگل‌های MIC1 ko (کمبود MIC6)، MIC3 و MIC1,3 ko، فعالسازی EGFR-Akt کاهش یافته را نشان می‌دهند و MIC3 نو ترکیب و MIC6، فعالسازی EGFR-Akt را القا می‌کند (مونیز-فلیسیانو و همکاران، ۲۰۱۴). بعلاوه، در سلول‌های درمان شده با محرک‌های اتوفاژی، MIC3 نو ترکیب و MIC6، تجمع LC3 را در اطراف انگل مهار می‌کند و انگل‌های MIC1-3 ko، هدف قرار گرفتن افزایشی را توسط ساختارهای LC3 نشان دادند و بیشتر مستعد کشته شدن هستند (مونیز-فلیسیانو و همکاران، ۲۰۱۴). بنابراین، این یافته‌ها از این مفهوم حمایت می‌کنند که توکسوبلاسمای گوندی از هدف قرار گرفتن توسط اتوفاگوزوم‌ها با دستکاری علامت دهنی سلول میزبان EGFR-Akt جلوگیری می‌کند و نشان می‌دهد که MICها نقش بدیعی در سیگنال‌های مؤثر در سلول‌های میزبان برای افزایش بقای انگل دارند.

دستگاه اتوفاژی در توکسوبلاسمای گوندی

مطالعات اخیر آشکار کردند که نه تنها اتوفاژی در سطح سلول‌های میزبان بلکه همچنین اتوفاژی در توکسوبلاسمای گوندی، نقش مهمی را در بیولوژی انگل بازی می‌کند. جستجو در پایگاه داده ToxoDB، حضور هومولوگ‌های فرضی زن‌های ATG از جمله TgATG1، TgATG3، TgVPS34 و TgATG7، TgATG8، TgATG18، TgATG20 همکاران، ۲۰۱۱؛ گاش و همکاران، ۲۰۱۲). در مقابل، به نظر می‌رسد TgATG5 و TgATG5 باشند. تفاوت دیگر در مقایسه با سایر یوکاریوت‌ها، مربوط به ترمینال-C از TgAtg8 غایب باشند. انتقال دیگر در صورت عدم بلوغ پروتئولیتیک می‌شود که ATG4، یک ترمینال-C گلیسین است. ATG8 معمولاً زمانی دچار بلوغ پروتئولیتیک می‌شود که ATG4، یک ترمینال-C گلیسین را که متعاقباً با فسفاتیدیل اتانول آمین (PE) آمیخته می‌شود در معرض قرار دهد. در مقابل، به نظر می‌رسد TgAtg8 در صورت عدم بلوغ پس از ترجمه در یک ترمینال-C گلیسین، پایان می‌یابد (بستیرو و همکاران، ۲۰۱۱). علیرغم این تفاوت‌ها، شواهد قوی دال بر کاربردی بودن اتوفاژی در توکسوبلاسمای گوندی وجود دارد.

¹ Cerede

² Sheiner

توکسپلاسمای گوندی که TgAtg8-GFP را بیان می‌کند، تولید شد تا آزمایش کند که آیا انگل، قادر به اتوفاژی است؟ تاکی زوئیت‌های خارج سلولی که در معرض گرسنگی قرار دارند، نقطعه گذاری TgAtg8-GFP را نشان می‌دهند (بستیرو و همکاران، ۲۰۱۱). بعلاوه، TgAtg8 با غشای وزبکول‌هایی که به نظر می‌رسد حاوی اندامک‌ها یا ماده سیتوپلاسمی تخریب شده‌اند، هم بیانی دارد (بستیرو و همکاران، ۲۰۱۱). علیرغم بیان سازنده مفروض ترمینال-C گلیسین، TgAtg8 بیشتر شبیه به ATG8 در سایر یوکاریوت‌ها رفتار می‌کند. تحت شرایط گرسنگی، تاکی زوئیت‌ها یک ایزوفرم TgAtg8 را بیان می‌کنند که سریعتر جابجا می‌شود، به نظر می‌رسد با غشاها مرتبط باشد و با PE آمیخته شده باشد (بستیرو و همکاران، ۲۰۱۱). پیش‌بینی می‌شود که کیناز TOR و نیز کلاس ۳ کیناز PI3 در توکسپلاسمای گوندی حضور داشته باشند. مطالعات با استفاده از انگل که TgAtg8 را بیان می‌کند، آشکار کردند که مهارکننده‌های این کینازها، اتوفاژی را به روی مشابه با آنچه در سایر یوکاریوت‌ها مشاهده شد، تنظیم می‌کنند (بستیرو و همکاران، ۲۰۱۱). انگل‌های داخل سلولی، نقاط TgAtg8 را به طور گذرا بیان می‌کنند، که نشان می‌دهد اتوفاژی در تاکی زوئیت‌های داخل سلولی نیز اتفاق می‌افتد (بستیرو و همکاران، ۲۰۱۱).

تولید انگل‌های شرطی TgAtg3 پیشنهاد می‌کند که TgAtg3 برای آمیختگی TgAtg8 با اتوفاگوزوم‌ها ضروری است (بستیرو و همکاران، ۲۰۱۱). بعلاوه، این مطالعات، نقش ضروری در حفظ عملکرد میتوکندری و افزایش رشد انگل را آشکار کردند. انگل‌های با نقص TgAtg3-، فقدان پتانسیل غشای میتوکندری همراه با ناهنجاری‌های مورفو‌لوژیکی مشخص این اندامک و نیز نرخ رشد کاهش یافته‌ای را نشان می‌دهند (بستیرو و همکاران، ۲۰۱۱). در کل، این یافته‌ها از این حقیقت حمایت می‌کنند که اتوفاژی، بقای تاکی زوئیت‌های توکسپلاسمای گوندی را افزایش می‌دهد.

مطالعه اخیر پیشنهاد می‌کند که اتوفاژی ممکن است با مرگ انگل همراه باشد. همانطور که با افزایش TgIF2α فسفریله شده مشهود است، گرسنگی تاکی زوئیت‌های خارج سلولی سبب توقف ترجمه شد (گاش و همکاران، ۲۰۱۲). این امر با تکه تکه شدن میتوکندری انگل و مرگ سلولی همراه بود. این حقیقت که این وقایع توسط متیل ۳ آدنین به همراه نقصان شاهدی برای مسیر آپوپتوزیک در توکسپلاسمای گوندی، احتمال گسترش مرگ انگل توسط اتوفاژی را افزایش داد (گاش و همکاران، ۲۰۱۲). مطالعات بیشتری برای مشخص نمودن این شکل از مرگ انگل مورد نیاز است.

فصل ۱۳: عوامل میزبان که اتوفاژی را بعنوان دفاع در برابر توکسوبلاسمای گوندی بکار می‌گیرند ^{۲۷۵}

در حالی که اتوفاژی ناشی از گرسنگی ممکن است با مرگ توکسوبلاسمای گوندی همراه باشد، شواهد قوی ای نشان میدهند که اتوفاژی برای بقای انگل، مهم است (بستیرو و همکاران، ۲۰۱۱). احتمال ندارد که تاکی زوئیت‌های داخل سلولی، گرسنگی را تجربه کنند. به هر حال، ماهیت پیچیدهٔ چرخهٔ زندگی انگل دلالت دارد بر اینکه توکسوبلاسمای گوندی باید با شرایط محیطی مختلف سازگار شود. این احتمال وجود دارد که اتوفاژی ممکن است برای این سازگاری مهم باشد. برای مثال، اتوفاژی ممکن است در سازگاری برای گرسنگی ای را شامل شود که انتظار می‌رود در مدت زمانی که تاکی زوئیت‌ها خارج سلولی هستند، رخ دهد. بعلاوه، چرخهٔ زندگی انگل، تبدیل به مراحل مختلفی از اندامگان^۱ را در بر می‌گیرد. باید مشخص شود که اتوفاژی در بازسازی سلولی در طی مرحلهٔ تبدیل درگیر است یا خیر.

نتیجهٔ گیری

روشن شده است که اتوفاژی در برهمکنش بین میزبان و توکسوبلاسمای گوندی و نیز در بیولوژی انگل نقش مهمی بازی می‌کند. تحریک اتوفاژی در سلول میزبان، سبب ریشه کنی انگل می‌شود. اهمیت اتوفاژی با کشف اینکه توکسوبلاسمای گوندی، علامت دهی سلول میزبان را برای جلوگیری از هدف گیری و تخریب اتوفاژی دستکاری می‌کند، تأکید می‌شود. کار بیشتری بر روی تنظیم تحریک اتوفاژی بر اساس اینمنی و مسیرهای مورد استفاده توسط انگل برای جلوگیری از تخریب اتوفاژیک ممکن است در رویکردهای ابداعی برای دستکاری اتوفاژی جهت بهبود کنترل پاتوژن مفید باشد.

تشکر و قدردانی

کار اصلی نویسنده، توسط مؤسسهٔ ملی بهداشت، انجمن قلب آمریکا (وابسته به دره اوهایو)، بنیاد بین المللی تحقیقات دیابت نوجوانان و بنیاد تحقیقات چشم شیرهای اوهایو^۲ حمایت شد.

¹ organism

² the Ohio Lions Eye Research Foundation

فصل ۱۴

مايكوباكتريوم توبرکلوزيس و مسیر اتوفاژيک

مايكوباكتريوم توبرکلوزيس، يك پاتوژن که در يك محفظه اي برای جلوگیری از کشتن توسط سلول میزبان در يك محفظه مناسب خود قرار می‌گيرد

ميکروباهای مايكوباكتريوم توبرکلوزيس، يك پاتوژن داخل سلولی است که سبب يك بیماری عفونی ریوی تهدید کننده حیات به نام سل^۱ می‌شود (راسل، ۲۰۱۳). امروزه، مرض سل يکی از بزرگترین مشکلات سلامت در سراسر جهان است که اساساً به دلیل فوریتِ سویه‌های مقاوم به داروهای چندگانه همه گیریهای مايكوباكتريوم توبرکلوزيس و HIV می‌باشد (لينچ، ۲۰۱۳). طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت (WHO) سال ۲۰۱۳، تخمين زده شده که ۴۵۰۰۰۰ نفر به سل مقاوم به داروهای چندگانه مبتلا شدند، و در سال ۲۰۱۲، $\frac{1}{3}$ میليون مرگ از بیماری سل تخمين زده شد که ۳۲۰۰۰ نفر از آنها، HIV مثبت بودند.

باکتری از طريق دستگاه تنفسی به بدن میزبان وارد می‌شود، که در برخی موارد، ممکن است کانالی^۲ برای گسترش سیستمی باشد. در افراد دارای نقص ایمنی، عفونت اولیه ممکن است به توبرکلوزيس فعال با کلنی سازی چند ارگان منجر می‌شود. فاگوسیتوز باکتری سببِ ایجاد يك پاسخ پیش التهابی می‌شود که منجر به جذب سلول‌های تک هسته ای از رگهای خونی کناری می‌شود. اين بکارگیری امكانِ تشکيلِ ماتريكسِ سلولی گرانولومای اوليه، يکی از نشانه‌های اين بیماری را می‌دهد. در اين مرحله، مرکز گرانولوم، از ماکروفازهای آلوده ای تشکيل شده است

¹ tuberculosis

² conduit

که با ماکروفاژهای کف آلد و سایر فاگوسیت‌های تک هسته‌ای محصور شده است و توسط لنفوسیت‌ها احاطه شده است (راسل و همکاران، ۲۰۱۰؛ الکینگتون و همکاران، ۲۰۱۱). همانطور که گرانولوم بالغ می‌شود، یک کپسول فیبری گستردگی، با کاهش نفوذ رگ‌های خونی به ساختار و افزایش تعداد ماکروفاژهای کف آلد، ایجاد می‌شود. به طور کلی، در فردی با اینمی قابل قبول، بار باسیلی ثابت می‌ماند و عفونت به تأخیر می‌افتد (مادلین و بلوم، ۲۰۱۳). در مقابل، در عفونت پیش رونده، مرکز نکروز پنیری شکل گرانولوما مایع شده و حفره زایی می‌کند^۱ که امکان گسترش هزاران باسیل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عفونی در راههای هوایی و تولید آئروسل‌های عفونی را می‌دهند و چرخه زندگی را دوباره شروع می‌کند.

این باکتریوم بسیار موفق در ماکروفاژهای آلد، با استفاده از استراتژی‌های قابل توجه برای باقی ماندن در بدن میزبان، زنده می‌ماند (راسل، ۲۰۰۱؛ سولداتی و نیروزلز، ۲۰۱۲؛ بنتراپ و راسل، ۲۰۰۱). به طور طبیعی، پس از فاگوسیتوز توسط ماکروفاژهای باکتری‌ها برای تخریب، به بخش لیزوزومی منتقل می‌شوند. به هر حال، مایکوباکتریوم‌های پاتوژنیک، بلوغ و بیوژنر فاگولیزوزوم را مسدود می‌کنند، بنابراین، مانع کشتن آنها توسط ماکروفاژهای می‌شوند. به ویژه، این فاگوزوم‌های حاوی مایکوباکتریوم، به خصوصیات لیزوزومی و اندوزومی متاخر نیاز ندارند (آرمستانگ و هرت، ۱۹۷۱؛ راسل و همکاران، ۲۰۰۲). برای دستکاری مولکول‌های سلول میزبان و مسیرهای داخل سلولی، مایکو باکتریوم توبرکلوزیس، عوامل ویرونانس متعددی شامل گونه‌های لیپید مانند فسفاتیدیل اینوزیتول گلیکوزیله شده، تولید می‌کند. اعتقاد بر اینست که لیپوآرابینومانان مایکوباکتریایی (LAM) با اکتساب نشانگرهای اندوزومی متاخر تداخل دارند (فراتی و همکاران، ۲۰۰۳، ۲۰۰۳)، در حالی که لیپید دیگر، فسفاتیدیل مانوزید (PIM)، همچوشی با فاگوزوم‌ها و اندوزوم‌های اولیه را تحریک می‌کند (بیتی^۴ و همکاران، ۲۰۰۰).

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ارتباط و عملکرد مولکولهای کلیدی متعددی که در انتقال و زیکولی مانند Rab GTPase‌ها و عوامل آنها درگیرند، را تعديل می‌کند (کی و همکاران، ۲۰۰۶؛ رابرتس و همکاران، ۲۰۰۶؛ کاردوسو و همکاران، ۲۰۱۰؛ ستو و همکاران، ۲۰۱۱؛ کاسماپور و همکاران، ۲۰۱۲). Rab7 همچوشی بین لیزوزوم‌ها و اندوزوم‌های متاخر را تنظیم می‌کند (فنگ و همکاران، ۱۹۹۵؛ بوکسی و همکاران، ۲۰۰۰). انتشارات قبلی نشان می‌دهند که مایکوباکتریوم حاوی

¹ cavitate

² Soldati and Neyrolles

³ Bentrup and Russell

⁴ Beatty

فاگوزوم، Rab5 را بکار می‌گیرند اما Rab7 را حذف می‌کنند. درواقع، تجزیه و تحلیل وسترن بلاط اتوفاگوزوم‌های جداسده از سلول‌های آلووده به BCG (باسیل کلمت-گورن^۱)، حفظ Rab5 را در فاگوزوم مایکوباکتریایی نشان داد، در حالیکه، Rab7 به طور انتخابی، حذف شد (ویا و همکاران، ۱۹۹۷). به هر حال، انتشارات بعدی گزارش کردند که در مراحل اولیه عفونت، حداقل کسری از Rab7 در بخش‌های فاگوزومی حاوی توبرکلوزیس وجود دارد (کلمنس و همکاران، ۲۰۰۰). این ابهامات ظاهری ممکن است با روش‌های مختلف بکارگرفته شده برای شناسایی پروتئین‌ها (وسترن بلاط در مقابل ایمونوفلورسانس) و نیز با استفاده از سویه‌های مایکوباکتریوم مختلف، توضیح داده شود (یعنی، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس H37Rv در مقابل مایکوباکتریوم باویس^۲ (BCG).

عملکرد Rab7، حداقل در بخشی، توسط RILP واکنش دهنده Rab7 (پروتئین لیزوژومی در تعامل با Rab7) واسطه می‌شود. به هر حال، در فاگوزوم‌های حاوی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ظاهراً Rab7، احتمالاً توسط عامل باکتریایی که سوئیچ GTP/GDP را در Rab7 کاتالیز می‌کند، غیرفعال می‌شود، از این‌رو، همچوشی با واسطه RILP با لیزوژوم‌ها را مختلف می‌کند. در واقع، فاگوزوم‌های حاوی مایکوباکتریوم باویس BCG زنده، با وجود اکتساب^۱ Rab7، مانع بکارگیری RILP شدند (سان و همکاران، ۲۰۰۷). در ۶ ساعت پس از آلوودگی، اکثر فاگوزوم‌های توبرکلوزیس، با LAMP-2 قرار می‌گیرند، نه با کاتپسین D (ستو و همکاران، ۲۰۱۰). به هرحال، ذکر این نکته جالب است که برخی نشانگرهای لیزوژومی، مانند LAMP-2، کاتپسین D و CD63، در فاگوزوم‌های حاوی باکتریوم توبرکلوزیس در مراحل مختلف عفونت گزارش شده است (وندرول و همکاران، ۲۰۰۷؛ ستو و همکاران، ۲۰۱۰). با این وجود، در نظر گرفتن این نکته، مهم است که آشکالی بالغ و نابالغ پروتئین کاتپسین D نمی‌توانند به تنها‌ی با میکروسکوپ ایمونوفلورسانس، که برای تعیین حضور یا عدم حضور آنزیم‌های فعال در این بخش ضروری است، تشخیص داده شوند. در واقع، استفاده از سلول‌های دندربیتی-مونوسیتی انسان، گروه پیتر پیترز^۳ پیشنهاد کردند (وندرول و همکاران، ۲۰۰۷) که در ساعات اولیه عفونت، فاگوزوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، بر اساس هم بیانی آنها با LAMP، CD63، CD63ها و کاتپسین D، با لیزوژوم‌ها همچوشی دارد. به هر حال، علیرغم وجود این نشانگرهای لیزوژومی، فاگوزوم‌ها

¹ bacilli Calmette–Guérin

² M. bovis BCG

³ Peter Peters

اسیدی نبودند (وندرول و همکاران، ۲۰۰۷). بنابراین، فرضیه فعلی پیشنهاد می‌کند که فاگوزوم‌های حاوی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در مراحل اولیه، شاید با بخش خاصی از لیزوژم‌ها، همچو شی دارد؛ به هر حال، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، Rab7 را در فاگوزوم‌ها غیر فعال می‌کند، که همچو شی با واسطه RILP بعدی را با لیزوژوم‌ها مهار می‌کند و از بلوغ کامل آن بخش جلوگیری می‌کند.

اخیراً، نشان داده شد که Rab34 بلوغ فاگوزوم را مستقل از Rab7، مسیری که برای کشتن مایکوباکتری، حیاتی بود، بهبود می‌بخشد. (کسمپور و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین، دانش اخیر از این ایده حمایت می‌کند که نه تنها Rab7 بلکه بکارگیری افتراقی GTPase Rab‌های متعدد توسط مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بیماریزا، بلوغ فاگوزوم را مختل می‌کند و بیوژنر بخش فاگولیزوژومی را مهار می‌کند (رابرتس و همکاران، ۲۰۰۶؛ ستو و همکاران، ۲۰۱۱).

سیستم ترشح ESX-1

مایکوباکتری پاتوژنیک، سیستم‌های ترشحی نوع VII ویژه‌ای به نام ESX-1 به ۵ ESX-5 را ایجاد کرده‌اند که ترکیب منحصر به فرد، اجازه انتقال عوامل را در سراسر دیواره سلولی می‌دهد (عبدالله و همکاران، ۲۰۰۷؛ هوین و همکاران، ۲۰۱۲). حداقل دو مورد از این ۵ سیستم ترشحی، ESX-1 و ESX-5 با ویرولانس همکاری می‌کنند. ESX-1، یک سیستم ترشحی خاص نوع VII است که توسط جایگاه ژنی که بعنوان منطقه متفاوت ۱ (RD1) شناخته شده است، نزدیک به مبداء کروموزومی تکثیر، رمزگذاری می‌شود. این منطقه شامل ژن‌هایی می‌شود که پروتئین‌های ویرولانسی که خارج شده‌اند را رمزگذاری می‌کند؛ اینها شامل esxA هستند که هدف آنتی ژنی ترشح شده ESAT-6 (6 kDa) را رمزگذاری می‌کند، esxB، پروتئین تصفیه شده کشت Mh3881c (CFP-10) ۱۰ kDa، و نیز ژن‌هایی که EspA و Mh3881c را رمزگذاری می‌کنند (سیمون و همکاران، ۲۰۰۹).

به خوبی مستند شده است که سیستم ترشح ESX-1 برای ویرولانس مایکوباکتری‌های پاتوژنیک (بیماری زا) مورد نیاز است. جهش در سرتاسر جایگاه ژن ESX-1، فنوتیپ‌های ویرولانس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و سایر مایکوباکتری‌ها را تضعیف می‌کند (مک لافلین^۱ و همکاران،

^۱ McLaughlin

۲۰۰۷). در طی عفونت ماکروفاژ، ESX-1 برای جلوگیری از بلوغ فاگو佐می، محدود کردن تولید سیتوکین‌های پیش التهابی متعدد و مختل کردن غشاها از طریق پروتئین ESAT-6، مشارکت می‌کند (زو^۱ و همکاران، ۲۰۰۷). ESAT-6، همولیزینی است که در مخلوط هومو-دایمری با CFP-10 ترشح می‌شود؛ ترشح و پایداری هر پروتئین به دیگری بستگی دارد. مطالعات متعدد اهمیت این مخلوط پروتئین را برای ویرولانس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، نشان داده‌اند.

ماکوباکتریوم مارینوم^۲، یک هم خانواده نزدیک که فرار می‌کند و دُم‌های اکتین را در سیتوپلاسم می‌سازد

ماکوباکتریوم مارینوم، از نظر فیلوجنتیکی به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بسیار نزدیک است، مایکوباکتریوم مارینوم، یک پاتوژن ماهی است که سبب بیماری کاملاً مشابهی با توبرکلوزیس می‌شود. به طور تصادفی، مایکوباکتریوم مارینوم، همچنین سبب گرانولوم در دستان انسان‌های آلوده می‌شود که مشابه آنهایی است که توسط مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ریه‌ها تولید می‌شوند (راماکریشنان^۳، ۲۰۱۳؛ سوایم^۴ و همکاران، ۲۰۰۶). مایکوباکتریوم مارینوم، مانند مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، یک سیستم ترشحی تخصص یافته نوع VII دارد. ESX-1 نقشی ضروری در فرار مایکوباکتریوم مارینوم از فاگو佐م‌های حاوی مایکوباکتریوم و در ساعات بعدی عفونت، تجزیه غشای پلاسمای سلول میزان، بازی می‌کند (عبدالله و همکاران، ۲۰۰۷؛ زو و همکاران، ۲۰۰۷). اعتقاد بر اینست که یکی از عوامل ترشح شده، پروتئین ESAT-6، غشای فاگو佐می را سوراخ می‌کند، به مایکوباکتریوم مارینوم امکان فرار به بخش سیتوپلاسمی را می‌دهد. جالب است که نسخه‌های متعدد فسفولیپاز C هم در مایکوباکتریوم مارینوم و هم در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، حضور دارد. به هر حال، شرکت این آنزیم‌ها در ساخت منافذ غشایی، به وضوح نشان داده نشده است.

هنگامی که مایکوباکتریوم مارینوم در سیتوپلاسم، اکتین را بکار می‌گیرد، دنباله‌های اکتین را تولید می‌کند که باکتری‌ها را به حرکت در می‌آورد و حرکت سلول به سلول را گسترش می‌دهد. اعتقاد بر اینست که ساخت این دنباله دارهای اکتینی باعث گسترش مستقیم سلول به سلول می‌شود، زیرا ساقه‌های غشایی فراتر از محدودیت‌های سلولی مشاهده شده‌اند (استام و همکاران،

¹ Xu

² M. marinum

³ Ramakrishnan

⁴ Swaim

۲۰۰۳. پلیمریزاسیون اکتین توسط فعالسازی با واسطه WASP از Arp2/3 میزان، آغاز می‌شود (استام و همکاران، ۲۰۰۳). مایکوباکتریوم مارینوم قادر است از WASP و N-WASP میزان برای القای تشکیل دم‌های اکتینی استفاده کند. به هر حال مایکوباکتریوم مارینوم هنوز دم‌های اکتین را هنگامی تشکیل می‌دهد که فسفوریلاسیون تیروزین یا جی تی پی آزهای متصل به دامنه‌ها لغو شدند، بنابراین، عنوان فعال کننده‌های بالادست، پروتئین تعامل کننده با Nck WASP و Cdc42 را حذف می‌کند. به هر حال، حذف فسفاتیدیل اینوزیتول^۴، ۵ بی‌فسفات متعلق به موتفی اصلی در N-WASP با تشکیل دم اکتین تعامل دارد که نشان می‌دهد که مکانیسم فعال کننده WASP مایکوباکتریوم مارینوم، منحصر به فرد است (استام و همکاران، ۲۰۰۵).

مایکوباکتریوم مارینوم نیز مانند مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ترکیب غشای فاگوزومی خود را تغییر می‌دهد تا از تخریب توسط لیزوزوم‌ها جلوگیری کند. بنابراین، آ.تی. پی آز H⁺ و اکوئلی، عملاً در ۶ ساعت پس از عفونت، غیر قابل تشخیص است و مانع تحويل کاتپسین دی پروتئاز لیزوزومی به لومن فاگوزومی نیز می‌شود (بارکر و همکاران، ۱۹۹۷؛ لرنا و کولومبو، ۲۰۱۱). جالب است که انتشار بسیار اخیر نشان داد که دپلیمره کردن^۱ اکتین یا اختلال در WASH عامل تحریک کننده هسته اکتین، منجر به تجمع آ.تی. پی آز H⁺ و اکوئل مایکوباکتریایی می‌شود (کولونکو و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین، مایکوباکتری‌های پاتوژنیک، پلیمر کردن اکتین را نه تنها برای گسترش بین سلول‌ها بلکه همچنین برای جلوگیری از اسیدی کردن فاگوزوم و جهش قبل از فرار به سیتوپلاسم واژگون می‌کند. بنابراین، اقدامات هماهنگ اصلاح بخش فاگوزومی، فرار به سمت سیتوپلاسم و تولید دم‌های اکتین برای حمله به سلول‌های کناری (همساخه) مشخصه‌های کلیدی مکانیسم‌های ویرولانسی مایکوباکتریوم مارینوم برای بقا و تکثیر در سلول‌های میزان هستند.

مایکوباکتریوم به طور فعال، اتوفاژی را تعدیل می‌کند

اتوفاژی، یک فرآیند حفظ شده تکاملی است که اندامک‌ها و پروتئین‌ها را با نیمه عمر طولانی برای تجزیه به لیزوزوم‌ها تحويل می‌دهد (برای مرور، نودا و یاشیموری، ۲۰۰۹؛ یانگ و کلیونسکی، ۲۰۱۰؛ راویکومار و همکاران، ۲۰۱۰ را ببینید). مسیر اتوفاژیک، یک فرآیند ضروری

¹ depolymerization

است که هم، کیفیت و هم، کمیت اجزای داخل سلولی را کنترل می‌کند. مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که اتوفازی از سلول‌ها در برابر پاتوژن‌های داخل سلولی دفاع می‌کند و سیستم‌های ایمنی ذاتی و سازگار را به هم متصل می‌کند (پولستون و سایمون، ۲۰۱۳). اتوفازی به فرآیندهای ایمنی سازگار انتخاب تیموسی، پلاریزاسیون سلول‌های کمک کننده T ۱ و کمک کننده T ۲، و ارائه آنتی ژن کمک می‌کند. در مورد ایمنی ذاتی، اتوفازی از سلول‌ها در برابر توکسین‌های باکتریایی حفاظت می‌کند و فعالسازی ماکروفازی را بهبود می‌بخشد. در یک مطالعه مشترک، نشان داده شد که یک اتوفازی مکانیسم دفاعی است که بقای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را در ماکروفازهای آلوده، مهار می‌کند (گوتیرز و همکاران، ۲۰۰۴). در واقع، فعالسازی اتوفازی توسط گرسنگی یا القاکننده‌های داروئی (یعنی راپامایسین) منجر به هدف قرار دادن مایکوباکتریوم باویس BCG و مایکوباکتریوم مارینوم برای مسیر اتوفازیک و افزایش پاکسازی پاتوژن می‌شوند (گوتیرز و همکاران، ۲۰۰۴). در حقیقت، برخی درمانهایی که برای درمان بیماری سل استفاده می‌شوند، مانند درمان با آنتی بیوتیک ایزونیازید، اتوفازی را در سلول‌های آلوده شده با مایکوباکتریوم مارینوم فعال می‌کنند. جالب است که اتوفازی سلول میزبان برای درمان این ضد مایکوباکتری مؤثر، مورد نیاز است (کیم و همکاران، ۲۰۱۲). علاوه، تنظیم تولید سیتوکین پیش التهابی، در طول درمان آنتی بیوتیکی نیز به فعالسازی اتوفازی بستگی دارد. این یافته‌ها نقش کلیدی اتوفازی در حفظ تعادل بین مکانیسم‌های دفاعی ذاتی و پاسخ‌های التهابی بیش از حد را مشخص می‌کنند.

در مطالعات اولیه ما با مایکوباکتریوم مارینوم BCG، مشاهده کردیم که فاگوزوم‌های حاوی باکتریوم توسط پروتئین اتوفازیک LC3 نشاندار نشدنند مگر اینکه اتوفازی توسط گرسنگی یا القای راپامایسین فعال شود، همانطور که در بالا ذکر شد. بنابراین، یک نتیجه غیرمنتظره این بود که در مورد مایکوباکتریوم مارینوم، حتی تحت شرایط کنترل شده (یعنی شرایط مواد مغذی کامل)، بکارگیری قابل توجه LC3 مشاهده شد. جالب است که بکارگیری LC3 به سیستم ترشحی ESX-1 کاربردی، وابسته است (لرنا و کولومبو، ۲۰۱۱). به هر حال، با وجود هم بیانی با LC3، فاگوزوم‌های حاوی مایکوباکتریوم مارینوم، فاقد آنزیم لیزوزومی کاتپسین D بودند و توسط پروتئین DQ-BSA نشانگذاری شدند، نشانگر قسمتهای تخریب کننده، به جز زمانی که اتوفازی توسط راپامایسین القا شد (لرنا و کولومبو، ۲۰۱۱). به علاوه، دریافتیم که جریان اتوفازیک

¹ Gutierrez

در ماکرووفاژهای آلوده شده مانع مایکوباكتریوم مارینوم شدند که نشان می‌دهد پاتوژن، یک پاسخ اتوفازیک غیر کاربردی را با تخریب تدریجی فعال اتوفازی را القا می‌کند و باکتری‌های داخل سلولی از تخریب جلوگیری می‌کنند.

مطابق با نتایج ما، یک انتشار اخیر نشان داد که در سلول‌های دندریتی، سویهٔ مایکوباكتریوم مارینوم پاتوژنیک Mtb H37Rv، همچو شی اتوفاغوزوم‌ها را با لیزوژوم‌ها مهار می‌کند ESAT-6 (روم‌اگنولی^۱ و همکاران، ۲۰۱۲). در مقابل، سویهٔ ضعیف شده H37Ra که ترشح ESAT-6 کاهش می‌یابد، و سویهٔ BCG که در بخش‌های سیستم ترشحی ESX-1 ناقص است، قادر به جلوگیری از بلوغ اتوفاغوزومی نبودند. نکته قابل توجه اینکه توانایی مهار جریان اتوفازیک در BCG نوترکیب بازیابی شد و سویه‌های Mtb H37Ra با مکمل ژنتیکی منطقهٔ ESX-1 است. به علاوه، محققان در مراحل اولیه عفونت، جذب افتراقی پروتئین‌های کلیدی مثل LC3 یا LAMP-1 را زمانی نشان دادند که سلول‌های دندریتی با مایکوباكتریوم مارینومی آلوده شدند که شکل نوترکیبی از ESAT-6 فاقد دوازده اسید آمینه در انتهای C را ترشح می‌کند (-ESAT-6). این مشاهده پیشنهاد می‌کند که یک ESAT-6 Δ84-95 کاربردی، برای مهار بلوغ اتوفاغوزوم توسط مایکوباكتریوم مارینوم، ضروری است.

در طی اتوفازی انتخابی، LC3 توسط پروتئین‌های جذب دهنده مانند p62 و NDP52 به محموله متصل می‌شوند پروتئین‌هایی که موظیف‌های به اصطلاح LIR (منطقهٔ تعاملی با LC3) و نیز یک دامنهٔ متصل به یوبی کوئیتین دارند (UBD) (بریس‌داتیر و همکاران، ۲۰۱۳). گروه جفری کوکس^۲ و همکاران (واتسون و همکاران، ۲۰۱۲) اخیراً گزارش کردند که یوبی کوئیتین و LC3 به مایکوباكتریوم مارینوم جذب می‌شوند و اینکه این هم بیانی به سیستم ESX-1 وابسته است. به همین ترتیب، کیناز متصل به TBK-1 (tank), مولکول اتصالی پایین دست NDP52، نیز به فاگوزوم‌های حاوی نوع وحشی H37Rv جذب می‌شوند اما به باکتری‌های با کمبود ESX-1 جذب نمی‌شوند (واتسون و همکاران، ۲۰۱۲). بسیار مهمتر است که وفق دهنده‌های p62 و NDP52 و نیز TBK-1 برای تحويل مؤثر مایکوباكتریوم مارینوم به اتوفاغوزوم‌ها ضروری هستند. کار قبلی نشان داد که وفق دهندهٔ اتوفازیک p62 می‌تواند توسط TBK-1 در Ser-TBK-1، یک زیر واحد ضروری برای القای پاکسازی اتوفازیک آن، فسفوریله شود. به علاوه، TBK-1 برای

¹ Romagnoli

² Jeffrey Cox

بلغ اتوفازیک مورد نیاز است. علاوه بر این، در ماکروفازهای Raw264.7 که با مایکروباکتری‌ها آلوده شدند، تحریک اتوفازیکی با β -IL-1 β یا گرسنگی، کشتن مایکروباکتری‌های داخل سلولی را افزایش داد؛ با این حال، وقتی TBK-1 مهار شد یا تنظیم کاهشی داشت، حذف پاتوژن از طریق اتوفازی را کاهش داد (بیلی و همکاران، ۲۰۱۲). همچنین این داده‌ها پیشنهاد می‌کنند که TBK-1 برای پاکسازی مایکروباکتری‌ها توسط اتوفازی مهم است. علاوه، در سلول‌هایی که در معرض اتوفازی ناشی از گرسنگی قرار می‌گیرند، وفق دهنده p62 با ساختارهایی که با واکوئل‌های حاوی مایکروباکتری‌ها همچوشی دارند هم بیان می‌شوند (پانپوآک و همکاران، ۲۰۱۰). تجزیه و تحلیل سلول‌هایی که بیان p62 در آنها خاموش شد یا سلول‌های مشتق شده از موش‌های دارای کمبود p62 نشان داد که این پروتئین وفق دهنده برای کشتن مایکروباکتری‌های باواسطه اتوفازی مهم است. به ویژه، p62 برای جداسازی پروتئین‌های سیتوزولی در ساختارهای اتوفازیک مورد نیاز است، جایی که از لحاظ پروتئولیتیک شکافته شده و به پیتیدهای ضد میکروبی تبدیل می‌شوند. بر خلاف TBK-1، p62 جهش اتوفاگوزومی را بهبود نمی‌دهد. بنابراین، وفق دهنده p62 عمل میکروب کشی آن را توسط مکانیسم غیرمستقیم متفاوتی اعمال می‌کند.

جالب است که p62 علاوه بر عملکرد آن بعنوان یک وفق دهنده اتوفازیک، مسیرهای سیگنال دهی متعددی از جمله mTOR و فعالسازی فاکتور هسته ای - کاپا B (NF-kB) را تنظیم می‌کند (برای مرور، مانلی و همکاران، ۲۰۱۳). NFkB، یک عامل رونویسی یوبی کوئیتین است که در بسیاری از فرآیندهای سلولی مرتبط با التهاب و عفونت نقش دارد. در ماکروفازهای انسانی، مهار فعالسازی NFkB، قابلیتِ حیاتِ مایکروبایریوم مارینوم داخل سلولی را با القای اتوفازی و نیز اپوپتوز، دو مکانیسم معروف برای کشتن این پاتوژن داخل سلولی، کاهش می‌دهد (بای و همکاران، ۲۰۱۳). در مقابل، مطالعات دیگر گزارش کردنده که فعالسازی NFKB در ماکروفازهای موش نوع murid، کشتار مایکروبایریوم اسمگماتیس¹ غیر پاتوژنیک را افزایش داد (گوتیرز و همکاران، ۲۰۰۸). از آنجایی که NFKB ممکن است کمپلکس‌های مولکولی مختلفی را تشکیل دهد، وسوسه انگیز است که حدس بزنیم با توجه به زیرواحدهای تشکیل دهنده آنها، این پیچیدگی‌ها نه تنها به سلول میزبان، بلکه به بیماری زایی میکرووارگانیسم مهاجم نیز بستگی دارند. علاوه بر این، در نظر گرفتن این نکته مهم است که p62، NF-kB را از طریق چندین دامنه که با پروتئین‌های متعدد در تعامل است، تنظیم می‌کند؛ بنابراین، برهمکنش‌های پروتئین

¹ nuclear factor-kappa B

² M. smegmatis

— پروتئین ویره ممکن است منجر به فعالسازی یا مهار NF-kB شوند. برای مثال، در پاسخ به IL-1، p62 خود اولیگومر می‌شود و پلی یوبی کوئیتیناسیون TRAF6 را بهبود می‌بخشد؛ مهار کننده p62-TRAF6 کیناز که نهایتاً تولید می‌شود، NF-kB را فعال می‌کند. به هر حال، p62 همچنین ممکن است با پروتئین سیلندروماتوز^۱ (CYLD)، یک دیوبیکوئیتیناز که TRAF6 را مهار و تنظیم منفی می‌کند (مانلی و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین، رابطه بین مسیر NK-Kb، پروتئین‌های مربوط به اتوفاژی مانند p62 کاملاً پیچیده است. برای روشن شدن این نکته که چگونه p62 سطوح تنظیم کننده‌های منفی و مثبت فعالسازی NF-kB را تنظیم دقیق می‌کند، به مطالعات بیشتری نیاز است.

بر همکنش بین ماکروفاژها و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس منجر به ترشح سیتوکین‌های پیش التهابی متعددی به نام فاکتور نکروز توموری^۲ (TNF-β)، IL-1β، IL-12، IL-18 و INF-γ می‌شود. TNF-β برای تشکیل گرانولوما مهم است. IL-18، توسط اینفلامازومها فعال می‌شود و ترشح INF-γ را تنظیم می‌کند. γ-INF به نوبه خود، ماکروفاژها را فعال و اتوفاژی را القا می‌کند، بنابراین، به حذف مایکوباکتری‌ها کمک می‌کند (گوتیرز و همکاران، ۲۰۰۴). بعلاوه، INF-γ، کلاس^۳ ۲ کمپلکس سازگاری بافتی اصلی را تنظیم افزایشی می‌کند تا حضور آنتی ژن را برای سلول‌های T افزایش دهد. γ-INF تعداد خیلی زیادی از ژن‌های میزبان از جمله، اعضای خانواده بزرگ جی تی پی آزِ بزرگی که به عنوان جی تی پی آزهای (IRG‌ها) مرتبط با ایمنی شناخته شده‌اند را القا می‌کند. Irgm-1 (LRG-47)، کنشگر^۴ پایین دست γ-INF است که به کنترل عفونت‌های مایکوباکتریوم مارینوم کمک می‌کند (مک مایکینگ، ۲۰۰۴). پس از تحریک INF-γ، سلول‌های Raw 267.4 که در ژن Irgm1 کمبود دارند، قدر به القای جهش فاگوزوم‌های حاوی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نبودند و بعنوان یک پیامده، سلول‌ها قادر به کنترل تکثیر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نبودند. Irgm-1 و نیز هومولوگ انسانی آن IRGM، مسیر اتوفاژیک را فعال می‌کند، که در برابر عفونت مایکوباکتریایی ایجاد مقاومت می‌کند (سینگ و همکاران، ۲۰۰۶).

اخیراً، یک خانواده ژن پروتئین متصل به گوانیلات (gbp)، بعنوان بخشی از خانواده جی تی پی آز ناشی از γ-INF توصیف داده شد (کیم و همکاران، ۲۰۱۱). این خانواده جی تی پی آزها،

¹ Cylindromatosis

² tumor necrosis factor

³ effector

⁴ MacMicking

فصل ۱۴: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مسیر اتوفاژیک ۲۸۷

همچنین به حفاظت با واسطه اتوفاژی در برابر پاتوژن‌ها کمک می‌کند. برای مثال، Gbp1 به p62 متصل می‌شود، در حالیکه Gbp7 در همکاری با ATG4، یک پروتئاز اتوفاژیک کلیدی در گیر در لپیداسیون / کاهش چربی LC3 عمل می‌کند.

جالب است، در حالیکه INF- γ سیتوکین Th1، اتوفاژی را برای کمک به کشن^۱ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس القا می‌کند، سیتوکین‌های Th2 مانند IL-4 و IL-13، مانع کنترل با واسطه اتوفاژی رشد داخل سلولی مایکوباکتری‌ها می‌شوند (هریس و همکاران، ۲۰۰۷). بنابراین، اینترلوکین‌های متعدد به طور متفاوتی، از طریق مدولاسیون مسیر اتوفاژیک بر بقای مایکوباکتریال تأثیر می‌گذارند.

مدولاسیون پاسخ‌های التهابی و اتوفاژیک در سلول‌های میزبان را با ژن مایکوباکتریوم توبرکلوزیس "بقای داخل سلولی افزایش یافته" (eis) نیز انجام می‌دهند (شین و همکاران، ۲۰۱۰). واکوئل‌های اتوفاژیک، در ماکروفازهای آلوده شده با H37Rv جهشی با حذف eis (Mtb-) جمع می‌شود. بعلاوه، بعد از آلودگی سلول‌ها، این جهش حذف در اتوگوزووم‌ها قرار دارد (یعنی، واکوئل‌های دوغشایی معمولی)، که نشان می‌دهد که پروتئین Eis به نحوی از هدف گیری اتوفاژیک پاتوژن جلوگیری می‌کند.

در مجموع، این داده‌ها نشان می‌دهد که یک تعامل پیچیده از عامل مایکوباکتریایی و میزبان، پاسخ اتوفاژیک در چندین نقطه را تعديل می‌کند. به نوبه خود، مدولاسیون اتوفاژی، تأثیر مستقیمی روی ظرفیت میزبان جهت حفاظت سلول‌ها از آلودگی با مایکوباکتریوم مارینوم دارد.

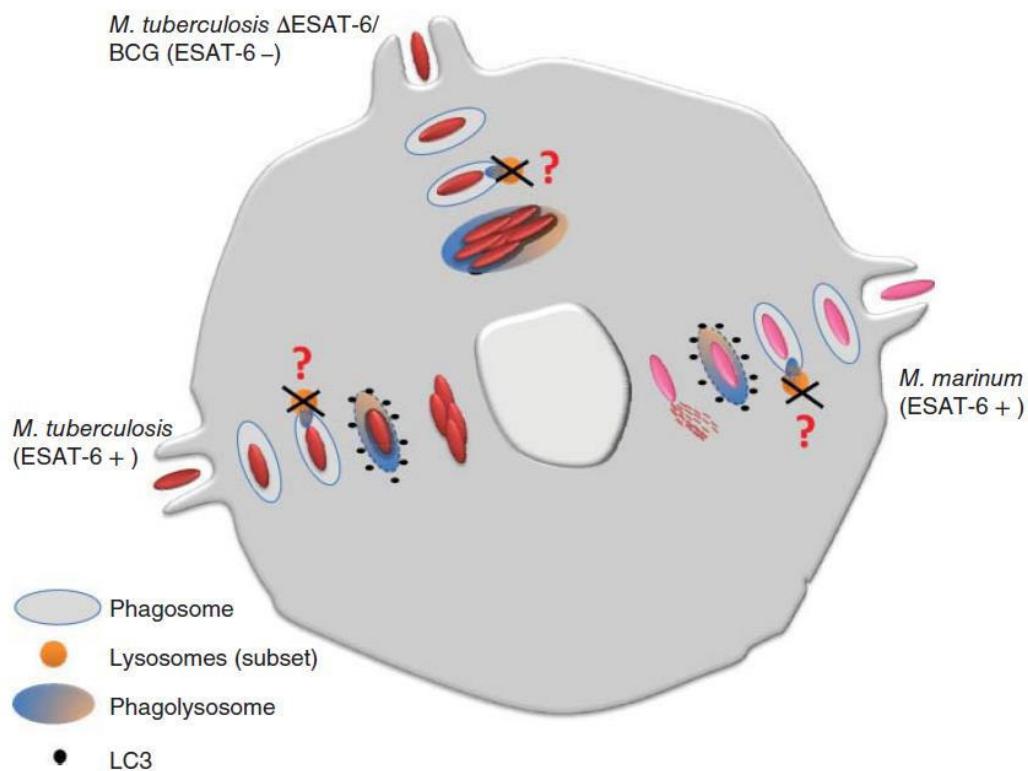
مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، پاتوژنی که قادر به فرار به سمت سیتوپلاسم نیز است

به طور کلاسیک در نظر گرفته می‌شد که مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، یکی از گروه پاتوژنهایی باشد که فاگوزووم خود را برای جلوگیری از تخریب توسط بخش لیزوزوومی تغییر می‌دهد (راسل، ۲۰۰۱؛ سولدتی و نیرولز^۱، ۲۰۱۲). به هر حال، شواهد جدید پیشنهاد می‌کنند که مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از استراتژی‌های دیگری برای بقای داخل سلولی استفاده می‌کند. مطالعات اخیر گزارش کرده‌اند که در سلول‌های دندritی، کسری از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم لپره^۲، بخش فاگوزوومی خود را برای فرار به سیتوپلاسم ترک می‌کنند (ون دروال و همکاران،

^۱ Soldati and Neyrolles

^۲ M. leprae

۲۰۰۷). سیستم ترشح کاربردی برای این فرار فاگوزومی نیاز است (هوبن و همکاران، ۲۰۱۲). تهاجم سیتوپلاسمی برای سویه‌های ضعیف شده ای مانند مایکوباکتریوم باویس BCG یا برای مایکوباکتری‌های کشته شده با استفاده از گرما، مشاهده نشد، و این استراتژی ویرولاس، به ترشح پروتئین‌های مایکوباکتریایی 6-ESAT و CFP-10 نیاز داشت (شکل ۱۴,۱ را ببینید). شواهد مضاعفی پیشنهاد می‌کنند که این فاکتورهای باکتری نفوذپذیری غشاها فاگوزومی را افزایش می‌دهند (اسمیت و همکاران، ۲۰۰۸).



شکل ۱۴,۱

باکتری‌های مهاجمی که به سیتوپلاسم فرار می‌کنند، می‌توانند توسط مسیر یوبی کوئیتین مورد هدف قرار بگیرند. در واقع، سوراخ شدن غشای فاگوزومی با واسطه سیستم ترشح ESX-1 امکان دسترسی بخش‌های سیتوپلاسمی مسیر یوبی کوئیتین به فاگوزوم‌های حاوی مایکوباکتریوم توپرکلوزیس را می‌دهد (واتسون و همکاران، ۲۰۱۲). بعلاوه، فاگوزوم‌های حاوی مایکوباکتریوم توپرکلوزیس نوع وحشی، پروتئین‌های حیاتی اتوفاژی مانند ATG12 یا LC3 را جذب کردند در حالیکه، جهش یافته‌هایی که در ترشح ESX-1 معیوب یا فاقد ESAT-6 بودند را جذب نکردند.

فصل ۱۴: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مسیر اتوفازیک

همانطور که در بالا اشاره شد، هدف گیری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به مسیر اتوفازیک نیز، نیازمند p62 و NDP52 وفق دهنده و نیز NDP52 کیناز می‌باشد. جالب است که سیستم ترشح ESX-1 برای مسیر سیتوزولی وابسته به STING حیاتی است تا DNA باکتریایی خارج سلولی را حس کند (واتسون و همکاران، ۲۰۱۲). شایان ذکر است که TBK-1 کیناز مسئول DNA است که هم در فعالسازی نوع یک IFN‌ها در پاسخ به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس DNA (استنلی و همکاران، ۲۰۰۷) و هم در اتوفازی (پیلی و همکاران، ۲۰۱۲) نقش دارد. بنابراین، تشخیص DNA باکتریایی برای سلول میزبان جهت هدف قرار دادن مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به مسیر اتوفازیک توسط فرایند درگیر در TBK-1، STING و علامت دهی سایتوکاین، حیاتی است.

بعنوان رویکرد دیگری برای بررسی فرار مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به سیتوپلاسم، روش انتقال انرژی رزونانسی فلورسانس (FRET) استفاده شده بود تا نشان دهد که مایکوباکتریوم توبرکلوزیس Δ RD1 یا BCG، که هر دوی آنها در ESAT-6 پروتئین ترشحی ESX-1 کمبود دارند، قادر بهب تهاجم به سیتوپلاسم نبودند (سیمئونه^۱ و همکاران، ۲۰۰۹، ۲۰۱۲). تمامی این شواهد تجربی قابل قبول از نقش حیاتی برای پروتئین ESAT-6 در مکانیسم فرار واکوئلی مایکوباکتری ها، حفاظت می‌کنند. به هر حال، در نظر گرفتن این نکته مهم است که مرگ سلولی پس از فرار باکتریایی به سیتوپلاسم، مشاهده شد. واضح است که بسیاری از پاتوژن‌ها آپوپتوز را برای دستکاری پیامد عفونت، تعديل می‌کنند. اخیراً گزارش شده است که آپوپتوز ناشی از ESX-1، گسترش سلول به سلول مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را افزایش می‌دهد (اگیلو و همکاران، ۲۰۱۳). در واقع، تنها سویه هایی که قادر به القای آپوپتوز هستند (یعنی، ترشح-ESAT-6) به سلول‌های همسایه تکثیر شدن.

نقش آپوپتوز یا مسیرهای مرگ سلولی دیگر در عفونت مایکوباکتریایی، کاملاً بحث برانگیز است (کین و همکاران، ۲۰۰۰؛ هسو^۲ و همکاران، ۲۰۰۳؛ پن و همکاران، ۲۰۰۵؛ لی و همکاران، ۲۰۱۱، ۲۰۱۱؛ پارک و همکاران، ۲۰۰۶). احتمالاً زمانی که مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به سیتوپلاسم دسترسی می‌یابد، توالی‌های سیگنال دهی منجر به فعالسازی مرگ سلولی می‌شود. به هر حال، مشخص نیست که آیا ESAT-6، تنها در سوراخ کردن غشای فاگوزومی شرکت می‌کند یا این فاکتور ویرولانس، مستقیماً یا غیر مستقیم، مسیرهای سیگنال دهی مرگ سلولی

¹ Simeone

² Hsu

را تعديل می کند (هریف و همکاران، ۲۰۱۲؛ گو و همکاران، ۲۰۱۲؛ گراور و ایزو، ۲۰۱۲). برای مثال، گزارش شده است که ESAT-6 با تحریک یک پاسخ استرسی ناشی از رتیکولوم اندوپلاسمیک منجر به آپوپتوز می شوند (چوی و همکاران، ۲۰۱۰).

به طور خلاصه، احتمال دارد که مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مشابه به مایکوباکتریوم مارینوم و احتمالاً مایکوباکتری های پاتوژنیک (بیماری زا) دیگر، از بیش از یک تاکتیک برای بقای داخل سلولی استفاده می کند. این پاتوژن ها نه تنها، ترکیب فاگوزوم را اصلاح می کنند بلکه با سوراخ کردن محفظه حاوی باکتری ها، فرار و به سیتوپلاسم حمله می کنند. علاوه بر این، همچنین پاتوژن برای افزایش گسترش عفونت، مرگ سلولی را تعديل می کند.

نتایج اظهار شده

همه شواهد بحث شده در بالا تائید می کنند که اتوفارزی، نقش اساسی در مقابله با عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بازی می کند. در هر زمان، مایکوباکتری های پاتوژنیک به طور فعال مسیر اتوفارزیک را جهت جلوگیری از تخریب، تعديل می کنند. در سلول های آلدوده، برهمکنش پیچیده ای بین مکانیسم های دفاعی میزبان و دستگاه مولکولی مایکوباکتریوم مارینوم جهت اجتناب از کشتن اتوفارزیک وجود دارد. واضح است که سیستم ترشحی ESX-1 و به ویژه پروتئین ESAT-6، بازیگران اصلی در این مدولاسیون هستند. مهم است در نظر داشته باشید که، با اینکه مایکوباکتری های بیماری زا توسط اتوفارزی مورد هدف قرار گرفتند، پاسخ ممکن است، غیر کاربردی باشد، از اینرو مانع جهش اتوفاگوزوم و تخریب همزمان با اتوفاگولیزوزوم ها می شوند. اکنون آشکار است که توانایی پاتوژن برای استفاده از مسیرهای سلول میزبان به نفع خود برای بقا ایش بسیار مهم است. علاوه بر این، برای اطمینان از بقای میکرووارگانیسم و نیز سلول آلدوده، دانش فعلی پیشنهاد می کند که یک تعادل خوبی باید بین پاسخ های دفاعی ایمن مورد هدف و فرآیندهای دستکاری شده توسط پاتوژن وجود داشته باشد.

فصل ۱۵

اتوفاژی، کارایی واکسن BCG را افزایش می‌دهد

مقدمه

بیماری‌های عفونی عامل مرگ و میر گسترده در انسان‌ها هستند. واکسن‌های چندگانه برای جلوگیری از آنها ایجاد شده‌اند. واکسیناسیون نوزادان، سلامت کودکان را تقویت کرده و باعث افزایش طول عمر می‌شود و برخی از آنها مانند واکسن آبله می‌توانند مصونیت مادام‌العمر ایجاد کنند. بیماری سل ایجاد شده توسط مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، سبب مرگ ناشی از عفونت در بشر با بیش از ۱/۵ میلیون مرگ گزارش شده در هر سال است. بیلیه کالمت و گرن^۱ (BCG)، یک سویه واکسن ضعیف شده زنده که از مایکوباکتریوم باویس مشتق شده است، به طور وسیعی بعنوان یک واکسن پیشگیرنده برای انسان‌ها در سراسر جهان استفاده می‌شود. در هر حال متا آنالیز آزمایشات اثربخشی واکسن نشان می‌دهد که واکسن ب.ث.ژ. سطوح مختلف ایمنی را در برابر توبرکلوزیس دوران کودکی ایجاد می‌کند و در برابر بیماری بزرگسالان، میزان حفاظت ضعیفی دارد. پیشنهاد شده است که نقصان آنتی ژن‌های ایمنی زای مشخصی در ب.ث.ژ، تنوع سویه و قرارگیری افراد در معرض عوامل مستعدکننده T-helper2 (Th2)، همه در اثربخشی ضعیف واکسن ب.ث.ژ. در برابر توبرکلوزیس تأثیر دارند. علاوه بر این، واکسن ب.ث.ژ، محلی سازی داخل سلولی غیر معمولی در فاگوزوم‌های نابالغ سلول‌های ارائه دهنده آنتی ژن (APC‌ها) مانند ماکروفاژها و سلولهای دندریتی دارد. بنابرین، فاگوزوم‌های ب.ث.ژ. rab5+ و rab7- در

¹ Bacille Calmette-Guérin

ماکروفاژها، با لیزوزوم‌ها همچوشی ندارند، احتمالاً بعلت فسفاتاز sapM که فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ فسفات را دفسفریله می‌کند، برای اتصال عوامل rab روی فاگوزوم‌ها مورد نیاز است و بلوغ را تسهیل می‌کند (کلمنس و هورویتز، ۱۹۹۶؛ درتیک و فراتی^۱، ۱۹۹۹؛ راسل، ۲۰۰۱). تعدادی از آنزیمهای دیگر مایکوباکتری‌ها، نیز طی توقيف جهش، دخیل است. در حالیکه نقصان همچوشی لیزوزومی به واکسن ب.ث.ژ. و مایکوباکتریوم مارینوم نوع وحشی امکان گریز از کشتن را می‌دهد. به طور متناقض، تخریب لیزوزومی برای تولید آنتی ژن‌های سطحی پیتیدی ضروری است. دومی در محفظه‌های بارگیری MHC-II (MIIC) طبقه بندی می‌شوند و MHC-II بارگیری شده با پیتید برای فعالسازی سلول‌های CD4T و ایجاد ایمنی Th1 به غشای پلاسمایی هدایت می‌شوند (هاردینگ، ۱۹۹۶؛ ملمن^۲، ۲۰۰۵؛ ویاس^۳ و همکاران، ۲۰۰۸). بنابراین، توقف بلوغ واکسن ب.ث.ژ. با ارائه مؤثر پیتیدها به سلول‌های CD4T و فرایندسازی ناکافی واکسن ب.ث.ژ. ممکن است زمینه سازِ ناتوانی آن در القای ایمنی طولانی تر و قوی تر باشد.

شایان ذکر است که کاهش سلول‌های CD4T در انسان در طول عفونت HIV-1، آنها را مستعد ابتلا به عفونت همزمان کشند با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌کند. بنابراین، ایمنی Th1 وابسته به CD4، نقش محافظتی در برابر توبرکلوزیس بازی می‌کند. در این زمینه تلاش برای افزایش اثربخشی واکسن ب.ث.ژ. منطقی به نظر می‌رسد زیرا ب.ث.ژ. واکسن ایمن و پرصرفی است. رویداد کلیدی در طی پرایمینگ و فعالسازی سلول‌های CD4T، تولید اپیتوپوز پیتیدی توسط APC‌ها است. اگرچه تفاوت‌های فیزیولوژی مشخصی بین مکانیسم‌های تولید واکنشگر آنتی ژن پیتیدی، مسیریابی و نموداز طریق کمپلکس‌های MHC-II وجود دارد، هم ماقروفاژها و هم DC‌ها قادر به فعالسازی سلول‌های CD4T هستند (ملمن، ۲۰۰۵). در هر حال، در هر دو نوع APC، لیزوزوم‌ها محل‌های اصلی تولید پیتیدها از طریق پروتئولیز هستند. در حالیکه فاگوزوم‌های واکسن ب.ث.ژ. با لیزوزوم‌ها همچوشی ندارند، فاگوزوم‌های نابالغ واکسن ب.ث.ژ. حاوی پروتئازهای متعددی از جمله، کاتپسین D هستند که البته به دلیل عدم اسیدی شدن، به شکل غیرفعال می‌باشند (سینگ و همکاران، ۲۰۰۶). سایرین دریافتهداند که MHC-II درون فاگوزوم‌های ب.ث.ژ. است و تجمع محدود واکنشگر آنتی ژن^۴ مشتق شده از آنتی ژن ترشحی (Ag85B) به داخل MHC-II در فاگوزوم‌های آنها اتفاق می‌افتد و آن پیتید بارگذاری شده

¹ Deretic and Fratti

² Mellman

³ Vyas

⁴ epitope

فصل ۱۵: اتوفاژی، کاراچی و اکسن BCG را افزایش می‌دهد ۲۹۳

MHC-II به غشای پلاسمایی فرستاده می‌شوند تا سلول‌های CD4T را فعال کنند (راماچاندرا و همکاران، ۲۰۰۱). این مشاهدات پیشنهاد می‌دهند که هدف گیری افزایش یافتهٔ فاگوزوم‌های ب.ث.ژ. به سمت لیزوژوم‌ها می‌توانند تولید واکنش‌گر آنتی ژن پپتیدی را بالا ببرد و نمود آنها را از طریق مسیر MHC-II افزایش دهد.

اتوفاژی، فرآیندی است که در آن یک فاگوفور دو غشایی آغاز می‌شود که سیتوزول و اندامک‌ها را می‌بلعد. فاگوفور، یک اتوفاگوزوم را تشکیل می‌دهد که متعاقباً با لیزوژوم همچوشه می‌کند که منجر به یک اتوفاگولیزوژوم می‌شود. تخریب سیتوزول و سایر وزیکول‌ها یا اندامک‌های متصل به غشا در دومی، واسطه‌های متابولیکی تولید می‌کند که می‌توانند در سلول بازیافت شود. مکانیسم‌های القای اتوفاژی پیچیده هستنداما فرآیند را می‌توان با تشخیص میکروتوبول مرتبط با زنجیره روش^۳ (LC3) نظارت کرد که بر روی غشای اتوفاگوزوم یا از طریق رنگ آمیزی اینمی، وسترن بلاست لیزات‌های سلولی یا با استفاده از GFP یا rfp با علامت LC3 که به اتوفاگوزوم‌ها جانمایی می‌شوند. اگرچه گرسنگی، یک محرک معروفی است، وقایع متعدد می‌توانند اتوفاژی را آغاز کنند. داروهایی مانند راپامایسین و عواملی مانند تورین^۱، هدف راپامایسین پستانداران (mTOR) را سرکوب می‌کنند و فرآیندهای داخل سلولی متعددی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (اندرسون و زیمرینگ، ^۲۲۰۰۶؛ اراکی^۳ و همکاران، ^۴۲۰۰۹؛ فرر^۵ و همکاران، ^۶۲۰۱۲؛ لو^۷ و همکاران، ^۸۱۹۹۴). راپامایسین، یک القاکننده اتوفاژی قدرتمند در APC‌ها می‌باشد (جاگانات و همکاران، ^۹۲۰۰۹؛ سمن^{۱۰} و همکاران، ^{۱۱}۲۰۰۹). مهار اتوفاژی خاص، با شکستِ BECN1 siRNA یک امکان‌پذیر می‌باشد در حالیکه ۳ متیل آدنین (3A)، یک مهارکننده قابل اعتماد اتوفاژی است. تعدادی از سویه‌های موش از کار افتاده ژن Atg در طی سالهای اخیر موجود شده است که ممکن است به تعریف نقش اتوفاژی طی اینمی کمک کند.

در این فصل، نشان می‌دهیم که فعالسازی اتوفاژی در ماکروفاژها و DC‌ها منجر به افزایش بومی سازی فاگوزوم‌های واکسن ب.ث.ژ. در لیزوژوم‌ها می‌شود، که تولید پپتید و نمود آنتی ژن افزایش یافته را در سلول‌های CD4T تسهیل می‌کند. همچنین نشان می‌دهیم که مکانیسم‌های اتوفاژیک می‌توانند تأثیرات متعددی بر روی APC‌ها داشته باشند، از جمله این تأثیرات می‌توان

¹ Torin1

⁴ Ferrer

² Anderson and Zimring

⁵ Luo

³ Araki

⁶ Saemann

به موارد ذیل اشاره کرد: مرتب سازی آنتی ژن‌های پروتئینی ذره ای و محلولی در محفظه‌های پروتئولیتیک و ترشح سیتوکین‌های تعديل کننده ایمنی مانند IL-1 β . در نهایت، مشخص شد که مصرف مشترک راپامایسین با واکسن ب.ث.ژ. عملکرد سلول T در موش‌ها را افزایش می‌دهد که از نقش نوظهور اتوفاژی در رشد و توسعه واکسن حمایت می‌کند.

القای اتوفاژی از طریق افزایشات mTOR

آلودگی APC‌های موشها در شرایط آزمایشگاهی با واکسن ب.ث.ژ، واکنشگر آنتی ژن پیتید ۲۵، Ag85B ترشح شده به سلول‌های CD4T را ارائه می‌کند (هیبریدوم ب.ب.۷). اختصاصی Ag85B (راماچاندرا و همکاران، ۲۰۰۱) چنین سلول‌های CD4 فعال شده IL-2 را ترشح می‌کنند که با استفاده از ساندویچ الایزا (سنجهش ایمنی ساندویچ) و زیست‌سنجه اندازه گیری می‌شود. Ag85B ترشحی، آنتی ژن غالب واکسن ب.ث.ژ و مایکروبکتریوم توبرکلوزیس است و هنگامی که به عنوان یک واکسن واحد فرعی به موش‌ها داده می‌شود، می‌تواند حفاظت قابل توجهی را در برابر توبرکلوزیس ناشی از آئروسل ایجاد کند (مصطفی ابو و الاتیه^۱، ۲۰۰۳). مدل جایگزین در شرایط آزمایشگاهی، نمود آنتی ژن توسط چندین محقق برای نشان دادن کارایی APC‌ها در فرآیند آنتی ژن Ag85B است. به ویژه، گروه هارینگ نشان داد که Ag85B را می‌توان در سطح فاگوزومی پردازش کرد و به غشای پلاسمای برای فعالسازی سلول‌های CD4T ب.ب.۷ ارسال کرد (راماچاندرا و همکاران، ۲۰۰۱). مطالعات ما نشان داد که Ag85B که از واکسن ب.ث.ژ ترشح شده است، در داخل فاگوزوم‌ها توسط پروتئاز کاتپسین-D تقسیم می‌شود. فرآیند آنتی ژن فاگوزومی، به هر حال، ناکافی بود، زیرا Ph فاگوزوم ب.ث.ژ. در ماکروفاژها تقریباً خنثی بود (سینگ و همکاران، ۲۰۰۶). جالب است که عفونتِ ماکروفاژها با واکسن نوترکیب ب.ث.ژ.^۲ ترشح کننده کاتپسین-S^۳، نمود Ag85B به سلول‌های cd4t را افزایش داد (سوالهین و همکاران، ۲۰۰۷). این مشاهدات تایید کردند که Ag85B ترشح شده، علیرغم اینکه یک ایمنی زای اصلی است، توسط APC‌ها به طور ناکارآمدی پردازش می‌شود. در زیر نشان می‌دهیم که سه مکانیسم اتوفاژی می‌توانند کارایی نمود آنتی ژن را افزایش دهند.

¹ Mustafa Abu and Al-Attiyah

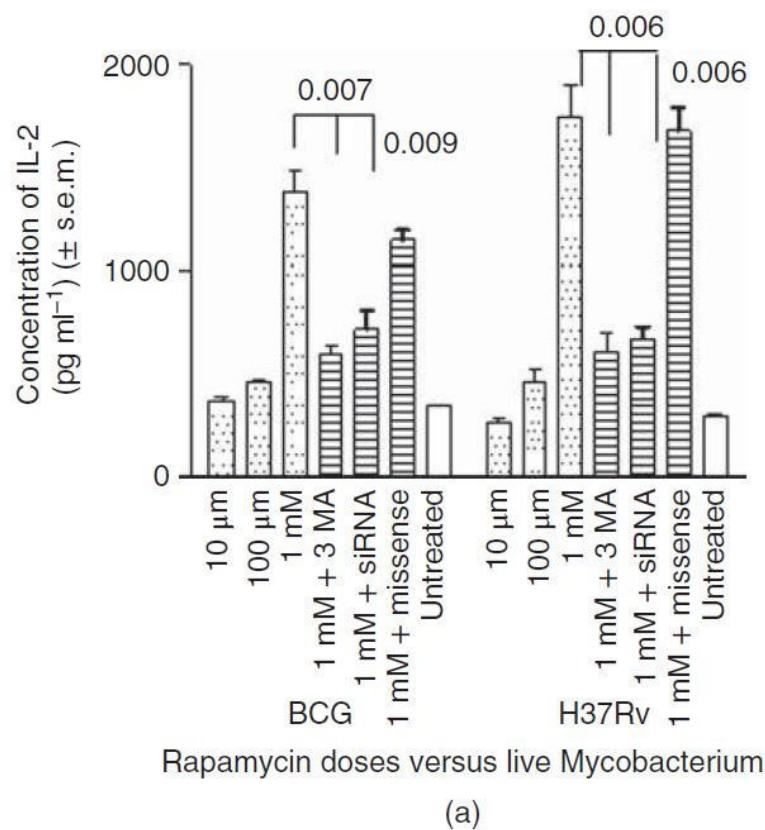
² Cathepsin-S

³ Soualhine

اتوفاژی ناشی از راپامایسین، نمود آنتی ژن را در APC‌ها افزایش می‌دهد

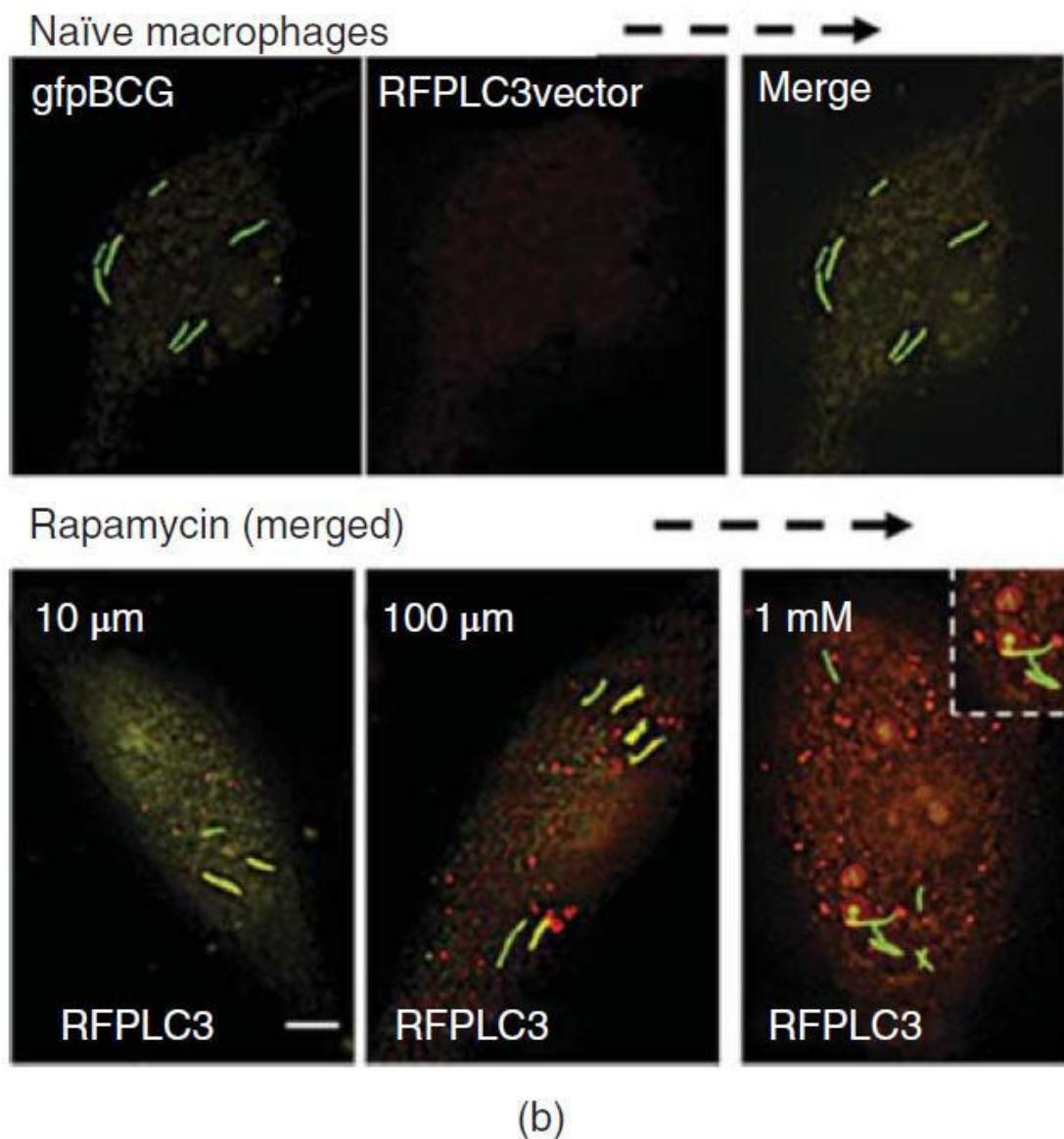
مطالعات نشان می‌دهند که واکسن ب.ث.ر. در فاگوزوم‌های نابالغ rab5⁺ که با لیزوژوم‌های rab7⁺ همچوشی ندارند، نفوذ می‌کند (درتیک و همکاران، ۱۹۹۷؛ ویا و همکاران، ۱۹۹۷). بنابراین، APC‌های درمان شده یا درمان نشده، برای القای اتوفاژی فعال شدند، با سلول‌های BB7 CD4 T پوشانده شد و نمود آنتی ژن با استفاده از سنجش IL-2 اندازه گیری شدواینگونه نشان می‌دهد که فعالسازی قبلی APC‌ها با راپامایسین، نمود آنتی ژن را افزایش داد در حالیکه انسداد اتوفاژی که از حذف BECN1 RNA (برونزادر) siRNA یا انسداد با متیل آدنین-۳ استفاده می‌کند، نمود آنتی ژن را کاهش داد. اتوفاژی القا شده با راپامایسین، با هدف گیری افزایش یافته می‌کند، نمود آنتی ژن را کاهش داد. اتوفاژی گذاری شده با rfp-LC3 در APC‌ها ارتباط دارد فاگوزوم‌های ب.ث.ر. gfp با اتوفاگوزوم برچسب گذاری شده با APC در

(شکل ۱۵,۱b) (جاگانات^۱ و همکاران، ۲۰۰۹).



شکل ۱۵,۱

^۱ Jagannath



(b)

شکل ۱۵.۱ (b)

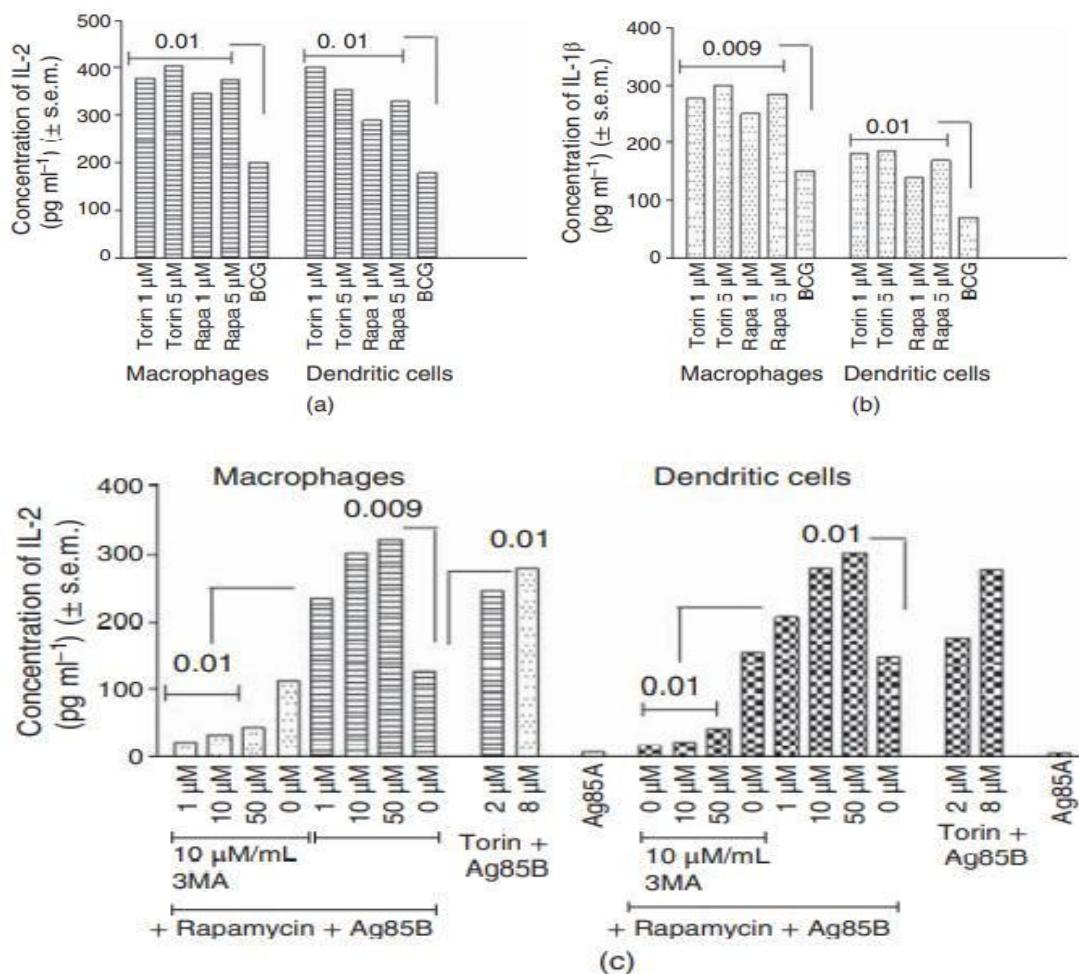
راپامایسین و اتوفاژی ناشی از تورین-۱، نمود آتنی ژن و نیز ترشح IL-1 β از ب.ث.ژ. آلوده شده با APC‌ها را افزایش می‌دهد

IL-1 β ، سیتوکین اصلی آزاد شده پس از فعالسازی توالی کاسپاز توسط اینفلامازومن APC‌ها است، اگرچه توالی ترشح مستقل کاسپاز IL-1 β نیز امکانپذیر است (نتیا و همکاران، ۲۰۰۸).

فصل ۱۵: اتوفاژی، کارایی واکسن BCG را افزایش می‌دهد ۲۹۷

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که IL-1 β می‌تواند از وزیکول‌های اتوفاژیک دفع شود که پیشنهاد یک مسیر جایگزین برای ترشح آن را می‌دهد (دوپونت^۱ و همکاران، ۲۰۱۱). IL-1 β در تنظیم پاسخ‌های سلول T، القای حافظه وابسته به سلول CD8 T تصادفی همراه با IL-18 و تسهیل چهش فاگوزوم دخیل است (دوپونت و همکاران، ۲۰۱۱؛ پیلی و همکاران، ۲۰۱۲؛ کوپز و همکاران، ۲۰۱۱). برای مشخص کردن اینکه رهاسازی IL-1 β در طی اتوفاژی تعديل می‌شود، APC‌ها با راپامایسین و ۱ فعال شدند (مهار کننده قوی mTORC1/mTORC2)، و به دنبال آن عفونت با واکسن ب.ث.ژ. و ارزیابی موازی نمود آنتی ژن و ترشح IL-1 β با استفاده از ساندویچ الایزا خواهد بود. همانطور که پیش بینی می‌شد، القای اتوفاژی منجر به افزایش نمود آنتی ژن به سلول‌های ب.ب. CD4T توسط APC‌ها شد (شکل ۱۵,۲a). APC‌های فعال شده به نوبه خود سطوح بیشتری از IL-1 β را در مقایسه با APC‌های غیرفعال اما آلوده به ب.ث.ژ. ترشح می‌کنند (شکل ۱۵,۲b). هنگامی که ب.ث.ژ. داخل سلولی، Ag85B ترشح می‌کند، اثر اتوفاژی با استفاده از راپامایسین و تورین^۱، APC‌هایی را فعال کرد که با Ag85B نوترکیب محلول پالس شدند. شکل ۱۵,۲c نیز نشان می‌دهد که اتوفاژی، نمود Ag85B را به سلول‌های CD4T که توسط ۳MA مهار شده بودند، افزایش داد. یک آنتی ژن نامربوط، Ag85B نوترکیب، توسط APC‌ها ارائه نشد که ویژگی ارزیابی Ag85B را تایید می‌کند. این داده‌ها نشان می‌دهند که القای اتوفاژی در APC‌ها هم نمود آنتی ژن و هم ترشح IL-1 β را افزایش می‌دهد، که هر یک از آنها می‌توانند تأثیر مثبت بر سلول‌های T داشته باشند (کوپز و همکاران، ۲۰۱۱؛ میلز و همکاران، ۲۰۱۳).

^۱ Dupont



شکل ۱۵.۲

مکانیسم‌های داخل سلولی مسیریابی اتوفازیک واکسن ب.ث.ژ ذره ای و ترشح MHC-II آنتی ژن با واسطه AG85B در اتوفاغوزوم‌ها و نمود آنتی ژن

بسیاری از میکروب‌ها، آنتی ژن‌های محلول را داخل APC‌ها و پپتیدهایی ترشح می‌کنند که باید از باکتری‌های دست نخورده تولید شوند یا آنتی ژن‌های ترشح شده آنها برای پاسخ‌های ایمنی سلول T باید وجود داشته باشند. پروتئین‌های باکتریابی موجود در سیتوزول، معمولاً از طریق پروتئازوم‌ها پردازش می‌شوند اما همچنین می‌توانند از طریق مسیرهای متعددی به لیزوزوم‌ها هدایت شوند. تخریب با واسطه پروتئازوم منجر به تولید پپتیدهایی می‌شوند که از طریق MHC-I به سلول‌های CD8T نمود می‌یابند، که بازوی جدایی ناپذیر ایمنی Th1 هستند. آنتی ژن‌های ذره ای مانند واکسن ب.ث.ژ. باید از طریق جهش فاگوزومی به لیزوزوم‌ها تحويل

فصل ۱۵: اتوفاژی، کارایی واکسن BCG را افزایش می‌دهد ^{۲۹۹}

داده شوند، اما این فرآیند توسط این باکتری‌ها متوقف می‌شود. داده‌های توضیح داده شده در بالا نشان داد که اتوفاژی ناشی از راپامایسین، ب.ث.ژ. و Ag85B ترشح شده آن را به اتوفاگوزوم‌ها تحويل داد. در هر حال، واکسن‌های انسانی، باید به گونه‌ای فرموله شوند که در حالیکه ایمنی زایی را حفظ می‌کنند، سمی بودن^۱ و نگرانی‌های ایمنی به حداقل برسند. در این بخش، ساخت‌های نوترکیب جدید واکسن ب.ث.ژ. برای تسهیل القای اتوفاژی بدون استفاده از داروهایی مانند راپامایسین ایجاد شد.

بیان بیش از حد Ag85B ترشح شده در واکسن ب.ث.ژ منجر به ساخت اگرزوم^۲ (توده پروتئین‌های بدتاخورده) در سیتوزول APC‌ها می‌شود

اگرچه واکسن ب.ث.ژ نوع وحشی، Ag85B را نیز ترشح می‌کند، دومی نیاز به میکروسکوپ الکترونی سیتوزول دارد تا سرنوشت خود را طی پردازش تعیین نماید. در هر حال، وقتی Ag85B در ب.ث.ژ، بیان بیش از حد دارند، پروتئین‌های آنها، توده هایی را تشکیل می‌دهند و اینها می‌توانند توسط میکروسکوپ ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی بادی مونوکوال TD17 شناسایی شوند (جاگانات و همکاران، ۲۰۰۹). برای تسهیل تجزیه و تحلیل انتقال اندوسیتی، rfpAg85B-BCG را با rfp برچسب گذاری شد و در ب.ث.ژ بیش از حد بیان شد که ایجاد کرد. ب.ث.ژ نوع وحشی، که سطوح پایین Ag85B بدون برچسب را ترشح می‌کند، نیز با rfp عنوان یک کنترل بازده rfpBCG، برچسب گذاری شد. یک سری از مطالعات بومی شده ایمونوفلورسانس نشان داد که پروتئین rfpBCG بیش از حد بیان شده از ب.ث.ژ اگرزوم هایی را ایجاد کردند که به تدریج در اندازه در سیتوزول APC‌ها افزایش می‌یابد. مطالعات قبلی ثابت کرده است که اگرزوم‌ها اطراف هسته γ-tubulin ایجاد می‌شوند و حاوی پروتئین‌های داربستی مختلف هستند، اگرچه ساختار، سازماندهی و سرنوشت اگرزوم‌ها و ساختارهای شبیه اگرزوم (ALIS) در ماکروفازها و DC‌ها (aka DALIS) مورد بحث قرار می‌گیرند (پیر، ۲۰۰۵؛ ونگر و همکاران، ۲۰۱۲). مطابق با مشاهدات قبلی، آنتی بادی‌ها به محفظه‌های اگرزومی مثل یوبی کوئیتین، توبولین-γ، ویمنتین و پروتتازوم، در سیتوزول ماکروفازهای آلوده با- rfpAg85B-BCG، برچسب rfpAg85B را زدند اما برچسب rfpBCG زده نشد (شکل ۱۵.۳a). در صد هم بیانی rfpAg85B-BCG با نشانگرهای اگرزوم در ماکروفازها اندازه گیری شد، و تأیید شد که به

¹ toxicity

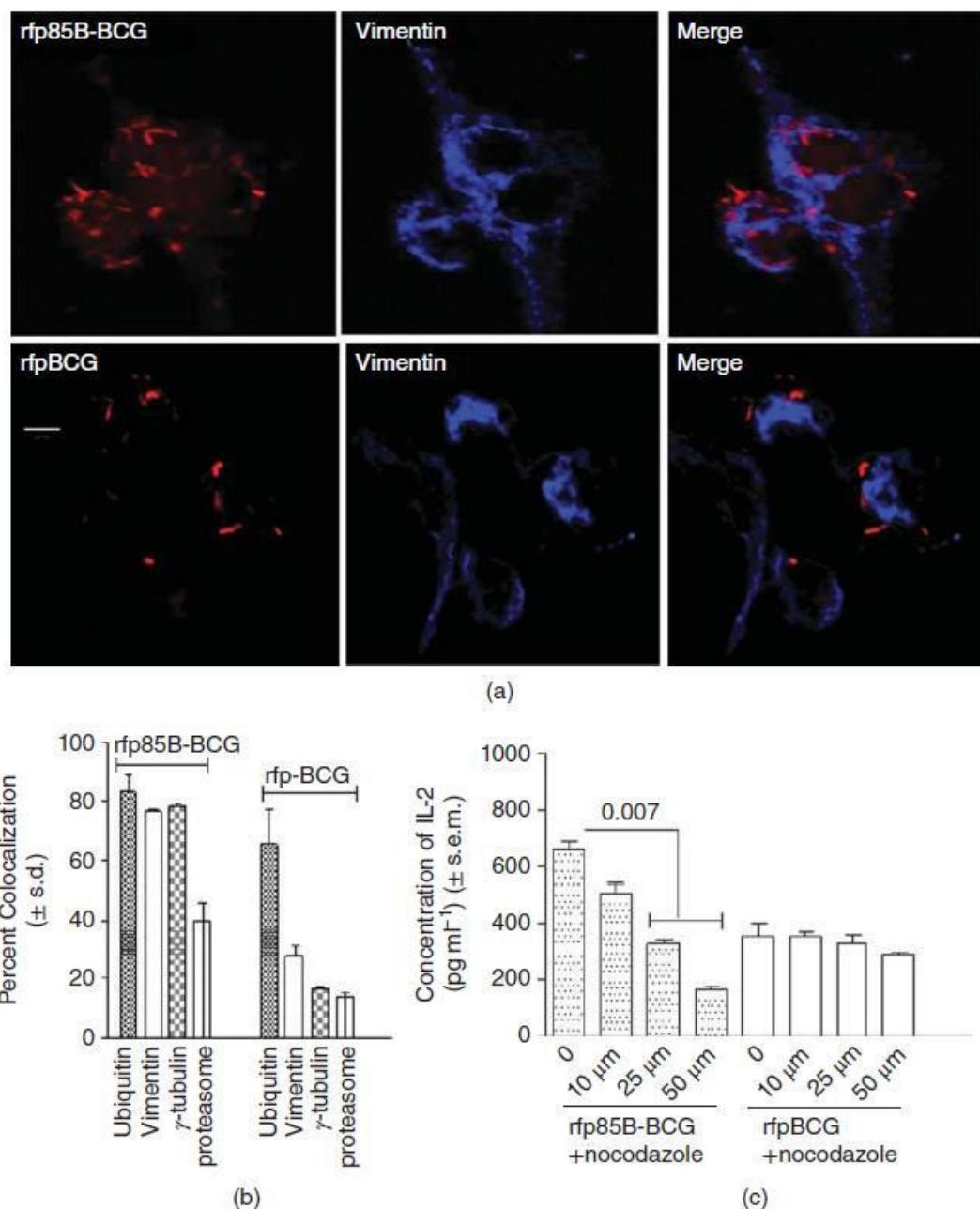
² aggresome

استثنای آنتی بادی برای یوبی کوئیتین، تنها rfpAg85B بیش از حد بیان شده، با این آنتی بادی‌ها برچسب گذاری شدند (شکل ۱۵,۳b). یوبی کوئیتین برچسب گذاری شده مطابق با مشاهداتی است که یوبی کوئیتین، کشنن مایکروباکتری‌ها را در ماکروفازها تسهیل می‌کند (آلونزو^۱ و همکاران، ۲۰۰۷؛ مانزانیلو^۲ و همکاران، ۲۰۱۳). در نهایت، نوکودازول، که میکروتوبول را مختل می‌کند و در نتیجه ساخت اگرزوم، به طور قابل توجهی نمود آنتی ژن را در ماکروفازهای آلوده با rfpBCG در مقایسه با rfpAg85B-BCG کاهش داد (شکل ۱۵,۳c). این پیشنهاد می‌کند که ساخت اگرزوم، نمود آنتی ژن را توسط APC‌ها تسهیل می‌کند، اگرچه مکانیسم‌های اساسی، هنوز باید روشن شوند.

¹ Alonso

² Manzanillo

فصل ۱۵: اتوفاژی، کارایی و اکسن BCG را افزایش می‌دهد ۳۰۱



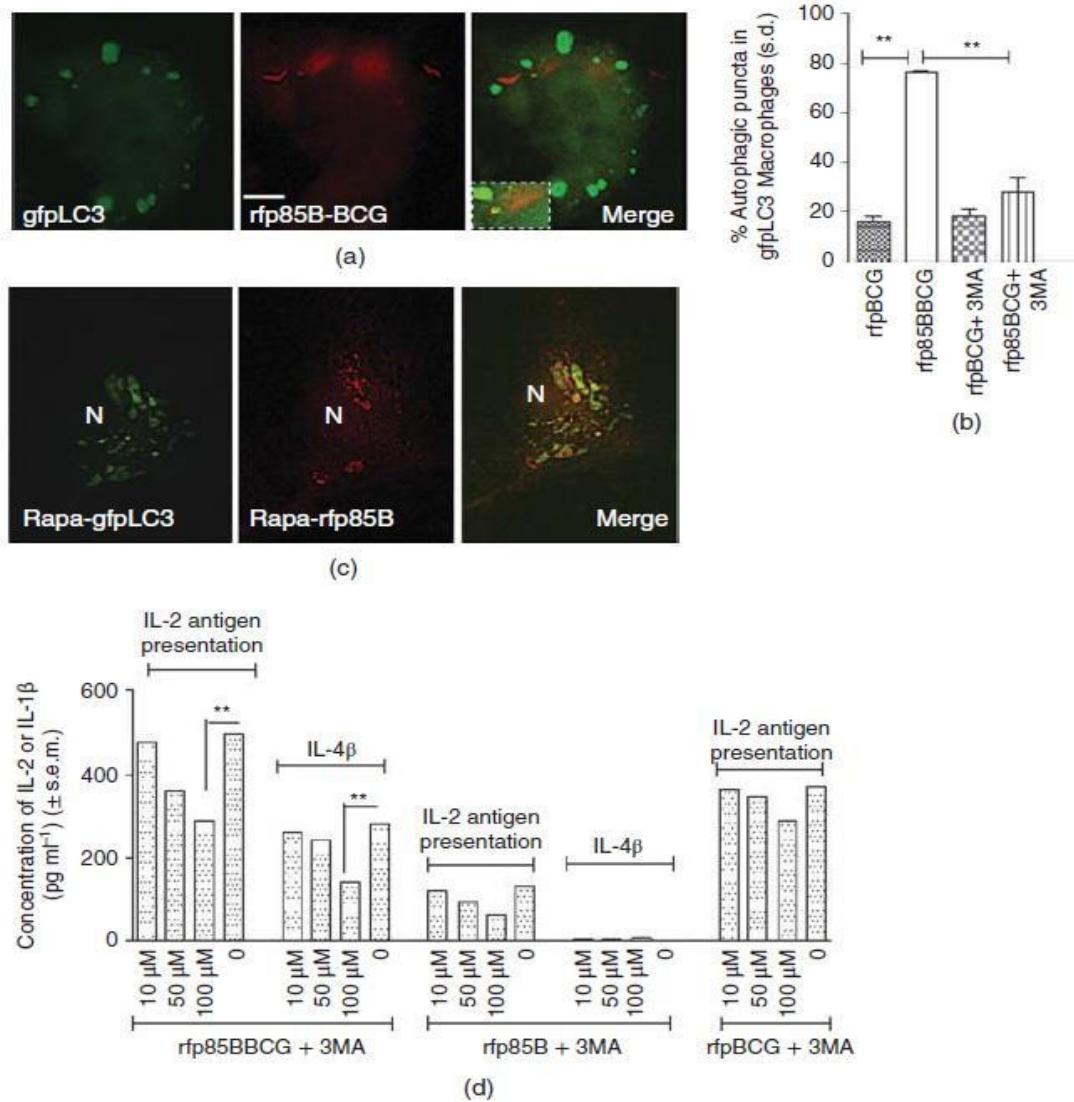
شکل ۱۵.۳

Ag85B بیش از حد بیان شده از واکسن ب.ث.ژ، اگرزووم‌ها را ایجاد می‌کند که نمود آنتی ژن را از طریق اتوفازی افزایش می‌یابد

شناخته شده است که توده‌های پروتئینی در سیتوزول، از طریق پروتئازوم‌ها یا از طریق اتوفازی متداول، پاکسازی می‌شوند (مونز^۱، ۲۰۰۶). برای روشن شدن این روند، ماکروفازهای gfp-LC3 با rfpBCG و rfpAg85B-BCG آلدود می‌شوند و به دنبال آن کمی سازی ن نقاط اتوفازیک و ارزیابی نمود آنتی ژن خواهد بود. همانطور که برای rfpBCG مقایسه شد، شکل ۱۵,۴ a و b شرح می‌دهد که rfpAg85B-BCG القای قوی تری از نقاط اتوفازیک را در ماکروفازهای gfp-rfpAg85B-BCG نشان داد. در مقابل، rfpAg85B محلول مشتق شده از فیلتر کشت LC3 برای هم بیانی با اتوفاغوزوم‌های gfp-LC3+، به فعالسازی قبلی با راپامایسین نیاز داشت (شکل ۱۵,۴c). بعلاوه، وقتی ماکروفازهای خام، غیرفعال، با این ساختهای ب.ث.ژ آلدود شدند، rfpAg85B-BCG توانایی افزایشی را برای القای IL-2 از سلول‌های CD4 T طی نمود آنتی ژن نشان داد، که با استفاده از 3MA مهار شد (شکل ۱۵,۴d). جالب است که آنتی ژن rfp85B محلول، توسط ماکروفازها نیز پردازش می‌شود اما منجر به IL-1 β نشد. بیان بیش از حد Ag85B در واکسن ب.ث.ژ، مکانیسم جدیدی است که اتوفازی را در ارتباط با ترشح IL-1 β بدون استفاده از فوریت‌های فعالسازی خارجی مثل راپامایسین افزایش می‌دهد.

¹Munz

فصل ۱۵: اتوفازی، کارایی واکسن BCG را افزایش می‌دهد



شکل ۱۵.۴

بحث: مطالعات آزمایشگاهی بر روی اتوفازی و نمود آنتی ژن

استراتژی‌های واکسیناسیون برای انسان‌ها شامل هم واکسن‌های ذره ای و هم واکسن‌های پروتئینی زیرواحدی هستند. در حالیکه کودکان با واکسن ب.ث.ژ زنده ضعیف شده واکسینه می‌شوند، بخاطر تأثیر ناقص و نقصان محافظت طولانی مدت، یک استراتژی تقویت اولیه^۱ ایجاد شده است. در این مورد، واکسیناسیون اولیه ب.ث.ژ بعد از واکسیناسیون تقویت کننده با واکسن

¹ prime-boost strategy

زیرواحدی انجام می‌شود که از طریق یک ناقل ویروسی یا از طریق پروتئین‌های دست نخورده امولسیون شده با مواد کمکی داده می‌شود. به هر حال، یک آزمایش بزرگ نوزادی از واکسن ب.ث.ژ. که توسط تقویت کننده مایکوباکتریوم بیانگر ویروس آنکارای اصلاح شده Ag85A انجام شد (MVA85A)، در محافظت افزایشی با شکست مواجه شد، بر نیاز به افزایش کارایی استراتژی "پرایم باکتریایی" و "تقویت واکسن زیرواحد" تأکید می‌کند (بیشای و همکاران، ۲۰۱۲؛ تامریس و همکاران، ۲۰۱۳). داده‌های نشان داده شده در شکل ۱۵,۳ و ۱۵,۴ نشان می‌دهند که دستکاری ژنتیکی ب.ث.ژ برای القای اتوفاژی، نمود آنتی ژن را در APC‌ها افزایش می‌دهد. گزارش کردیم که ب.ث.ژ نوترکیب که بیان بیش از حد Ag85B را دارد، کارائی افزایش یافته‌ای در برابر توبرکلوزیس موش‌ها دارد و حفاظت آن طولانی‌تر است (جاگانات و همکاران، ۲۰۰۹).

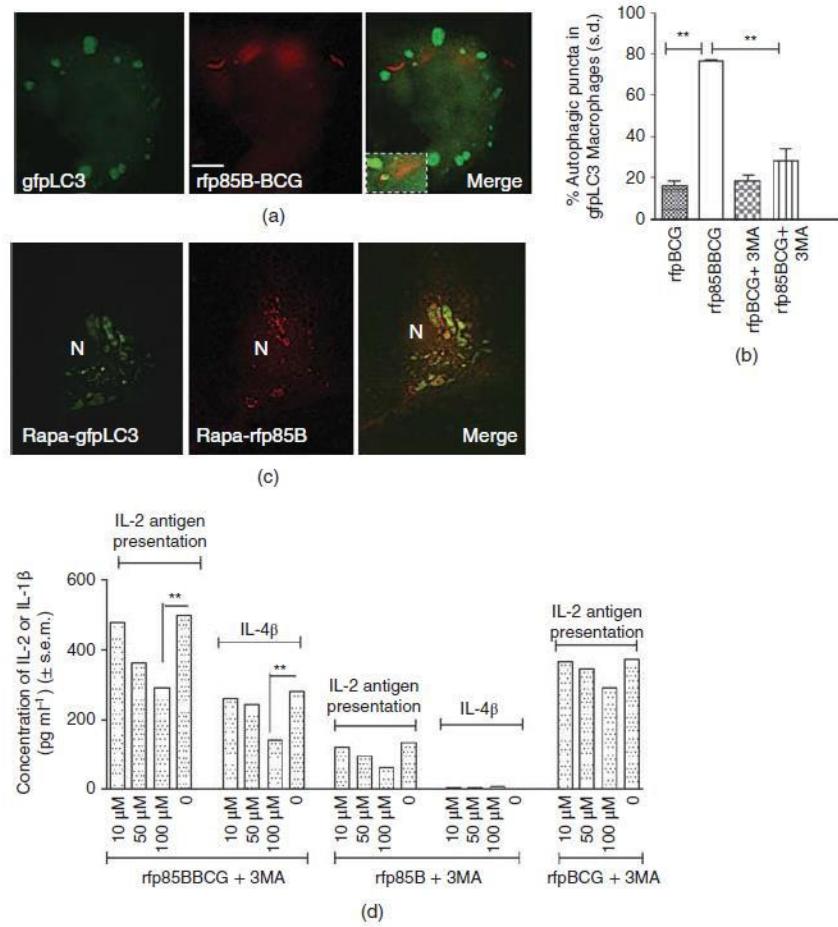
استراتژی نوآورانه فعالسازی مسیر اتوفاژیک از طریق بیان بیش از حد آنتی ژن‌ها در یک ناقل باکتریایی زنده پیامدهای متعددی برای بھبود واکسن‌ها دارد. اول، کارایی واکسن‌های داده شده از طریق یک رژیم اولیه را می‌توان با شبیه سازی یک سری پیتیدهای ایمونوژنیک به یک پروتئین همچوشی افزایش داد که در یک ناقل زنده مانند ب.ث.ژ، بیان بیش از حد شده‌اند. این احتمالاً، مجموعه سلول T تولید شده توسط APC‌ها را گسترش می‌دهد. بنابراین، ایجاد یک انبار آنتی ژنیک^۱ یا اگرزوم در سیتوزول APC‌ها، رویکردی برای شروع ایمن اتوفاژی است. در حالیکه باید روشن شود که مکانیسم‌ها از طریق کدام اگرزوم‌ها باعث اتوفاژی می‌شوند، اگرزوم‌های rfpAg85B با آنتی بادی‌ها برای یوبی کوئیتین و چندین چاپرون^۲ از جمله hsc60 و hsc60 برچسب زدند (مشاهدات منتشر نشده). مطالعات ما بر روی پروتومیکس‌های فاگوزوم‌های ب.ث.ژ خالص، نیز غنی سازی را برای چاپرون‌های مختلف نیز نشان داد (راؤ و همکاران، ۲۰۰۹؛ لی و همکاران، ۲۰۱۰). بنابراین، پیشنهاد می‌کنیم که اتوفاژی در اگرزوم حاوی APC‌ها می‌توانند توسط یوبی کوئیتینه کردن Ag85B، و ب.ث.ژ، از طریق یک فرآیند مستقل Atg16L1 یا از طریق چاپرون‌های خاص که می‌توانند اگرزوم‌های Ag85B را به سمت اتوفاگوزوم‌ها مرتب کنند، شروع شوند (ماسی و همکاران، ۲۰۰۶؛ فوجیتا و یاشیموری، ۲۰۱۳؛ چین و همکاران، ۲۰۱۲؛ ایمای و همکاران، ۲۰۱۱). در این زمینه، یک رویکرد جذاب برای القای اتوفاژی با استفاده از پیتید Tat-Beclin 1 قابل نفوذ به سلول نیز گزارش شده بود (شوچی-کاواتا و همکاران، ۲۰۱۳). پروتئین‌های واکسن زیر واحد نوترکیب که با بخش‌های القا کننده اتوفاژی

¹ antigenic depot

² Chaperones

فصل ۱۵: اتوفاژی، کارایی واکسن BCG را افزایش می‌دهد

در ارتباط اند، می‌توانند برای تولید بهتر کنشگ آنتی ژن پیتیدی، آنها را به اتوفاگوزوم‌ها دسته بندی کنند. در نهایت، واکسن‌های ناشی از اتوفاژی، نیز احتمالاً ترشح IL-1 β را افزایش دهنده، که می‌تواند تأثیر مثبتی بر روی عملکرد سلول T و فعالسازی بازخوردی جهش فاگوزوم داشته باشد.



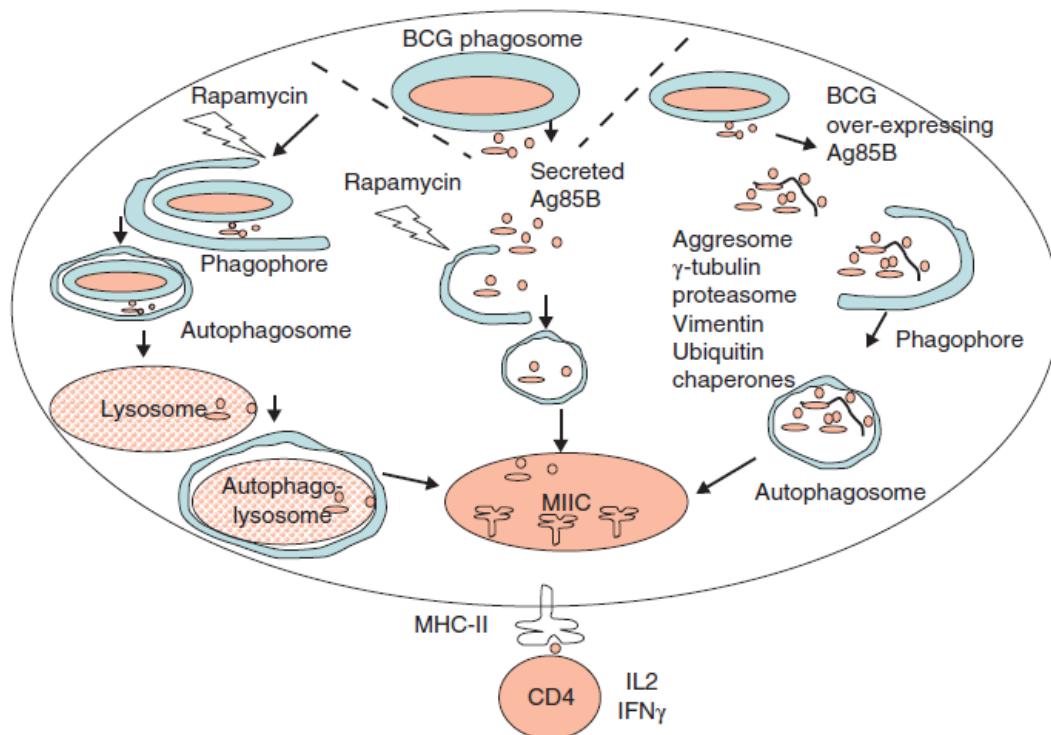
تصویر ۱۵^۴ بیان بیش از حد Ag85B از واکسن BCG از آگرژوم^۱‌ها که باعث ایجاد اتوفاژی^۲ مرتبط با افزایش ارائه آنتی ژن می‌شود. (a) ماکروفافاژهای RAW آلوده به gfp-LC3، با 3MA تحت درمان قرار گرفته با درمان نشدنی، و سپس با rfpBCG و rfpAg85B-BCG آلوده شدند. بخش (a) نشان می‌دهد که اتوفاژی قوی را القا می‌کند که با پروتئین rfpAg85B ترشح شده از واکسن همپوشانی دارند. بخش (c) نشان می‌دهد که اتوفاگوزوم‌های ماکروفافاژهای gfp-LC3 فعال شده با راپامایسین، با آنتی ژن محلول B rfpAg85B همپوشانی دارند. (b) درصد همپوشانی^۳ (\pm SD) با شمارش rfp BCG در ۵۰ ماکروفافاژ در هر چاهک سه تکراری برای هر آزمایش، تعیین گردید (SD: دو آزمایش جداگانه، *: آزمون t). (d) ماکروفافاژها با 3MA

¹ aggregation of proteins: تجمع پروتئین‌هایی با تاخورده‌گی غلط در سلول

² autophagy

³ colocalization

شده و سپس با آلووده شده یا آنتیژن rfpBCG یا rfpAg85B محلول به آنها اضافه گردید. ماکروفاژهای شسته شده، با سلولهای CD4 BB7 T پوشانده شدند و IL-2 از جمجمه آنتیژن یا مواد روبی، ۱۸ ساعت بعد با استفاده از ساندویچ الایزا برای IL-1 β مورد آزمایش قرار گرفتند ($\pm SD$: دو آزمایش جداگانه، $p < 0.01$).*



تصویر ۱۵,۵ این شکل مصور نشان‌دهنده مکانیسم‌های اتوفاژی تقویت کننده آنتیژن وابسته به MHC-II در سلولهای دندریتیک و ماکروفاژهای آلووده به واکسن BCG می‌باشد. واکسن نوع وحشی BCG در فاگوزوم نابالغ ماکروفاژها جدا گردیده و در لیزوژوم ادغام نمی‌شود. توقف بلوغ با یک خط شکسته نشان داده شده است. با این حال Ag85B را ترشح می‌کند که به سیتوزول می‌گریزد. Ag85B ترشح شده به یک اپی‌توب پیتید-۲۵ فرآوری می‌گردد که در MHC-II بارگیری شده و به سلولهای BB7 T ارائه می‌شود. آنها پس از شناسایی آنتیژن از طریق گیرنده سلول T (TCR)-2 IL-2 را ترشح می‌کنند. راپامایسین بر ارائه Ag85B دو تأثیر می‌گذارد: ۱- می‌تواند اتوفاژی را القاء کند و اتوفاگوزوم‌ها واکسن BCG را می‌بلعند و آنها را هدف اتوفاژی-لیزوژوم‌ها قرار می‌دهند؛ ۲- غشای فاگوفور القا شده توسط راپامایسین، Ag85B سیتوزولی را جدا ساخته و آنها را در قسمت‌های حاوی MHC-II (MIIC) مستقل از راپامایسین، بیان بیش از حد Ag85B باعث تشکیل ساختارهای شبه آگرزووم (ALIS) می‌شود که برای شناسایی γ-توبولین، ویمنتین، یوبی‌کوئیتین، پروتئازوم و شاپرون‌ها رنگ می‌شوند. آگرزووم‌ها از طریق یک فرآیند وابسته به وابسته به شاپرون یا یوبی‌کوئیتین، تشکیل فاگوفور و اتوفاگوزوم‌ها را القا می‌کنند که در لیزوژوم‌ها ادغام شده و تحریب Ag85B و افزایش ارائه پیتید را تسهیل می‌نمایند.

فصل ۱۵: اتوفاژی، کارایی واکسن BCG را افزایش می‌دهد

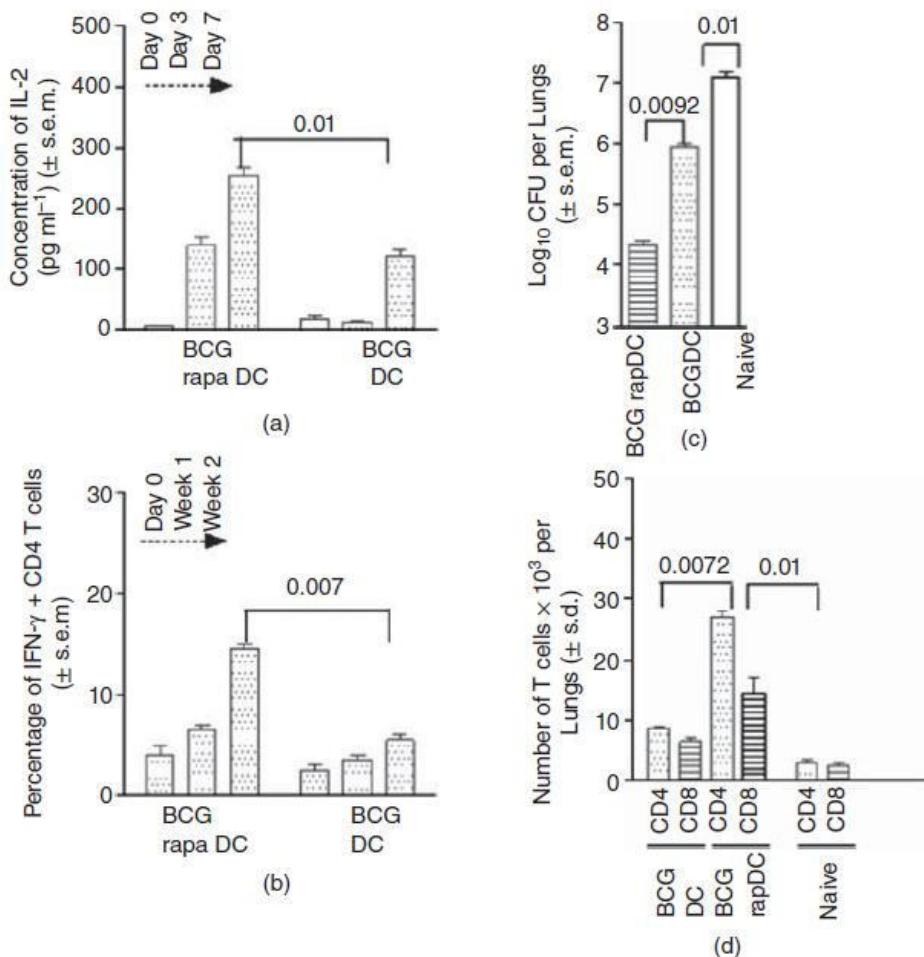
تصویر ۱۵,۵ مکانیسم‌هایی را خلاصه می‌کند که از طریق آنها اتوفاژی می‌تواند ارائه آنتیژن وابسته به MHC-II را طی ابتلا به APC‌ها با واکسن BCG افزایش دهد.

فعال کردن سلول‌های دندریتیک توسط راپامایسین اثربخشی واکسن DC-BCG را افزایش می‌دهد

جالفتاده است که DC‌ها به وسیله فرآوری پیتید آنتیژنهای میکروبها و ارائه آنها از طریق مسیرهای وابسته به CD-I، MHC-I و MHC-II، میانجی ایمنی هستند. چون مطالعات پیشین نشان دادند که راپامایسین آغازگر اوتوفاژی در DC‌ها بود و ارائه آنتیژن به سلول‌های CD4T را افزایش داد، آزمایشات بیشتری انجام شد تا شواهد آزمایش در بدن موجود زنده بدست آید که DC‌ها می‌توانند ایمنی بهتری تولید نمایند (جاگاناث و باکرو، ۲۰۱۲؛ جاگاناث و همکاران، ۲۰۰۹). DC‌های اولیه مشتق شده از مغز استخوان با راپامایسین در آزمایشگاه فعال شدند، با واکسن BCG زنده آلوود گردیدند، و DC‌های شسته شده همراه با DC‌های غیرفعال محتوى واکسن BCG به عنوان واکسن‌هایی به موش‌ها تزریق شدند. طی ده روز بعد از واکسیناسیون، طحال‌های موش با استفاده از آزمایش سلوهای T ارزیابی شدند؛ در روز سیام موش‌ها با یک دوز اسپری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به چالش کشیده شدند که چهار هفته بعد با قربانی شدن و شمارش عضو مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و پروفایل‌های سلول T دنبال شد. تصویر آ و ب ۱۵ نشان می‌دهد موش‌هایی که به آنها واکسن rapa-DC داده شد، در مقایسه با DC‌های غیرفعال محتوى واکسن BCG زنده، در پی واکسیناسیون پاسخهای APC افزایش یافته در بدن موجود زنده و واکنش‌های آزمون ELISpot به Ag85B سلول T نشان دادند. همچنین بعد از یک چالش مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، واکسن rapa-DC در مقایسه با واکسن DC-BCG، به اندازه ۱/۵ لگاریتم ۱۰ محافظت بهتری ایجاد می‌کند (تصویر ث ۱۵,۶). ریه‌های این موش‌ها نیز محتوى مقادیر افزایش یافته هر دو نوع سلول T CD4 و CD8 بود (تصویر د ۱۵,۶). این داده‌ها اثبات می‌کنند درمان DC‌ها با راپامایسین قطعاً ایمنی‌زاوی واکسن را بالا می‌برد.

در تلاش برای درک توانایی ارتقا یافته DC‌ها برای ارائه آنتیژن، بعد از فعالسازی راپامایسین با استفاده از فلوسایتومتری سطوح MHC-II و MHC-I سنجیده شد. به طور جالبی، راپامایسین مقادیر MHC-II با سطح بیان شده را با استفاده از فلوسایتومتری در DC‌های آلوود به BCG بالا می‌برد اما نه میزان MHC-I را (نشان داده نشده). علاوه بر این، در DC‌های درمان شده با

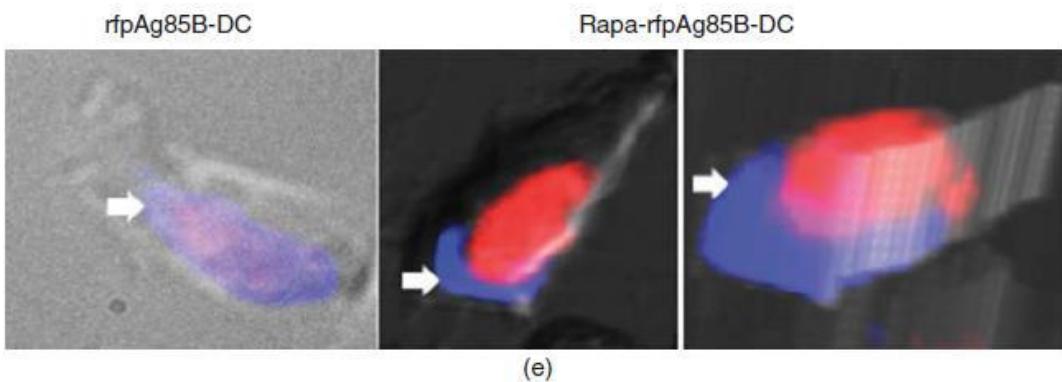
rfpAg85B محلول، راپامایسین یک تغییر مکان MHC-II از داخل سلول به سطح را القا نمود، که مطالعات فلوسیتومتری را تصدیق می‌کند (تصویری ۱۵,۶).



تصویر ۱۵,۶ پیش درمان سلول‌های دندریتیک آلوده به مایکوباکتریوم توسط راپامایسین، پاسخ‌های Th1 را در موش‌ها را افزایش داده و اثربخشی واکسن را بالا می‌برد. موش‌های C57BL/6 به صورت زیر جلدی با سلول‌های دندریتیک فعال شده توسط راپامایسین (BCG rapa-DC) یا سلول‌های دندریتیک بکر (BCG-DC) که از قبل با BCG آلوده شده بودند (10^6 سلول دندریتیک (DCs) در هر موش) (دو آزمایش) ایمن گردیدند. (a) در فواصل سه روزه، سلول‌های غدد لنفاوی اینگوینال با استفاده از دانه‌های CD3 از سلول‌های CD3+ T خالی شدند و سلول‌های ارائه‌دهنده‌ی آنتی‌ژن که باقی ماندند با سلول‌های CD4 BB7 T برای سطح IL-2 با استفاده از ساندویچ الایز، بطور همزمان کشت داده شدند. واکسن BCG در مقایسه با واکسن BCG-DC پرایمینگ سریع را برای Ag85B ایجاد کرد (مقادیر p برای گروه‌های مقایسه‌ای نشان داده شده‌اند؛ آزمون T. (b) موش‌های واکسینه شده در فواصل زمانی کشته شدند، طحال‌ها تشریح گردیده و تعداد سلول‌های CD4+ ترشح کننده IFN-γ از طریق فلوسیتومتری و با استفاده از نرم افزار BD FacsScan و Cellquest ارزیابی گردید. داده‌های دو آزمایش نشان دادند که گسترش سلول‌های IFN-γ+CD4+ در موش‌های واکسینه شده با

فصل ۱۵: اتوفاژی، کارایی واکسن BCG را افزایش می‌دهد

با BCG rapa-DC بیشتر بود. (c) موش‌ها همانند روشی که در بالا برای (a) توصیف گردید (دو آزمایش جداگانه) واکسینه شدند. چهار هفته بعد، موش‌ها با سویه بدخیم *M. tuberculosis* (Mtb) Erdman به چالش کشیده شده و تعداد واحد تشکیل دهنده کلی بакتریایی (CFUs) در ریه‌ها از طریق آبکاری همگناهای اندام به مدت ۴ هفته دیگر تعیین شدند. به موش‌های بکر و حفاظت نشده، اجازه رشد گسترش Mtb در ریه‌ها داده شد (تا \log_{10} ۷). واکسن‌های DC، که از قبل آلووده به مایکوباكتریوم بودند، محافظت قابل توجهی را ارائه دادند. BCG rapa-DC‌ها در مقایسه با واکسن BCG-DC، پاکسازی بیشتری برای Mtb در ریه‌های موش ایجاد کردند (مقادیر p برای گروه‌های مقایسه‌ای نشان داده شده اند؛ ANOVA). (d) زمانی که ها در ریه‌های موش تعیین شدند، تعداد سلول‌های CD4+ T و CD8+ IFN- γ ترشح کننده در ریه‌ها با استفاده از فلورسیوتومتری ارزیابی گردید. در مقایسه با کاربرد صرف واکسن BCG DC، واکسن BCG rapa-DC نفوذ قوی‌تری به سلول‌های T در ریه‌ها ایجاد کرد (مقادیر p برای گروه‌های راپامایسین-DC در مقایسه با گروه‌های واکسن تنها، نشان داده شده اند؛ آزمون t).



شکل ۱۵.۶ (ادامه) (e) DC‌های بکر یا درمان شده با راپامایسین، با rfpAg85B محلول درمان گردیده و سپس با استفاده از هم‌بیوغی آنتی بادی-آمینو متیل کومارین، برای MHC-II تشییت و رنگ آمیزی شدند. میکروسکوپ کانفوکال لیزری نشان می‌دهد که DC دارای rfpAg85B و MHC-II است (بخش سمت چپ؛ فلش نشان‌دهنده MHC-II آبی می‌باشد). MHC-II پس از فعال شدن راپامایسین، به غشای پلاسمایی منتقل می‌گردد. بخش میانی تصویری از DC درمان شده با راپامایسین را نشان می‌دهد، آخرین بخش نیز نمایانگر همان سلولی است که در بخش Z با ضربهای ۴ میکرومولار از یک تصویر سه‌بعدی نمایش داده شده است.

بحث و گفتگو

داده‌های ما نشان می‌دهند درمان DC‌ها با راپامایسین به‌طور قطع اینمی‌زایی آن را افزایش می‌دهد (باکرو، ۲۰۱۲؛ جاگاناث و باکرو، ۲۰۱۲). در تطابق با این مشاهده، دیگران گزارش نموده‌اند که فعالسازی DC‌ها با راپامایسین، گیرنده‌های کمک محرک و گسترش سلول‌های T را طی واکسیناسیون اتولوگ تقویت می‌نماید (آمیل و همکاران، ۲۰۱۲). اگرچه در مطالعات CD8

¹ homogenate

ما را پامایسین بیان سطحی MHC-I را بیشتر نکرد، این امکان وجود دارد که شاید وقایع درون سلولی ارائه وابسته به MHC-I را که منجر به میزان افزایش یافته سلولهای CD8 T بعد از واکسیناسیون DC می‌گردد، تعدیل کند. همینطور، واضح نیست که آیا را پامایسین تأثیر مثبتی بر سنتز MHC-II دارد یا مورد دوم همزمان با افزایش تولید اپیتوپهای پیتید در لیزوژوم بیشتر می‌شوند. اثرات مفید فعالسازی را پامایسین بر DCها نشان می‌دهد نیاز به بررسی بیشتر درمورد مکانیسم‌های مولکولی ارائه آنکه زن وجود دارد.

تجویز همزمان را پامایسین با واکسن BCG در موش‌ها حفاظت میانجیگری شده سلول‌های CD4 T و CD8 بر علیه توبرکلوزیس را تقویت می‌نماید

را پامایسین داروی مشهوری است با خواص ضدنئوپلاسم^۱. با سرکوب کردن هدف پستانداران را پامایسین (mTOR)، تنوع گسترده‌ای از سیگنالهای بیوشیمیایی درون سلولهای پستانداران به راه می‌اندازد (اندرسون و زیمرینگ، ۲۰۰۶؛ اراکی و همکاران، ۲۰۰۹؛ فرر و همکاران، ۲۰۱۰؛ لوو و همکاران، ۱۹۹۴). همزمان با کشف اینکه را پامایسین جهت افزایش اثربخشی واکسن BCG، اتفاقاً را القا می‌کند، کشف شد که این دارو طول عمر حافظه وابسته به سلول T CD8 را علیه عفونتها ویروسی در موش‌ها افزایش می‌دهد (جاگاناث و همکاران، ۲۰۰۹؛ اراکی و همکاران، ۲۰۰۹). به علاوه، گزارش شد که را پامایسین به شیوهٔ متکی بر دوز تأثیر دوگانه بر فاکتورهای رونویسی T-bet و Eomes در موش‌ها اعمال می‌کند و به ترتیب بر حافظهٔ مؤثر و حافظهٔ مرکزی سویهٔ سلول T اثر می‌گذارد (رائو و همکاران، ۲۰۱۰). از آنجایی که را پامایسین تأثیرات مفید خود را روی سلول‌های CD8 T در دوزهایی اعمال می‌کند که بسیار پایین‌تر از دوز سمی بودند که قابلیت دوام سلول‌های CD4 T را تحت تأثیر قرار دهنده، ما اثر دوز پایین را پامایسین را روی پاسخ‌های ایمنی تولید شده در موش‌ها طی واکسیناسیون BCG بررسی نمودیم. ما این فرضیه را بررسی کردیم که در دوزهای پایین، را پامایسین ممکن است یک اثر دوگانه روی APCها و سلول‌های CD8 T داشته باشد، در نتیجه کیفیت کلی واکسیناسیون را بهبود بخشد. ما انتظار داشتیم APCها شاید پاسخ‌های سلولی CD4 T را تقویت نماید، ضمن اینکه یک اثر مستقیم را پامایسین روی mTOR سلول‌های CD8 T ممکن است اثربخشی

^۱ Antineoplastic: ضدنئوپلاسمی؛ بازدارندهٔ بلوغ و تکثیر سلولهای بدخیم

فصل ۱۵: اتوفاژی، کارایی واکسن BCG را افزایش می‌دهد ۳۱۱

و طول عمرش را گسترش دهد. این مطالعات با جزئیات بیشتر در جای دیگری توصیف شده‌اند (باکرو، ۲۰۱۲). یک آزمایش کلیدی در پایین شرح داده می‌شود.

موس‌ها با یک دوز از واکسن BCG زنده در روز صفر واکسینه شدند همراه با تزریق‌های روزانه یک دوز پایین راپامایسین که به اندازه ۷۵ میکروگرم در هر کیلوگرم برای ۳۰ روز داده شد (تصویر آ ۱۵,۷). در روز سی و دوم، موس‌ها با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بدخیم به چالش کشیده شدند و چهار و هشت هفتۀ بعد اعضای بدن موس برای شمارش باکتریایی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و فنوتیپ سلول‌های CD8 T و CD4 با استفاده از فلوسایتومتری تجزیه و تحلیل شد. تصویر آ ۱۵,۷ نشان می‌دهد موس‌هایی که به آنها راپامایسین همراه با واکسن BCG داده شد نسبت به آنها بیکاره از صرفاً واکسن BCG دریافت نمودند محافظت بهتری در برابر توبرکلوزیس نشان دادند. از آنجایی که دوز پایین راپامایسین هیچ تأثیری بر قابلیت دوام مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در آزمایشگاه نداشت (مشاهدات چاپ نشده)، و راپامایسین به تنها بی اثری بر شمارش باکتریایی از این ارگانها نگذاشت، این داده‌ها نشان می‌دهند راپامایسین پاسخ‌های ایمنی را، احتمالاً از طریق تنظیم عملکرد APC و تأثیر مستقیم بر سلول‌های CD8 T تقویت نمود.

مطالعات اخیر نشان می‌دهند سلول‌های CD8 T مخصوص اپیتوپ‌های H2-d آنتی‌زن ترشح شده ۴ TB10.4 و ESAT6 به تعداد قابل توجهی در موس‌های آلوده شده به توبرکلوزیس رخ می‌دهند و با استفاده از تترامیرها قابل کشف هستند (امکانات تترامیر، مرکز واکسیناسیون امروی، آتلانتا، جرجیا، ایالات متحده آمریکا) (وودورث و همکاران، ۲۰۰۸؛ باکرو، ۲۰۱۲؛ جاگاناث و باکرو، ۲۰۱۲). BCG و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هر دو TB10.4 و ESAT6 را ترشح می‌کنند در حالی که فقط مایکوباکتریوم توبرکلوزیس آنتی‌زن ESAT6 را ترشح می‌کند. تصویر ب ۱۵,۷ نمایش می‌دهد موس‌هایی که به آنها راپامایسین و BCG داده شد شمار بالارفته تترامیر مخصوص سلول‌های CD8 T را در اعضا نشان دادند. به طرز چشمگیری، وقتی شمار مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ریه افت نمود، شمار سلول‌های CD8 T مخصوص TB10.4 از ۱۲٪ به ۳٪ کاهش یافت، اما شمار سلول‌های CD8 T مخصوص ESAT6 از ۷٪ به ۴٪ پایین آمد. این مشاهده با نمایش پیشین منطبق است که سلول‌های CD8 T مخصوص TB10.4 با محافظت در برابر توبرکلوزیس در موس‌ها همبستگی دارد، و آنها هنگام تماس با ماکروفازهای آلوده دستخوش سیتولیز می‌شوند. علاوه بر این، شمار سلول‌های CD8 T مخصوص تترامیر در

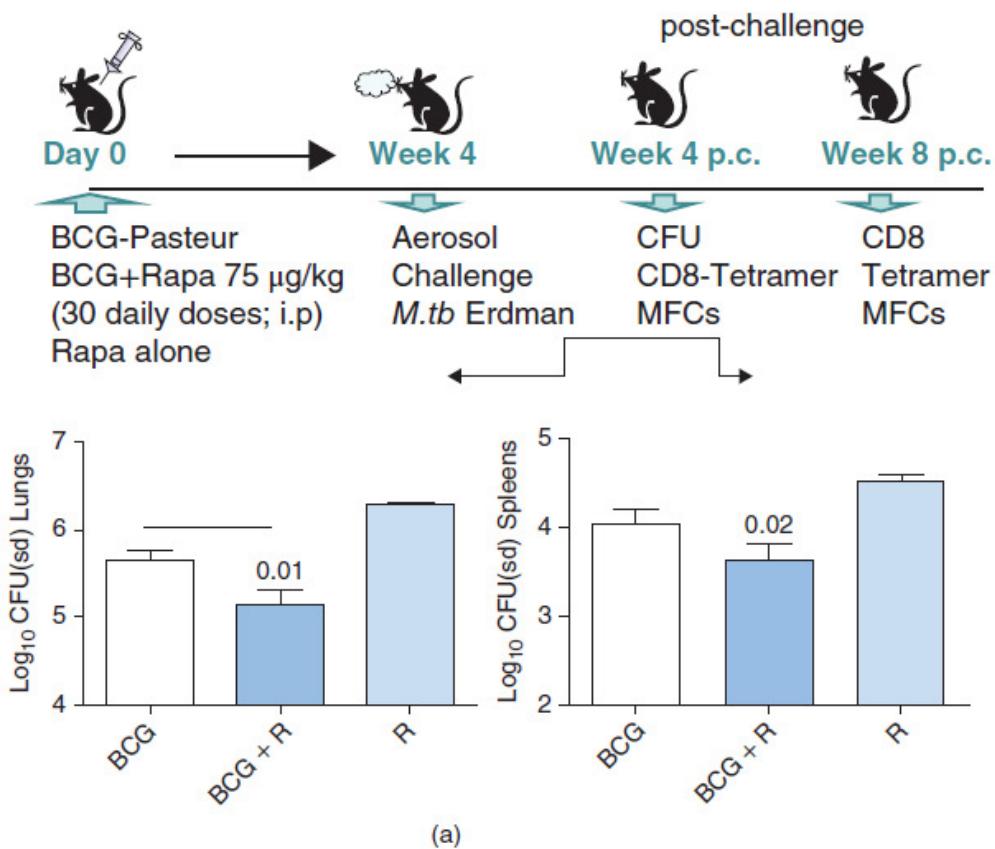
طحال‌ها پیش از هشت هفته افزایش یافت، که این حقیقت را که راپامایسین به‌طور تصاعدی پاسخ‌های حافظه در قسمت لنفوئید را گسترش می‌دهد پشتیبانی می‌نماید.

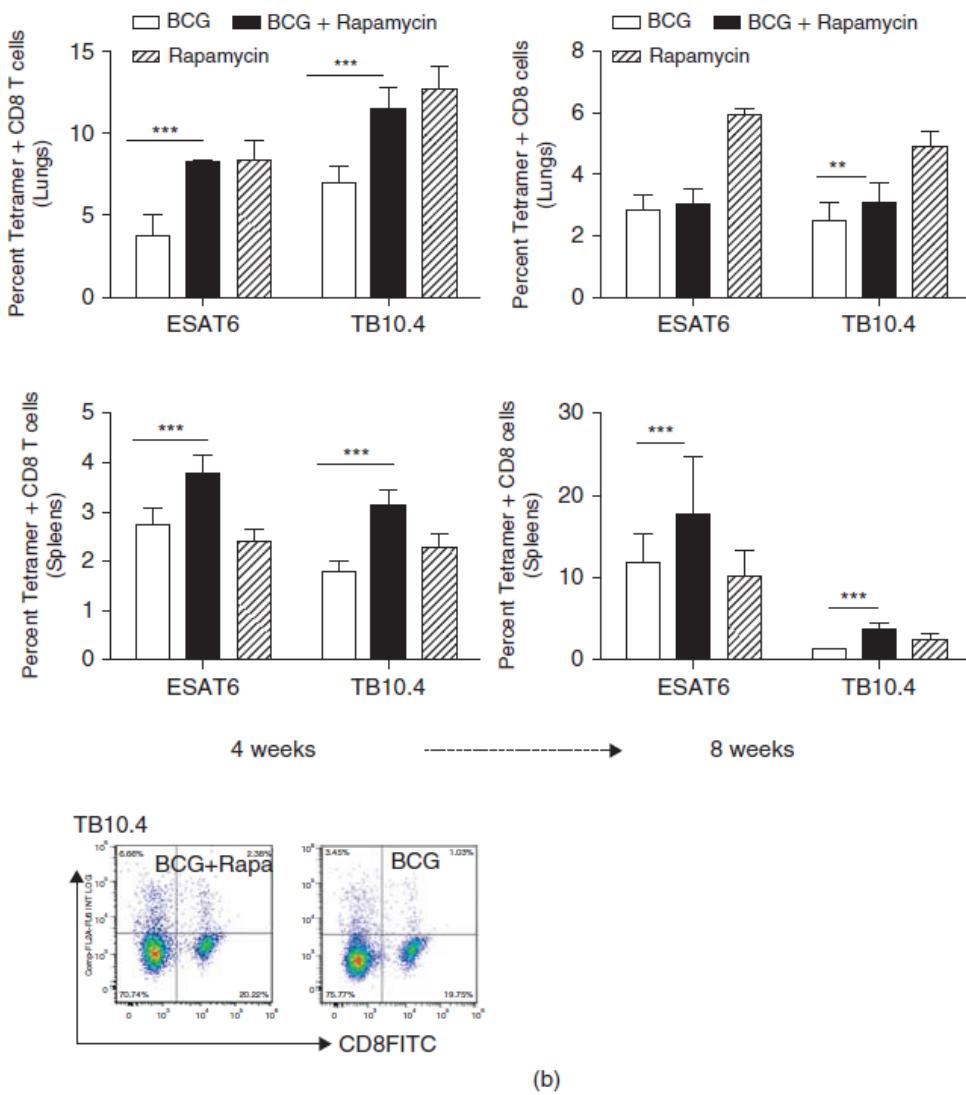
پژوهش‌های اخیر اشاره دارند که انتقال سلول‌های T مؤثر به پیش‌ساز سلول‌های T حافظه تحت شرایط تعریف شده رخ می‌دهد که احتمالاً توسط هر دو مورد حذف عامل بیماریزا و عوامل رونویسی درون سلولی T-bet و Eomesodermin (Eomes) دیکته می‌شوند (أباز و لفرانکوس، ۲۰۱۰؛ کیچ و کویی، ۲۰۱۲). ابتدا عفونت تا حد زیادی توسط مؤثرها کنترل می‌شود، که سیگنال فرستادن‌های تداعی‌کننده مدام از سوی APC‌ها به سلول‌های CD8 T را حذف کرده یا کاهش می‌دهند. دوم، شاید بخاطر سیگنال فرستادن سایتوکاین، یک جابجایی از سوی یک مؤثر به درون یک فنوتیپ حافظه که توسط T-bet و Eomes تنظیم می‌شود، اتفاق بیفتد. در حمایت از این مشاهده، سلول‌های CD8⁺ T-bet فاقد به عنوان سلول‌های حافظه دارای عمر طولانی تمایز تقویت شده‌ای را نشان می‌دهند. از این گذشته، موش‌های دارای کمبود Eomes قابلیت محدودی در رقابت برای قسمت‌های حافظه مخصوص عامل بیماریزا در سلول‌های CD8 T دارند (بانرجی و همکاران، ۲۰۱۰).

این مشاهدات ما را به سمت بررسی شمارش سلول‌های CD8 T-bet⁺ CD8⁺ Eomes⁺ هدایت کردند که از نظر عملیاتی بصورت سلول‌های T مؤثر با عمر کوتاه (SLECs) و پیش‌ساز حافظه سلول‌های T مؤثر (MPECs) تعریف می‌شوند (کیچ و کویی، ۲۰۱۲) (تصویر ث ۱۵,۷). راپامایسین تجمع زودهنگام (چهار هفته) Eomes⁺ CD8 MPECs را بعد از عفونت در ریه‌ها افزایش داد که بعداً در طحال‌ها پایدار ماند. همزمان، گسترش قوی CD8 SLECs را بین چهار تا هشت هفته حفظ نمود. گسترش فنوتیپ‌های MPECs و CD8 SLECs با اثرات مفید شناخته شده راپامایسین بر سلول‌های CD8 منطبق است و با کنترل بهتر توبرکلوزیس در موشهایی که به آنها راپامایسین و BCG داده شد، همبستگی دارد (اراکی و همکاران، ۲۰۰۹؛ رائو و همکاران، ۲۰۱۰). به طرز جالبی، راپامایسین در ترکیب با BCG همچنین SLECs و CD4 MPECs را افزایش می‌دهد، بویژه در میان ارگان‌های لنفوئیدی که به نظر می‌رسد قبل از ۸ هفته در ریه‌ها خانه می‌کنند (تصویر ث ۱۵,۷). پیشنهاد شده است که سلول‌های CD4 T Eomes⁺ سیتولیتیک باشند. از آنجایی که مشخص نیست راپامایسین به‌طور مفیدی بر سلول‌های CD4 T اثر بگذارد، این داده‌ها نشان می‌دهد راپامایسین به احتمال زیاد عملکرد APC‌ها را در بدن موجود زنده تقویت نموده است، در نتیجه توانایی آنها را به سمت گسترش پاسخ‌های سلول

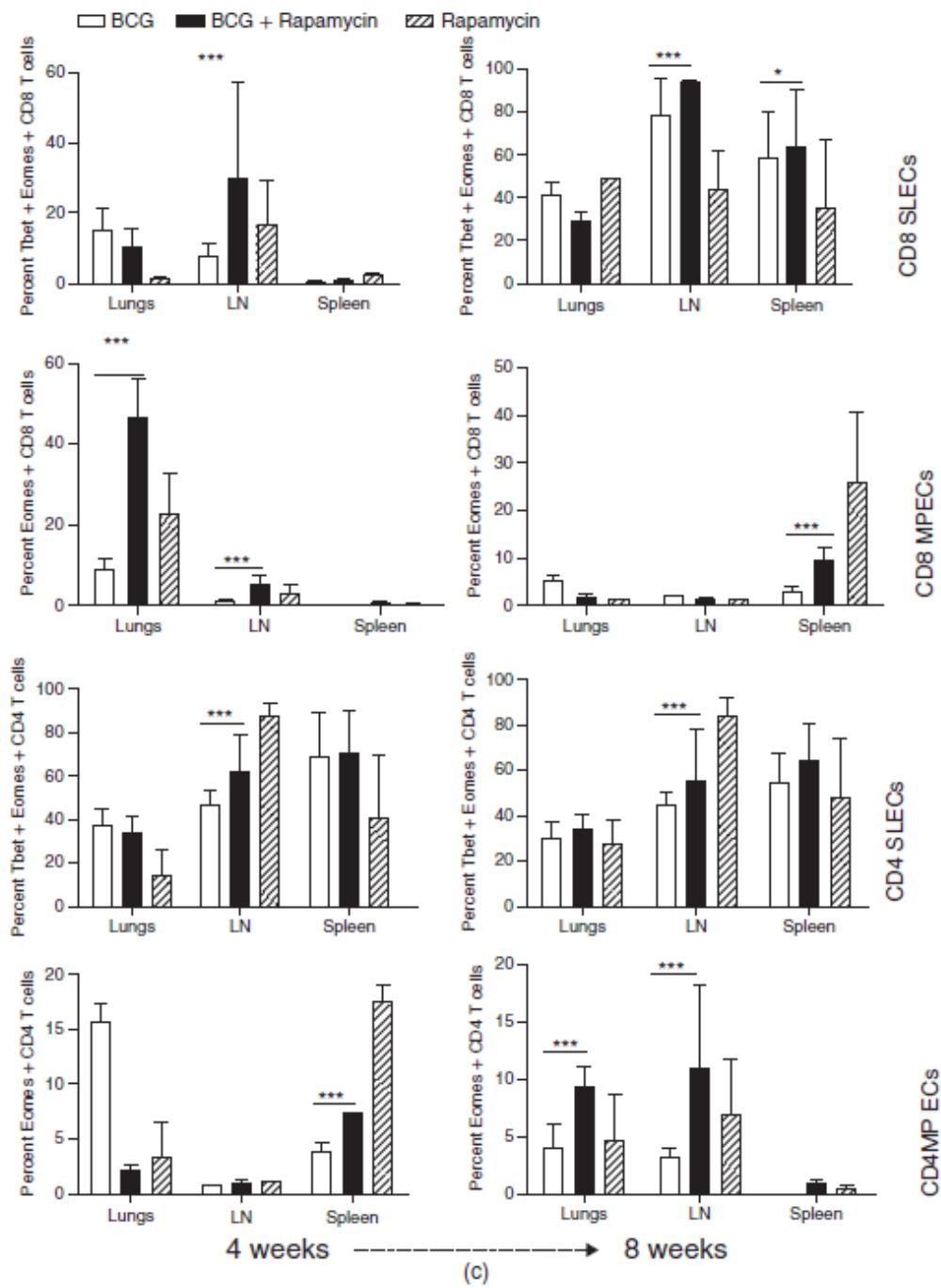
فصل ۱۵: اتوفاژی، کارایی واکسن BCG را افزایش می‌دهد

CD4 T از طریق ارائه بهتر آنتیژن پیش می‌برد. در مجموع، این مشاهدات اشاره دارد که راپامایسین یک عملکرد بدیع و دوگانه در افزایش سلول‌های CD4 T و CD8 در موشهای دارد که کنترل مؤثرتر توبرکلوزیس را امکان‌پذیر می‌سازد (باکرو، ۲۰۱۲).





فصل ۱۵: اتوفاژی، کارایی واکسن BCG را افزایش می‌دهد



تصویر ۱۵,۷ تجویز همزمان واکسن BCG و راپامایسین باعث محافظت بهتر در برابر سل می‌شود که با افزایش پاسخ سلول‌های CD4 و CD8 T ارتباط دارد. موش‌های C57BL/6 با BCG به تنها یکی با واکسن BCG واکسینه شدند و سپس ۳۰ تزریق روزانه راپامایسین برای آنها انجام گرفت (دوزهای داخل صافاقی: ۷۵ میکروگرم بر کیلوگرم). در روز ۳۲، تعداد ۱۰۰ واحد تشکیل دهنده کلیی باکتریایی (CFU) برای هر موش *M. tuberculosis* بمنظور تعیین حفاظت، در چالش آتروسل قرار گرفتند. چهار هفته بعد، موش‌ها کشته شدند و اندام‌ها (مشخصاً ریه‌ها، غدد لنفاوی (LN)، طحال) همگن گردیده و برای واحد تشکیل دهنده کلیی باکتریایی

(CFU) با آبکاری بر روی آگار 7H11 7 قرار گرفتند که به صورت \log_{10} CFU در هر اندام بیان می‌شد. سلول‌های T حاصل از اندام‌های موش کشته شده در هفته‌های ۴ و ۸ نیز با استفاده از فلوسیتومتری آنالیز شدند. (a) درمان همزمان راپامایسین به دنبال واکسن BCG باعث پاکسازی بهتر *M. tuberculosis* از هر دو اندام شد (مقدار p با استفاده از ANOVA دو طرفه در مقابل گروه BCG تنها، تعیین گردید؛ $n = 5$ موش در هر گروه). درمان صرفاً با راپامایسین، هیچ اثر باکتری کشی بر تعداد اندام‌های *M. tuberculosis* ندارد زیرا این موش‌ها رشد بیشتر از $6\log_{10}$ را برای *M. tuberculosis* در ریه‌ها و بیشتر از $4/5\log_{10}$ در طحال نشان می‌دهند. (b) سلول‌های T ۴ و ۸ هفته پس از چالش، با استفاده از تترامرهای اختصاصی برای آنتی‌زن‌های ESAT6 و TB10.4 آنالیز شدند (تاسیسات Emory، مرکز واکسن Tetramer، جورجیا، ایالات متحده آمریکا). در هفته چهارم، هم ریه‌ها و هم طحال موش‌های واکسینه شده با BCG-راپامایسین حاوی تعداد بیشتری از سلول‌های CD8 T اختصاصی تترامر (TB10.4 و ESAT6) بودند (چهار موش در هر گروه؛ $p < 0.009$ ، ***؛ $p < 0.01$ ، **؛ آزمون t). سلول‌های CD8 T اختصاصی تترامر در هفته هشتم در ریه‌ها کاهش می‌و در طحال افزایش می‌یابند. نمودارهای نقطه‌ای سلول‌های CD8 T اختصاصی TB10.4 را در ریه‌ها نشان می‌دهند. (c) سلول‌های T برای سلول‌های CD4 و CD8 رنگ‌آمیزی شدند که T-bet و Eomes درون سلولی را بیان می‌کنند، و به ترتیب مارکرهای سلول‌های T موثر کوتاه‌عمر (T-bethi SLECs) و سلول‌های T موثر پیش‌ساز حافظه (Eomes hi MPECs) می‌باشند. در هفته چهارم، راپامایسین باعث افزایش سطح BCG-SLECs را در ریه‌ها شد، اما CD8-MPECs را در طحال و غدد لنفاوی در اندام‌های لنفاوی افزایش داد. علاوه بر این، BCG-راپامایسین تعداد CD4-SLEC‌ها در غدد لنفاوی و تعداد CD4-MPEC‌ها در ریه و غدد لنفاوی را تا هفته هشتم افزایش داد که نمایانگر افزایش بازگشت به ریه هاست (به بخش آبکاری مراجعه کنید).

بحث و گفتگو

از آنجایی که راپامایسین اتوفاژی را در APC‌ها فعال نمود و ارائه آنتی‌زن و ترشح IL-1 β را تقویت نمود، انتظار می‌رفت DC‌های محتوى واکسن BCG زنده قادر باشند پاسخهای ایمنی بهتری در برابر عفونت توبرکلوزیس در موش‌ها ایجاد نمایند. اگرچه واکسن‌های DC علیه سرطان استفاده شده‌اند، با درنظر گرفتن شمار عظیم افراد مبتلا به توبرکلوزیس، کاربرد آنها در پیشگیری از عفونت شاید بخارط دلایل لجستیک محدود باشد (آمیل و همکاران، ۲۰۱۲). از این رو، ما بدنال ارزیابی راپامایسین به عنوان یک القاکننده بالقوه اتوفاژی در موش‌ها بودیم. مطالعات اولیه نشان دادند راپامایسین باید حداقل در ده دوز روزانه داده شود تا به طور مفیدی پاسخهای ایمنی در موشهای را تحت تأثیر قراردهد (باکرو، ۲۰۱۲). این با پژوهش‌های چاپ شده مطابقت داشت (راؤ و همکاران، ۲۰۱۰). به طور جالبی، چندین تجویز روزانه دوز پایین راپامایسین بدنال واکسن BCG هر دو مورد پاسخهای سلول T CD4 و CD8 را در موش‌ها تقویت می‌نماید، که دفاع بهتری را در برابر توبرکلوزیس امکان‌پذیر می‌سازد (باکرو، ۲۰۱۲؛ جاگاناث و باکرو، ۲۰۱۲).

فصل ۱۵: اتوفاژی، کارایی واکسن BCG را افزایش می‌دهد ۳۱۷

از آنجایی که راپامایسین تأثیر مفید بر سلول‌های CD4 T شناخته نمی‌شود، نتیجه می‌گیریم تجویز مکرر راپامایسین عملکرد APC در بدن موجود زنده را به طور مثبتی تحت تأثیر قرار می‌دهد، سلول‌های CD4 T را تقویت می‌نماید، و احتمالاً بر mTOR سلول‌های CD8 T قطعاً اثر می‌گذارد (اراکی و همکاران، ۲۰۰۹؛ پیتر و همکاران، ۲۰۱۰). به این ترتیب، این آزمایشات این مشاهده را تأیید می‌کنند که فعالسازی اتوفاژی در بدن موجود زنده به شیوه‌ای کنترل شده می‌تواند پاسخهای ایمنی را برای کنترل بهتر توبرکلوزیس منحرف نماید.

نتایج

این مطالعه نشان می‌دهد با امکانپذیر نمودن بهبود دسته دسته کردن واکسن در قسمت‌های پروتئولیتیک APC‌ها از طریق القای اتوفاژی، اثربخشی واکسن BCG می‌تواند افزایش یابد. این فرآیند به تقویت تولید اپیتوپ پیتید و ارائه به مسیرهای وابسته به MHC-II و افزایش پاسخهای آشکار سلول CD4 T در هر دو مورد آزمایشگاه و موش‌ها منتهی می‌شود. چون مکانیسم‌های فرآوری و ارائه پیتید به سلول‌های CD4 T به طور کلی یک مکانیسم متداول را دنبال می‌نمایند، ما حدس می‌زنیم مکانیسم‌های اتوفاژی شاید بتوانند جهت آغاز ایمنی‌زای سایر بیماری‌ها درون سلولی استفاده شوند مانند لیستریا، سالمونلا و شبیگلا. همچنین قابل تصور است که بسیاری از این بیماری‌ها مکانیسم‌هایی بمنظور تداخل در اتوفاژی دارند که زنده ماندن آنها را امکانپذیر می‌سازد (دریتیک و لوین، ۲۰۰۹). ظهور شیوه‌های جدیدتر القای اتوفاژی از طریق یوبی کوئیتین و فرآیندهای وابسته به شاپرون، استفاده از پیتیدهای القاکننده اتوفاژی نشأت‌گرفته از بکلین ۱، و درک بهتر مکانیسم‌های درون سلولی اتوفاژی، طراحی بهتر واکسن‌های ایمنی‌زا و اثربخش را امکانپذیر خواهد ساخت.

قدرتانی و تشکر

این مطالعه با حمایت AI49534 و AI78420 انجام شد. نویسنده‌گان از هدیه سلول‌های T BB7 T از طرف دکتر سی دبلیو هاردینگ، دانشگاه کیس وسترن رزرو، ایالات متحده قدردانی می‌نمایند.

فصل ۱۶

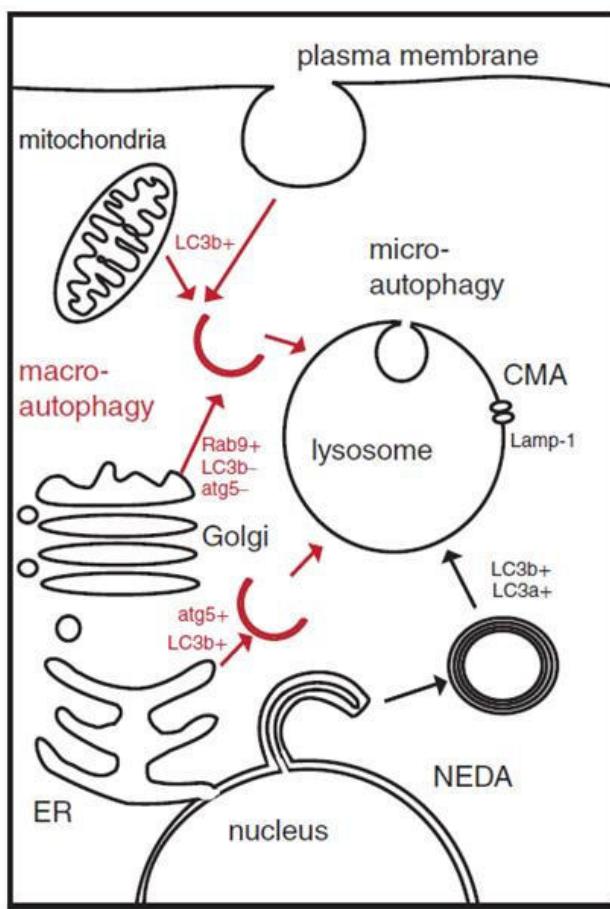
مشارکت اتوفارزی جهت ایمنی ذاتی و تطبیقی: یک بررسی اجمالی

اتوفارزی: مسیرهای مختلف به سوی هدف یکسان؟

اصطلاح "اتوفارزی" برای تجزیه لیزوژومی اجزای خود سلول اخیراً تولد پنجاه سالگی اش را جشن گرفته است (کلاینسکی، ۲۰۰۸). نصف دهه تحقیق به ما کمک کرده است تا بفهمیم نه یک مسیر اتوفارزی بلکه دست کم سه دسته اصلی اتوفارزی وجود دارد. ماکرواتوفارزی محتوای سیتوپلاسمی را در یک وزیکول می‌پیچد که بعد به یک قسمت لیتیک منتقل می‌شود، میکرواتوفارزی مستقیماً محمولة سیتوپلاسمی را از طریق یک فرآیند جوانه‌زنی^۱ به درون لیزوژوم می‌برد، و اتوفارزی، بدون بازآرایی غشا، بواسطه شاپرون پروتئین‌ها را از یک طرف به طرف دیگر غشای لیزوژومی منتقل می‌کند (تصویر ۱۶,۱ را ببینید) (درتیک و لوین، ۲۰۰۹؛ یانگ و کلاینسکی، ۲۰۱۰). به عبارت دیگر قسمت لیزوژومی لیتیک می‌تواند بخواهد غذایش را تحويل دهنده، بیرون آن را بخورد، یا حتی توسط یک چاپرون به او خورانده شود. طی دو دهه گذشته گزینه تحويل ماکرواتوفارزی توجه زیادی توسط جامعه پژوهشی بین‌المللی به خود جلب نموده است و تمرکز این بخش خواهد بود.

^۱ Budding process: فرآیند جوانه‌زنی

منبع غشای جداسازی که وزیکول ماکرواتوفاژی را تشکیل می‌دهد با حرارت مورد بحث بوده است. کاندیداها عبارتند از رتیکولوم آندوپلاسمیک (ER)، دستگاه گلثری، میتوکندریها، و غشای پلاسما (تصویر ۱۶,۱) (پلا آنتیلا و همکاران، ۲۰۰۹؛ هیلی و همکاران، ۲۰۱۰؛ هیاشی-نیشینو و همکاران، ۲۰۱۰؛ راوی کومار و همکاران، ۲۰۱۰؛ وان در وات و رگیوری، ۲۰۱۰؛ پن و همکاران، ۲۰۱۰). پیشرفتهای اخیر نشان می‌دهند که کم و بیش چندین مسیر ماکرواتوفاژی مشخص وجود دارد و هر یک ممکن است منبع غشای متفاوتی را استفاده نماید. در حالی که ماکرواتوفاژی وابسته به ATG5 احتمالاً غشای خود را از ER دریافت می‌کند (هیاشی-نیشینو و همکاران، ۲۰۱۰)، یک مسیر جدید که از Rab9 استفاده می‌نماید اما نه از ATG5، ATG7، LC3، یا LC3a، شاید از ترانس-گلثری نشأت بگیرد (نیشیدا و همکاران، ۲۰۰۹). دیگر مسیر اتوفاژی-LC3b و LC3a-positive که در سلول‌های آلوود به ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک رخ می‌دهد از پوشش هسته‌ای استفاده می‌کند (انگلیش و همکاران، ۲۰۰۹؛ رادتکه و همکاران، ۲۰۱۳). این داده‌ها با همدیگر اشاره دارند که وزیکول‌های اتوفاژی می‌توانند بوسیله مسیرهای مولکولی بسیار متفاوتی تشکیل شوند. با این حال صرف نظر از منشأ آنها، این وزیکول‌ها جهت تجزیه محتوای خود در نهایت باید به یک واکوئل لیتیک مانند یک اندوزووم نهایی یا یک لیزوزووم برسند. وسوسه‌کننده است درباره این حدس بزنیم که راههای مختلفی که اتوفاگوزوم می‌تواند شکل بگیرد، یک دستگاه به خوبی میزان شده و به طور متمایزی تنظیم گردیده را انعکاس می‌دهد، که قادر است به علامت‌های مشخصی واکنش نشان دهد و چندین عملکرد را به انجام برساند، که برخی از آنها در زیر مورد بحث قرار می‌گیرد.



تصویر ۱۶,۱ مکانیسم‌های اتوفاژی و منابع بالقوه غشاء. چندین مکانیسم متمایز از اتوفاژی شناخته شده‌اند. این مکانیسم‌ها شامل ماکرواتوفاژی، میکرواتوفاژی، اتوفاژی با واسطه شاپرون (CMA) و اتوفاژی با منشا پوشش هسته‌ای (NEDA) می‌باشند. از آنجایی که احتمالاً چندین بخش مختلف سلولی در غشای جداسازی تشکیل شده طی ماکرواتوفاژی تحت شرایط مختلف نقش دارند، ماکرواتوفاژی یک مسیر یکنواخت نیست. این تنوع بیشتر با تفاوت در دستگاه‌های سلولی که در این کار دخالت دارند، مشخص می‌گردد. توجه: اندیس بالا + نشان می‌دهد که پروتئین مربوطه در گیر است و - نمایانگر عدم در گیری آن می‌باشد.

زینوفاژی: این دنیا، سگ را می‌خورد است

احتمالاً مستقیم‌ترین روش برای مبارزه با عفونت میکروبی از طریق تجزیه خود عامل بیماری زا است. این استراتژی دفاعی از طریق زینوفاژی قابل دستیابی می‌باشد، یک مسیر اتوفاژی که به‌طور خاص میکروارگانیسم‌های مهاجم را هدف قرار می‌دهد و تجزیه لیزوژومی آنها را تسهیل می‌نماید. مکانیسم‌های زینوفاژی متنوع هستند و تاحد زیادی به موضعی‌سازی زیرسلولی عامل بیماریزا بستگی دارد (لوین، ۲۰۰۵). عوامل بیماریزا سیتوسوکلیک می‌توانند توسط غشای

جداسازی تازه شکل گرفته که ویژگی ماکرواتوفاژی است برداشته شوند. عوامل بیماریزایی که بواسطهٔ فاگوسیتوز وارد سلول می‌شوند و داخل واکوئول فاگوسیتیک می‌مانند وقتی پروتئین‌های اتوفاژی (مانند LC3 یا ATG5) در غشای فاگوزومی آنها به خدمت گرفته می‌شوند می‌توانند تجزیهٔ شوند، سپس این عناصر، بدون تشکیل یک وزیکول جدید، آمیزش واکوئول فاگوسیتیک با لیزوزوم‌ها را تسهیل می‌نماید، (سانخوان و همکاران، ۲۰۰۷). با این وجود، چرخهٔ زندگی بسیاری از عوامل بیماری زا دربرگیرندهٔ هر دو مرحلهٔ واکوئولی و سیتوسولیک است، بنابراین این فرآیندهای اتوفاژی دو به دو ناسازگار نیستند (کنادر و سلی، ۲۰۱۱). علاوه بر حذف عوامل بیماری زای مهاجم، زینوفاژی احتمالاً با تولید پیتیدهایی برای ارائهٔ آنتیزن، و شاید با محدود نمودن آسیب بافتی نیز، که یک پاسخ پیش‌التهابی قوی باعث آن می‌شود، در پاسخ ایمنی تطبیقی مشارکت دارد (لوین، ۲۰۰۵؛ کنادر و سلی، ۲۰۱۱؛ بیرن و همکاران، ۲۰۱۳؛ چوی و روی، ۲۰۱۳؛ جو و همکاران، ۲۰۱۳).

برخلاف برخی دیگر از شکل‌های اتوفاژی، زینوفاژی تاحد زیادی مخصوص زیرلایه است. تمایز قائل شدن بین دوست و دشمن بوسیلهٔ حداقل سه مکانیسم متفاوت قابل دستیابی می‌باشد: (۱) یوبی‌کوئیتینه شدن^۱ انتخابی عوامل بیماری زا که به دنبال آن اتصال به یک پروتئین وفق‌دهنده صورت می‌گیرد مانند سکوستوزوم/p62، NDP52، یا اپتی‌نورین که به نوبهٔ خود عوامل بیماریزای یوبی‌کوئیتینه شده را به LC3 وصل می‌کند و در نتیجهٔ وزیکول زینوفاژی نوظهور شکل می‌گیرد؛ (۲) یک تعامل مستقیم دستگاه اتوفاژی را به پروتئین‌های عامل بیماریزا متصل می‌نماید، همانطور که در مورد اتصال شیگلا IcsA به ATG5 صدق می‌کند؛ یا (۳) یک تعامل بین دستگاه اتوفاژی و عوامل بیماری زا بوسیلهٔ گیرنده‌های شناسایی الگو مانند گیرنده‌های Toll-like یا گیرنده‌های شناسایی الگوی سیتوسولیک علامت داده می‌شود (کنادر و سلی، ۲۰۱۱؛ چوی و روی، ۲۰۱۳).

اتوفاژی و گیرنده‌های Toll-like: یک تحریک دو طرفه

گیرنده‌های Toll-like (TLRs) بهتر توصیف شده‌ترین گیرنده‌های شناسایی الگو هستند. پاسخ‌های TLR، سیگنال فرستادن به پایین دست، و خروجی‌های مؤثر^۲ جهت پاکسازی اثربخش و زودهنگام عوامل بیماریزا موردنیاز هستند. اخیراً آشکار شد که TLR و اتوفاژی در پاسخ به

^۱ یوبی‌کوئیتینه شدن، فراگیر شدن: Ubiquitination

^۲ انگیزه رسان، مؤثر: Effector

فصل ۱۶: مشارکت اتوفاژی جهت ایمنی ذاتی و تطبیقی: یک بررسی اجمالی ۳۲۳

PAMPs (الگوهای مولکولی مرتبط با عامل بیماری زا) باهم مشارکت می‌نمایند. برای مثال تحریک TLR4 اتوفاژی را در ماکروفاژهای موش سانان القامی کند (سانخوان و همکاران، ۲۰۰۷؛ ژو و همکاران، ۲۰۰۷؛ دلگادو و همکاران، ۲۰۰۸؛ شی و کرل، ۲۰۰۸)، و تحریک LPS باعث هم‌منطقه نمودن مایکروبکتریوم توبرکلوزیس با اتوفاگوزومها می‌گردد (ژو و همکاران، ۲۰۰۷). با بررسی مشارکت TLRهای خاص و القای اتوفاژی، دلگادو و همکارانش نشان دادند آگونیستهای TLR3، TLR4، TLR7 القاکننده اتوفاژی در ماکروفاژهای موش سانان هستند، در حالی که آگونیستهای TLR1/2، TLR5، یا TLR9 نیستند. آنها همچنین دریافتند اتوفاژی وابسته به لیگاند TLR7، حذف اتوفاژیک سویه مایکروبکتریوم توبرکلوزیس واکسن BCG را بهبود می‌بخشد (دلگادو و همکاران، ۲۰۰۷).

علیرغم اتفاق نظر روبه رشد در مورد اینکه اتوفاژی می‌تواند با سیگنال فرستادن TLR در بسیاری از انواع سلول فعال شود، در برخی سلول‌های اصلی تحریک TLRهای جداگانه القاکننده یک پاسخ اتوفاژیک آشکار نیست. در سلول‌های دندریتیک پلاسماسیتوئیدی تحریک مستقیم TLR7 اتوفاژی را القا نمی‌کند (لی و همکاران، ۲۰۰۷). سائیتو و همکارانش نیز گزارش نمودند LPS قادر به القای اتوفاژی در ماکروفاژهای اصلی نیست (سائیتو و همکاران، ۲۰۰۸). شاید بتوان این اختلاف را با این واقعیت توضیح داد که برخی سلول‌ها یا میزان اتوفاژی بنیادی بالایی دارند یا مسیرهای علامت‌دهنده در حال رقابت که در این سلول‌ها القامی شوند می‌توانند اتوفاژی را خنثی نمایند.

علاوه بر تحریک شدن بوسیله TLRها، اتوفاژی می‌تواند به نوبه خود سیگنال فرستادن TLR را فعال نماید. بعد از اینکه اتوفاژی، PAMPهای سیتوپلاسمی را می‌گیرد و به مسیر اندوزومی تحويل می‌دهد، محصولات میکروبی قادر هستند TLRهای اندوزومی مانند TLR7 را تحریک کنند (لی و همکاران، ۲۰۰۷).

علاوه بر شرکت سیگنال فرستادن TLR در ماکروآتوفاژی مرسوم، TLRها نیز به نظر می‌رسد فرآیند غیرمرسومی، با اصطلاح فاگوسیتوز مرتبط با LAP (LC3)، را میانجیگری می‌کنند، که LAP را مستقیماً برای فاگوزومها به خدمت می‌گیرد (سانخوان و همکاران، ۲۰۰۷). طی LAP، LC3 یک میکرووارگانیسم یا یک لیگاند TLR بوسیله فاگوسیتوز مرسوم گرفته می‌شود، و سپس دستگاه اتوفاژی بلوغ فاگوزوم مرسوم را از طریق مسیری شبیه آن که برای اتوفاگوزومهای مجدداً

شکل گرفته استفاده می‌شد، تقویت می‌نماید. اتوفاژی که توسط TLRها به همراه LAP برانگیخته می‌شود ارائه آنتیزن را افزایش می‌دهد (جاگاناث و همکاران، ۲۰۰۹؛ لی و همکاران، ۲۰۱۰). در سلول‌های دندریتیک، LAP نیز حمل TLR9 به درون قسمت‌های سیگنال فرستنده تخصص یافته اینترفرون (IFN) را بهبود می‌دهد (سانخوان و همکاران، ۲۰۱۲).

از این رو، به نظر می‌آید گفتگوی متقابل گسترده‌ای بین TLRها، اتوفاژی و پاسخهای ایمنی ذاتی وجود دارد. TLRها و اتوفاژی یکدیگر را تحریک می‌کنند که خروجی هر دو سیستم را در پاسخ به تهاجم میکروبی شدت می‌بخشد.

اتوفاژی و ارائه آنتیزن: فریادی برای کمک جهت زدودن مهاجمین بیماری زا

اثربخشی پاسخهای ایمنی تطبیقی با واسطه‌گری سلول T به توانایی سلول‌های ارائه‌دهنده آنتیزن جهت نمایش پیتید و مجموعه‌های سازگاری بافتی اصلی (MHC‌ها) روی سطح خود بستگی دارد. در حالی که مولکول‌های کلاس ۱ MHC بوسیله تمام انواع سلول بیان می‌شوند و توسط سلول‌های CD8⁺ T شناسایی می‌گردند، مولکول‌های کلاس ۲ MHC به سلول‌های ارائه‌دهنده آنتیزن (سلول‌های B، ماکروفازها، سلول‌های دندریتیک) محدود می‌شوند، که سپس توسط سلول‌های CD4⁺ T شناسایی می‌گردند (نیفجس و همکاران، ۲۰۱۱). رفت و آمد غشایی در هر دو مورد فرآوری و ارائه درونی و بیرونی آنتیزن نقشی کلیدی ایفا می‌نماید (تصویر ۱۶,۲ را ببینید).

در ابتدا، دو مسیر مجازی ارائه آنتیزن پیشنهاد شد. آنتیزن‌های درونی، از جمله پروتئین‌های ویروسی سنتزشده توسط سلول‌های آلوده، بوسیله پروتئازوم در سیتوپلاسم تجزیه می‌شوند. پیتیدهای حاصل به درون لومن رتیکولوم درون پلاسمایی تغییر مکان داده می‌شوند، جایی که آنها روی مولکول‌های کلاس ۱ MHC بار زده شده و از طریق مسیرهای ترشحی به سطح سلول منتقل می‌گردند (تصویر آ ۱۶,۲) (یورک و همکاران، ۱۹۹۶). بر عکس، آنتیزن‌های بیرونی بوسیله اندوسیتوز یا فاگوسیتوz درونی می‌شوند، از طریق هیدرولیز در قسمت‌های درون واکوئولی لیتیک فرآوری می‌گردند، و بعد پیتیدهای حاصله روی مولکول‌های کلاس ۲ MHC بار زده شده و به سطح سلول تغییر مکان می‌دهند (تصویر ب ۱۶,۲) (نیفجس و همکاران، ۲۰۱۱).

فصل ۱۶: مشارکت اتوفاژی جهت اینمی ذاتی و تطبیقی: یک بررسی اجمالی ۳۲۵

متعاقباً تفکیک سختگیرانه این دو مسیر جهت توضیح توانایی سلول‌ها بمنظور ارائه آنتی‌ژن‌های درونی روی مولکول‌های کلاس I MHC، فرآیندی که به عنوان ارائه متقاطع اطلاق می‌شود، مجدداً بررسی شد (تصویر ث ۱۶,۲) (کریس ول و همکاران، ۲۰۰۴). در سال‌های اخیر آشکار شد که آنتی‌ژنهای درونی نیز می‌توانند توسط اتوفاگوزوم‌ها گرفته و روی کلاس II MHC ارائه شوند (فصل ۱۸ نوشته کریستین مونتر را ببینید). اتوفاژی در فرآوری و ارائه آنتی‌ژن کلاس I MHC هم مشارکت دارد (تصویر د تا ف ۱۶,۲).

اولین مدرکی که اتوفاژی در ارائه آنتی‌ژن مشارکت دارد از مطالعات ارائه درونی آنتی‌ژن کلاس II MHC نشأت گرفت (تصویر د ۱۶,۲) (نیمرجان و همکاران، ۲۰۰۳؛ پالودان و همکاران، ۲۰۰۵؛ اشمیت و همکاران، ۲۰۰۷). وقتی از اتوفاژی ممانعت شد، ارائه آنتی‌ژن نئومایسین فسفوترانسفراز سیتوسولیک روی کلاس II MHC در تبارهای سلول تغییرشکل یافته با ویروس اپشتین-بار بشدت کاهش یافت (نیمرجان و همکاران، ۲۰۰۳). آنتی‌ژن هسته‌ای ۱ ویروس اپشتین-بار نیز توسط تجزیه لیزوژومی فرآوری گردید، و بازداری از اتوفاژی ارائه این آنتی‌ژن را روی کلاس II MHC کاهش داد (پالودان و همکاران، ۲۰۰۵).

مطالعات شیستشوی پیتید، موجودی لیگاندهای ارائه شده به سلول‌های CD4⁺ T را در شرایط کشت مختلف توصیف می‌نماید. اتوفاژی ناشی از القای گرسنگی مخزن لیگاندهای II MHC را به سمت نمایش مکررتر پیتیدهای داخل سلولی تغییر می‌دهد، از جمله پروتئین LC3 اتوفاژی (دنگجل و همکاران، ۲۰۰۵). این غنی‌سازی برای اپیتوب‌های سیتوسولیک نشان می‌دهد که افزایش اتوفاژی یا هدف قراردادن آنتی‌ژن‌ها جهت اتوفاگوزوم‌ها توسط LC3 می‌تواند ارائه آنتی‌ژن II MHC را بالا ببرد. علاوه بر ماکرواتوفاژی، یک مطالعه اخیر نشان داده است که اتوفاژی با واسطه شاپرون (CMA) نیز می‌تواند منجر به ارائه کلاس II MHC خود-آنتی‌ژن‌های سیتوسولیک گردد (ژو و همکاران، ۲۰۰۵).

گذشته از مشارکت در ارائه آنتی‌ژن درونی کلاس II MHC، دستگاه اتوفاژی در ارائه آنتی‌ژن‌های بیرونی کلاس II MHC نیز درگیر است (تصویری ۱۶,۲). پژوهش‌های متعددی نشان می‌دهند که ماکرواتوفاژی یا عناصر خاصی از دستگاه مولکولی‌اش در تحويل کارآمد فاگوزوم‌ها به لیزوژوم‌ها برای فرآوری آنتی‌ژن‌های ویروسی یا باکتریایی خارج سلولی مشارکت دارند. سلول‌ها ممکن است یا بوسیله تشکیل مجدد اتوفاگوزوم‌ها یا از طریق به خدمت‌گرفتن مستقیم عناصر

دستگاه ماکرواتوفاژی جهت غشای فاگوزومی، آنتیژن‌های خارجی را بگیرند (بالانچت و همکاران، ۲۰۱۰؛ کونی و همکاران، ۲۰۱۰؛ لی و همکاران، ۲۰۱۰). همانطورکه در بالا اشاره شد، سیگنال فرستادن TLR نیز از طریق LAP مسیر اتوفاژی را به فاگوسیتوز وصل می‌نماید (تصویری ۱۶,۲).

اگرچه رابطه بین اتوفاژی و ارائه آنتیژن روی کلاس MHC۲ به خوبی مستندسازی شده، نقش اتوفاژی در ارائه کلاس MHC۱ بسیار کمتر درک گردیده است. اتوفاژی قطعاً در ارائه کلاس MHC۱ در پیتیدهای ویروسی خارجی در ماکروفاژهای آلوده نقش دارد (تصویر ف ۱۶,۲ (انگلیش و همکاران، ۲۰۰۹). یک تجزیه و تحلیل فراساختاری از ماکروفاژهای آلوده به ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ یک شکل جدیدی از اتوفاژی را نشان داد، که به آن اتوفاژی با منشا پوشش هسته‌ای اطلاق می‌شود (NEDA) (تصویر ۱۶,۲ را ببینید) (انگلیش و همکاران، ۲۰۰۹؛ راتکه و همکاران، ۲۰۱۳). به شیوه‌های بسیاری NEDA از ماکرواتوفاژی متمایز است و با تشکیل وزیکول‌های بسته‌شده با چهار غشایی که از پوشش هسته‌ای نشأت می‌گیرند مشخص می‌شود. همینطور، ماکرواتوفاژی برای فرآوری آنتیژن وابسته به TAP (انتقال دهنده مرتبط با فرآوری آنتیژن) پروتئین ویروسی بیرونی دیگری نیاز دارد که روی مولکول‌های کلاس MHC۱ ارائه می‌شود (تی و کانا، ۲۰۱۲). یک مطالعه پروتومیک کمی اخیر آشکار نمود که ماکروفاژهای فعال شده بوسیله فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α) تجزیه اتوفاژی میتوکندری‌ها را القا نمود و ارائه آنتیژن‌های میتوکندریایی درونی را روی کلاس MHC۱ افزایش داد (بل و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین ارائه کلاس MHC۱ با واسطه اتوفاژی یک مسیر مناسب ارائه آنتیژن برای چندین مورد مرتبط با ویروس و خود-آنتیژن‌ها است.

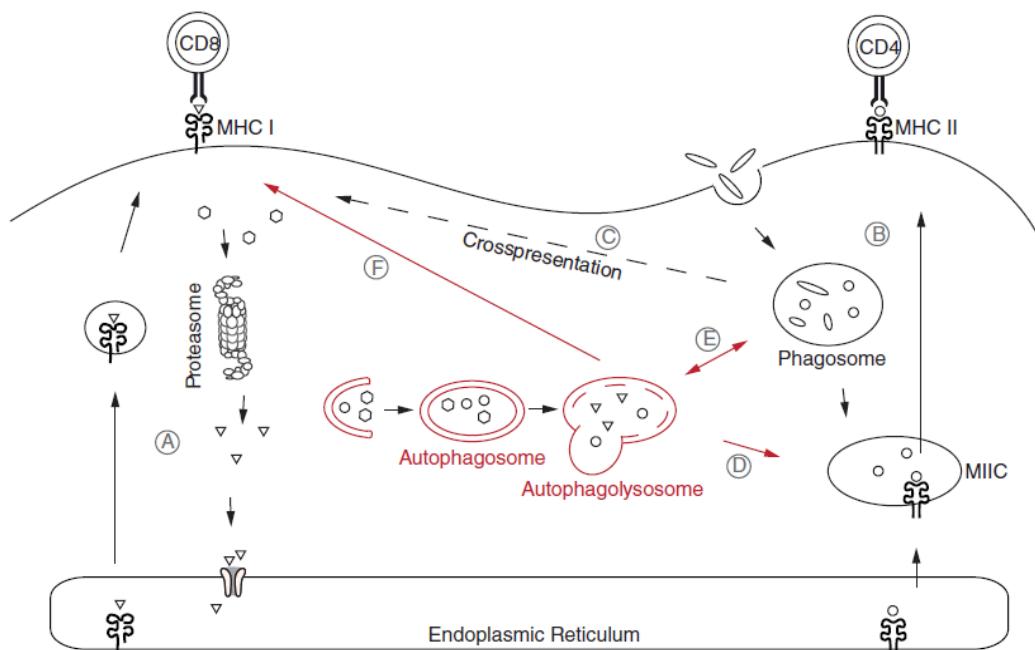
مشارکت اتوفاژی در ارائه متقطع کلاس MHC۱ احتمال دارد پیچیده باشد. یک گزارش نشان می‌دهد اتوفاژی، ارائه متقطع کلاس MHC۱ را در سلول‌های دندرتیک تحت تأثیر قرار نمی‌دهد (لی و همکاران، ۲۰۱۰)، درحالی که دو مطالعه دیگر نشان می‌دهند وقتی ماکرواتوفاژی در سلول‌های اهداکننده آنتیژن القا می‌شود ارائه متقطع آنتیژن‌های ویروسی و توموری افزایش می‌یابد (لی و همکاران، ۲۰۰۸؛ یول و همکاران، ۲۰۰۹). مشاهدات دوم ثابت نمود که اتوفاگوزومها به عنوان وسایل نقلیه مفیدی برای تحويل آنتیژن‌های بیرونی به مسیر ارائه متقطع، دست کم در سلول‌های اهداکننده آنتیژن، خدمت می‌کنند. بعلاوه، یک پژوهش اخیر

فصل ۱۶: مشارکت اتوفاژی جهت ایمنی ذاتی و تطبیقی: یک بررسی اجمالی ۳۲۷

نشان داد اتوفاژی در ارائه متقاطع آنتی‌زن OVA مرتبط با نانوذرات شرکت می‌کند و پیشنهاد نمود ارائه متقاطع در خود اتوفاگوزوم رخ می‌دهد (لی و همکاران، ۲۰۱۱).

علاوه بر تحویل و فرآوری آنتی‌زن، مسیر اتوفاژی ممکن است مولکول‌های کلاس I MHC را نیز بین غشای پلاسمما و قسمت‌های درون سلولی جابجا نماید. بویژه بازداری از اتوفاژی بیان سطحی مولکول‌های کلاس I MHC را افزایش می‌دهد (لی و همکاران، ۲۰۱۰).

در نتیجه، هر دو مورد فرآوری و ارائه آنتی‌زن کلاس I و کلاس II MHC (تصویر ۱۶,۲) و نیز رفت و آمد کردن کلاس I MHC را تعديل و تنظیم می‌نماید. از این گذشته، ماکرواتوفاژی می‌تواند فرآوری آنتی‌زن را نه تنها بوسیله افزایش مستقیم بلوغ فاگوزوم بلکه همچنین بوسیله تحویل هیدرولازها به لیزووزوم بهبود بخشد (ایرلند و همکاران، ۲۰۱۱). بنابراین اتوفاژی نقشی حیاتی برای تنظیم پاسخ‌های ایمنی ذاتی و تطبیقی فعال علیه هر دو عامل بیماری زای درون سلولی و بیرون سلولی بازی می‌کند.



تصویر ۱۶,۲ سهیم اتوفاژی در فرآوری و ارائه آنتی‌زن MHC کلاس‌های I و II. (a) آنتی‌زن‌های درونی در سیتوپلاسم و توسط پروتئازوم تجزیه می‌شوند. پیتیدهای حاصل به شبکه آندوپلاسمی (ER) تغییر مکان می‌دهند و در آنجا روی مولکول‌های MHC کلاس I بارگیری گردیده و در وزیکول‌ها به سطح سلول منتقل می‌شوند تا به سلول‌های CD8⁺ T ارائه گردند. (b) آنتی‌زن‌های بیرونی توسط اندوسیتوز یا فاگوسیتوز درونی می‌شوند، توسط هیدرولازها فرآوری می‌گردند و سپس قبل از تغییر مکان به سطح سلول و ارائه به سلول‌های

CD4+ T مولکول‌های MHC کلاس II بارگیری می‌شوند. (c) آنتی ژن‌های بیرونی را می‌توان روی MHC کلاس I نیز ارائه کرد، فرآیندی که به آن ارائه متقاطع می‌گویند. (d و e) اتوفاژی در ارائه و فرآوری آنتی ژن‌های درونی و بیرونی MHC کلاس II، از طریق تحویل آنتی ژن‌های درونی به قسمت‌های حاوی MHC کلاس II (MIIC) برای فرآوری آنتی ژن لیزوژومی و بارگیری MHC کلاس II آنتی ژن (d) و با تسهیل فرآوری آنتی ژن بیرونی برای ارائه MHC کلاس II از طریق فاگوسیتوز مرتب با LAP (LC3) کمک می‌کند(e). (f) اتوفاژی همچنین می‌تواند به ارائه آنتی ژن‌های درونی توسط مولکول‌های MHC کلاس I نیز کمک کند. آنتی ژن‌های درونی ممکن است از اتوفاگوزوم به سیتوزول منتقل گرددند تا وارد مسیر کلاسیک شوند یا پیتیدها ممکن است روی مولکول‌های MHC کلاس I در محفظه اتوفاگولیزوژوم بارگیری شوند.

اتوفاژی و اینفلامازوم‌ها: تنظیم دوسویه برای یک پاسخ ایمنی اثربخش

مسیرهای اتوفاژی و اینفلامازوم مکانیسم‌های قدیمی برای کنترل عوامل بیماری زای مهاجم هستند که، همانطور که بعداً کشف خواهیم نمود، بوسیله تنظیم دوسویه با هم ارتباط دارند. اینفلامازوم‌ها پلتفرم‌های فرستنده سیگنال کلیدی برای شناسایی علامت خطر هستند که سایتوکاین‌های پیش‌التهابی ایترلوکین ۱- β (IL-1 β) و ۱۸-IL را فعال می‌نمایند (لاتز و همکاران، ۲۰۱۳). اینفلامازوم‌های استاندارد گروهی از کمپلکس‌های پروتئینی مولتی‌مریک هستند که حاوی یک مولکول حسگر اینفلامازوم، پروتئین تطبیقی ASC، و کاسپاز ۱ می‌باشند. تشکیل مجموعه اینفلامازوم، بلوغ پیش‌ساز کاسپاز ۱ را راهاندازی می‌کند، پروتئازی که بعداً بصورت پروتئولیتیک سایتوکاین‌های پیش‌التهابی IL-1 β و ۱۸-IL را فعال و رهاسازی آنها را القا می‌نمایند. بیشتر کمپلکس‌های اینفلامازوم که تا به این تاریخ توصیف شده‌اند حاوی مولکول حسگر گیرنده NOD-like (NLRP1، NLRP3، NLRP6، NLRP7، NLRP12) هستند از جمله ASC و همکاران، ۲۰۱۱.

اتوفاژی یک تنظیم‌کننده مهم فعالیت اینفلامازوم است، اما مکانیسم‌هایی که بوسیله آنها اتوفاژی فعالیت اینفلامازوم را تنظیم می‌نماید هنوز تحت بحث و مجادله هستند. اتوفاژی قادر است به چندین روش در ترشح IL-1 β تداخل ایجاد کند. اولاً می‌تواند پیش‌ساز IL-1 β را تجزیه کند، درنتیجه تولید این سایتوکاین پیش‌التهابی توسط اینفلامازوم را به طور منفی تنظیم نماید (هریس و همکاران، ۲۰۱۲). ثانیاً، اتوفاژی همچنین بوسیله جداسازی اینفلامازوم‌های محتوی ASC و همکاران، ۲۰۱۱ میتوکندری‌ها با یکپارچگی از هم گسیخته، که بوسیله اتوفاژی پاکسازی نشدن گونه‌های واکنش

فصل ۱۶: مشارکت اتوفاژی جهت ایمنی ذاتی و تطبیقی: یک بررسی اجمالی ۳۲۹

دهنده به اکسیژن و DNA میتوکندریایی را رها می‌نمایند که اینفلامازوم‌ها را فعال و پاسخ‌های التهابی را القا می‌کنند (ناکاهیرا و همکاران، ۲۰۱۱؛ ژو و همکاران، ۲۰۱۱). همینطور وقتی اتوفاژی از طریق دارویی مهار می‌شود، یک دوز پایین فلازلین سیتوسولیک، ماکروفاژ مرگ سلولی پیش‌التهابی وابسته به کاسپاز ۱ یا پایروپتوز^۱ را راهاندازی می‌نماید (بیرن و همکاران، ۲۰۱۳).

یک گزارش اخیر نیز یک تعامل مشارکتی بین اتوفاژی و فعالسازی اینفلامازوم را توصیف می‌کند. دستگاه اتوفاژی در ترشح IL-1 β بالغ از طریق یک مسیر ترشحی غیراستاندارد مشارکت دارد (دوپان و همکاران، ۲۰۱۱).

در عوض، اتوفاژی نیز بوسیله عناصر اینفلامازوم تنظیم می‌گردد. به‌طور قابل توجه‌تری، نشان داده شده است که IL-1 β اتوفاژی را افزایش می‌دهد (انگلیش و همکاران، ۲۰۰۹؛ شی و کرل، ۲۰۱۰؛ پرال دکاسترو و همکاران، ۲۰۱۲). علاوه بر این، در مقایسه با سلول‌های نوع وحشی، ماکروفاژ‌هایی که فاقد یا پیش‌ساز کاسپاز ۱ یا پروتئین‌های NLR، شامل Naip5، NLRC4، یا HSP90 هستند در پاسخ به فلازلین سیتوسولیک تحويل داده شده توسط لژیونلاپنوموفیلا یا انتشار پتاسیم به خارج، تغییرات دائمی اتوفاژیک کمتری به نمایش می‌گذارند (بیرن و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین مسیرهای اتوفاژی و اینفلامازوم به‌طور واضحی یکپارچه می‌شوند تا ترشح سایتوکاین‌های التهابی و حذف استرس‌های سایتوزولیک که محرک التهاب هستند را کنترل نمایند.

مکالمه متقابل بین اتوفاژی و سایتوکاین‌ها

بیشتر دانش کنونی ما از تأثیر سایتوکاین‌ها بر اتوفاژی/زینوفاژی از مطالعات پاسخ ماکروفاژ به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نشأت می‌گیرد. زینوفاژی ماکروفاژها را تجهیز می‌نماید تا بر ممانعت بلوغ فاگوزوم که توسط مایکوباکتری‌ها تحمیل می‌شود غلبه کنند و عامل بیماری زای واکوئولی را نابود نمایند (گوتی پرزا و همکاران، ۲۰۰۴؛ سینگ و همکاران، ۲۰۰۶).

^۱ پایروپتوز؛ یک نوع شدیداً التهابی از مرگ برنامه ریزی شده سلول به دنبال عفونت داخل سلولی

فعالسازی ماکروفاژها با γ -IFN، بلوغ مایکوباكتریهای محتوی فاگوزومها را بهبود میبخشد، و γ -IFN تولیدشده با القای Irgam1 GTPase این پاسخ حفاظتی حیاتی است (شاپیل و همکاران، ۱۹۹۸؛ ویا و همکاران، ۱۹۹۸؛ مک میکینگ و همکاران، ۲۰۰۳). علاوه، γ -IFN اتفاقاً را در ماکروفاژها به شبیه وابسته به IRGM1 القامی نماید (تصویر ۱۶,۳) (گوتی بزر و همکاران، ۲۰۰۴؛ سینگ و همکاران، ۲۰۰۶). مکانیسمی که بواسیله آن اتفاقاً در بلوغ فاگوزوم القا شده توسط γ -IFN در ماکروفاژهای آلوده به مایکوباكتریوم توبرکلوزیس مشارکت دارد هنوز به طور کامل درک نشده و نیاز به بررسی بیشتر دارد.

به طرز چشمگیری، γ -IFN در تمام شرایط محرک اتفاقاً نیست. برای مثال، درمان ماکروفاژهای آلوده به ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ با β -IL اتفاقاً را افزایش میدهد و پاسخ سلول T CD8⁺ به یک آنتیژن ویروسی را تقویت مینماید، اما درمان با γ -IFN این کار را نمیکند (انگلیش و همکاران، ۲۰۰۹).

TNF- α ، دیگر سایتوکاین پیش‌التهابی اصلی، فاکتور مهمی در پاسخ ایمنی محافظتی به مایکوباكتریوم توبرکلوزیس است. بویژه TNF- α برای شکل‌گیری و نگهداری گرانولوم‌ها، ساختارهای سازمان‌یافته ماکروفاژها و سلول‌های بشدت متمایز شده متشکل از سلول‌های کف‌آلوده محاصره شده با دیوارهای از لنفوسيتها که مشخصه عفونت توبرکلوزیس هستند، حیاتی میباشد (فلین و چان، ۲۰۰۱). TNF- α اتفاقاً را در انواعی از سلول‌ها تحریک میکند (تصویر ۱۶,۳) (آندرید و همکاران، ۲۰۰۶؛ جیا و همکاران، ۲۰۰۶؛ لینگ و همکاران، ۲۰۰۶) (تصویر ۱۶,۳) (آندرید و همکاران، ۲۰۰۹؛ هریس و کین، ۲۰۱۲؛ کلر و همکاران، ۲۰۱۱). در عوض اتفاقاً بارگامیان و همکاران، ۲۰۰۹؛ لینگ و همکاران، ۲۰۰۶؛ کلر و همکاران، ۲۰۱۱) در ارائه آنتیژن‌های این سلول‌های میزبان را تجهیز مینماید تا توکسوپلاسمای گوندی را برطرف کنند (آندرید و همکاران، ۲۰۰۶؛ لینگ و همکاران، ۲۰۰۶). علاوه بر این، TNF- α تجزیه اتفاقاً میتوکنندی‌ها را القامی نماید (بارگامیان و همکاران، ۲۰۰۹؛ بیل و همکاران، ۲۰۱۳) و در ارائه آنتیژن‌های میتوکندریایی درون سلولی روی کلاس MHC1 مشارکت دارد (بل و همکاران، ۲۰۱۳).

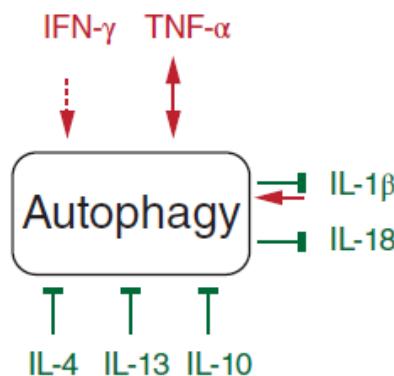
در حالی که سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند γ -IFN و TNF- α القاکننده اتفاقاً هستند، IL-4 و IL-13 بازدارنده آن میباشند (تصویر ۱۶,۳) (هریس، ۲۰۱۱). برای نمونه، IL-13 یک بازدارنده قوی اتفاقاً ناشی از گرسنگی در سلول‌های اپیتیلیال ۲۹-HT است (پتیو و همکاران، ۲۰۰۰؛ آریکو و همکاران، ۲۰۰۱). در زمینه عفونت با مایکوباكتریوم توبرکلوزیس هر دو مورد IL-4 و

فصل ۱۶: مشارکت اتوفاژی جهت اینمی ذاتی و تطبیقی: یک بررسی اجمالی ۳۳۱

IL-13 بازدارنده اتوفاژی القایی گرسنگی یا γ -IFN هستند، به این ترتیب بلوغ فاگوزوم را کاهش و بقای درون سلولی باکتری را افزایش می‌دهند (هریس و همکاران، ۲۰۰۷). بر طبق آن، تعديل و تنظیم اتوفاژی بوسیله سایتوکاین‌ها و عوامل بیماری زا ممکن است نمایانگر میدان نبرد مهمی در رقابت تسليحاتی تکاملی بین میزبان و مایکروباكتری‌ها باشد (هریس و همکاران، ۲۰۰۷).

IL-10 نیز از اتوفاژی ممانعت می‌کند که وقتی ماکروفاژهای موش‌سانان گرسنگی داده می‌شوند یا با راپامایسین درمان می‌گردند القا می‌شود (تصویر ۱۶,۳) (فون گرول و همکاران، ۲۰۱۰؛ پارک و همکاران، ۲۰۱۱). متعاقباً از آنجایی که IL-10، IL-4 و IL-13 به طور غالب توسط ماکروفاژها ترشح می‌شوند، تعديل و تنظیم اتوکرین اتوفاژی بوسیله لوکوسیت‌ها احتمالاً پاسخ‌های اینمی خاص به عوامل بیماری زای مسری را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

به طور جالبی، اتوفاژی می‌تواند به طور مستقیم هم رونویسی، فرآوری و ترشح تعدادی از سایتوکاین‌ها را تعديل و تنظیم نماید (هریس، ۲۰۱۱). همانطورکه در بالا با جزئیات بیشتری بحث شد، وقتی از اتوفاژی ممانعت می‌شود، رهاسازی IL-18 و IL-13 بالا می‌رود. شواهدی نیز هست که اتوفاژی بواسطه ماکروفاژها و سلول‌های دندربیتیک در تعديل و تنظیم ترشح TNF- α درگیر است (تصویر ۱۶,۳). بویژه درمان با بازدارنده اتوفاژی ۳-متیل آدنین، ترشح وابسته به TLR سایتوکاین TNF- α را بشدت کاهش می‌دهد (کریشان و همکاران، ۲۰۱۱).



تصویر ۱۶,۳ مقاله متقابل بین اتوفاژی و سایتوکاین‌ها. سایتوکاین‌هایی مانند γ -IFN و TNF- α و IL-1 β باعث القای اتوفاژی شده و IL-4، IL-13 و IL-10 آن را مهار می‌کنند. اتوفاژی نیز به نوبه خود، به طور منفی ترشح IL-1 β و IL-18 و به طور مثبت ترشح TNF- α را تنظیم می‌کند.

داده‌های بحث شده در اینجا مکالمه متقابل گسترده بین اتوفاژی و سایتوکاین‌ها را به نمایش می‌گذارد. تنوعی از مکانیسم‌ها در میزانی از یکپارچگی بین این مسیرهای دفاعی مشارکت دارند، که به چندین فاکتور بستگی دارد از جمله گیرنده‌ها و انواع سلولی خاص. از این‌رو، اتوفاژی یک هدف درمانی محوری بالقوه برای تنظیم پاسخ‌ها و التهاب ایمنی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان از دایانا مائئود و آنجلیک بلمار-پلتیه (دانشگاه مونترال) برای بحث‌های مفید و خواندن و تصحیح دست‌نوشته قدردانی می‌کنند. علاوه بر این، از محققان بسیاری در حوزه اتوفاژی که داستان‌های هیجان‌انگیزشان را نتوانستند بخاطر محدودیت‌جا ذکر نمایند، عذرخواهی می‌کنند.

فصل ۱۷

اتوفاژی در پاسخ‌های ایمنی به ویروس‌ها

ایمنی ذاتی در برابر ویروس‌ها

به محض حمله میکروب‌ها، ارگانیسم‌ها می‌توانند با سرعت شماری از مکانیسم‌های دفاعی را که بخشی از جنگ‌افزار ذاتی سیستم ایمنی هستند، حرکت دهند. در میان میکروب‌ها، ویروس‌ها مهاجمین درون سلولی اجباری هستند که حضورشان درون سلول‌ها بوسیله گیرنده‌های متصل به غشا یا رگه زایشی سایتوزوولیک کدگذاری شده بنام گیرنده‌های شناسایی الگو (PRRs) احساس می‌شود، که به الگوهای مولکولی مرتبط با عامل بیماری زای محافظت شده (PAMPs) واکنش نشان می‌دهند و سیگنال‌های درون سلولی را جهت راهاندازی پاسخ‌های زودهنگام مناسب میانجیگری می‌نمایند. این پاسخ‌ها عبارتند از مکانیسم‌های دفاعی خودمنتار سلول، از جمله اتوفاژی، و تولید واسطه‌ای حلال که با سرعت به سلول‌های محیطی هشدار می‌دهند و/یا آنها را برای مبارزه با عفونت‌ها (سایتوکاین‌های ضدویروسی و التهابی) به خدمت می‌گیرند.

گیرنده‌های PRRs با غشاهای سلولی و واکوئولی در ارتباط هستند، در حالی که TLR1/2/4/5/6/10 روی سطح سلول حضور دارند، TLR3/7/8/9 داخل قسمت‌های اندوزمی پخش هستند. در میان TLRs، TLR2/3/4/7/8/9 می‌توانند حضور تعیین‌کننده‌های مولکولی ویروس را احساس نمایند، که عبارتند از اسیدهای نوکلئیک ویروسی یا پروتئین‌های در معرض ویروس (فائز و رابرین-گمبه، ۲۰۱۱). تمام TLRs، به استثنای TLR3، از طریق تطبیق‌دهنده MyD88 سیگنال می‌فرستند، که مسیر سیگنال دادن آنها به فعالسازی بشدت

تنظیم شدهٔ فاکتور هسته‌ای B (NF-_kB) می‌شود، یک فاکتور رونویسی که برای تعديل و تنظیم ژن‌های کدگذاری سایتوکاین‌های التهابی طی تهاجم میکروبی مفید است. TLR4 نیز می‌تواند از طریق به خدمت گرفتن تطبیق دهندهٔ دیگری، TRIF، سیگنال بفرستد که به نوبهٔ خود برای فعالسازی عوامل رونویسی تنظیمی (IRFs) اینترفرون نوع ۱ (IFN-I) سیگنال ارسال می‌نماید که سنتز سیتوکین (IFN- α/β) IFN-I ضدویروسی را تعديل و تنظیم می‌کند. TRIF تنها تطبیق دهندهٔ ارسال سیگنال TLR3 است. تمام TLRهایی که موجودیت‌های ویروسی را شناسایی می‌کنند سنتز IFN-I را به راه‌می‌اندازند، در نتیجه عملکردهای کلیدی این سایتوکاین‌ها را در پاسخ به ویروس‌ها پرزنگ می‌نمایند (باربالات و همکاران، ۲۰۰۹). سلول‌های دندریتیک پلاسماسیتوئید (pDCs) بالا‌فصله بعد از اکتشاف ویروس بالاترین مقادیر هر دو مورد IFN α و IFN β را در هر سلول تولید می‌کنند. این قدرت بخارطه بیان ساختاری هر دو مورد IRF3 و IRF7 توسط pDCs است. در بیشتر انواع دیگر سلول، تنها IRF3 پیش از هر تحریکی بیان می‌شود، که فقط رونویسی IFN β را تنظیم می‌کند. سپس IFN β حل شدنی به گیرندهٔ IFN-I (IFNAR) در یک مسیر بازخورد مثبت اتوکرین/پاراکرین وصل می‌شود که به القای مقادیر بالای IFN α ختم می‌گردد. با همان IFNAR درگیر می‌شود که IFN β شد و سیگنال‌ها را هدایت می‌نماید، که منجر می‌گردد به بیان دهها هزار IFN محرک ژن‌های (ISGs) دارای خواص ضدویروسی مستقیم درون سلول‌های آلوده.

در سطح سیتوزول، ویروس‌ها قابلیت حس شدن توسط خانوادهٔ گیرندهٔ ژن ۱ القاکننده (RIG-I-like RLR) از جملهٔ RIG-I و MDA5 (اسید رتینوئیک RNA هلیکاز جعبهٔ DEVD/H) را دارند. تحت شرایط عفونت ویروسی یا تحریک IFN-I، سطح بیان RIG-I و MDA5، که هر دو RNA ویروسی را کشف می‌کنند، دچار افزایش تحریک می‌شود. بعد از درگیری، RIG-I به تطبیق دهندهٔ مرتبط با میتوکندری IFN β که محرک و بهبوددهندهٔ یک است (IPS-1)، همچنین مشهور به VISA، یا MAVS، (CARDIF) متصل می‌شود، که جهت فعالسازی و انتشار یک پاسخ ایمنی ذاتی ضدویروسی بوسیلهٔ تولید سایتوکاین‌های التهابی و IFN-I از طریق فعال نمودن به ترتیب NF-_kB و IRFs، خود را افزایش می‌دهند (هو و همکاران، ۲۰۱۱). انتهای جریان درگیری IFNAR، تحریک بیان پروتئین کیناز سایتوزولیک تنظیم شده بوسیلهٔ RNA (PKR) نیز افزایش می‌یابد. PKR یک عامل کلیدی در شناسایی RNA ویروسی دو رشته‌ای می‌باشد. فعالسازی PKR منجر می‌شود به فسفریلاسیون فاکتور آغاز سنتز پروتئین eIF2 α ، در نتیجه ممانعت از

فصل ۱۷: اتوفاژی در پاسخ‌های ایمنی به ویروس‌ها

فرآیند ترجمۀ پروتئین، که می‌تواند مانع کپی‌برداری ویروس گردد. سایر PRRs می‌توانند ویروس‌ها را درون سیتوسول کشف نمایند. علاوه بر توانایی شناخت آن جهت اتصال عناصر باکتریایی، عضو خانواده NOD2 گیرنده Nod-like (NLR) می‌تواند RNA تکرشته‌ای ویروسی سایتوزولیک را در سایتوزول کشف کند و از طریق به خدمت گرفتن IPS-1 یک پاسخ IFN-I را القا نماید (صبح و همکاران، ۲۰۰۹). بعلاوه، DNA ویروسی می‌تواند بوسیله سایر حسگرهای DNA سایتوزولیک کشف شود مانند فعال کننده IRFs وابسته به DNA (DAI)، که قادر است تولید سایتوکاین التهابی و یا IFN-I را راهاندازی نماید.

دیگر نتیجه احتمالی عفونت ویروسی، فعالسازی مجموعه‌ای از پروتئین‌های سیتوسولیک بنام اینفلاماژوم است. اگرچه جزیيات کشف لیگاند میکروبی مستقیم برای فعالسازی اینفلاماژوم همچنان مبهم باقیست، این فرآیند ذاتی می‌تواند توسط PRRs، که اعضای خانواده NLR هستند، و نیز حسگر DNA سیتوسولیک غایب در ملانومای ۲ (AIM2)^۱ راهاندازی شود. بخارط تقسیم وابسته به کاسپاز ۱ پیش‌سازهای سایتوکاین که بوسیله محور PRRs/NF-_KB القا می‌شود، فعالسازی اینفلاماژوم منجر می‌گردد به رهاسازی سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند اینترلوکین (IL-18 و IL-33) و IL-1_B. این سایتوکاین‌ها، برای مثال، بواسطه به خدمت گرفتن و فعال نمودن ماکرووفاژها پاسخ‌های ایمنی ذاتی را پیش می‌برند.

برخلاف پاسخ‌های ذاتی اشاره شده در بالا، که بعد از حس کردن تماس/عفونت ویروسی بسرعت القا می‌شوند اما شامل چند گام رونویسی هستند، اتوفاژی می‌تواند فوراً به محض ورود عوامل بیماری زا به درون سلول درگیر شود تا برای تجزیه آنها را هدف قرار دهد. سه نوع عمدۀ چنین فرآیندهای کاتابولیک وابسته به لیزوژوم در پستانداران مشخص شده است: اول، میکرواتوفاژی، که مولکول‌های سیتوسولیک را از طریق تورفتگی غشای لیزوژومی تجزیه می‌کند؛ دوم، اتوفاژی با واسطه چاپرون، که پروتئین‌های سایتوزولیک محتوى توالی‌های خاص را به درون لیزوژوم‌ها هدایت می‌نماید؛ و سوم، ماکرواتوفاژی، از این به بعد به آن اتوفاژی اطلاق می‌شود، که حجم‌های بزرگ سیتوپلاسم را در درون وزیکول‌های ویژه‌ای بنام اتوفاگوزوم‌ها دسته دسته می‌کند، که در نهایت با لیزوژوم در هم می‌آمیزند. در این بخش تنها جنبه‌های مرتبط با (ماکرو) اتوفاژی و دستگاه مولکولی آن پوشش داده می‌شود. اتوفاژی ابتدا به عنوان یک مکانیسم حفظ بقای متکی

^۱ غایب در ملانومای ۲: AIM2-absent in melanoma (AIM2).

بر تولید متابولیت‌ها از بازیافت اندامک‌ها و پروتئین‌های سایتوزولیک تحت شرایط منابع ناکافی توصیف گردید، به عبارت دیگر، گرفتن غیرانتخابی بخش‌های عظیمی از سیتوزول. در حقیقت، به نظر می‌رسد یک بخش تشکیل‌دهنده سطح پایین اتوفاژی برای دفع و بازیافت پروتئین‌های با عمر طولانی، تجمعات پروتئینی، و اندامک‌های آسیب دیده یا سالخورده مانند میتوکندری‌ها یا پراکسی‌زوم‌ها ضروری باشد. بنابراین اتوفاژی برای حفظ و نگهداری هومئوستازی سلولی تحت شرایط فیزیولوژیکی سودمند است. از نظر مکانیکی، گرفتن اجزای سیتوپلاسمی دربر گیرندهٔ تشکیل یک غشای جداکننده بنام فاگوفور است، که وزیکول‌های اتوفاگوزومی متمایز گردیده با غشای دوتایی خود را تشکیل می‌دهند. به محض آمیزش با لیزوژوم‌ها، محمولة اتوفاگوزوم‌ها در معرض هیدرولیز و تجزیه قرار می‌گیرد. در پستانداران، اجرا و تعدیل و تنظیم فرآیندهای اتوفاژی نیازمند شرکت شمار زیادی از پروتئین‌های مرتبط با پروتئین‌های ژن مربوط به اتوفاژی (ATG) قارچ و نیز فاکتورهای اضافی مشخصی هست. بسته به نوع سلول و یا عامل القاکننده اتوفاژی، فاگوفور می‌تواند به‌طور فیزیکی از چندین منبع نشأت بگیرد که شامل غشای پلاسمما، رتیکولوم اندوپلاسمیک، میتوکندری‌ها یا دستگاه گلتری می‌شود (ماری و همکاران، ۲۰۱۱). علاوه بر نقش مرکزی آن در حفظ و نگهداری هومئوستازی از طریق توده‌ای از فرآیندهای غیرانتخابی، اتوفاژی می‌تواند به‌عنوان یک مسیر نابودگر انتخابی جهت از بین بردن میکروب‌های درون سلولی عمل نماید. فرآیند گرفتن میکرووارگانیسم‌های درون سلولی در داخل اتوفاگوزوم‌ها و هدایت آنها به سمت لیزوژوم‌ها برای تجزیه، زینوفاژی نامیده می‌شود (لوین، ۲۰۰۵). عوامل تخصص یافته، از یک طرف، قادر به گرفتار کردن اشکال فرعی یوبی کوئیتینه شده مانند میکرووارگانیسم‌های داخل سلولی هستند و از طرف دیگر، توانایی بستن آنها به LC3 از طریق یک منطقه تعامل با (LIR) را دارند (درتیک و همکاران، ۲۰۱۲). تطبیق‌دهنده‌های خانواده گیرنده- sequestosome- NIX (SLR)، مانند NDP52، SQSTM/p62 (همچنین CALCOCO2 نامیده می‌شود)، NBR1، و اپتی‌نورین، متعلق به این گروه از فاکتورها هستند. جدای از هدف قراردادن تمام عوامل بیماریزا، اتوفاژی می‌تواند به‌طور انتخابی نیز اجزای ضروری میکروب‌ها را هدف بگیرد. علاوه بر این، اتوفاژی بوسیلهٔ تعدیل و تنظیم مسیرهای سیگنال فرستادن به انتهای جریان PRRs در یک پاسخ ایمنی ذاتی شرکت می‌کند. در این بخش آغازین، ما پیشرفت‌های اخیر مربوط به نقش اتوفاژی و پروتئین‌های مرتبط با اتوفاژی را تحت شرایط عفونت ویروسی خلاصه خواهیم نمود. همچنین جنبه‌های مربوط به زینوفاژی ویروس، مشارکت اتوفاژی در پاسخ‌های

ایمنی ذاتی ضدویروسی و استراتژی‌های ویروسی جهت خنثی نمودن اتوفاژی بمنظور فرار از پاسخ‌های ایمنی ذاتی را بررسی خواهیم کرد.

اتوفاژی در ایمنی ذاتی ضدویروسی

حس کردن ویروس جهت القای اتوفاژی

اتوفاژی می‌تواند بوسیلهٔ کشف با واسطهٔ TLR اجزای ویروس القا شود. برای مثال، RNA ویروس می‌تواند توسط TLR3، TLR7، و TLR8 کشف شود و پروتئین‌های ویروسی در معرض نمایش بوسیلهٔ TLR4 قادر به احساس شدن هستند (دلگادو و همکاران، ۲۰۰۹؛ شی و کرل، ۲۰۰۸؛ ژو و همکاران، ۲۰۰۷). مسیرهای مولکولی درگیر در اتوفاژی با واسطهٔ TLR هنوز به طور کامل درک نمی‌شوند. اگرچه در یک مطالعهٔ اولیه مشاهده نشد (ژو و همکاران، ۲۰۰۷)، کار بعدی نشان داد که اتوفاژی با واسطهٔ TLR می‌تواند روی یک مسیر وابسته به MyD88 القا گردد (دلگادو و همکاران، ۲۰۰۹). بعلاوه، بکلین ۱ می‌تواند با هر دو مورد MyD88 و TRIF مکروفافاژهای انسانی، بعد از افزایش تحريك ژن‌های مربوط به ویتامین D (VDR) و پپتید میکروبی کاتلیسیدین (CAMP)، فعالسازی TLR8 اتوفاژی را القا می‌کند. این محور CAMP-VDR-TLR8-اتوفاژی جهت محدود نمودن کپی‌برداری از HIV-1 ضروری می‌باشد (بخش ۸ را ببینید) (کمپبل و اسپکتر، ۲۰۱۲). PKR نیز می‌تواند به محض کشف RNA ویروسی، از طریق یک مسیر وابسته به فسفویلاسیون eIF2α، اتوفاژی را آغاز نماید (تالوکتزی و همکاران، ۲۰۰۲). NOD2، که قادر است ssRNA ویروسی را کشف کند، نیز می‌تواند بعد از به خدمت گرفتن ATG16L1 اتوفاژی را القا نماید (ترراوسوس و همکاران، ۲۰۱۰). رخدادن جهش طبیعی در حوزهٔ تعامل ATG16L1 از NOD2 منجر به زینوفافاژی باکتریایی در معرض خطر می‌شود. با این حال، این که آیا در رابطه با زینوفافاژی ویروسی این امر صحت دارد هنوز ناشناخته باقیست. براستی، طی عفونت ویروسی آنفولانزا A، NOD2 می‌تواند حذف اتوفاژیک میتوکندری‌ها را تعدیل و تنظیم نماید، در نتیجه تولید گونه‌های واکنش‌دهنده به اکسیژن و فعالسازی بعدی اینفالاماژوم NLRP3 و تولید سایتوکائین IL-18 را محدود نماید (لوپفر و همکاران، ۲۰۱۳). از این رو یک محور NOD2-اتوفاژی می‌تواند در القای اتوفاژی نقش داشته باشد، هم

بمنظور کنترل میکروب‌های درون سلولی و هم جهت تعدیل نمودن پاسخ التهابی برای پیشگیری از ایمونوپاتولوژی‌های با واسطه ویروس.

القای اتوفاژی در متن عفونت با DNA ویروس‌ها نیز مشاهده می‌شود مانند سایتومگالوویروس انسانی (HCMV) و ویروس هرپس سیمپلکس ۱ (HSV-1) (مک فارلین و همکاران، ۲۰۱۱). به طرز قابل توجهی، ژنوم DNA ویروسی قادر است القای اتوفاژی را بدون سنتز پروتئین ویروسی بهبود بخشد که نشان می‌دهد حسگرهای DNA درون سلولی مانند AIM2 یا DAI توانایی القای اتوفاژی را دارند. هر چند این امر که آیا اعضای خانواده‌های RLR می‌توانند اتوفاژی را به راه اندازند می‌ماند تا مشخص گردد، چندین PRRs قادرند این فرآیند را به محض کشف ویروس راه اندازی کنند. اینکه آیا تمامی این PRRs به طور مؤثری القاکننده اتوفاژی به محض ابتلای سلول‌های پستانداران می‌باشند یا نه، می‌ماند تا در بدن موجود زنده بررسی شود. در مگس میوه^۱، اتوفاژی در پاسخ به عفونت ویروس وزیکولار استوتوماتیتیس (VSV)، از طریق شناسایی مستقیم گلیکوپروتئین VSV، توسط TLR7 القا می‌گردد (ناکاموتو و همکاران، ۲۰۱۲)، که از نقشی برای PRRs برای درگیری در القای اتوفاژی در بدن موجود زنده در واکنش به عفونت با ذرات ویروسی کاملاً مسری حمایت می‌نماید.

علاوه بر PRRs، سایر گیرندهای متصل شونده به ویروس می‌توانند اتوفاژی را آغاز نمایند. برای مثال، CD46-Cyt-1، که یک گیرنده سلولی برای ویروس سرخ ضعیف شده (MeV) است، از طریق یک مسیر مستقیم در برگیرنده پروتئین اسکافولد GOPC که با شکل گیری اتوفاگوزوم کمپلکس بکلین 1/VPS34 تعامل دارد، اتوفاژی را القا می‌نماید (ژوبرت و همکاران، ۲۰۰۹). به محض ورود ویروس، این مسیر مولکولی به یک القای بسیار زودهنگام اما زودگذر اتوفاژی منجر می‌گردد. بر عکس، CD150، گیرندهای برای سویه‌های مسری MeV، تنها اندکی اتوفاژی را به محض ورود MeV را راه اندازی می‌کند (ربیکتا و همکاران، ۲۰۱۳)، که نشان دهنده یک مشارکت احتمالی برای مسیر بکلین ۱-CD46-GOPC ضعیف شده است.

^۱ Drosophila: مگس میوه؛ مگس سرگه؛ دروزوفیلا:

نقش اتوفاژی در زینوفاژی ویروس‌ها

مطالعات کمی وجود دارد که حضور ذرات ویروسی دست‌نخورده درون اتوفاگوزوم‌ها را مستندسازی کرده باشند. در یک مورد، یک نسخه جهش یافته HSV-1 ICP34.5 فاقد ICP34.5، که یک فاکتور فراگیر بازدارنده اتوفاژی بوسیله هدف قراردادن بکلین ۱ (HSV-1 Δ ICP34.5) است، یک اتوفاژی وابسته به PKR را القا نمود و ویروس‌ها درون اتوفاگوزوم‌ها مشاهده شدند (تالوکتزی و همکاران، ۲۰۰۶). با این وجود، کپی‌برداری از ویروس جهش یافته در سلول‌های اختیاری با کپی‌برداری در نوع وحشی HSV-1 در سلول‌های با قابلیت یا عدم قابلیت اتوفاژی قابل مقایسه است، که نشان می‌دهد زینوفاژی ویروسی نقشی مرکزی در مقاومت علیه HSV بازی نمی‌کند (الکساندر و همکاران، ۲۰۰۷؛ اروادال و همکاران، ۲۰۰۷). با این وجود، صرف نظر نمی‌شود که زینوفاژی ویروس ممکن است جهت محدود نمودن عفونت، بلا فاصله بدنیال ورود ویروس، استفاده شود زیرا ویروس‌های مشخصی می‌توانند از طریق یک فرآیند درونی‌سازی به عنوان اندوسیتوز یا فاگوسیتوز وابسته به کلاترین وارد سلول‌ها شوند. به طرز جالبی، پروتئین‌های مرتبط با اتوفاژی می‌توانند در فاگوزوم‌های نوظهور جهت بهبود بلوغ و تجزیه محمولة آنها به خدمت گرفته شوند. از این گذشته، شکل‌گیری اتوفاگوزوم‌ها می‌تواند غشای پلاسمای مرتبط با کلاترین را درگیر کند (راوی کومار و همکاران، ۲۰۱۰؛ سانخوان و همکاران، ۲۰۰۷). بنابراین به محض ورود ذره ویروسی هر دو مورد اندوسیتوز و فاگوسیتوز وابسته به کلاترین ممکن است در زینوفاژی ویروسی مشارکت داشته باشند. علاوه براین، در مورد تهاجم باکتریایی، بوسیله کشف یوبی‌کوتئین، گلیکان‌های سایتوزولیک، یا دیاسی گلیسرول ها، که روی وزیکول‌های محتوى باکتری‌ها در سطح جاهای آسیب‌دیده حضور دارند، اتوفاژی می‌تواند راهاندازی شود (دوپون و همکاران، ۲۰۰۹؛ شاه نظری و همکاران، ۲۰۱۰؛ ثرس-ton و همکاران، ۲۰۱۲). مشخص نیست که آیا این اندوزوم‌های حاوی ویروس می‌توانند چنین تغییراتی را پرورش دهند یا حتی پروتئین‌های ویروسی را در معرض کشف بوسیله دستگاه اتوفاژی اختیاری بگذارند.

گذشته از امکان حذف ویروس‌ها از طریق زینوفاژی، سلول‌ها می‌توانند اتوفاژی را برای حذف عناصر جداگانه ضروری جهت کپی‌برداری یا سرهم‌کردن ویروسی بسیج نمایند، فرآیندی که به آن ویروفاژی اطلاق می‌شود (اروادال و همکاران، ۲۰۱۱؛ ریکتا و فائور، ۲۰۱۳). برای نمونه، SQSTM1/p62 با کپسید ویروس سیندیس ارتباط برقرار می‌کند و آن را هدف می‌گیرد تا برای تجزیه نمودن اتوفاژی کند، در نتیجه مانع مرگ سلولی ناشی از تجمع کپسید شود. برخلاف

بیشتر فاکتورهای هدف گرفته شده توسط SQSTM1/p62 برای اتوفاژی انتخابی، این تعامل مستقل از یوبیکوئیتینه شدن است (أروDAL و همکاران، ۲۰۱۰). در میان اجزای ویروسی هدف گرفته شده توسط تطبیق دهنده‌های اتوفاژی برای اتوفاژی انتخابی، برخی ممکن است خاص ویروس یا حفاظت شده در میان خانواده‌های ویروس باشند. در یک جستجوی صفحه سایت برای ژن‌های درگیر در هدف قراردادن انتخابی کپسید ویروس سیندیسیس جهت اتوفاژی، بیش از یکصد ژن مفروض شناسایی شدند. این ژنهای بر روی اتوفاژی در جریان تأثیری نمی‌گذارند، در نتیجه از نقش آنها در ویروفناژی انتخابی حمایت می‌کنند (أروDAL و همکاران، ۲۰۱۱). به طرز جالبی، یکی از این ژن‌ها، SMURF1، نیز نشان داده شد که در هدف گرفتن HSV-1 ICP34.5 از طریق یکی از این ژن‌ها درگیر بود، که نشانگر آن است که اجزای مشترک بین خانواده‌های ویروسی معین می‌توانند از طریق مکانیسم‌های مشابهی برای اتوفاژی انتخابی هدف قرار گیرند. از طریق اجرای یک تجزیه و تحلیل برهم‌کنش پروتئین بر پروتئین^۱، بیش از ۳۵٪ از ۴۴ پروتئین مرتبط با اتوفاژی، گزارش شده است که با پروتئین‌های متعلق به پنج خانواده مشخص از ویروس‌های RNA تعامل دارند. چندین پروتئین مرتبط با اتوفاژی با پروتئین‌هایی از خانواده‌های ویروس RNA معین در ارتباط هستند (گرگوایر و همکاران، ۲۰۱۱). این سؤال که آیا هیچ یک از این تعاملات در ویروفناژی سراسری مشارکت دارند بدون جواب باقی می‌ماند.

در نتیجه مشارکت زینوفناژی / ویروفناژی در محدودیت مسری بودن ویروسی نامشخص باقی می‌ماند. با این حال، بسته به نوع سلول، این فرآیند ممکن است دارای سطوح متفاوتی از اهمیت باشد. یوردی و همکارانش (۲۰۱۲) ثابت کرده‌اند که، در سلول‌های غیرمتیوزی مانند نورون‌ها، زینوفناژی / ویروفناژی می‌توانست، از طریق تجزیه مستقیم میکروبها، مشارکت کننده ایمنی ذاتی اصلی در کنترل عفونت ویروسی باشد. بر عکس، در سلول‌های متیوزی، ویروفناژی می‌توانست ضرورتاً اجزای ویروسی را برای القای پاسخ ایمنی ذاتی ضدویروسی مکمل هدف قراردهد.

نقش اتوفاژی در سیگنال فرستادن ایمنی ذاتی ضدویروسی

اتوفناژی در مسیرهای سیگنال فرستادن ایمنی ذاتی ضدویروسی درگیر است. برای نمونه، در در حال کپی‌برداری از ویروس وزیکولار استوماتیتیس (VSV) یا ویروس‌های pDCs موش،

^۱ Protein on protein interactome analysis: تحلیل ایتراکتوم/برهم‌کنش پروتئین بر پروتئین

فصل ۱۷: اتوفاژی در پاسخ‌های ایمنی به ویروس‌ها

سِندای می‌توانند در اتوفاگوزوم‌ها گرفتار شوند، پیش از اینکه با اندزوم‌های حاوی TLR7 جوش بخورند، که می‌توانند RNA ویروسی را کشف کنند و جهت القای تولید IFN-I سیگنال بفرستند (لی و همکاران، ۲۰۰۷). همانطورکه در DC‌های انسانی آلوده به ویروس نقص ایمنی انسانی ۱ (HIV-1) مشاهده شد، اتوفاژی می‌تواند برای سنتز IFN-I مستقل از کپی‌برداری ویروسی نیز موردنیاز باشد (ژو و همکاران، ۲۰۱۲). استفاده از وُرتمانین نیز قادر است سنتز IFN-I را طی عفونت pDC انسانی توسط یک ویروس DNA، ویروس اپشتین-بار (EBV)، تعديل و تنظیم نماید (سِورا و همکاران، ۲۰۱۳). نقش مفید اتوفاژی در سنتز IFN-I به نظر می‌آید یک مشخصه کاربردی pDCs باشد. برای مثال، pDCs، اما نه DCs مرسوم، IFN α را به محض سرایت ویروس ۵ میمون‌سانان (SV5) از طریق یک فرآیند وابسته به اتوفاژی ترشح می‌کند (مانوس و همکاران، ۲۰۱۰). سلول‌های بسیار کارآمد تولیدکننده IFN-I با سطح بالایی از اتوفاژی در جریان هستند (لی و همکاران، ۲۰۰۷)، که ممکن است در تحت هشدار نگه داشتن مداوم سلول‌ها و بهینه‌سازی پاسخ‌ها در برابر عفونت‌های ویروسی نقش داشته باشند. اخیراً یک شکل غیراستاندارد اتوفاژی جهت فعالیت برای تولید IFN-I در pDCs پیشنهاد شد (هنالت و همکاران، ۲۰۱۲). بعد از اندوسیتوز مجموعه‌های ایمنی حاوی DNA، TLR9 جهت اندوزوم‌ها به خدمت گرفته می‌شود. سپس به عنوان گام موردنیاز جهت تحریک سنتز IFN α وابسته به TLR9 به محض شناسایی LC3 به غشای اندوزومی محکم می‌شود و در بلوغ وزیکول مشارکت می‌کند. با این وجود، اتوفاژی ممکن است در تولید اندک IFN β در سایر انواع سلول‌ها همکاری داشته باشد. در DCs استخراج شده از مغز استخوان موش، اتوفاژی در تولید IFN-I مشارکت دارد که در پاسخ به عفونت ویروس سین‌سیشال تنفسی (RVS) رخ می‌دهد (موریس و همکاران، ۲۰۱۱).

به طرز جالبی، تعديل و تنظیم IFN-I بوسیله اتوفاژی می‌تواند دوطرفه باشد. برای نمونه، به محض عفونت ویروسی، مسیرهای اتوفاژی مشخصی یا از سیگنال فرستادن IFN α یا IFN β ناشی می‌شوند. IFN β ، که ابتدا توسط هپاتوسیت‌ها به محض عفونت‌های VSV یا HCV سنتز می‌شود، بمنظور هدف قراردادن پروتئین‌های ویروسی در جهت تجزیه اتوفاژی درون اتوپلیزوزوم ها، سیگنال می‌فرستد. بر عکس، IFN α ، که بعداً تولید می‌شود، به مسیر اتوفاژی متفاوتی ختم می‌گردد، که در آن اتوفاگوزوم‌ها با لیزووزوم‌ها جوش نمی‌خورند، اما در عوض ممکن است از

طریق تحویل اجزای ویروسی به اندوزومهای محتوی TLR، در القای بیشتر تولید IFN-I ضدویروسی نقش داشته باشدند (دساپی و همکاران، ۲۰۱۱).

ویروس‌های زیادی قابلیت مداخله در تولید IFN-I را دارا می‌باشند. در چنین مواردی، تولید IFN γ ، که می‌تواند خواص ضدویروسی داشته باشد، مهم است. IFN γ سایتوکاینی است که توسط سلول‌های قاتل طبیعی در پاسخ به ویروس‌ها به میزان زیاد و بسرعت تولید می‌شود. در فیبروبلاست‌های جنینی موش (MEF)، اتصال IFN γ به گیرنده‌اش (IFNGR) اتوفاژی را آغاز می‌نماید، در نتیجه تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی را بهبود می‌بخشد (چانگ و همکاران، ۲۰۱۰). برخلاف MEFs طبیعی، در MEFs دارای کمبود ATG5 کپی‌برداری HSV-1 بواسطه IFN γ تحت تأثیر واقع نمی‌شود. پاسخ ضدویروسی با واسطه IFN γ علیه عفونت نوروویروس موش‌سانان نیازمند هر دو مورد سیستم ATG12/5/16/L1 و فاکتور ATG7 می‌باشد، که از سرهم کردن مجموعه کپی‌برداری MNV جلوگیری می‌نماید، به این ترتیب در کنترل عفونت MNV مشارکت می‌کند (هوآنگ و همکاران، ۲۰۱۲). به طرز جالبی، نه فرآیند کاتابولیک اتوفاژی MNV فعال نه عوامل اتوفاژی مانند ATG4B برای پاسخ ضدویروسی با واسطه IFN γ علیه MNV ضروری بودند، که اشاره دارد که عوامل خاصی از دستگاه اتوفاژی می‌توانند اثرات ضد ویروسی مستقل از فرآیند اتوفاژی استاندارد اعمال نمایند. همچنین IFN γ می‌تواند از طریق یک مسیر دربرگیرنده پروتئین M خانواده GTPase (IRGM) مرتبط با ایمنی، اتوفاژی را جهت مقاومت در برابر عفونت مایکروبکتریایی راهاندازی کند (سینگ و همکاران، ۲۰۰۶). قابل ملاحظه است که IRGM به طور مکرر توسط پروتئین‌هایی از ویروس‌های RNA که مشهور به براندازی اتوفاژی هستند، مورد هدف قرار می‌گیرد (گرگوایر و همکاران، ۲۰۱۱؛ پتکووا و همکاران، ۲۰۱۲). جهت تعیین اینکه آیا رابطه‌ای بین عملکردۀای ضدویروسی با واسطه IRGM و IFN γ وجود دارد و مشخص نمودن جزئیات مسیرهای مولکولی دربرگیرنده IRGM در اتوفاژی القا شده در پاسخ به عفونت ویروسی بررسی‌های بیشتری موردنیاز است.

اگرچه در متن‌های سلولی مستندسازی گردیده، جزئیات تعدیل و تنظیم اینفلامازوم توسط اتوفاژی در ارتباط با عفونت ویروسی به طور ضعیف ذکر شده باقی می‌ماند (فائزور و لفانت، ۲۰۱۳؛ سائیتو و همکاران، ۲۰۰۸؛ شی و همکاران، ۲۰۱۲). به عنوان یک مثال، عفونت چشم‌های موش با یک HSV-1 نوترکیب قادر توانایی ممانعت از اتوفاژی منجر به افزایش تحریک اتوفاژی، اینفلامازوم NLRP3، و ایمنی ذاتی ضدویروسی کلی می‌گردد (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۳). اگرچه

فصل ۱۲: اتوفاژی در پاسخ‌های ایمنی به ویروس‌ها

اینفلامازوم NLRP3 یک بازیکن مهم در پاسخ ضدویروسی است، هنوز ناشناخته است که چگونه ویروس‌ها را احساس می‌کند (کانگانتی، ۲۰۱۰). بسته به ماهیت ویروس و نوع سلول‌های مبتلا، اتوفاژی می‌تواند فعالسازی اینفلامازوم را به محض عفونت‌های ویروسی بهینه‌سازی کند.

دستکاری اتوفاژی بوسیله ویروس‌ها برای مقاومت در برابر ایمنی ذاتی

دستکاری اتوفاژی بوسیله ویروس‌ها جهت پیشگیری از سنتز IFN-I

همانطور که در بالا بحث شد، در حالی که اتوفاژی ممکن است به طور مثبتی تولید IFN-I را در آلووده به ویروس تنظیم نماید، پروتئین‌های دستگاه اتوفاژی می‌توانند تولید IFN-I وابسته به RLR القا شده توسط ویروس را در سلول‌های دیگر محدود نمایند. در سلول‌های اپیتیلیال و فیبروبلاستی، مجموعه ATG5-ATG12 به طور سازنده‌ای با RIG-I و با IPS-1 سیگنال فرستنده میانجی ارتباط برقرار می‌کند. این تعامل به محض عفونت VSV تقویت می‌شود، در نتیجه مانع تولید IFN-I وابسته به فعالسازی RIG-I می‌گردد (جونای و همکاران، ۲۰۰۷). این فرآیند در حال حاضر به طور کامل فهمیده نمی‌شود. با این حال در ماکروفاژها و MEFs موش، اتوفاژی سازنده تحریک سیگنال فرستادن RIG-I را از طریق گونه‌های میتوکندریایی و اکسیژن (ROS) کاهش می‌دهد، که در غیر این صورت بیان IPS-1 درون سلولی را بهبود بخشیده و سیگنال فرستادن RIG-I ناشی از VSV برای تولید IFN-I را بالا می‌برد (تال و همکاران، ۲۰۰۹).

بواسطه القای اتوفاژی طی عفونت ویروسی نیز می‌توان از تولید IFN-I جلوگیری نمود. از این رو، سرایت ویروس آنسفالیت ژاپنی (JEV) به سلول‌های نوروبلاستوما اتوفاژی را راهاندازی می‌کند، که در تضعیف سنتز IFN-I ضدویروسی مشارکت دارد (جين و همکاران، ۲۰۱۳). HCV پاسخ پروتئین رهاسده را به راهی اندازد، که به نوبه خود تغییرات پی در پی اتوفاژی کامل را القا می‌نماید، که برای کپی‌برداری HCV RNA در سلول‌های هپاتومای انسانی مجاز است (که و چن، ۲۰۱۱). سرکوب سنتز IFN β/α مسئول چنین اثر پروویروسی اتوفاژی است که می‌تواند در عفونت مقاوم HCV نقش داشته باشد. به دنبال کشف PAMPs مشتق شده از HCV توسط RIG-I، بهبوددهنده IFN β فعال می‌شود و این فعالسازی مربوط به رونویسی توسط مسدود نمودن یا اتوفاژی یا UPR تقویت می‌گردد. بازداری از بلوغ اتوفاگوزم، فعالسازی بهبود دهنده

IFN β را افزایش می‌دهد، در حالی که بهبود آزمایشی آتوفاژی آن را کم می‌کند، که نشان می‌دهد شکل‌گیری کامل اتولیزوزوم‌ها برای ممانعت از تولید IFN-I موردنیاز است. بعلاوه، در سلول‌های فاقد اتوفاژی، عفونت HCV یا بیان بیش از حد پروتئین HCV-NS5A تولید IFN-I را راهاندازی می‌کند، که با تولید ROS میتوکندریایی ارتباط دارد (شریوستاوا و همکاران، ۲۰۱۲). به طرز جالبی، پروتئاز HCV-NS3/4A، که IPS-1 را جدا می‌نماید تا فعالیت سیگنال فرستادن آن را طی عفونت خنثی کند، نیز با IRGM، یک پروتئین مرتبط با اتوفاژی، تعامل دارد (گرگوآیر و همکاران، ۲۰۱۱). همانند IPS-1، IRGM هم در میتوکندری واقع شده و هم با ATG5 در تعامل است (گرگوآیر و همکاران، ۲۰۱۱). بنابراین عفونت HCV می‌تواند از طریق بازداری از تعاملات IRG-I/IPS-1 بواسطه القای اتوفاژی، سنتز IFN-I را محدود نماید. همینطور، به محض عفونت VSV، پروتئین TUFM میتوکندریایی بوسیله تعامل با NLRX1، که یک پروتئین سلولی تعاملی/بازدارنده IPS-1 است، در ممانعت از سنتز IFN β مشارکت می‌کند. به طرز قابل توجهی، TUFM یک عملکرد دوگانه ایفا می‌نماید زیرا با مجموعه ATG5-ATG12 نیز ارتباط دارد، و بدین روش اتوفاژی را القای می‌کند (لی و همکاران، ۲۰۱۲). هنوز ناشناخته است که آیا القای ممانعت IFN-I مستقیماً با القای اتوفاژی وابسته به TUFM مرتبط است. با این وجود، عملکرد دوگانه پروتئین میتوکندریایی (فعالسازی اتوفاژی در مقابل بازداری IFN-I) به محض عفونت ویروس ممکن است یک مشخصه کلی‌تر بهره‌برداری شده توسط ویروس‌ها جهت بهبود عفونت‌زایی آنها باشد. برای مثال، پروتئین میتوکندریایی دیگری بنام MFN2، که در اندوخته غشاها میتوکندریایی برای تکامل حیات اتوفاگوزوم‌ها مشارکت دارد (هیلی و همکاران، ۲۰۱۰)، با IPS-1 نیز جهت مسدود نمودن سنتز IFN β در تعامل است، که در نهایت کپی‌برداری VSV را تسهیل می‌کند (یاسوکاوا و همکاران، ۲۰۰۹). زیرا واحد سیتوکروم اکسیداز سی COX5B نیز با IPS-1 تعامل دارد تا قدرت سیگنال فرستادن خود را برای سنتز IFN-I تنظیم و تعدیل کند و کپی‌برداری ویروسی را تسهیل نماید. بازهم، برای این هدف COX5B با ATG5 همکاری می‌کند تا از تجمع IPS-1 جلوگیری نماید، گامی ضروری برای سیگنال فرستادن ضدویروسی با واسطه IPS-1 (ژائو و همکاران، ۲۰۱۲). این حقیقت قابل ملاحظه است که ویروس‌ها نیز می‌توانند هم مانع اتوفاژی و هم ارسال سیگنال IFN-I شوند. برای نمونه، PKR می‌تواند جهت ممانعت از یک پاسخ ذاتی ضدویروسی و نیز پیشگیری از القای اتوفاژی ضدویروسی، توسط ویروس‌ها مورد هدف قرار گیرد (لوسیگ نول و همکاران، ۲۰۱۳).

ویروس‌ها اتوفاژی برمی‌اندازند تا مانع پاسخ‌های التهابی شوند

ویروس‌ها می‌توانند فرآیند اتوفاژی را دستکاری کنند تا ایمنی ذاتی ضدویروسی را خنثی کرده و کپی‌برداری خود را بهبود بخشنند. برای مثال، فاکتور M45 سایتومگالوویروس موش‌سانان NEMO (MCMV) با زیرواحد تنظیم‌کننده NF- κ B از NEMO تعامل دارد، که منجر به تجزیه NF- κ B از طریق اتوفاژی می‌شود (فلیس و همکاران، ۲۰۱۲). چنین هدف قراردادنی فعالسازی NF- κ B را به خطر می‌اندازد و مانع تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی می‌شود. تحت شرایط بیان بیش از حد، پروتئین M45 موجب تجمع پروتئین می‌گردد که می‌تواند برای تجزیه اتوفاژی هدف قرار داد شود. فعالسازی اینفلامازوم در پاسخ‌های ایمنی ذاتی به عفونت ویروسی نقش دارد، بویژه از طریق تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی IL-1 β . جالب توجه است که بازداری از اتوفاژی تولید IL-1 β را بهبود می‌بخشد در حالی که فعال نمودن اتوفاژی فعالسازی اینفلامازوم را تعديل می‌کند (شی و همکاران، ۲۰۱۲). از این رو، اتوفاژی به نظر می‌رسد قادر به تضعیف پاسخ التهابی تحت شرایط فیزیولوژیکی باشد. در ماکروفازها فعالسازی اینفلامازوم AIM2 یا NLRP3 از طریق درگیری پروتئین G بنام Ra1B منجر به القای اتوفاژی می‌گردد. از سوی دیگر، جزء ASC اینفلامازوم یوبی‌کوئیتینه می‌شود، تغییری که موجب هدف قراردادن انتخابی آن جهت تجزیه اتوفاژیک توسط SQSTM1، و درنتیجه تضعیف فعالسازی اینفلامازوم می‌گردد. از طریق پروتئین M2 غشای یکپارچه خود، که به عنوان یک کانال پروتون عمل می‌کند و برای کپی‌برداری ویروس بسیار مهم است، ویروس آنفولانزای A می‌تواند هم اینفلامازوم را فعال نماید و هم مانع اتوفاژی شود. در واقع، طی عفونت، درگیری TLR7 رونویسی pro-IL-1 β را پیش می‌برد، که بخاطر یک فعالسازی NLRP3 وابسته به M2، جداسازی می‌شود تا IL-1 β را رها نماید. از سوی دیگر، فعالیت کانال M2 موجب به خارج فرستادن H^+ از گلتری اسیدی شده می‌گردد، که به جور شدن و فعالسازی کمپلکس NLRP3 اینفلامازوم منتهی می‌شود (ایچینووه و همکاران، ۲۰۱۱). ویژگی دیگر پروتئین M2 آنفولانزا ظرفیت آن برای ممانعت از بلوغ اتوفاگوزوم مستقل از فعالیت کانال پروتون آن است (گاناگ و همکاران، ۲۰۰۹). اینکه آیا این اثر، فعالیت اینفلامازوم را تحت تأثیر قرار می‌دهد یا نه ناشناخته است. مستقل از تضعیف فعالسازی اینفلامازوم توسط آن، اتوفاژی می‌تواند بوسیله سرکوب رونویسی IL-1 β ، تولید IL-1 β را تعديل نماید. مطالعات بیشتری مورد نیاز است تا این تعديل و تنظیم را، که احتمالاً می‌تواند بوسیله ویروس‌ها دستکاری شود تا در برابر پاسخ‌های التهابی مقاومت کند، موشکافی نماید.

(کریسان و همکاران، ۲۰۱۱). بسرعت می‌توان از اتوفاژی در DCs مبتلا به HIV-1 جلوگیری کرد. این اثر، که ویروس را از تجزیه حفظ می‌کند، بدلیل پوشش پروتئین است و متکی بر مسیر ارسال سیگنالی می‌باشد که تا حدی شامل گیرنده کمکی CD4 است. ممانعت از اتوفاژی با کاهش قابل توجه تولید TNF- α در DCs در پاسخ به درگیری TLR ارتباط دارد. به محض ممانعت از اتوفاژی، HIV-1 در ساختارهایی مشهور به ایمونوآمفیزم‌ها جمع می‌شود، اندامک‌های مشتق شده از جوش خوردگی اندوزوم/فاگوزوم با اتوفاگوزوم‌ها که پاسخ‌های ایمنی را در DCs تعديل و تنظیم می‌نمایند. این تجمع منجر می‌گردد به انتقال HIV به سلولهای T CD4 $^{+}$ در حال تقویت شدن. بازداری از اتوفاژی بوسیله HIV نشان می‌دهد ایمونوآمفیزم‌ها احتمالاً به طور مؤثری گرفتن و تجزیه ذرات ویروسی در DCs را بهبود می‌بخشند (بالانچت و همکاران، ۲۰۱۰). به همین ترتیب، HCMV نیز قادر به ممانعت از اتوفاژی بمنظور فرار از تجزیه و ختی نمودن پاسخ‌های ایمنی ذاتی است. به محض عفونت HCMV، تغییرات پی در پی کامل اتوفاژیک بدون نیاز به سنتز مجدد پروتئین ویروسی القا می‌شود زیرا درمان HCMV تحت UV همچنان اتوفاژی را القا می‌نماید. بعداً ویروس بوسیله مسدود کردن بلوغ اتوفاگوزوم از طریق سنتز مجدد یک فاکتور ویروسی بنام TRS1 مانع اتوفاژی می‌شود. هیچ نقشی برای تعامل قبلاً توصیف شده TRS1-PKR در این ممانعت وجود ندارد. در عوض، این انسداد متکی به هدف قرار دادن بكلین ۱ توسط TRS1 است. بنابراین، جهت فرار از تجزیه، HCMV از طریق دو مکانیسم مشخص در مسیر اتوفاژی مداخله می‌نماید: ممانعت از PKR القاکنده اتوفاژی و جلوگیری از بلوغ اتوفاگوزوم توسط آن (شومورسل و همکاران، ۲۰۱۲).

اتوفاژی و مرگ سلولی طی عفونت ویروسی

مرگ سلولی سلول‌های آلدوه می‌تواند به کنترل تکثیر ویروسی در یک ارگانیسم کمک نماید. از آنجایی که اتوفاژی مرگ سلولی را تضعیف می‌نماید و بقای سلول را بهبود می‌بخشد، ویروس‌ها ممکن است از آن سود ببرند. هر دو فلاوی ویروس‌های موذاک موش‌سانان و نوع ۲ ویروس دنگی انسانی (DEN2) اتوفاژی را در سلول‌های اپیتیلیال آلدوه القا می‌نمایند و آنها را در برابر القای آزمایشی مرگ سلولی مقاوم می‌سازند (مک لین و همکاران، ۲۰۱۱). MeV یک اتوفاژی بلندمدت درون سلول‌های مبتلا القا می‌کند، که از یک ترکیب مسیرهای ارسال سیگنال مختلف ناشی می‌شود. سویه‌های ضعیف شده و نیز کشنده MeV از طریق ربدن یک مسیر وابسته به

فصل ۱۲: اتوفاژی در پاسخ‌های ایمنی به ویروس‌ها

IRGM، اتوفاژی را در سلول‌های مونونوکلئوتیدی مبتلا القا می‌نمایند. اتوفاژی متعاقباً با شکل‌گیری سین‌سیشا (جوش خوردن بین سلول‌های آلوده و سلول‌های غیرآلوده) بیشتر استمرار می‌یابد. این اتوفاژی بلندمدت سطح بالا در بقای سلولی سلول‌های مبتلا به MeV مشارکت دارد، که منجر به افزایش کپی‌برداری کلی MeV می‌گردد (ریکتا و همکاران، ۲۰۱۳). اثر پروویروسی اتوفاژی بواسطه کاهش کپی‌برداری ویروسی ثابت می‌گردد که می‌تواند تحت شرایط اتوفاژی ممانعت شده مشاهده شود. به طور جالبی، اثر به نفع بقای اتوفاژی در ماکروفاژهای مبتلا به ویروس‌های دنگی و موداک مشاهده نشد که نشان‌دهنده یک اثر وابسته به نوع سلول است. درواقع، عفونت‌های ویروس دنگی و ویروس موداک می‌توانند سلول‌ها را در برابر مرگ تحمیل شده توسط ویروس‌های با تغییرات پاتولوژیک سلولی^۱ مانند آنفولانزای A، که مانع اتوفاژی می‌شود، مقاوم سازند (گاناگ و همکاران، ۲۰۰۹). تحلیل تنظیم و تعديل اتوفاژی و رابطه آن با قابلیت مرگ سلولی در سلول‌های دچار عفونت مشترک با عوامل بیماریزای متمایز که استراتژی‌های متفاوتی را جهت دستکاری اتوفاژی ایجاد نموده است یک مسیر تحقیق جالب خواهد بود. ویروس چیکونگونیا از طریق تولید ROS و نیز فعالسازی استرس رتیکولوم اندوپلاسمی، اتوفاژی را در سلول‌های مبتلا القا می‌نماید (ژوبرت و همکاران، ۲۰۱۲). مرگ سلولی در MEFs فاقد ATGs مبتلا به چیکونگونیا تسريع می‌شود، که نشان می‌دهد اتوفاژی سلول‌ها را از مرگ سلولی محافظت می‌نماید در حالی که ممانعت از مرگ سلولی عفونت ویروسی را محدود می‌سازد. اگرچه میزان پروتئین ویروسی در Bax/Bac/MEFs بالا رفت، انتشار ویروس در میان سلول‌های همسایه محدود بود. بر عکس، کسری از سلول‌های مبتلا در Atg5/MEFs نسبت به سلول‌های کنترل افزایش یافت. بنابراین به نظر می‌رسد بسته به چرخه زندگی ویروس و اینکه آیا برای ویروس مفید است مرگ سلولی را القا نماید یا بقای سلولی را ارتقا بخشد، اثر ضدمرگ سلولی اتوفاژی عوایق پروویروسی یا ضدویروسی خواهد داشت.

^۱ ویروس‌های با تغییرات پاتولوژیک Cytopathic viruses:

آتوفاژی در ایمنی تطبیقی ضدویروسی

ارتقاء پاسخ‌های ایمنی تطبیقی به عفونت ویروسی بوسیله آتوفاژی

اکنون شناخته شده است که آتوفاژی یک منبع پیتیدها از آنتی‌زن‌های درون سلولی برای اتصال به مجموعه سازگاری بافتی اصلی (MHC) است. MHC‌های خودپیتیدی جورشده در قسمت‌های خاص بعداً برای ارائه به گیرنده سلول T (TCR) لنفوسیت‌های T β کلاسیک به سطح سلول منتقل می‌شوند (گانگ و مونز، ۲۰۰۹). مجموعه‌های کلاس MHC II -پیتید درون قسمت‌های اسیدی غنی‌شده با پروتئاز مانند اندوزوم‌ها یا قسمت‌های محتوى کلاس MHC II (MIICs) جور می‌شوند.

در این وزیکول‌ها، تکه‌های زنجیرهٔ یکسانی تجزیه می‌شوند، که از کanal مولکول‌های کلاس MHC II به تازگی سنتزشده از ER رسیده حفاظت می‌کنند، و پیتیدهای آنتی‌زنی در دسترس با کمک عامل تبادل پیتید H2/HLA-DM بارگیری می‌شوند. مجموعه‌های پایدار کلاس MHC II -پیتید سپس برای شناسایی سلول‌های CD4 $^+$ T به سطح سلول فرستاده می‌شوند. بسیاری از پیتیدها از طریق اندوسیتوز از آنتی‌زن‌های بیرون سلولی و سطح سلولی نشأت می‌گیرند.

آتوفاژی نیز بوسیله مولکول‌های کلاس MHC II در به نمایش گذاشتن خود-پیتیدها نقش دارد. این در مورد ارائه کلاس ۲ MHC روی سلول‌های اپیتیلیال تیموسی قشری (TECs) جهت انتخاب قطعی سلول‌های CD4 $^+$ T، و نیز روی TECs نخاعی برای پاکسازی سلول‌های CD4 $^+$ در حال توسعه با واکنش آشکار به خود-پیتیدها، صدق می‌کند. بنابراین، آتوفاژی در شکل‌دهی موجودی سلول CD4 $^+$ T بالغ (ایکینگر و همکاران، ۲۰۱۳؛ ندجیک و همکاران، ۲۰۰۸) و احتمالاً موجودی سلول CD4 $^+$ T ضدویروسی نقش دارد. همانند TECs، سلول‌های حرفة‌ای ارائه‌دهنده آنتی‌زن (APCs) مانند سلول‌های B یا سلول‌های دندریتیک (DCs) یک شکل‌گیری سازنده آتوفاگوزوم‌ها را پرورش می‌دهند، که به طور مداوم با بخش‌های بارگیری کلاس MHC II جوش می‌خورند. همراه با سایر فرآیندها مانند آتوفاژی با واسطهٔ چاپرون، آتوفاژی اجازه نمایش به موظیف‌ها از خود-آنتی‌زن‌های سایتوزوپلیک و هسته‌ای روی مولکول‌های کلاس MHC II را می‌دهد (دنگ بیل و همکاران، ۲۰۰۵؛ نیمرجان و همکاران، ۲۰۰۳؛ اشمیت و همکاران، ۲۰۰۷؛ ژو و همکاران، ۲۰۰۵). در موافقت با این مفهوم، هدف‌گیری مهندسی شده یک آنتی‌زن ویروسی، همچون ماتریس پروتئین ۱ آنفولانزا (MP1) به آتوفاگوزوم‌ها از طریق

جوش خوردن به LC3 مرتبط با غشای جداکننده، شناسایی آن بوسیله کلون‌های سلول T CD4⁺ خاص MP1، محدودشده توسط کلاس MHC2 را بهبود می‌بخشد، بدون در نظر گرفتن سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌زن استفاده شده (DCs، سلول‌های B، یا سلول‌های اپیتیلیال) (اشمیت و همکاران، ۲۰۰۷). همینطور، دُمین S1 هماگلوتینین آنفولانزای متصل به LC3 به طور مؤثری در زمینه مولکول‌های I-E^d کلاس MHC2 به یک هیرید سلول T CD4⁺ خاص S1 ارائه شد. این ارائه بوسیله درمان‌های دارویی تعديل و تنظیم گردید که اتوفاژی را افزایش داده یا ممانعت نمود و در حضور siRNA خاص ATG7 کاهش یافت (کامبر و همکاران، ۲۰۱۱). به همین ترتیب، مسیر اتوفاژی می‌تواند در ارائه محدودشده تعیین‌کننده‌های آنتی‌زنی مشتق شده از میکروارگانیسم‌های درون سلولی توسط مولکول MHC به لنفوسيت‌های T و در نتیجه نظارت درون سلولی برای عوامل بیماری زا نقش داشته باشد (کوبala و همکاران، ۲۰۱۲؛ مونز و همکاران، ۲۰۰۹؛ اشمیت و مونز، ۲۰۰۷). چنین وقایع شناسایی اجازه فعالسازی سلول‌های T CD8⁺ و APCs را روی CD4⁺ حرفه‌ای به محض تعامل با، به ترتیب، مولکول‌های کلاس MHC1 و کلاس MHC2 می‌دهد.

ارائه اپیتوپ‌های ویروسی محدود شده توسط کلاس ۲ MHC

در خصوص اپیتوپ‌های مشتق شده از ویروس، اولین نمایش یک اثر مثبت اتوفاژی روی ارائه آنتی‌زن به سلول‌های T در برگیرنده سلول‌های B آلوده به ویروس اپشتین بار (EBV) بود. کشف شد که آنتی‌زن ۱ هسته‌ای نهفته EBV (EBNA1) به طور کارآمدی به مسیر کلاس MHC2 برای شناسایی سلول CD4⁺ از طریق تجزیه لیزوژومی مرتبط با اتوفاژی دسترسی دارد؛ اگرچه شناسایی سلول CD8⁺ T آنتی‌زن هسته‌ای EBNA3A بدون اختلال پیش رفت، شناسایی تعیین‌کننده‌های EBNA1 توسط سلول CD4⁺ به محض ممانعت از اتوفاژی میانجیگری شده یا بواسطه بازدارنده دارویی یا نابودی بیان ATG12 از طریق مداخله RNA کاهش یافت (پالودان و همکاران، ۲۰۰۵). به طور مهمی، هیچ یک از این دو پرسه مقادیر بیان سطحی هترودیمرهای کلاس MHC2 را تحت تأثیر قرار نداد. مطابق با مفهوم یک مشارکت اتوفاژیک در مسیر ارائه/فرآوری کلاس MHC2، بازداری اسیدی شدن لیزوژومی اجازه تصویرسازی، با میکروسکوپ الکترونی، از واکوئول‌های محتوی EBNA1 محاصره شده با غشاها دوتایی را داد. به طور جالبی، وقتی به عنوان یک پروتئین سایتوژولیک بیان شد، تجزیه اتوفاژیک EBNA1

افزایش یافت، و اپیتوپ‌های EBNA1 بیشتری برای ارائه به و شناسایی توسط سلول‌های T CD4⁺ هم‌خانواده در دسترس قرار گرفت. این اشاره می‌کند که مکان EBNA1 براستی ارتباط آن با مسیر اتوفاژی را محدود می‌کند و از کشف آن توسط سلول‌های T محدود شده توسط کلاس ۲ MHC ممانعت می‌نماید (لئونگ و همکاران، ۲۰۱۰). همانطور که بواسطه تبدیل-LC3-I تا LC3-II یا شکل‌گیری اتوفاگوزوم ارزیابی شد، آنتی‌ژن نهفته پروتئین ۱ (LMP1) غشای EBV می‌تواند اتوفاژی را بهبود بخشد. LMP1 نیز می‌تواند برای تجزیه توسط اتوفاژی هدف قرار گیرد چون بازداری از اتوفاژی از طریق نابودی ATG1 یا بکلین ۱ منجر به تجمع LMP1 گردید (لی و ساگدن، ۲۰۰۸). اما این سؤال که آیا اتوفاژی منبع پیتیدهای LMP1 برای ارائه کلاس ۲ MHC و شناسایی سلول T CD4⁺ است بی‌جواب باقی می‌ماند. شکل‌گیری اتوفاگوزوم‌ها نیز به محض عفونت RSV در DCs مشاهده می‌شود. بازداری دارویی از اتوفاژی، ظرفیت DCs مبتلا به RSV را جهت فعالسازی سلول‌های CD4⁺ T جدا شده از موش‌های آلوده به RSV در یک آزمایش یادآوری کم کرد. بارگیری DCs با اول‌البومین آنتی‌ژن مدل (OVA) نشان داد که ممانعت از اتوفاژی مانع ارائه آنتی‌ژن کلاس ۲ MHC به سلول‌های T خام CD4⁺ تا ۱۱ جداسده از یک موش ترانس ژنیک TCR بیان‌کننده DO.11 TCR خاص OVA می‌شود. بنابراین فعالسازی هر دو مورد سلول‌های CD4⁺ T آنتی‌ژن تجربه کرده و سلول‌های CD4⁺ خام به نظر نسبت به مسدود نمودن اتوفاژی در DCs حساس هستند (موریس و همکاران، ۲۰۱۱). برای تجزیه و تحلیل احتیاجات ATG5 در ارائه آنتی‌ژن توسط DCs به سلول‌های T CD4⁺ در بدن موجود زنده، لی و همکارانش (۲۰۱۰) از کایمرای کبد نوزدای و موش‌های با ژن Atg5^{fl/fl} مشروط حفظشده فاقد Atg5 در CD11c بیان‌کننده سلول‌ها (موش‌های Atg5^{fl/fl}) با موش‌های بیان‌کننده کری-ریکامبیناز تحت کنترل بهبوددهنده CD11c تلفیق شدند) استفاده کردند. آنها دریافتند DCs فاقد ATG5، شناسایی ایمنی ذاتی عادی، درونی سازی، مهاجرت، بلوغ آنتی‌ژن، و ترشح سیتوکین را پرورش می‌دهد. با این حال، ATG5 برای DCs جهت تحریک سلول‌های CD4⁺ T در بدن موجود زنده بعد از ابتلا به ویروس هرپس HSV-1α و القای یک پاسخ سلول‌های Th1 CD4⁺ T ضد‌ویروسی محافظتی به محض عفونت درون واژینالی با دوزهای بالای HSV-2 موردنیاز است. ATG5 و سایر فاکتورهای اتوفاژی مانند ATG7 یا ATG12 برای فرآوری مؤثر و ارائه گونه‌ای از شکل‌های آنتی‌ژن‌های فاگوسیتوز شده توسط کلاس ۲ MHC که حاوی عناصری برای درگیری TLR می‌باشند سودمند هستند. با استفاده از

میکروسکوپ الکترونی عبوری، لی و همکارانش هیچ عالیمی از ساختارهای غشای دوتایی اطراف فاگوزوم‌های درگیر در جوش‌خوردگی با غشاها لیزوژومی، بجز نقشی برای اتوفاژی استاندارد نیافتند. در رابطه با ظرفیت فرآوری آنتیژن آنها، DCs فاقد ATG5 دارای میزان اسیدی شدن عادی لیزوژوم‌ها و فاگولیزوژوم‌های خود بودند اما یک جوش‌خوردگی فاگوزوم-لیزوژوم تأخیری و تحويل ناقص پروتئازهای لیزوژومی خانواده کاتپسین به قسمت‌های فاگوزومی را به نمایش گذاشتند. این احتمال هست که ATG5 بوسیله به خدمت گرفتن فاکتورهای کلیدی اتوفاژی در غشاها فاگوزوم‌ها، بلوغ فاگوزوم را بهبود بخشد. این مطالعات شواهد موردنیاز از بدن موجود زنده برای یک فرآیند وابسته به ATG5 در ارائه آنتیژن به سلول‌های CD4⁺ T فراهم نمود و نقشی مهم برای اجزای دستگاه اتوفاژی در فرآوری و ارائه آنتیژن‌های میکروبی بیرون سلولی در DCs توسط کلاس MHC2 را آشکار کرد. تقویت ارائه آنتیژن به سلول‌های T CD4⁺ ویروسی بوسیله اتوفاژی می‌تواند با یک پاسخ استرس یکپارچه مرتبط باشد. این در مورد واکسن تب زرد YF-17D نشان داده شد: به محض واکسیناسیون، پاسخهای مخصوص ویروس سلول T CD4⁺ به طور قابل توجهی در موش‌های فاقد کنترل کلی کیناز ۲ فعال نشدنی (GCN2)، که یک سنسور گرسنگی اسیدآمینه و القاکننده پاسخ استرس یکپارچه است، کم شدند. به دنبال تقلیل اسید آمینه‌های آزاد القاشده توسط آغاز کپی‌برداری ویروسی، GCN اتوفاژی را در سلول‌های دندریتیک فعال می‌کند و ارائه آنتیژن ویروسی محدود شده توسط کلاس MHC2 را بهبود می‌بخشد (راویندران و همکاران، ۲۰۱۴). اگرچه اتوفاژی، یا دست کم دستگاه اتوفاژی، به طور واضحی قادر به مشارکت در ارائه آنتیژن ویروسی محدود شده توسط کلاس MHC2 به سلول‌های CD4⁺ T می‌باشد، چنین مشارکتی به نظر می‌رسد یک قانون کلی نباشد، زیرا احتمال دارد القای ویروسی اتوفاژی را بدون اثر قابل کشف روی ارائه آنتیژن به سلول‌های CD4⁺ T خاص ویروس مشاهده نمود. این در مورد آنتیژن‌های ویروس آنفولانزا صادق است که برایش خنثی‌سازی ATG7 با واسطه siRNA در سلول‌های مبتلا به آنفولانزا ارائه‌دهنده آنتیژن بر پاسخ سلول‌های CD4⁺ T پالایش شده از طحال موشهای آلوده به آنفولانزا اثری نداشت. این نتیجه برای تمام سلول‌های ارائه‌دهنده آنتیژن آزمایش شده بکار می‌رود: فیربولاستهای ترانسفکت شده کلاس MHC2، تبار سلول B، تبار سلول ماکروفاز، DCs مشتق شده از مغز استخوان، و نیز فیربولاستهای فاقد ATG5. بنابراین، اتوفاژی با القای آنفولانزا به نظر می‌رسد در ارائه پیتیدهای آنفولانزای محدود شده توسط کلاس MHC2 نقش داشته باشد (کُمبر و

همکاران، ۲۰۱۱). بعلاوه برای یک ویروس معین، مسیر اتفاقاًزی می‌تواند در فرآوری ارائه پیتیدهای آنتی‌زنی از برخی اما نه سایر آنتی‌زنها، به سلول‌های T CD4⁺ هم‌خانواده مشارکت نماید. برخلاف EBNA1 (پالودان و همکاران، ۲۰۰۵)، مشاهده شد که تعیین کننده‌ها از EBNA2 و EBNA3 آنتی‌زن‌های نهفته می‌توانند فرآوری شده و بدون درگیری اتفاقاًزی مرسوم به کلون‌های سلول T CD4⁺ خاص ارائه شوند (تیلور و همکاران، ۲۰۰۶). سرانجام، با استفاده از لیزوزیم سفیده تخم مرغ (HEL) آنتی‌زن مدل نشان داده شد که گام‌های فرآوری مرتبط با اتفاقاًزی منجر به ارائه پیتیدهای سیتروولینه شده، که در آن آرژنین بوسیله آمین‌زادی به سیتروولین تبدیل می‌شود، روی مولکول‌های کلاس MHC2 به سلول‌های CD4⁺ می‌گردد (ایرلند و اونانیو، ۲۰۱۱). هر دو مورد DCs و ماکروفازها می‌توانند پیتیدهای سیتروولینه شده ارائه کنند. با این حال، در سلول‌های B، که به طور سازنده سطح بالای اتفاقاًزی را ندارند، سیتروولینه شدن به محض القای اتفاقاًزی به یک روش متکی بر ATG5 رخ می‌دهد. مطابق با نقشی برای اتفاقاًزی در سیتروولینه شدن، فعالیت دی‌آمیناز آرژنین پیتیدی (PAD) در اتفاقاًزوم‌های غنی‌شده با LC3 II که از ماکروفازهای پریتونی پالایش گردیدند، کشف شد. در حال حاضر، مشخص نیست که آیا آنتی‌زن‌های ویروسی که ارائه کلاس MHC2 آنها در برگیرنده یک همکاری از جانب اتفاقاًزی است در معرض اصلاحات بعد از ترجمه مانند سیتروولینه شدن قرار می‌گیرند یا نه.

ارائه اپیتوپ‌های ویروسی محدود شده توسط کلاس ۱ MHC

رابطه بالقوه بین دستگاه اتفاقاًزی و ارائه آنتی‌زن به سلول‌های T CD4⁺ تمرکز تحقیقات اخیر بوده است. مسیر ارائه آنتی‌زن کلاس ۱ MHC1 حاضر در تمام سلول‌های نوکلئوتیدی به سنتز درون سلولی آنتی‌زن‌ها (سیتوپلاسمی، هسته‌ای، توموری، یا آنتی‌زن‌های ویروسی) توسط دستگاه سیستم یوبی‌کوئیتین-پروتئازوم در سیتوزول بستگی دارد. سپس پروتئین‌های آنتی‌زنی تولید شده پیش از اصلاحات اضافی توسط آمینوپیتیدازها یا ارتباط مستقیم با مولکول‌های کلاس ۱ MHC1 به تازگی تولید شده در حضور پروتئین‌های چاپرون ویژه مانند تاپاسین، کالرتیکولین و ERp57، بوسیله مجموعه‌های انتقال دهنده خاص بنام TAP (انتقال دهنده مرتبط با فرآوری آنتی‌زن) به رتیکولوم اندوپلاسمی منتقل می‌شوند. آنگاه مجموعه‌های پیتیدهای روی هم سوار شده و کلاس ۱ MHC از طریق دستگاه گلزاری عبور می‌کنند و توسط وزیکول‌های ترشحی به سطح سلول فرستاده می‌شوند. از این رو، این مسیر ترشحی یا "کلاسیک" ارائه

فصل ۱۲: اتوفاژی در پاسخ‌های ایمنی به ویروس‌ها

آنٹی‌زن کلاس ۱ MHC نامیده می‌شود (جنسن، ۲۰۰۷). همانطورکه در بالا اشاره شد، شناسایی اپیتوپ‌های EBNA3A توسط سلول‌های T محدوده شده توسط کلاس ۱ MHC بوسیله بازدارنده‌های اتوفاژی یا هدف قرار دادن ATG12 در سلول‌های B بوسیله siRNA تحت تأثیر واقع نمی‌شود (پالودان و همکاران، ۲۰۰۵). لئونگ و همکارانش (۲۰۱۲) دریافتند هرچند ۳-متیل‌آدنین بر ارائه اپیتوپ‌های SNP و VYG از EBNA1 به سلول‌های CD4⁺ T اثر گذاشت، ارائه اپیتوپ HPV محدود شده توسط HLA-B35 از EBNA1 به کلون‌های سلول T مخصوص HPV را تحت تأثیر قرار نداد. برخلاف پتانسیل ارائه کلاس ۲ MHC^۲ تغییر یافته آنها، DCs فاقد ATG5 هیچ نقصی در ظرفیت آنها جهت ارائه تعیین‌کننده‌ها از OVA قابل حل روی مولکول‌های کلاس ۱ MHC به سلول‌های OTI CD8⁺ T مخصوص OVA در آزمایشگاه یافت نشد (لی و همکاران، ۲۰۱۰). هم‌یوغی^۱ آنتی‌زن MP1 آنفولانزا با LC3 برای هدف‌گرفتن آنتی‌زن جهت تجزیه اتوفاژیک، بر ارائه آنتی‌زن به یک کلون سلول T CD8⁺ محدود شده توسط HLA-A2 یا در سلول‌های اپیتیلیال، سلول‌های B یا DCs اثری نداشت (اشمیت و همکاران، ۲۰۰۷). در نهایت ۳-متیل‌آدنین و دوزهای کم و رتمنانی نتوانستند اثری بر ارائه اپیتوپ‌ها از یک آنتی‌زن سایتوزولیک در سلول‌های تغییر شکل یافته EBV توسط کلاس ۱ MHC داشته باشند (نیمرجان و همکاران، ۲۰۰۳). بنابراین، چندین مشاهده مستقل به نظر نشان دادند اتوفاژی شاید به طور چشمگیری در ارائه آنتی‌زن توسط مولکول‌های کلاس ۱ MHC به طور کلی و متعلق به اپیتوپ‌های ویروسی به طور خاص مشارکت نداشته باشند. با این وجود، مطالعات جدیدتر این مفهوم را پشتیبانی می‌کند که، تحت شرایط مشخصی، اتوفاژی قادر به بهبود ارائه تعیین‌کننده‌های ویروسی توسط مولکول‌های کلاس ۱ MHC برای فعالسازی سلول‌های CD8⁺ T هم‌خانواده است. مبتلا کردن ماکروفاژهای موش به یک ویروس جهش یافته HSV-1 ICP34.5 دارای خاصیت بیماریزایی برای بافت عصبی منجر به تجمع LC3 روی ساختارهای وزیکولی سیتوپلاسمی گردید و ارائه آنتی‌زن یک اپیتوپ B گلیکوپروتئین (gB) HSV-1 به یک سلول هیبریدی CD8⁺ T خاص را افزایش داد، که نشان می‌دهد اتوفاژی می‌تواند در فرآوری و ارائه اپیتوپ‌های ویروسی توسط مولکولهای کلاس ۱ MHC در ماکروفاژها نقش داشته باشد (انگلیش و همکاران، ۲۰۰۹). به طور قابل توجهی، همانطورکه ابتلاء ماکروفاژها توسط HSV-1 عادی پیش می‌رود، اتوفاژی قطعاً اتفاق می‌افتد، در نتیجه توانایی ماکروفاژهای مبتلا برای فعالسازی

^۱ هم‌یوغی؛ شفاق دودویی؛ کونژوگاسیون: Conjugation

سلول‌های T^{CD8⁺} خاص gB را بهبود می‌بخشد. این اتوفاژی مرتبط با ابتلای آخری، هم یک اتوفاژی مرسوم (متمازیز شده بواسطه غشای دولایه مطمئن برای LC3 و gB) را در بر می‌گیرد و هم یک شکل غیرمتداول اتوفاژی تمایزیافته بوسیله پیچ‌خوردن هر دو غشای درونی و بیرونی هسته را، که منجر به شکل‌گیری اتوفاگوزوم‌های غیرعادی مشتمل بر چهار لایه غشا می‌گردد. چنین ساختارهای چهار لایه‌ای که حاوی مقادیر زیاد آنتیژن ویروسی LC3 و gB هستند (همانطور که بوسیله میکروسکوپ الکترونی ایمنی سنجیده شد)، قادر به جوش خوردن به اندامک‌های لیتیک می‌باشند و با ارائه پرثمر کلاس 1 MHC ارتباط دارند زیرا به آنها اجازه فعالسازی هیبرید سلول CD8⁺ T را می‌دهد. به طرز جالبی، HSV-1 جهش‌یافته فاقد ICP34.5 منجر به القای غالب اتوفاگوزوم‌های دو لایه‌ای کلاسیک گردید که نشان می‌داد تسلط آخری اتوفاگوزوم‌های غیرمتداول تاحدی به بازداری زودهنگام شکل‌گیری اتوفاگوزوم کلاسیک مرتبط است. به شکل برجسته‌ای، ارائه کلاس 1 MHC ارتقا‌یافته توسط اتوفاژی قطعاً دربرگیرنده فعالیت پروتئازومی و انتقال گلزی بود، که نشان می‌دهد این مسیر اتوفاژی غیرمتداول به نوعی با مسیر کلاس 1 MHC متداول ارتباط دارد. داده‌های مربوط به فاز آخر ابتلای اتوفاگوزوم‌ها به بهترین وجه توسط مدلی توضیح داده می‌شوند که در آن، نواحی غنی‌شده با gB در مجاورت پوشش هسته‌ای باعث شکل‌گیری ساختارهای اتوفاگوزومی چهار لایه‌ای غیرمتداول می‌گردند، که با لیزوژوم‌ها جوش می‌خورند، در نتیجه اتوفاگولیزوژوم‌های مجاز را برای سطح اول تجزیه آنتیژن ویروسی تولید می‌نمایند. در یک گام دوم نامتمازی، مواد ویروسی ظاهرآ برای تلفیق با مسیر ارائه آنتیژن کلاس 1 MHC متکی به انتقال دهنده وابسته به پروتئازوم، به سیتوزول منتقل می‌شوند. بنابراین شکل‌های مشخص اتوفاژی ظاهرآ قادر به بهبود ارائه تعیین‌کننده‌های HSV-1 روی مولکول‌های کلاس 1 MHC برای شناسایی و فعالسازی سلول‌های T^{CD8⁺} می‌باشند. از این رو یک فرآیند اتوفاژی نسبتاً کلاسیک می‌تواند ارائه پیتید B به سلول‌های T^{CD8⁺} (احتمالاً بوسیله بازیافت مولکول‌های کلاس 1 MHC) را بهبود دهد، مگر اینکه توسط ICP34.5 تحریک شود، که در این صورت، یک مسیر اتوفاژی جایگزین جهت به خدمت گرفتن در همان هدف بعداً وارد عمل می‌شود. سرانجام، هایپرترمی کنترل شده و اینترلوکین 1 β ، اتوفاژی، تولید پیتیدهای ویروسی در اتوفاگوزوم‌ها، و فعالسازی سلول T^{CD8⁺} را تقویت می‌کند (انگلیش و همکاران، ۲۰۰۹)، که مسیرهای مفروضی برای مداخلات درمانی می‌گشاید. مطالعه دیگر اشاره نمود همراه با مسیر ارائه کلاس 1 MHC کلاسیک، یک مسیر واکوئولی متکی به ارائه TAP

یک اپیتوب ویروسی سنتز شده در درون سلول می‌تواند همزمان با اتوفاژی وجود داشته و از آن تأثیر بگیرد (تی و کانا، ۲۰۱۲). پروتئین pUL138 مرتبط با دوره کمون متعلق به HCMV حاوی یک موتیف ۱۳ اسیدآمینه‌ای است بنام LPL که می‌تواند بوسیله آلل HLA-B*3501 متعلق به سیستم کلاس MHC1 انسانی، هم به شیوه متکی به TAP و هم به روش مستقل از TAP، بدون اتکا به پروتئازوم، ارائه گردد. این ارائه هم برای بازدارنده‌های اسیدی شدن اندوزومی و هم پروتئازها حساس است، که نشانگر نقشی برای یک قسمت اندوواکوئلی می‌باشد. هنگامی که افزایش تحریک اتوفاژی بوسیله شوک گرمایی، آن را به شیوه متکی به ATG12 بیشتر نمود، هر دو مورد درمان ۳-متیل‌آدنین و سرکوب بیان ATG12 از طریق مداخله RNA، ارائه LPL را کاهش داد. در نهایت، pUL138 با LC3 و مارکر LAMP2 لیزوژومی هم‌منطقه شد، که اشاره به موضعی بودن اتوفاگولیزوژومی دارد. این مشاهدات هم برای فیبروبلاست‌های در معرض آدنوویروس نوترکیب فاقد قابلیت کپی‌برداری که pUL138 و فیبروبلاست‌ها را کدگذاری می‌کنند، یا DCs مشتق شده از مونوцит، که به‌طور طبیعی به HCMV مبتلا می‌شوند، معتبر بود. در مجموع، داده‌ها با مدلی سازگار بودند که ارائه LPL متکی به TAP در برگیرنده یک فرآیند اتوفاژیک هدایت‌کننده pUL138 درون سلولی به اتوفاگولیزوژوم‌ها برای تجزیه توسط پروتئاز‌های سرین لیزوژومی و بارگیری اپیتوب‌های حاصل روی مولکول‌های کلاس MHC1 اندوسیتیک که بازیافت شده‌اند باشد. علیرغم جداسازی آن از مسیر ارائه کلاس MHC1 کلاسیک، این مسیر واکوئلی با واسطه اتوفاژی، اپیتوب‌هایی تولید نمود که ظاهرًا یکسان، یا بسیار مشابه، با آنها بودند که بوسیله مسیر ارائه کلاس MHC1 کلاسیک تولید و توسط همان سلول‌های CD8⁺ T شناسایی شدند. این طور فرضیه‌سازی شد که ارائه متکی به TAP مرتبط با اتوفاژی می‌تواند استراتژی‌های ویروسی تأمین نماید که دقیقاً مسیر ارائه کلاس MHC1 کلاسیک را هدف‌گیری نمایند، برای نمونه از طریق ممانعت عملکرد TAP بوسیله فاکتور HCMV US6.

اتوفاژی و ارائه مقاطع

علاوه بر مسیر کلاسیک ارائه آنتی‌ژن کلاس MHC1، ماکروفافاژها و DCs می‌توانند از مسیر دیگری استفاده کنند که اجازه ارائه بوسیله مولکول‌های کلاس MHC1 تعیین‌کننده‌های آنتی‌ژنی بدست آمده از مواد بیرون سلولی اندوسیتیوز یا فاگوسیتیوز شده را می‌دهد. این فرآیند

جایگزین اصطلاحاً ارائه متقاطع نامیده می‌شود (کریسویل و همکاران، ۲۰۰۵؛ هیث و همکاران، ۲۰۰۴) و می‌تواند معرف یک فرآیند مهم برای توسعه یک پاسخ سلول T کشنده^۱ مخصوص ویروس در بدن موجود زنده باشد. برای مثال، ارائه متقاطع بوسیله CD8α⁺ DCs زیرمجموعه MCMV C57BL/6 موش‌ها با است (بوش و همکاران، ۲۰۱۳). ارائه متقاطع می‌تواند مشتمل بر چندین مسیر باشد که در حال حاضر به طور کامل درک نمی‌شوند (جوفره و همکاران، ۲۰۱۲). مثلاً تجزیه آنتیژن و اتصال پیتید به مولکول‌های کلاس I MHC1 می‌تواند در فاگوزوم‌ها یا قسمت‌های اندوسیتیک بازیافت کننده، پیش از انتقال به سطح سلول بدون عبور از دستگاه گلتری رخ دهد. این مسیر مستقل از TAP، "مسیر واکوئولی ارائه متقاطع" نامیده می‌شود. فرآوری آنتیژن نیز می‌تواند بوسیله پروتئازوم بعد از جابجایی آنتیژن از فاگوزوم‌ها یا اندوزوم‌ها، در سیتوپلاسم اتفاق بیفت. در این حالت، پیتیدهای سایتوزولیک حاصل از طریق مولکول‌های TAP به درون رتیکولوم اندوپلاسمی منتقل می‌شوند و پیش از تلفیق مجموعه‌ها به درون مسیر ترشحی با مولکول‌های کلاس I MHC1 در هم می‌آمیزند. از طرف دیگر، پیتیدهای فرآوری شده می‌توانند برای بارگیری روی مولکول‌های کلاس I MHC1 دوباره به درون فاگوزوم‌ها فرستاده شوند، که بعد به سطح سلول می‌روند. مکانیسم آخری بستگی به حضور فاکتورهای بارگیری TAP و مولکول‌های کلاس I MHC1 در درون فاگوزوم‌ها دارد که از طریق روابط با اجزای تخصص‌یافته واسط رتیکولوم اندوپلاسمی - دستگاه گلتری، به خدمت فاگوزوم‌ها گرفته می‌شوند. آن مسیرهای متشكل از مسیرهای ارائه متقاطع متکی به TAP سایتوزولیک هستند. اهمیت نسبی هر مسیر برای ارائه متقاطع در ماکروفازها و DCs در حال حاضر بخوبی ترسیم نمی‌شود. چندین مطالعه که یک مشارکت اتوفاژی در ارائه تعیین‌کننده‌های ویروسی محدودشده توسط کلاس II MHC2 را مستندسازی نمودند، به بررسی نقش احتمالی برای دستگاه اتوفاژی در ارائه متقاطع نیز پرداخته و نتوانستند شواهدی برای چنین نقشی بیابند. برای نمونه، با گذاشتن سلول‌های طحال پر از OVA پرتودیده روی DCs فاقد ATG5، لی و همکارانش (۲۰۱۰) یک ظرفیت ارائه متقاطع عادی برای سلول‌های OT-I T نسبت به DCs دستکاری نشده یافتند. با بهره‌برداری از کلون‌های سلول T CD8⁺ HIV-I gag، بلانچت و همکارانش (۲۰۱۰)

^۱ T کشنده؛ سلول T سیتوکسیک: Cytotoxic T cell

فصل ۱۲: اتوفاژی در پاسخ‌های ایمنی به ویروس‌ها

متوجه شدند که ارائه متقاطع کلاس MHC1 DCs توسط بارگیری شده با HIV بوسیله تغییر دارویی اتوفاژی تحت تأثیر قرار نگرفتند، دست کم در مقاطع اولیه زمانی که ممانعت از اتوفاژی قطعاً روی ارائه کلاس ۲ MHC به کلون‌های سلول T⁺ CD4⁺ هم خانواده اثر گذاشتند. با این وجود، یک مطالعه گزارش نمود سلول‌های آلوده به ویروس، که در حال مردن از چیزی بودند که آنها به اصطلاح "مرگ سلولی اتوفاژیک" نامیدند، نسبت به همتای خود که در حال مردن از زوال سلولی هستند، به طور مؤثرتری جهت فعال کردن سلول‌های T⁺ CD8⁺ DCs توسط متقاطع می‌شوند (یول و همکاران، ۲۰۰۹). فیبروبلاست‌های جنینی موش قادر متقاطع (MEFs) bax/bak (MEFs) که می‌توانند دستخوش مرگ سلولی مستقل از کاسپاز قرار گیرند بمنظور مطالعه چگونگی اثر مسیرهای مرگ سلولی بر کارآمدی تحریک متقاطع^۱ بکار گرفته شدند. به عنوان منبع آنتیژن برای ارائه متقاطع بوسیله سلول‌های ارائه‌دهنده آنتیژن به سلول‌های T MEFs CD8⁺ مخصوص ویروس در کشت یا به سلول‌های T⁺ CD8⁺ خام در بدن موجود زنده، MEFs با آنفولانزای A آلوده شدند. در حالی که درمان UV-B الزاماً زوال سلولی را در WT MEFs نمود، MEFs Fag/Bax/Bak دستخوش مرگ سلولی با ویژگی‌های سلولی و بیوشیمیایی اتوفاژی قرار گرفتند مانند شکل گیری اتوفاگوزوم و کشف LC3-II. هر دو نوع آلوده MEF می‌توانند، به محض فاگوسیتوز، آنتیژن ویروسی را برای ارائه متقاطع توسط DCs به سلول‌های T⁺ CD8⁺ حافظه مخصوص ویروس در آزمایشگاه تحويل دهنند. ظرفیت MEFs در حال مرگ جهت تحریک کردن سلول‌های T⁺ CD8⁺ خام بوسیله تزریق آنها بصورت داخل پوستی به سویه‌های مختلف موش ارزیابی گردید. دو هفته بعد، سلول‌های T⁺ CD8⁺ پالایش شده از طحال برای ظرفیت آنها جهت واکنش به موتیف ۳۷۴-۳۶۶^۴ نوکلئوپروتئین (NP) ارائه شده بوسیله D^d مولکول‌های کلاس I MHC1 D^b یا موتیف ۵۲۶-۵۱۲^۵ هماگلوتینین (HA) ارائه شده بوسیله D^d در آزمایشگاه تجزیه و تحلیل شدند. تحت چنین شرایطی MEFs قادر Bax/Bak نسبت به WT MEFs تحریک تقویت شده‌ای را القا نمودند. MEFs قادر Bax/Bak نیز میزان بالاتری گسترش و سطح ترشح بیشتری از IFN-γ را در میان سلول‌های ترانس ژنیک TCR CD8⁺ T مخصوص HA₅₁₈₋₅₂₆-D^d در بدن موجود زنده القا کردند. افزایش تحریک متقاطع با ارائه متقاطع یک مجموعه کلاس I MHC -پیتید بیشتر شده و سطح ترشحی بالاتر اینترفرون نوع ۱ بوسیله DCs ارتباط داشت. خاموشی Atg5 در MEFs قادر Bax/Bak توسط siRNA، پیش

^۱ تحریک متقاطع: Cross-priming

از سرایت ویروس آنفولانزا، مانع ظرفیت بهبود تحریک متقطع گردید. این نشان می‌دهد که ATG5 در ظرفیت افزایش یافته سلول‌های درحال مرگ اهداکننده آنتیژن با اتوفاژی بالا رفته بمنظور القای تحریک متقطع سلول‌های T CD8⁺ مخصوص آنفولانزا بوسیله DCs درگیر هستند. بنابراین، سطح اتوفاژی در سلول‌های اهداکننده در حال مرگ مبتلا به ویروس بر کارآمدی تحریک متقطع سلول‌های CD8⁺ مخصوص ویروس توسط DCs اثر می‌گذارد. در آن مطالعه، ماهیت مسیر ارائه متقطع درگیر در سطح سلول‌های ارائه‌دهنده آنتیژن ناشناخته بود. در مطالعه‌ای جداگانه، مشاهده شد وقتی سلول‌های ارائه‌دهنده توسط یک ویروس واکسینیای نوترکیب (rVACV) بیان‌کننده RSV-F آلوده شد، یک مسیر مستقل از TAP می‌تواند ارائه موتفیف ۲۴۹-۲۵۸ گلیکوپروتئین ادغام‌کننده RSV (F) توسط مولکول^d Kلاس ۱ MHC موش به سلول‌های CD8⁺ T سایتوتوكسیک را پیش ببرد. آزمایشات انجام شده با rVACVs متمایز بیان‌کننده اشکال متنوع F، و نیز بازدارنده‌های داروبی، آشکار نمودند این ارائه مستقل از TAP دربرگیرنده فرآوری اندوزومی پروتئین F از قبل موجود در ایناکولوم^۱ است، فرآیندی که توسط 3-MA ممانعت گردید (جانستون و همکاران، ۲۰۱۲). اگرچه مشارکت اتوفاژی در آن فرآیند نیازمند تأیید بیشتر است، داده‌ها یادآور مشاهدات توسط تی و کانا (۲۰۱۲) در مورد ارائه یک آنتیژن HCMV درون سلولی توسط یک مسیر واکوئولی مستقل از TAP هستند. در مجموع، این نشان می‌دهد دستگاه اتوفاژی ممکن است در ارائه متقطع یک آنتیژن ویروسی بیرون سلولی نقش داشته باشد، که دربرگیرنده فرآوری مستقل از TAP در قسمت‌های اندولیزوزومی اسیدی است، پیش از اینکه روی مولکول‌های کلاس ۱ MHC در حال بازیافت، که از بازیافت سریع اندوزوم‌های آغازین مشتق می‌شود، به سطح ارائه گردد. این حقیقت جالب بود که نتایج آزمایشگاه با تحریک متقطع سلول‌های CD8⁺ T خاص F249-258 در بدن موجود زنده ارتباط دارد (جانستون و همکاران، ۲۰۱۲). موش‌های فاقد GCN2 قبلًاً اشاره شده، نیز بعد از واکسیناسیون YF-17D در ترتیب دادن پاسخ‌های ضدویروسی سلول T CD8⁺ کمتر مفید بودند. این فنتیپ احتمالاً دربرگیرنده یک ارائه متقطع تغییریافته از اپیتوپ‌های ویروسی است زیرا سلول‌های دندریتیک فاقد GCN2 قادر به ارائه متقطع یک آنتیژن الگو به سلول‌های CD8⁺ T هم‌خانواده در آزمایشگاه بودند. در این سیستم اتوفاژی القاشه توسط GCN2 در هر

^۱ ایناکولوم: ماده‌ای که درمایه کوبی واکسن وجود دارد

دو مورد سلول فاگوسیتوزکننده و در حال مرگ برای ارائه متقطع بهینه مهم بود (راویندران و همکاران، ۲۰۱۴). بنابراین داده‌های در دسترس نشان می‌دهند اتوفاژی می‌تواند ارائه متقطع تعیین‌کننده‌های ویروسی از محمولة فاگوسیتوزشده در دو سطح را بهبود بخشد: (۱) کارآمدی ارائه متقطع می‌تواند توسط سطح اتوفاژی بنashده در سلول‌های مبتلا در زمان رویداد فاگوسیتیک تحت تأثیر واقع شود و (۲) دستگاه اتوفاژی ممکن است از طریق ارتباط با یک مسیر واکوئولی اندولیزوزومی در ارائه متقطع مشارکت نماید. اینکه آیا اگزوسیتوز مرتبط با اتوفاژی (دریک و همکاران، ۲۰۱۲) بوسیله سلول‌های اهداکننده می‌تواند در یکی یا هر دوی این سطوح مشارکت نماید ناشناخته است. علت‌های اینکه مطالعات اولیه نتوانستند اثر دستگاه اتوفاژی روی ارائه متقطع آنتیژن‌های ویروسی را کشف کنند نامشخص است. ممکن است چنین اثری به نوع سلول، نوع ویروس و یا مسیر درگیر در تجزیه پروتئین بستگی داشته باشد.

دستگاری اتوفاژی توسط ویروس‌ها جهت فرار از ایمنی قطبیقی

مجموعه مطالعاتی که در بالا اشاره شد نشان می‌دهند اتوفاژی می‌تواند نقشی برجسته در ارائه اپیتوپ‌های ویروسی به لنفوسیت‌های $\beta\alpha$ T ضدوبروی برای هر دو مسیر ارائه کلاس MHC II و کلاس MHC I ایفا نماید. همانطورکه می‌توان انتظار داشت، تعدادی از ویروس‌ها دارای مکانیسم‌های مولکولی تحول‌یافته‌اند که قادر به خنثی‌سازی اتوفاژی، و در نتیجه، آسیب رساندن به مشارکت اتوفاژیک در ارائه آنتیژن پیتید روی مولکول‌های MHC می‌باشند. چنین مکانیسم‌هایی عبارتند از بازداری از آغاز اتوفاگوزوم همانطورکه برای HSV-1 مشاهده گردید (ارودال و همکاران، ۲۰۰۷)، EBV، سارکوم کاپوزی مرتبط با ویروس هرپس (KSHV)، و ویروس ۶۸ هرپس-۷ موش‌سانان (کو و همکاران، ۲۰۰۸؛ لیانگ و همکاران، ۲۰۰۸) و ممانعت از بلوغ اتوفاگوزوم همانطورکه برای HCV نشان داده شد (آییت-گوقولته و همکاران، ۲۰۰۸؛ دروکس و همکاران، ۲۰۰۹)، HIV (بالانچت و همکاران، ۲۰۱۰؛ کایه و همکاران، ۲۰۰۹) و ویروس آنفولانزا (گانگ و همکاران، ۲۰۰۹). در برخی نمونه‌ها، تغییر شناسایی اپیتوپ ویروسی، توسط سلول‌های T ضدوبروی مستندسازی شده است.

مسیر ارائه آنتیژن کلاس ۲ MHC

همانطورکه قبلاً اشاره شد، فاکتور ICP34.5 متعلق به HSV-1 دارای خاصیت بیماری زایی برای بافت عصبی مانع القای اتوفاژی کلاسیک می‌شود. اکنون درک می‌شود که این مداخله با خاطر هدف‌گیری بکلین ۱ توسط یک دامنه تخصص یافته ICP34.5، به ممانعت سریع سرهم کردن اتوفاگوزوم بستگی دارد (هی و لوین، ۲۰۱۰). با انجام این کار، ICP34.5 براستی پاسخ‌های سلول T CD4⁺ در پاکسازی ویروسی طی عفونت قرنیه‌ای در موش‌ها را به‌طور منفی تعديل و تنظیم می‌نماید. بر طبق آن، عفونت داخل چشمی با ویروس HSV-1 جهش یافته دربردارنده یک مولکول اصلاح شده ICP34.5 با ناتوانی در برقراری ارتباط با بکلین ۱، که یک پاسخ تقویت شده سلول CD4⁺ را در بدن موجود زنده به راه انداخت، به‌طور مؤثری نابود شد و منجر به کاهشی در مرگ و میر گردید (لیب و همکاران، ۲۰۰۹). علاوه بر این، برخلاف فیروblast‌ها و نورون‌ها، ICP34.5 (همچنین مشهور به Y34.5) از شکل‌گیری اتوفاگوزوم در DCs جلوگیری نمی‌کند، بلکه در عوض جوش‌خوردگی اتوفاگوزوم‌ها با لیزوژوم‌ها را مسدود می‌نماید، که منجر می‌شود به تجمع اتوفاگوزوم، همانطورکه بوسیله تجمع فاکتور SQSTM1/p62 نشان داده شد، با این پیامد که اپیتوب‌های HSV-1 کمتر در دسترس مولکول‌های کلاس ۲ MHC هستند و با کارآمدی کمتری به سلول‌های CD4⁺ T ارائه می‌شوند (گُبیل و لیب، ۲۰۱۲). به همین ترتیب، فاکتور ۲ ماتریس پروتئین ویروس آنفلانزای A، که با بکلین ۱ هم تعامل دارد، به‌طور یکسانی از بلوغ اتوفاگوزوم‌ها جلوگیری می‌کند (گاناگ و همکاران، ۲۰۰۹) و ظرفیت ارائه آنتیژن مولکول‌های کلاس ۲ MHC را از بین می‌برد (کامبر و همکاران، ۲۰۱۱). در مورد HIV-1، مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که بلافارسله بعد از عفونت DC HIV-1 از تغییرات پی درپی اتوفاژی ممانعت می‌کند و از طریق فعالسازی مسیر ارسال سیگنال کیناز-mTOR-S6 توسط پروتئین پوشش HIV-1، مخزن اتوفاگوزوم‌های موجود را تمام می‌کند. چنین ممانعتی منجر به افزایش محتوای HIV-1 در DCs و بالا رفتن انتقال DC ویروسی به سلول CD4⁺ T گردید. انسداد اتوفاژی القاشده توسط HIV-1 فرآوری آنتیژن GAG ویروسی و ارائه با واسطه مولکول کلاس ۲ MHC به سلول‌های CD4⁺ T مخصوص-GAG HIV-1 را کاهش داد (بلانچت و همکاران، ۲۰۱۰).

مسیر ارائه آنتیژن کلاس ۱ MHC

ما دیده‌ایم که مکانیسم‌های تحول یافته HSV-1 با بازداری از سازماندهی اتوفاگوزوم به سرعت مانع اتوفاژی کلاسیک می‌شوند. علاوه بر تأثیرگذاری بر ارائه آنتیژن کلاس ۲ MHC ۲ در بدن موجود زنده (لیب و همکاران، ۲۰۰۹)، چنین ممانعتی فرآوری و ارائه اپیتوب gB HSV-1 بوسیله مولکول‌های کلاس ۱ MHC ۱ را نیز توسط ماکروفاژهای موش در آزمایشگاه به خطر می‌اندازد (انگلیش و همکاران، ۲۰۰۹). به طور کلی‌تر، می‌توان توقع داشت بیشتر مکانیسم بازدارنده‌ای که ویروس‌ها تکامل داده‌اند تا مانع اتوفاژی مرسوم شوند قادر است به طور منفی ارائه تعیین‌کننده‌های ویروسی درون سلولی توسط کلاس ۱ MHC که بوسیله اتوفاژی ارتقا یافته را تعديل و تنظیم نماید. بنابراین، مسیر کلاسیک با واسطه اتوفاژی (انگلیش و همکاران، ۲۰۰۹) و مسیر واکوئولی با واسطه اتوفاژی (تی و کانا، ۲۰۱۲) که در ارائه تعیین‌کننده‌ها از آنتیژن‌های ویروسی درون سلولی به سلول‌های CD8⁺ T نقش دارند به طور بالقوه توسط چنین مکانیسم‌های بازدارنده‌ای تحت تأثیر قرار گیرند. این سؤال که آیا ویروس‌ها مکانیسم‌هایی جهت ممانعت از شکل‌های غیرمتداول اتوفاژی توسعه داده‌اند، مانند اتوفاژی دربرگیرنده اتوفاگوزوم‌های چهارلایه‌ای با منشا هسته‌ای (انگلیش و همکاران، ۲۰۰۹)، یک سؤال بدون جواب است.

اتوفاژی و عملکرد ارائه آنتیژن سلول

فعالسازی مؤثر سلول‌های T خام توسط DCs نه تنها به ارائه آنتیژنی محدود شده توسط MHC بلکه به میزان مشخصی تحریک کمکی ارائه شده توسط مولکول‌های سطحی مانند CD86، CD80، CD40، CD80، CD40 هم نیاز دارد و نیز تولید مناسب سایتوکاین‌هایی که بزرگی و ماهیت پاسخ‌های ایمنی تطبیقی القا شده را تعديل و تنظیم می‌نمایند. این ویژگی‌های فنوتیپی و عملکردی DCs معرف پایه و اساس دستورالعمل پاسخ‌های ایمنی تطبیقی توسط ایمنی ذاتی می‌باشند. مطابق با آن، از آنجایی که اتوفاژی به نظر قادر به تعديل و تنظیم رویدادهای ارسال سیگنال القا شده بوسیله درگیری TLR است (لوین و درتیک، ۲۰۰۷)، اثر ویروس‌هایی که از اتوفاژی روی فعالسازی سلول T خود ویروسی جلوگیری می‌کنند احتمالاً تنها محدود به تعديل و تنظیم میزان آنتیژن در دسترس برای مولکول‌های MHC نمی‌شود. در عوض، چنین ویروس‌هایی تحریک سلول T خام از طریق تغییر شبکه‌های ارسال سیگنال که در DCs در معرض تولیدات میکروبی القا می‌شوند را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند. موریس و همکارانش (۲۰۱۱)

مشاهده نمودند همراه با ظرفیت کاهش یافته آنها جهت فعالسازی سلول‌های T CD4⁺ از موش‌های مبتلا به RSV، بازداری از اتوفاژی در DCs مبتلا به RSV منجر به کاهش تولید IFN نوع ۱، TNF، IL-6، و IL12-p40 می‌گردد. علاوه بر این، کلاس MHC۲ و میزان بیان مولکول تحریک‌کننده کمکی، هر دو کم شدند که نشان می‌دهد اتوفاژی بلوغ DCs موش القاشه توسط RSV را تنظیم می‌نماید (موریس و همکاران، ۲۰۱۱). در راستای این موضوع، موش‌های مبتلا به RSV فاقد اتوفاژی (Beclin1⁺¹)، که پاتولوژی ریه بدخیم را به نمایش گذاشتند، کاهشی در تولید سیتوکین ذاتی و میزان کلاس MHC۲ در چندین زیرمجموعه DCs ریوی را آشکار نمودند. این خصوصیات به محض کشت مشترک با کم‌شدن القای سایتوکاین‌های ضدویروسی (γ-IFN و IL-17a) در سلول‌های CD4⁺ در HIV-1 مخصوص Gag همبستگی داشتند. داده‌های بالا نشان می‌دهد اتوفاژی نقش مهمی را در بیولوژی DC طی عفونت ویروسی ریوی ایفا می‌کند، که به آنها اجازه می‌دهد از توسعه یک پاسخ ضدویروسی سلول T CD4⁺ Th1 حمایت کنند (رید و همکاران، ۲۰۱۳). بوسیله مسدود کردن اتوفاژی در DCs انسان، HIV-1 فعالسازی سلول T مخصوص Gag بوسیله سلول‌های مبتلا به HIV-1 را کاهش می‌دهد. این اثر مطمئناً نه تنها بر یک فرآوری ارائه آنتی‌زن Gag کاهش یافته بلکه همچنین بر پاسخ‌های اصلاح شده DCs به HIV-1 در DCهایی که فاقد ATG5 یا LC3 هستند بستگی دارد. از این گذشته، پاسخ سایتوکاین به HIV-1 یا لیگاندهای TLR می‌تواند به طرز چشمگیری کاهش یابد و با فسفریالاسیون کاهش یافته NF-κB ارتباط داشته باشد. با این حال، این اثرها قطعاً به نظر می‌رسد بر میزان کلاس MHC۲ (HLA-DR) کاهش کلاس MHC۲ برخلاف DCs موش مبتلا به RSV، فاقد DCs Atg-5 مبتلا به HIV-1 کاهش کلاس MHC۲ یا یک میزان بیان تحریک کننده کمکی را نشان ندادند و کاهش ظرفیت جهت تولید TNF-α، IL-6، یا IL-12p40 را آشکار ننمودند (لی و همکاران، ۲۰۱۰). علت اینکه فقدان اتوفاژی در DCs منجر به کمبود تولید سایتوکاین یا کلاس MHC۲/تحریک بیش از حد مولکول تحریک‌کننده کمکی در پاسخ به برخی، اما نه بقیه، عفونت‌های ویروسی می‌شود مبهم است و ممکن است به ویژگیهای ویروس مطالعه شده بستگی داشته باشد.

بیانات پایانی

دانش فعلی ما از فرآیند اتوفاژی، ویژگی هایش، و ارتباطش با مسیرهای ارسال سیگنال ایمنی ذاتی در سلول‌های آلوده به ویروس هنوز در دوران طفولیت خود است. به نظر می‌رسد چندین PRRs شناسایی کننده تعیین کننده‌های ویروسی قادر به القای اتوفاژی هستند، با این حال بررسی PRRs کامل مکانیسم‌های مولکولی دقیق زیربنای چنین القاهايی باقی می‌ماند. بعلاوه، سایر PRRs می‌توانند بر اتوفاژی اثر بگذارند مانند گیرنده‌های رفتگر، گیرنده مانوز، ICAM مخصوص سلول دندربیتیک قاپنده غیراینتگرین (DC-SIGN)، که قادر به کشف ویروس‌ها و میانجیگری جذب ذرات ویروسی می‌باشد. به طور واضحی، تأثیرات دوسویه بین اتوفاژی و مسیرهای ارسال سیگنال القاشه توسط گیرنده‌های ایمنی ذاتی و عواقب چنین اثراتی روی پاسخ‌های ایمنی ضدویروسی باشیست کشف شود. مسیر دیگر تحقیق باشیست بر نقش اتوفاژی در ایمنی ذاتی طی عفونت‌های هم‌مان ویروسی تمرکز نماید. بسته به سطح حساسیت یک عامل بیماری زای مشخص به اتوفاژی، مراحلی که در آن عوامل بیماری زای عفونت هم‌مان ممکن است اتوفاژی، ترتیب ابتلا، و ماهیت این سلول‌ها، را تعديل و تنظیم نمایند، اتوفاژی ممکن است معرف یک پارامتر کلیدی در نتیجه پاسخ ایمنی ذاتی به سرایت هم‌مان عامل بیماری زای باشد. در رابطه با ایمنی تطبیقی، داده‌های در دسترس اشاره می‌نمایند که اتوفاژی می‌تواند نه تنها در تحويل آنتی‌زن ویروسی به قسمت‌های واکوئولی اسیدی تخصص یافته برای تجزیه، مجموعه‌های سرهم شده پیتید-کلاس MHC۲، و ارائه سطحی به سلول‌های CD4⁺ T نقش داشته باشد، بلکه قادر است ارائه تعیین کننده‌های ویروسی درون سلولی به سلول‌های CD8⁺ T را بوسیله مولکول‌های کلاس MHC۱ ارتقا بخشد. در نهایت، اتوفاژی در سلول‌های اهداف کننده مبتلا و دستگاه اتوفاژی در DCs می‌تواند بر کارآمدی ارائه متقاطع تعیین کننده‌های ویروسی بیرون سلولی به سلول‌های T CD8⁺ اثر بگذارد. بنابراین، سلول‌های حرفة‌ای ارائه کننده آنتی‌زن مانند DCs قادر به ارائه محصولات تجزیه‌ای هر دو آنتی‌زن‌های ویروسی بدست آمده بیرون سلولی و آنتی‌زن‌های ویروسی درون سلولی به سلول‌های T CD8⁺ و CD4⁺ خام برای القای کمک‌کننده و لنفوسيت‌های T ضدویروسی سایتوتوکسیک می‌باشند. رمزگشایی رویدادهای دقیق سلولی و بیوشیمیایی زیربنای این اثرات در درک اینکه چگونه اتوفاژی دقیقاً با ترشح، اندوسیتوز، و فاگوسیتوز ارتباط دارد تا ارائه آنتی‌زن ویروسی محدود شده توسط MHC را تنظیم نماید، و

احتمالاً، در طراحی راهکارهای جدید جهت بهتر کردن واکسیناسیون ضدویروسی چشمگیر خواهد بود.

تقدیر و تشکر

کار این نویسنده‌گان بوسیله کمک هزینه ANR، سازمان دانشگاهی فرانسه (IUF، MF)، CNRS، INSERM، FINOVI، بنیاد فرانسوی اپتی، هیأت ملی دو ران دلا لیگ مقابله با سرطان حمایت گردید. آنها چارچوب LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0042) از دانشگاه لیون را درون برنامه سرمایه‌گذاریهای دُوئنیر(ANR-11-IDEX-0007) انجام شده توسط آژانس تحقیقات ملی فرانسه (ANR)، که کار در قالب آن انجام شد، تصدیق نمودند.

فصل ۱۸

فرآوری و ارائه آنتیژن‌ها توسط MHC بعد از اندوسیتوز، اگزوسیتوز و تجزیه سیتوپلاسم با کمک اتوفاژی

مقدمه

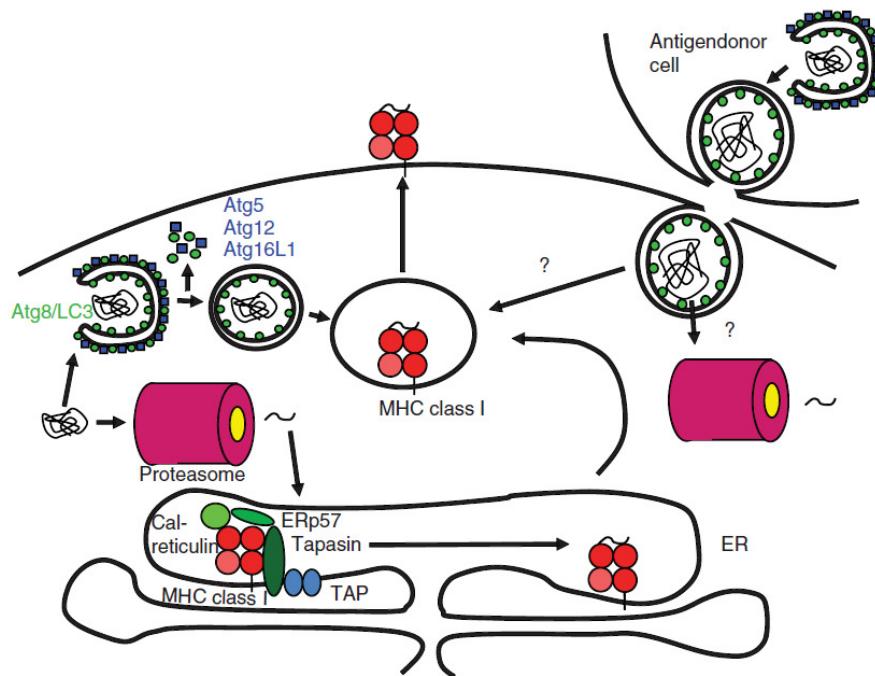
سیستم ایمنی تطبیقی مهره‌داران طی عفونت‌ها از انتخاب کلونال^۱ برای گسترش سلول‌های ایمنی خاص از یک ذخیره بزرگ استفاده می‌کند که گیرنده‌هایش را بوسیله نوترکیبی سوماتیک از عناصر سازنده ژنتیکی متنوع ساخته است (دِنگ و همکاران، ۲۰۱۳). دو سلول ایمنی تطبیقی که این مکانیسم‌ها را به خدمت می‌گیرند سلول‌های B (نشأت‌گرفته از بورس فابریسیوس یا مغز استخوان)، و سلول‌های T (نشأت‌گرفته از تیموس). گیرنده و آنتی‌بادی‌های سلول B بصورت شکل حلال خود، عناصر ساختاری آنتیژن‌های بیرون سلولی دست‌نخورده روی سطوح سلول و در شکل حلال را تشخیص می‌دهند، در حالیکه سلول‌های T تکه‌های آنتیژن‌های درون سلولی و بیرون سلولی را بعد از تجزیه درون سلولی در سلول‌های ارائه‌کننده آنتیژن می‌شناسند، که تکه‌های حاصل متصل به مولکول‌های کمپلکس بافت سازگاری اصلی (MHC) را روی سطح سلول‌های خود به نمایش می‌گذارند (ثرامبتا و ملمن، ۲۰۰۵؛ ویکتورا و نوسنزویگ، ۲۰۱۲). برای سلول‌های T CD8⁺ که حفاظت در برابر عفونت‌های ویروسی و سلول‌های توموری را

^۱ مربوط به تولیدمثل غیرجنسی: Clonal

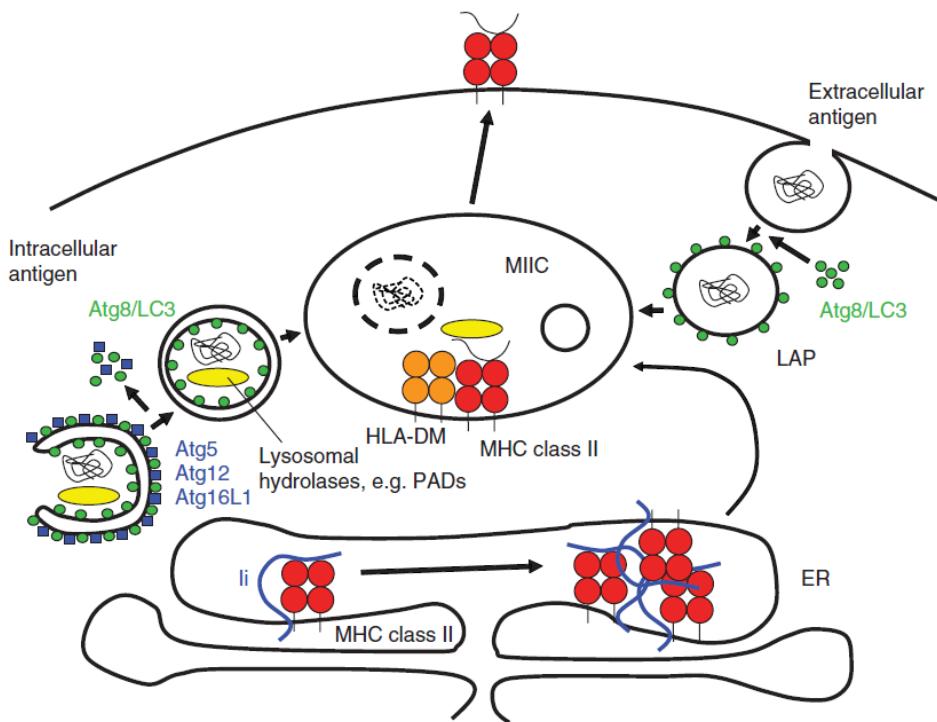
میانجی‌گری می‌کنند، عمدتاً پیتیدهای اُكتا یا نانومِر روی مولکول‌های کلاس MHC1 حاضر می‌شوند. مولکول‌های کلاس MHC2 معمولاً پیتیدهای درازتر را ارائه می‌نمایند که همچنین دارای یک توالی اسید آمینه نانومری است برای اتصال کلاس MHC2 به سلول‌های T CD4⁺ و سلول‌های B کمک‌کننده، که پاسخ‌های ایمنی تطبیقی را با کمک به سلول‌های T CD8⁺ و سلول‌های B هدایت می‌نمایند، اما در بیشتر موارد به صورت N- و C- انتهایی گسترش می‌یابند. بیشتر لیگاندهای کلاس 1 MHC توسط پروتئازوم، یک پروتئاز چند کاتالیزوری در سیتوزول و هسته، تولید می‌شوند. برای مسیر فرآوری آنتی‌زن کلاس 1 MHC کلاسیک (تصویر ۱۸,۱) این پیتیدها سپس بوسیله انتقال‌دهنده مرتبط با فرآوری آنتی‌زن (TAP) به درون رتیکولوم اندوپلاسمی (ER) فرستاده می‌شوند. TAP جهت بارگیری کمپلکس پیتید (PLC) کلاس 1 MHC از طریق اتصال به تاپاسین به خدمت گرفته می‌شود، و این کمپلکس همچنین حاوی کال‌رتیکولین، یک پروتئین دی‌سولفید ایزومراز ERp57، شاپرون متصل‌شونده به قند، زنجیره سنگین کلاس 1 MHC، و بتا ۲ میکرو‌گلوبولین ($\beta 2m$) است (بلوم و همکاران، ۲۰۱۳). وقتی که مولکول‌های کلاس 1 MHC پر از لیگاندهای با افینیتی^۱ بالا شدند جهت اسکن شدن توسط سلول‌های T CD8⁺ به سطح سلول مهاجرت می‌کنند. تصور می‌شود مولکول‌های کلاس 2 MHC عمدتاً لیگاندهای خود را در قسمت‌های اندوزومی آخر (MIICs) دریافت نمایند (تصویر ۱۸,۲). این مولکول‌های کلاس 2 MHC ارائه‌دهنده پیتیدها عمدتاً توسط تجزیه لیزوژومی تولید می‌شوند. مولکول‌های کلاس 2 MHC، که متشکل از یک زنجیره α و یک زنجیره β هستند با کمک زنجیره پایدار چاپرون (Ii) از ER به MIICs می‌رسند. Ii اتصال پیتید نابالغ مولکول‌های کلاس 2 MHC را مسدود می‌نماید و به رفتن آنها به MIICs از طریق دامنه سایتوزولیک خود کمک می‌کند. در MIICs Ii بوسیله پروتئازهای لیزوژومی تجزیه می‌شود و مابقی پیتید Ii مرتبط با کلاس 2 CLIP (CLIP) با کمک H2-M چاپرون در موش‌ها و HLA-DM در انسان‌ها از کanal اتصال پیتید کلاس 2 MHC زدوده می‌شوند. این چاپرون‌ها همچنین اطمینان می‌یابند که یک لیگاند با افینیتی بالا به مولکول‌های کلاس 2 MHC متصل شود قبل از اینکه اینها به سطح سلول مهاجرت نمایند تا توسط سلول‌های T CD4⁺ اسکن شوند. این ویژگی‌های مسیرهای فرآوری آنتی‌زن کلاس 1 و 2 MHC پیش‌بینی می‌کند که سلول‌های T CD4⁺ و CD8⁺، محصولات دو دستگاه کاتابولیک اصلی در سلول، به ترتیب پروتئازوم‌ها و لیزوژوم‌ها، را نظارت می‌نمایند.

^۱ افینیتی؛ ثابت تمایل:

فصل ۱۸: فرآوری و ارائه آنتیژن‌ها توسط MHC بعد از اندوسیتوز، آگزوسیتوز ... ۳۶۷



تصویر ۱۸,۱ ماکرواتوفاژی در فرآوری آنتی‌زن برای ارائه MHC کلاس I. به طور کلاسیک، لیگاندهای کلاس MHC I با تخریب پروتئین‌های پروتئولیک یا سیتوزولی یا هسته‌ای و یا آنتی‌زن‌های اندوسیتوز شده تولید می‌گردند که تصور می‌شود از آندوزوم‌ها به سمت سیتوزول خارج می‌شوند. سپس پیتیدهای حاصل از طریق ناقل مرتبط با فرآوری آنتی‌زن (TAP) به شبکه آندوپلاسمی (ER) وارد می‌گردند. آنها در ER بر روی مولکول‌های MHC کلاس I در کمپلکس بارگیری پیتید (PLC) حاوی تاپاسین، ERp57، و کالرتیکولین به اضافه‌ی مولکول‌های MHC و TAP، بارگیری می‌شوند. البته تحت شرایط مهار TAP، مثل محموله اتوفگوزومی، نیز ممکن است با MHC کلاس I در قسمت‌های آندوزومی، بارگیری پیتید جایگزین را تجربه کند، این قسمت همچنین می‌تواند ورودی از آندوزوم‌ها را دریافت نماید. هنگامی که آنتی‌زن‌ها در سلول‌های اهداف‌کنندهٔ واجد شرایط ماکرواتوفاژی بسته‌بندی می‌شوند، فرآوری آنتی‌زن اندوسیتوز شده برای ارائه MHC کلاس I، که به عنوان ارائهٔ متقاطع شناخته می‌شود، به طور موثری انجام می‌گیرد.



تصویر ۱۸,۲ ماکرواتوفازی در ارائه آنتی ژن MHC کلاس II. مولکول‌های MHC کلاس II با کمک زنجیره پایدار (Ii) به قسمت‌های اندوزوومی اخیر، از جمله قسمت بارگیری پیتید آنها (قسمت حاوی MHC کلاس II یا MIIC) می‌رسند. Ii از اتصال پیتید نابالغ در ER جلوگیری نموده و حرکت مولکول MHC کلاس II به MIIC را هدایت می‌کند. آنتی ژن‌های اندوسيتوز شده می‌توانند به MIIC‌ها برسند، آنها توسط هیدرولازهای لیزوزوومی تجزیه می‌گردند تا محصولات پیتیدی با کمک HLA-DM بر روی مولکول‌های MHC کلاس II بارگیری شوند. به نظر می‌رسد این فرآوری آنتی ژن خارج سلولی برای ارائه MHC کلاس II، زمانی که LC3B با فاگوزوم‌ها برای فاگوسیتوز مرتبط با LAP (Lysosomal Associated Membrane Protein) می‌باشد، موثرتر انجام می‌گیرد. متنابه، MIIC‌ها نیز آنتی ژن‌های درون سلولی و عمدها سیتوبولی را از طریق هم‌یوغی با اتوفاغوزوم‌ها دریافت می‌کنند.

شناصایی زیرلایه توسط ماکرواتوفازی

جدای از اندوسيتوز، اتوفازی زیرلایه‌ها را برای تجزیه به درون لیزوزووم‌ها منتقل می‌کند (میزوشیما و همکاران، ۲۰۱۰). دست کم سه مسیر اتوفازیک اجزای سیتوپلاسمی را به درون لیزوزووم‌ها تحويل می‌دهند. اتوفازی با واسطه چاپرون، زیرلایه‌ها را به شیوه وابسته به یک پیتید سیگنال شناسایی نموده و پروتئین‌های مربوطه را از غشای لیزوزوومی عبور می‌دهد (کائوشیک و کوئروو، ۲۰۱۲). مایکرواتوفازی نیز پروتئین‌های سایتوزولیک را مستقیماً در لیزوزووم یا، در یوکاریوت‌های عالی‌تر، یک اندوزووم احتمالی اخیر وارد می‌نماید (ساهو و همکاران، ۲۰۱۱). برای این منظور، غشای وزیکولی مربوطه به سمت داخل تا می‌شود و زیرلایه را بوسیله یک بدنه

فصل ۱۸: فرآوری و ارائه آنتیژن‌ها توسط MHC بعد از اندوسیتوز، آگزوسیتوز ... ۳۶۹

درون وزیکولی تحويل می‌دهد. الزامات پیتید سیگنال مشابهی همانند اتوفاژی با واسطه چاپرون ممکن است در مورد زیرلایه‌های مایکرواتوفاژی بکار رود (ساهو و همکاران، ۲۰۱۱). مسیر سوم بنام ماکرواتوفاژی، وزیکول‌های اختصاص‌یافته‌ای را برای محمولة خود شکل می‌دهد. این به اصطلاح اتوفاگوزوم‌ها توسط دو غشا محاصره می‌شوند و می‌توانند ساختارهای بزرگتری مانند تجمع‌های پروتئینی، اندامک‌های آسیب‌دیده، و عوامل بیماری زای سایتوزولیک را ببلعند. سپس برای تجزیه غشای داخلی و محمولة خود با لیزوزوم‌ها جوش می‌خورند. بیش از ۳۰ محصول زن مربوط به اتوفاژی (ATG) در شکل‌گیری و تجزیه اتوفاگوزوم درگیر هستند.

از بین اینها بویژه ATG8 و شش همولوگ پستانداران آن (LC3C، LC3B، LC3A، GABARAP1، GABARAP2) در درازشدن غشای اتوفاگوزومی و به خدمت‌گرفتن زیرلایه در اتوفاگوزوم‌ها مهم هستند (میزوشیما و همکاران، ۲۰۱۰). ATG8 مستقیماً در یک واکنش مشابه یوبی‌کوئیتین با فسفاتیدیل اتانول آمین (PE) در غشای بیرونی و درونی اتوفاگوزوم جفت می‌شود. مجموعه ATG5-12-16L1 فعالیت آنزیم ۳ لیگاز را در این هم‌بووغی میانجی‌گری می‌کند و اغلب بوسیله سرکوب زن یا خاموشی RNA جهت بازداری از ماکرواتوفاژی هدف قرارداده می‌شود. پروتئین‌های ATG8 جفت شده با غشا رویدادهای جوش‌خوردن غشا را واسطه‌گری می‌کنند (ناکاتوگاوا و همکاران، ۲۰۰۷؛ ویدبرگ و همکاران، ۲۰۱۱). بعلاوه، پروتئین‌های ATG8 می‌توانند زیرلایه‌ها را جهت شکل‌گیری اتوفاگوزوم‌ها یا جفت و جور کردن غشاهای اتوفاگوزومی با زیرلایه‌ها به خدمت بگیرند. آنها این کار را بوسیله تعامل با نواحی در تماس با LC3 (LIR) انجام می‌دهند، که می‌توان در پروتئین‌های سایتوزولیک یافت که یا اندامک‌ها را به خدمت می‌گیرند، مانند میتوکندری‌ها (NIX، FUNDC1، BNIP3، ATG32)، تجمعات درشت مولکولی (Cb1 برای Src کینازها و Stbd1 برای گلیکوژن)، یا زیرلایه‌های یوبی‌کوئیتینه شده (TAX1BP1، NDP52، NBR1، p62، TAX1BP1، NDP52، NBR1، p62، گلیکوزیلاسیون‌های در معرض سیتوزول (گالکتین ۸ همراه با NDP52) (بیرگیسدوتیر و همکاران، ۲۰۱۳؛ راندو و موذر، ۲۰۱۲). پروتئین‌های LIR مخصوص اندامک در سراسر بیکاریوتی‌ها ذخیره می‌شوند، اما یوبی‌کوئیتینه شدن به عنوان برچسبی برای زیرلایه‌های ماکرواتوفاژی و دامنه اتصال یوبی‌کوئیتین مربوطه حاوی پروتئین‌های اتصالی (TAX1BP1، NDP52، TAX1BP1، NDP52، NBR1، p62، یا آپتی نورین) اخیراً در سیر تکامل ایجاد شده‌اند (کرافت و همکاران، ۲۰۱۰). لیگازهای یوبی‌کوئیتین (آنزیم‌های E3) درگیر در این برچسب زدن زیرلایه‌های اتوفاژی

به تازگی در حال شناسایی هستند (کوآنگ و همکاران، ۲۰۱۳). در میان اینها، پارکین و RNF185 ثابت شده است پروتئین‌های میتوکندریایی را برای تجزیه این اندامک‌ها از طریق ماکروفاژی یوبی کوئیتینه کنند. ممکن است CHIP در یوبی کوئیتینه شدن تجمعات پروتئینی برای تصفیه ماکرواتوفاژی درگیر باشد (آرنت و همکاران، ۲۰۱۰). بعلاوه، به SMURF1 در تجزیه کپسید هرپس سیمپلکس و سیندیبیس بوسیله ماکرواتوفاژی اشاره شده است (أروڈال و همکاران، ۲۰۱۱). با این حال، فعالیت لیگاز E3 آن ممکن است در این عملکردها موردنیاز نباشد. مکانیسم‌های تا بحال شناسایی شده به خدمت‌گیری زیرلايه در اتوفاگوزوم‌ها نشان می‌دهد در بسیاری از نمونه‌ها بیش از یک مکانیسم جهت به خدمت‌گیری محمولة خاصی برای ماکرواتوفاژی ایجاد شده است. میتوکندری‌ها دارای پروتئین‌های اختصاصی مانند NIX جهت اتصال به LC3s و GABARAPs هستند، و نیز می‌توانند غشای پروتئین‌ها را یوبی کوئیتینه کنند. برای مثال پروتئین میتوکندریایی بنام پارکین، می‌تواند LIR را به خدمت بگیرد که حاوی تطبیق‌دهنده‌های اتصال به یوبی کوئیتین مانند p62 هستند. همینطور، طی عفونت سالمونلا تیفی موریوم، عامل بیماری زای آسیب دیده حاوی اندوزوم‌ها، دستگاه ماکرواتوفاژی را از طریق اتصال به گالکتین ۸ و به خدمت‌گیری NDP52 جهت گلیکوزیلاسیون لومینال، و با جنبش آهسته‌تر، یوبی کوئیتینه شدن این عوامل بیماریزای باکتریایی سپس برای اتصال p62 و آپتی‌نورون اتفاق می‌افتد، بدنبال آن به درون اتوفاگوزوم‌ها وارد می‌شوند (ثرستون و همکاران، ۲۰۱۲). این مکانیسم‌های زاید ممکن است به چندین لایه تنظیم برای به خدمت‌گیری زیرلايه خاصی جهت ماکرواتوفاژی اشاره داشته باشد، که این مسیر را برای وضعیت‌های متابولیک متفاوت یا به خدمت‌گیری‌ها در انواع سلولی مختلف یوکاریوت‌های عالی‌تر منطبق می‌نمایند.

فرآوری آنتی‌زن برای ارائه کلاس ۲ MHC بوسیله ماکرواتوفاژی

این به خدمت‌گیری خاص زیرلايه برای ماکرواتوفاژی به پروتئین‌های سایتوزولیک و هسته‌ای اجازه می‌دهد در لیزوژوم‌ها تجزیه شوند و این آنتی‌زن‌ها را روی مولکول‌های کلاس MHC۲ ارائه نمایند. در حقیقت، تقریباً در مطالعات اولیه پیرامون مشخص نمودن لیگاندهای پیتید متصل به کلاس MHC۲، کشف شد که ۲۰ تا ۳۰ درصد پیتیدهای مربوطه از پروتئین‌های با منبع سایتوزولیک و هسته‌ای نشأت می‌گیرند (چیکتس و همکاران، ۱۹۹۳؛ دنگیل و همکاران، ۲۰۰۵). برخی از اینها را می‌توان در غلظت‌های بالاتر روی مولکول‌های کلاس MHC۲ سلول‌های

فصل ۱۸: فرآوری و ارائه آنتیژن‌ها توسط MHC بعد از اندوسیتوز، آگزوسیتوز ... ۳۷۱

گرسنه یافت، که دارای تحریک بیش از حد ماکرواتوفاژی در پاسخ به نقصان مواد مغذی هستند (دنگیل و همکاران، ۲۰۰۵). به طور جالبی در میان پروتئین‌های با منبع سایتوزولیک لیگاندهای کلاس ۲ MHC، دو پروتئین ATG8 (GABARAP و LC3B) و یک پروتئین اتصالی محتوى TAX1BP1 (LIR) یافت شدند (دنگیل و همکاران، ۲۰۰۵؛ سوری و همکاران، ۲۰۰۵). رسیدن محمولة اتوفاگوزوم به MIICs برای بارگیری روی مولکول‌های کلاس ۲ MHC در مطابقت با هم موضع سازی قابل توجه GFP-LC3B با HLA-DR و HLA-DM در سلول‌های انسانی (اشمیت و همکاران، ۲۰۰۷) و با H2-M در سلول‌های اپیتیلیال تیموسی موش (TECs) در آزمایشگاه و در بدن موجود زنده است (کساوی و همکاران، ۲۰۰۹). بطبق آن، جوش خوردگی آنتیژن‌ها به پایانه N از LC3B، پایانه C را برای جفت شدن با غشای اتوفاگوزومی در دسترس گذاشت، در نتیجه ارائه آنتیژن‌های جفت شده روی سلول‌های اپیتیلیال، سلول‌های B، و سلول‌های دندریتیک توسط کلاس ۲ MHC را تا بیست برابر افزایش داد (کامبر و همکاران، ۲۰۱۱؛ اشمیت و همکاران، ۲۰۰۷). بنابراین به نظر می‌رسد اتوفاگوزوم‌ها به طور مکرر با قسمت‌های بارگیری کلاس ۲ MHC جوش می‌خورند تا محمولة ماکرواتوفاژی برای ارائه به سلول‌های T CD4⁺ را تحويل دهند (تصویر ۱۸.۲).

ارائه خود-پروتئینی روی مولکول‌های کلاس ۲ MHC از طریق ماکروافاژی به نظر می‌رسد طی انتخاب تیموسی سلول‌های T نقشی را ایفا می‌نماید. طی این فرآیند، پیش‌سازهای سلول T از مغز استخوان در تیموس منزل می‌کنند تا دستخوش انتخاب مثبت در قشر تیموس و انتخاب منفی در مدولای تیموس قرار گیرد (کایوسکی و کلاین، ۲۰۰۶). انتخاب مثبت از طریق تعاملات با آفینیتی پایین گیرنده‌های سلول T مربوطه که به طور کلونالی با مولکول‌های MHC روی TECs قشری نوترکیب شدند، اطمینان می‌دهد تنها در صورتی سلول‌های T به تمایزسازی خود ادامه می‌دهند که بتوانند با خود-MHC ارتباط برقرار کنند. انتخاب منفی از طریق تعاملات با آفینیتی بالای گیرنده‌های سلول T خود با مولکول‌های MHC روی TECs مدولاری و سلول‌های دندریتیک تیموسی، سلول‌های T خودایمنی را حذف می‌کند. از آنجایی که دندریتیک‌ها دارای گنجایش اندوسیتیک پایینی هستند، تصور می‌شود مسیرهای فرآوری آنتیژن داخل سلولی نقشی اصلی برای ارائه خود-آنتیژنی روی مولکول‌های کلاس ۱ و ۲ MHC بازی می‌کنند. همزمان کشف شد اپیتیلیوم تیموسی دارای یکی از سطوح محتواهی اتوفاگوزوم با بالاترین ثبات وضعیت در موش‌ها است (میزوشیما و همکاران، ۲۰۰۴). نشان داده شده است

بافت‌های پیوندی تیموسی فاقد ماکرواتوفاژی می‌توانند به طور مثبت تنها برخی، اما نه سایر، سلول‌های CD4⁺ T ترانس ژنیک گیرنده سلول T را انتخاب کنند که مطابق با یک ارتباط عملکردی تغییر و تبدیل بالارفته آتوفاگوزوم در این بافت است (ندجیک و همکاران، ۲۰۰۸). کشف شد که لیگاندهای پیتید مشتق شده از گیرنده غشا در غیاب رقابت از سوی زیرلايه‌های ماکرواتوفاژی بهتر ارائه می‌شوند، زیرا احتمالاً فرآوری لیگاندهای مشتق شده از گیرنده مستقل از ماکرواتوفاژی است. بر عکس، با این اثر روی انتخاب مثبت سلول T CD4⁺، تنوعی از سلول‌های CD8⁺ T ترانس ژنیک گیرنده سلول T به طرز یکسانی توسط تیموس فاقد ماکرواتوفاژی بخوبی به طور مثبت انتخاب می‌شوند. از این گذشته، موش‌های لخت بدون تیموس به محض پیوند تیموس فاقد Atg5، یک ذخیره سلول T ایجاد نمودند که به طور خودجوش باعث نفوذ سلول T خودایمنی به درون چند عضو از جمله شکم گردید.علاوه، اگر انتخاب آنتی‌ژن به طور ترانس ژنیکی با میتوکندری یکی شود، در حالی که آنتی‌ژن متصل به غشا نیازمند Atg5 نباشد، انتخاب منفی سلول‌های CD4⁺ ترانس ژنیک گیرنده سلول T تعریف شده وابسته به ماکرواتوفاژی است (آیکینگر و همکاران، ۲۰۱۳). علاوه بر این، آنتی‌ژن هدف‌گیری شده برای آتوفاگوزوم‌ها از طریق جوش خوردن به LC3B نیز انتخاب منفی را بیرون کشید، اما تنها در صورتی که ظرفیت جفت شدن با غشاها بوسیله انتهای C خود را حفظ می‌نمود. این پژوهش‌ها نشان دادند ارائه خود-آنتمی‌ژنی روی مولکول‌های کلاس MHC2 از طریق ماکرواتوفاژی، از هر دو انتخاب مثبت و منفی سلول T CD4⁺ توسط سلول‌های اپیتیلیال تیموسی حمایت می‌کند.

علاوه بر فرآوری خود-آنتمی‌ژنی توسط ماکرواتوفاژی برای ارائه کلاس MHC2، کشف شده است ماکرواتوفاژی نیز برخی از آنتی‌ژن‌های مشتق شده از عامل بیماریزا برای تحریک سلول‌های CD4⁺ T را تحويل می‌دهد. در این خصوص، آنتی‌ژن هسته‌ای ۱ ویروس اپشتین بار (EBNA1) اولین آنتی‌ژن ویروسی بود، که کشف شد ماکرواتوفاژی برای آن، فرآوری آنتی‌ژن چهت ارائه کلاس MHC2 به کلون‌های سلول T CD4⁺ در سطح فیزیولوژیکی در سلول‌های مبتلا به ویروس را واسطه‌گری می‌نماید (مونز و همکاران، ۲۰۰۰). فرآوری مبتتنی بر ماکرواتوفاژی EBNA1 برای ارائه کلاس MHC2 به محض ممانعت از دسترسی آن به هسته افزایش یافت (لئونگ و همکاران، ۲۰۱۰). این ثابت نمود آنتی‌ژن ویروسی سایتوزولیک عمده‌اً از طریق ماکرواتوفاژی به MIICs تحويل داده می‌شود. بدنبال این مفهوم، آنتی‌ژن‌های باکتریایی که بوسیله سیستم‌های ترشحی به درون سیتوسول تزریق می‌شوند نیز به نظر می‌رسد تا حدی،

فصل ۱۸: فرآوری و ارائه آنتیژن‌ها توسط MHC بعد از اندوسیتوز، آگزوسیتوز ...

از طریق ماکرواتوفاژی روی مولکول‌های کلاس MHC II ارائه شوند. این شامل Atg85B مایکروباکتریایی و YopE کدگذاری شدهٔ یرسینیا است (جاگانث و همکاران، ۲۰۰۹؛ راسمان و همکاران، ۲۰۱۰). علاوه بر این، نئومایسین فسفوتانسفراز ۲ (NeoR) مشتق شده از ترانسپوزون برای ارائه کلاس MHC II به شیوهٔ حساس به بازدارندهٔ ماکرواتوفاژی به‌طور درون سلولی فرآوری می‌شود (نیمرجان و همکاران، ۲۰۰۳). از این گذشته، جوش خوردن اپیتوپ‌های هماگلوبینین ویروس آنفولانزرا به NeoR ارائه کلاس MHC II آنها را افزایش می‌دهد، هر چند نه به قدرت جوش خوردن اپیتوپ‌ها به LC3B (کامبر و همکاران، ۲۰۱۱). به‌طور جالبی، موضعی نمودن هسته‌ای NeoR بوسیلهٔ جوش خوردن به یک توالی ورود هسته‌ای به‌طور چشمگیری ارائه کلاس MHC II متکی به ماکرواتوفاژی آن را خراب می‌کند (رایدل و همکاران، ۲۰۰۸). بنابراین، موضعی نمودن هسته‌ای به نظر نمی‌رسد از تمام آنتیژن‌ها از فرآوری آنتیژن کلاس MHC II با واسطهٔ ماکرواتوفاژی به‌طور یکسانی محافظت نماید، اما آنتیژن‌های سایتوزولیک ممکن است ترجیحاً بوسیلهٔ این مسیر مورد هدف قرار گیرند.

علاوه بر ماکرواتوفاژی در فرآوری آنتیژن درون سلولی برای ارائه کلاس MHC II ، یک مطالعه نیز نشان داده است اتووفاژی با واسطهٔ چاپرون می‌تواند در مخزن لیگاند متصل به کلاس MHC II نقش داشته باشد (ژو و همکاران، ۲۰۰۵). در این مطالعه کشف شد دو اتوآنتیژن، یکی یک آنتیژن مرتبط با دیابت شیرین بنام گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۵ (GAD65)، و دیگری یک زنجیره سبک k ایمونوگلوبولین جهش‌یافته بنام SMA هیپاتیت خودایمنی، بهتر است بعد از بیان بیش از حد LAMP2a، عنصری از ترانسلوکون^۱ مفروض در غشای لیزوژومی برای اتووفاژی با واسطهٔ شاپرون، هر دو روی کلاس MHC II ارائه شوند. اما همچنان نامشخص باقی می‌ماند که تا چه حد این اتوآنتیژن‌ها حاوی یک توالی پیتید تکی هستند که برای اتووفاژی با واسطهٔ چاپرون موردنیاز خواهد بود. با این وجود، بیش از یک مسیر اتووفاژی می‌تواند در فرآوری آنتیژن درون سلولی برای ارائه کلاس MHC II به سلول‌های T CD4 $^{+}$ مشارکت داشته باشد.

^۱ ترانسلوکون؛ مجموعهٔ پروتئینهای مسئول Translocon: جابجایی پیتیدها از غشا

یک نقش ماکرواتوفاژی در ارائه آنتیژن کلاس ۱ MHC

از آنجایی که اتوفاژی زیرلایه‌ها را به لیزوژوم‌ها تحویل می‌دهد و دستگاه کاتالیزوری آنها بیشتر لیگاندھای کلاس MHC۲ را تولید می‌کنند، مشارکت مسیرهای اتوفاژیک در فرآوری آنتیژن برای ارائه کلاس MHC۲ منطقی به نظر می‌رسد. با این حال، آیا و چگونه اتوفاژی در ارائه آنتیژن کلاس MHC۱ نقش دارد بسیار کمتر درک می‌شود. اما پیشنهاد شده است تحت شرایط بازداری مسیر فرآوری آنتیژن کلاسیک با واسطه عامل بیماری زا برای ارائه کلاس MHC۱، مانند ممانعت از TAP بوسیله اوسینس ایمنی ویروسی، اتوفاژی هنوز می‌تواند اجازه مقداری فرآوری آنتیژن برای ارائه کلاس MHC۱ را بدهد. اولین مطالعه‌ای که بر ماکرواتوفاژی در ارائه آنتیژن روی مولکول‌های کلاس MHC۱ دلالت داشت، ارائه گلیکوپروتئین B از ویروس هرپس سیمپلکس (HSV) به سلول‌های CD8⁺ T را مورد بررسی قرار داد (انگلیش و همکاران، ۲۰۰۹). عمدتاً ارائه آنتیژن آخری روی مولکول‌های کلاس MHC۱ از ماکروافاژهای انسانی آلود به HSV (بیشتر از ۱۰ ساعت) به نوع دارویی بازدارنده ماکرواتوفاژی و خاموش‌کننده RNA مخصوص ATG5 حساس بود. به عنوان مثال دوم، گزارش شد ارائه محدود شده توسط کلاس MHC۱ مستقل از TAP آنتیژن UL138 سایتومگالوویروس انسانی (HCMV) بستگی به ماکرواتوفاژی داشت (تی و کانا، ۲۰۱۲). فرآوری UL138 بعلاوه همچنین مستقل از پروتئازوم بود، اما کلاس MHC۱ مقاوم در برابر اسید به اضافه مجموعه‌های پیتید در اتولیزوژوم‌ها را تولید نمود. علاوه بر آنتیژن‌های ویروسی، اپیتوب‌های کلاس MHC۱ مشتق شده از کلامیدیا به نظر به شیوهٔ متکی بر ماکرواتوفاژی تولید شدند (فایگل و همکاران، ۲۰۱۳). در یک تبار سلول دندریتیک مشتق شده از مغز استخوان مosh، فاگوژوم‌های حاوی کلامیدیا مختل می‌شوند، در حالی که باکتری‌های کلامیدیایی که اکنون سایتوزولیک هستند توسط اتوفاگوژوم‌ها بلعیده می‌شوند. عوامل بیماری زای بلعیده شده سپس به قسمت‌های اندوزومی منتقل می‌گردند، که حاوی هر دو مولکول کلاس MHC۱ و TAP می‌باشند. بعد از پیش‌فرآوری لیزوژومی، پیتیدهای مشتق شده از کلامیدیا برای تجزیه بیشتر توسط پروتئازوم‌ها به سیتوزول فرار می‌کنند، پیش از اینکه توسط TAP دوباره وارد و روی مولکول‌های کلاس MHC۱ به سلول‌های CD8⁺ T ارائه شوند. این مطالعات در مطابقت با ماکرواتوفاژی تحویل دهنده آنتیژن ویروسی و باکتریایی به قسمت‌های اندوزومی هستند که در آنها مولکول‌های کلاس MHC۱ می‌توانند بارگیری شوند. بسته به میزان ممانعت از TAP طی عفونت مربوطه هر دو فرآوری لیزوژومی و پروتئازومی، یا

فصل ۱۸: فرآوری و ارائه آنتیژن‌ها توسط MHC بعد از اندوسیتوز، اگزوسیتوز ... ۳۷۵

فقط لیزوژومی، می‌توانند در تولید اپیتوب سلول T⁺ CD8 مشارکت نمایند. در واقع، شواهد بیشتری برای چنین قسمت بارگیری کلاس ۱ MHC ۱ اندوزومی موجود است. سلول‌های فاقد TAP در دمای اتاق، مولکول‌های کلاس ۱ MHC ۱ را در سطح سلول و درون اندوزوم‌ها ثبیت می‌نمایند (لیانگرن و همکاران، ۱۹۹۰؛ مِرزوگی و همکاران، ۲۰۱۱). این ثبیت مستقل از مولکول‌های کلاس ۱ MHC ۱، به آنتیژن بیرون سلولی اجازه می‌دهد برای ارائه متقارع به سلول‌های T⁺ CD8 مولکول MHC ۱ بارگیری شوند (مِرزوگی و همکاران، ۲۰۱۱). مولکول‌های کلاس ۱ MHC ۱ اندوزومی، که به این قسمت‌های وزیکولی می‌رسند یا در پایین تر از دماهای فیزیولوژیکی به پیتیدهای با افینیتی پایین وصل می‌شوند یا در دماهای فیزیولوژیکی به پیتیدهای با افینیتی بالا. بنابراین، این مولکول‌ها می‌توانند با محصولات لیزوژومی در این موقعیت‌های بارگیری فرض شده، بارگیری شوند. به نظر می‌رسد ماکرواتوفاژی قادر باشد برخی از این زیرلایه‌ها را به مسیر فرآوری آنتیژن کلاس ۱ MHC تا حدی غیرمعمول تحويل دهد، که ممکن است طی بازداری از TAP برجسته شود (تصویر ۱۸,۱).

رهاسازی آنتیژن توسط اگزوسیتوز با کمک اتوفاژی

اتوفاژی با تحويل مواد درون سلولی، مانند پروتئین‌ها یا اندامک‌های سایتوزولیک، به اندوزوم‌ها، که با خارج سلول در ارتباط هستند، یک وارونگی توپولوژیک^۱ انجام می‌دهد. ترشح به طور مشابهی پلی‌پیتیدهایی را که روی ریبوزوم‌های سایتوزولیک سنتز می‌شوند برای رهاسازی به خارج، به درون ER منتقل می‌نماید. بیشتر فرآیندهای ترشح پروتئین توسط پیتیدهای سیگنال و واردات کمک-ترجمه‌ای به درون ER هدایت می‌شوند (دانکورت و بارلو، ۲۰۱۰). اما اخیراً شناخته شد که ماکرواتوفاژی نیز می‌تواند در یک ترشح مستقل از پیتید تکی نقش داشته باشد. کشف شد که پروتئین متصل شونده به A کوانزیم آسیل (ACBP) از سلول‌های قارچ به شیوهٔ متکی بر ماکرواتوفاژی آزاد می‌شوند (دوران و همکاران، ۲۰۱۰؛ مانجی ثایا و همکاران، ۲۰۱۰). دریافتیم که آزادسازی ACBP بعلاوهٔ به جوش‌خوردگی غشای سلول بستگی دارد، اما نه به دستگاه اتصال لیزوژومی. این مطالعات برای اولین بار نقشی برای ماکرواتوفاژی در اگزوسیتوز نشان دادند. زیرلایهٔ دیگر اگزوسیتوز مستقل از پیتید سیگنال بنام اینترلوکین ۱β (IL-1β) نیز

^۱ وارونگی توپولوژیک؛ وارونگی: Topologic inversion؛ جغایقیای

ممکن است این مسیر را دنبال کند (دوپونت و همکاران، ۲۰۱۱). در قارچ، یک قسمت جدید برای ترشح پروتئین غیرمتداول ممکن است در اگزوسیتوز با واسطهٔ ماکرواتوفاژی درگیر باشد (برانز و همکاران، ۲۰۱۱). تشریح شد که این بخش حاوی Grh1، VPS23، ATG8، ATG9 و نیز فسفاتیدل اینوزیتول ۳-فسفات می‌باشد. علاوه بر این، ترشح پروتئین غیرمتداول با واسطهٔ ماکرواتوفاژی ممکن است توسط کاسپاز تعديل و تنظیم شود، بویژه کاسپاز ۳، زیرا سکرتم وابسته به کاسپاز سلول‌های گرسنه مواد مغذی، حاوی پروتئین‌های ترشح شده بسیاری بدون پیپیدهای سیگنانل هستند (سیروئیز و همکاران، ۲۰۱۲). جدای از ترشح پروتئین غیرمتداول، در سایر فرآیندهای ترشحی بر عناصر مولکولی دستگاه ماکرواتوفاژی دلالت شده است. کشف شد که در میان اینها، شکل‌گیری ریزدانهٔ ترشحی در سلول‌های پانت روده در موش‌های دچار ماکرواتوفاژی در معرض خطر معیوب است (کادول و همکاران، ۲۰۰۸). ترشح پانت میکروبی توسط سلول‌های پانت در حضور عفونت نوروویروس مزمن معیوب است (کادول و همکاران، ۲۰۱۰). متوجه شدیم علاوه بر این، ترشح محتوای لیزوژومی توسط اُستئوکلاست‌ها برای جذب دوباره استخوان نیازمند عناصر دستگاه ماکرواتوفاژی بود (دسلم و همکاران، ۲۰۱۱). از این رو، به نظر می‌رسد فرآیندهای متنوع ترشح توسط ATGs میانجیگری می‌شوند، و دست‌کم برای برخی از آنها ماکرواتوفاژی ممکن است عناصر سایتوزولیک را به درون قسمت‌های وزیکولی وارد نماید که بعد محتواهای سایتوزولیک می‌توانند از آنجا سلول‌ها را ترک نمایند.

آنترن‌ها برای ارائه MHC نیز ممکن است از طریق این مسیر به سلول‌های ارائهٔ کنندهٔ آنتی‌زن همسایه برسند (تصویر ۱۸,۱). در حقیقت کشف شد که آنتی‌زن‌های ویروسی و توموری روی مولکول‌های کلاس MHC1 بهتر به صورت متقطع ارائه می‌شوند اگر سلول اهداکنندهٔ آنتی‌زن قادر باشد ماکرواتوفاژی را انجام دهد (لی و همکاران، ۲۰۰۸؛ یول و همکاران، ۲۰۰۹). رهاسازی مؤثرتر آنتی‌زن با کمک ماکرواتوفاژی برای آنتی‌زن‌های ویروس آنفولانزای A نشان داده شد (یول و همکاران، ۲۰۰۹). ویروس آنفولانزای A بلوغ اتوفاگوزوم‌ها و جوش‌خوردگی آنها با لیزوژوم‌ها را مسدود می‌نماید (گاناگ و همکاران، ۲۰۰۹). تجمع حاصلهٔ وزیکول‌های اتوفاژیک، که حاوی پروتئین‌های ویروسی هستند، ممکن است اجازهٔ رهاسازی آنتی‌زن آنفولانزا و ارائهٔ متقطع مؤثرتر را بدهد. علاوهٔ ارائهٔ متقطع آنتی‌زن تومور در غیاب ماکرواتوفاژی در سلول‌های اهداکنندهٔ HEK293 اپیتیلیال و ملانومای کلیه به خطر افتاد، اما به محض تحریک ماکرواتوفاژی افزایش یافت (لی و همکاران، ۲۰۰۸). دریافتیم که اتوفاگوزوم‌های غنی‌شده یک منع خوب

فصل ۱۸: فرآوری و ارائه آنتیژن‌ها توسط MHC بعد از اندوسیتوز، اگزوسیتوز ... ۳۷۷

آنچه این‌ها برای ارائه متقاطع بودند. این مطالعات نشان می‌دهند اگزوسیتوز با کمک ماکرواتوفاژی در فعالسازی سلول T بوسیله رهاسازی آنتیژن‌ها از سلول‌های آلوده و تغییر شکل یافته در قالبی که به طور کارآمدی ارائه متقاطع شود مشارکت دارد.

فأگوسیتوز با کمک اتفاژی

تمام مسیرهای بحث شده در بالا ممکن است هنوز دست کم تا حدی از اتفاژی کلاسیک استفاده نمایند، از جمله تحویل اجزای سیتوپلاسمی به اندوزوم‌ها و لیزوزوم‌های آخري. با این وجود، دستگاه مولکولی، بویژه تعديل و تنظیم رویدادهای جوش خوردنگی و زیکولی آن، به نظر می‌آید جهت اصلاح سرنوشت فاگوزوم‌های کلاسیک نیز مورد استفاده قرار گیرد. این در ابتدا برای لیگاندهای فاگوسیتوز شده گیرنده‌های TOLL-Like (TLRs) مشاهده شد (سانخوان و همکاران، ۲۰۰۷). در گیری TLR به سیستم ایمنی در مورد حضور الگوهای مولکولی مرتبط با عامل بیماریزا (PAMPs) طی عفونت هشدار می‌دهد و اغلب طی واکسیناسیون بوسیله ادجواونتها راه‌اندازی می‌شود. در عین حال، لیگاسیون^۱ TLR ماکرواتوفاژی را در فاگوسیتوزها افزایش می‌دهد (دلگادو و همکاران، ۲۰۰۸). فاگوسیتوز محمولة محتوى لیگاند TLR، LCEB را جهت فاگوزوم‌های مربوطه به خدمت می‌گیرد و بلوغ آنها را در فاگوزوم‌های موش‌سانان شدت می‌بخشد (سانخوان و همکاران، ۲۰۰۷). این فرآیند اصطلاحاً فاگوسیتوز با کمک LC3 (LAP) نامیده می‌شود و به نظر می‌رسد نیازمند دستگاه هسته‌ای هم‌بوغی ATG8 با غشاها باشد، از جمله ATG5 و ATG7، اما نه رویدادهای بالادستی برای ماکرواتوفاژی کلاسیک، از جمله هدف بازداری راپامایسین (TOR) و فعالسازی ATG1/ULK1 (فلوری و همکاران، ۲۰۱۱؛ مارتینز و همکاران، ۲۰۱۱؛ سانخوان و همکاران، ۲۰۰۷). جدای از لیگاندهای TLR، LAP به نظر می‌رسد در تمام فاگوسیتوز سلول (انتوسیس^۲) (فلوری و همکاران، ۲۰۱۱)، فاگوسیتوز خرد سلول مرده از طریق شناسایی بوسیله TIM4 (مارتینز و همکاران، ۲۰۱۱)، لیگاسیون گیرنده لکتین نوع C بنام دکتین ۱ (ما و همکاران، ۲۰۱۲)، و اتصال گیرنده Fc (هنالت و همکاران، ۲۰۱۲) در گیر باشد. در ماکرواتوفاژهای موش‌سانان، فاگوزوم‌های LAP سریعتر بالغ می‌شوند تا با لیزوزوم‌ها جوش بخورند و محمولة خود را تجزیه نمایند (فلوری و همکاران، ۲۰۱۱؛ مارتینز و همکاران، ۲۰۱۱).

¹ لیگاسیون، بستن:

² انتوسیس؛ فرآیند حمله یک سلول به سلول زنده: Entosis: دیگر و بلعین آن

سانخوان و همکاران، ۲۰۰۷)، درحالی که در سلول‌های دندریتیک پلاسماسیتوئیدی انسانی، LAP گیرنده Fc را تحويل داد در نتیجه کمپلکس‌های ایمنی را جهت TLR9 حاوی اندوزوم‌ها برای شناسایی DNA متصل به کمپلکس ایمنی درگیر نمود (هنالت و همکاران، ۲۰۱۲). علاوه بر این، در انسان ماکروفازها و DCs LC3B مرتبط با فاگوزوم‌ها به نظر می‌رسد برای دوره‌های زمانی طولانی پایدار می‌مانند و تنها بعد از برطرف کردن اُرتولوگ‌های ATG8 از غشای فاگوزومی با لیزوژوم‌ها جوش می‌خورند (رومائو و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین، چندین مکانیسم مخصوص شناسایی زیرلایه فاگوزوم، LC3B را در غشای فاگوزوم به خدمت می‌گیرند و این کار سرنوشت فاگوزوم‌های مربوطه را تغییر می‌دهد، زیرا تجزیه شدت گرفته یا تغییر مسیر بستگی به نوع سلول دارد.

با تغییر سرنوشت فاگوزوم، به نظر می‌آید LAP فرآوری آنتی‌زن را برای ارائه کلاس ۲ MHC در آزمایشگاه و بدن موجود زنده تعديل و تنظیم می‌نماید (لی و همکاران، ۲۰۱۰؛ ما و همکاران، ۲۰۱۲). با این وجود، اینکه چطور LAP ارائه آنتی‌زن کلاس ۲ MHC را ارتقا می‌بخشد مبهم باقی می‌ماند. نسبت به موش‌های نوع وحشی، در موش‌های دارای سلول‌های دندریتیک فاقد ماکرواتوفازی نشان داده شد عفونت ویروس هرپس سیمپلکس (HSV)، پاسخ کمتر قدرتمندی از سلول T CD4⁺ بیرون می‌کشد (لی و همکاران، ۲۰۱۰). در همین راستا، DCs آنها نسبت به DCs نوع وحشی وقتی با آنتی‌زن بیان کننده لیستریا یا اسپلنوسیت‌های پوشیده از آنتی‌زن بارگیری شدند آنتی‌زن کمتری روی مولکول‌های کلاس ۲ MHC ارائه نمودند. این با کاهش محتوای کاتپسین کاتالیزوری فعال موجود در فاگوزوم‌های پالایش شده همبستگی دارد، اما اینکه آیا فعالیت پایین‌تر پروتئاز لیزوژومی نیز فاگوزوم‌های با LC3B مثبت را تحت تأثیر قرار دادند مبهم باقی ماند. در فاگوزوم‌ها و DCs انسان، فاگوزوم‌های با LC3B مثبت، آنتی‌زن بیرون سلولی را برای دوره زمانی طولانی جهت فرآوری و ارائه با تأخیر مولکول‌های کلاس ۲ MHC به کلون‌های سلول T CD4⁺ حفظ نمودند (رومائو و همکاران، ۲۰۱۳). از این رو، فاگوزوم‌های با LC3B مثبت ممکن است متشکل از یک قسمت ذخیره آنتی‌زن در سلول‌های ارائه کننده آنتی‌زن انسانی برای ارائه آنتی‌زن طولانی‌مدت در بافت‌های لنفوئید ثانویه باشند (دلamar و همکاران، ۲۰۰۵). علاوه، این مسیر ممکن است ارائه متقطع روی مولکول‌های کلاس ۱ MHC را نیز تسهیل نماید. در هر آنتی‌زن ویروسی و قارچی احتمال دارد از طریق این مسیر به ارائه کلاس ۱ MHC برسند (جانستون و همکاران، ۲۰۱۲؛ لوکا و همکاران، ۲۰۱۲). آنتی‌زن‌های

فصل ۱۸: فرآوری و ارائه آنتیژن‌ها توسط MHC بعد از اندوسيتوز، آگزوسيتوز ... ۳۷۹

ویروس سین سیشال تنفسی (RSV) و آسپرژیلوس فومیگاتوس در غیاب ماکرواتوفاژی با کارآمدی کمتری به سلول‌های CD8⁺ T ارائه متقاطع شدند. در مورد پروتئین جوش‌خوردن RSV، مسیر فرآوری آنتیژن مربوطه مستقل از پروتئازوم و TAP بود (جانستون و همکاران، ۲۰۱۲)، که نشان می‌دهد تحويل آنتیژن توسط LAP به قسمت‌های بارگیری کلاس ۱ MHC1 اندوزومی مستقل از ماکرواتوفاژی است. در نتیجه، فاگوزوم‌های مرتبط با ATG8/LC3 ممکن است با به تأخیر انداختن تجزیه سریع آن در لیزوزم‌ها، آنتیژن‌ها را برای بارگیری کلاس ۱ و ۲ MHC اندوزومی هدف قرار دهند (تصویر ۱۸,۲)، اما این امر چطور با استفاده از اتصال ATG8/LC3 به غشای فاگوزومی حاصل می‌شود، مبهم باقی می‌ماند.

سرانجام، یک مکانیسم آخر که بوسیله آن ماکرواتوفاژی می‌تواند فاگوسیتوز و تجزیه لیزوزومی را حمایت کند، انتقال هیدرولازهای لیزوزومی به اندوزوم‌ها و لیزوزوم‌های آخری است. در راستای اینها، آلفا مانوزیداز (Ams1) و آمینوبیتیداز ۱ (Ape1) بوسیله سیتوپلاسم مرتبط با ماکرواتوفاژی به مسیر هدفگیری واکوئول (Cvt) به درون واکوئول قارچ لیزوزومی وارد می‌شود (لينچ-دی و کيليونسکي، ۲۰۱۰). در سلول‌های پستانداران، پیتیدیل آرزين دایمینازهای (PADs) ۲ و ۴ بوسیله اتوفاگوزوم‌ها به اندوزوم‌ها تحويل می‌شوند (ایرلند و اونانيو، ۲۰۱۱). اینها برای تولید پیتیدهای سیترولينه لازم هستند که به طور مکرر توسط آنتی بادی‌ها در بیماران آرتروز روماتوئید شناسایی می‌شوند و نیز برای سلول‌های CD4⁺ حاوی اپیتوب‌ها می‌باشند. بر طبق آن، سلول‌های فاقد ماکرواتوفاژی در ارائه لیزوزوم تخم مرغ آنتیژن مدل توسط کلاس ۲ MHC به سلول‌های CD4⁺ مخصوص برای یک اپیتوب سیترولينه شده از این آنتیژن معیوب بودند. در نتیجه ماکرواتوفاژی ترکیب دستگاه تجزیه اندوزومی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و به نظر می‌آید به این روش بر فرآوری آنتیژن بیرون سلوی اثر می‌گذارد (تصویر ۱۸,۲).

نتیجه‌گیری‌ها و چشم انداز

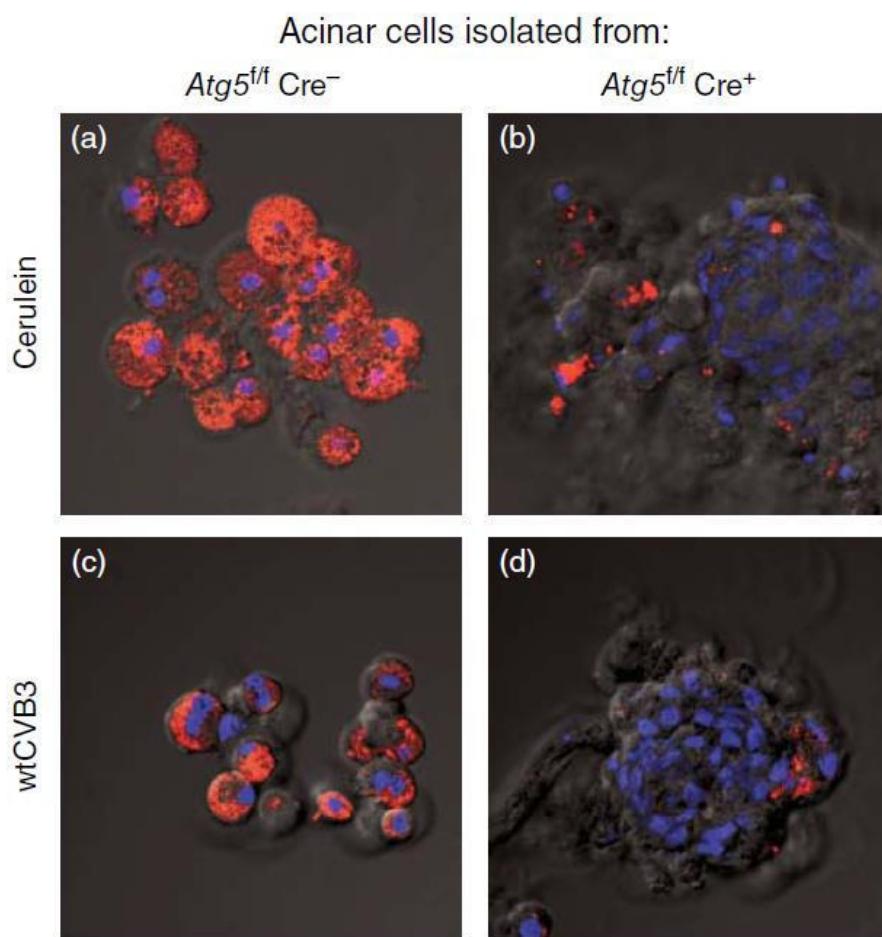
همانطورکه از یکی از دستگاه‌های تجزیه اصلی در سلول‌ها انتظار می‌رود، در سال‌های اخیر کشف شده است اتوفاژی در سطوح مختلفی در فرآوری آنتیژن برای ارائه MHC نقش دارد. اما، بسیاری از جنبه‌های مسیرهای مرتبط که عمدهاً توسط دستگاه مولکولی ماکرواتوفاژی تحت تأثیر قرار می‌گیرند مبهم باقی می‌مانند. اینها مربوط می‌شوند به قسمت بارگیری کلاس ۱ MHC1 اندوزومی، که ممکن است توسط ماکرواتوفاژی، نه تنها آنتیژن‌ها بلکه همچنین آنتیژن‌های

بیرون سلولی طی ارائه متقاطع به آن خورانده شوند. از این گذشته، واضح نیست که چطور ATG/LC3، جفت شده با یک غشای وزیکولی، بر سرنوشت فاگوزوم یا اندوزوم مربوطه اثر می‌گذارد. سرانجام، مشخص نیست چطور ذخیره پروتئین‌های ATG برای این وظایف متفاوت توزیع می‌شوند تا از ماکرواتوفازی و LAP در همان سلول حمایت نمایند. بمنظور استفاده از دستگاه اتوفازی برای ارائه تقویت شده آنتیژن و پاسخ‌های ایمنی بهبودیافته، این سوالات بایستی در آینده پاسخ داده شوند.

تقدیر و تشکر

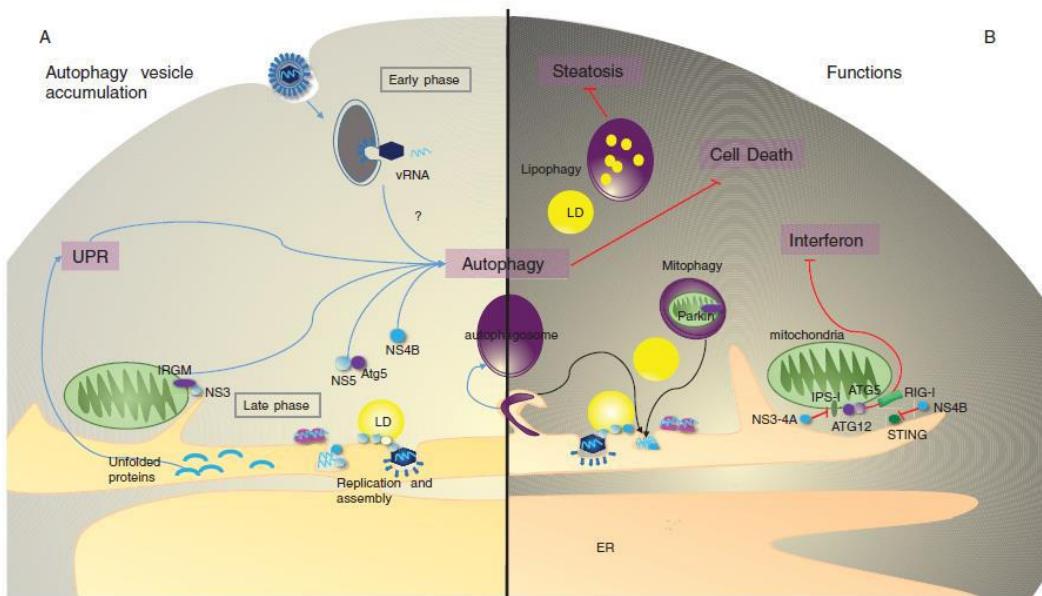
این تحقیق در آزمایشگاه نویسنده توسط بنیاد ساسلا، تحقیقات سرطان سوئیس (KFS-02652-08-2010)، انجمن بین‌المللی تحقیقات سرطان (11-0516)، بنیاد بوگارت، نوارتیس، KFSP^{HLD} و KFSP^{MS} دانشگاه زوریخ، بنیاد آکتریا و بنیاد ملی علوم سوئیس (310030_143979_CRSII3_136241) پشتیبانی گردید.

ضمیمه: مرور تصاویر مجه



تصویر ۴. ۵ عفونت CVB3 سلول‌های آسینار، تریپسینوژن داخل سلولی را به روشی وابسته به اتوفاژی فعال می‌سازد. کشت‌های سلولی آسینار اولیه و کوتاه‌مدت برای موش‌های Atg5-دست‌خورده (ستون چپ) یا موش‌های Atg5^{fl/fl}/Cre⁺ (ستون سمت راست) انجام شدند. سلول‌ها در معرض سرولئین ۱۰ نانومتری (ردیف بالا) قرار گرفته یا با wtCVB3 (ردیف پایین) آلوده شدند. سلول‌ها با معرف BZiPAR (در حضور تریپسین فعال) انکوبه گردیده و با رنگ مخالف^۱ Hoechst 33342 رنگ آمیزی شدند.

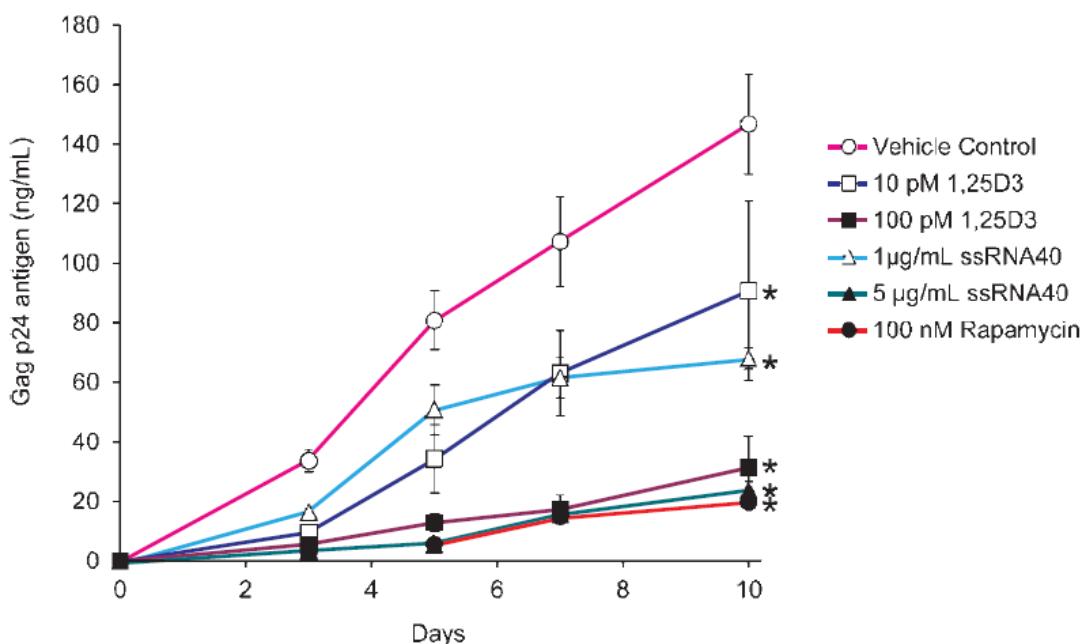
¹ counterstain



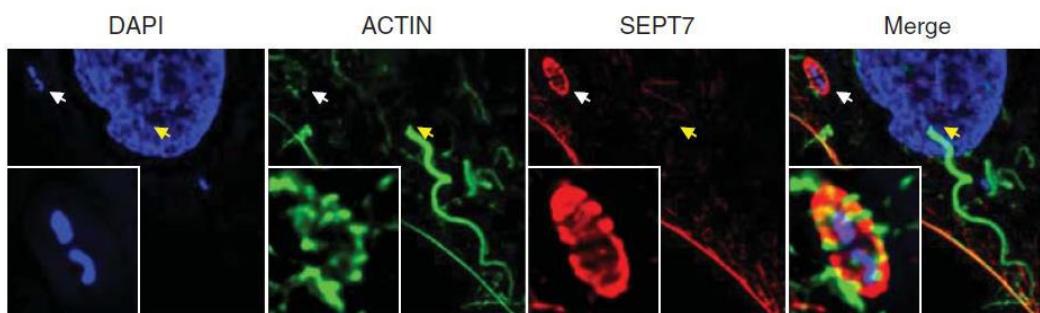
تصویر ۷. ۱ الای اتوفاژی و نقش پریوپرسی در طول تکثیر HCV. HCV و اجزای ویروسی به رنگ آبی، پروتئین‌ها و وزیکول‌های اتوفاژی به رنگ بنفش، میتوکندری‌ها و پروتئین‌های ایمنی ذاتی به رنگ سبز و قطرات چربی به رنگ زرد نشان داده شده‌اند. آرایه‌های آبی، سیاه و قرمز به ترتیب نشان دهنده الای اتوفاژی، اثرات مثبت بر تکثیر HCV و مهار فرآیندهای سلولی و سیگنال دهی هستند. بخش a: عفونت RNA و مکانیسم‌های مختلف باعث تجمع وزیکول‌های اتوفاژی می‌شود. در ابتدا یعنی در مرحله اولیه عفونت، پریوپرسی منتشر شده در سیتوپلاسم احتماً منجر به اتوفاژی می‌گردد. پس از آن، در مرحله پایانی عفونت، پروتئین‌های غیرساختاری (NS3 و NS4B) تشکیل اتوفاگوزوم را افزایش می‌دهند. علاوه بر این، تکثیر و بیان HCV نیز احتماً باعث افزایش تعداد پروتئین‌های تانخورده^۱ در ER و فعال کردن UPR می‌شود که به نوبه خود سبب الای اتوفاژی می‌گردد. بخش b: دستگاه اتوفاژی، سلول را در درون محیطی بهینه برای تکثیر HCV، بازسازی می‌کند. ابتدا اتوفاژی سلول را از آپوپتوز محافظت نموده و بدین ترتیب تکثیر ویروس را حفظ می‌کند. همچنین احتماً در MAM، یک زیر دامنه از غشای ER که دقیقاً متضاد میتوکندری‌های ATG12 و ATG5 است، از تعامل RIG-I با IPS-1 ممانعت نموده و در نتیجه سیگنال دهی ناشی از RIG-I را مختل می‌سازد. مهار پاسخ IFN نیز بواسطه NS3-4A و NS4B انجام می‌گیرد که به ترتیب IPS-I و STING را مسدود می‌کند. در بر این HCV باعث الای میتوفاژی بواسطه پارکین می‌شود که به طور مثبت تکثیر ویروس را تنظیم می‌کند. در نهایت، با وجود جذب کلسترول استری نشده و اسید چرب خشی، وزیکول‌های اتوفاژی استاتاپوز^۲ میکروزویکولار را محدود می‌سازند.

¹ unfolded

² steatosis: استحاله چربی



تصویر ۸. ۲ القا کننده‌های مولکولی کوچک اتوفازی، تکثیر HIV را مهار می‌کنند. ماکروفازها با ssRNA40 (یک لیگاند TLR8)، α1، ۲۵ دی هیدروکسی کوله کلسيفرول (1,25D3) یا راپامایسین به مدت ۲۴ ساعت قبل از آلودگی با HIV_{Ba-L} برای ۳ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌ها شسته شده و با 1,25D3 ssRNA40 یا راپامایسین به مدت ۱۰ روز انکوبه گردیدند. انتشار خارج سلولی آنتی ژن p24 HIV به ماده رویی سلول در روزهای ۰، ۳، ۵، ۷ و ۱۰ از طریق الیزا شناسایی شد.

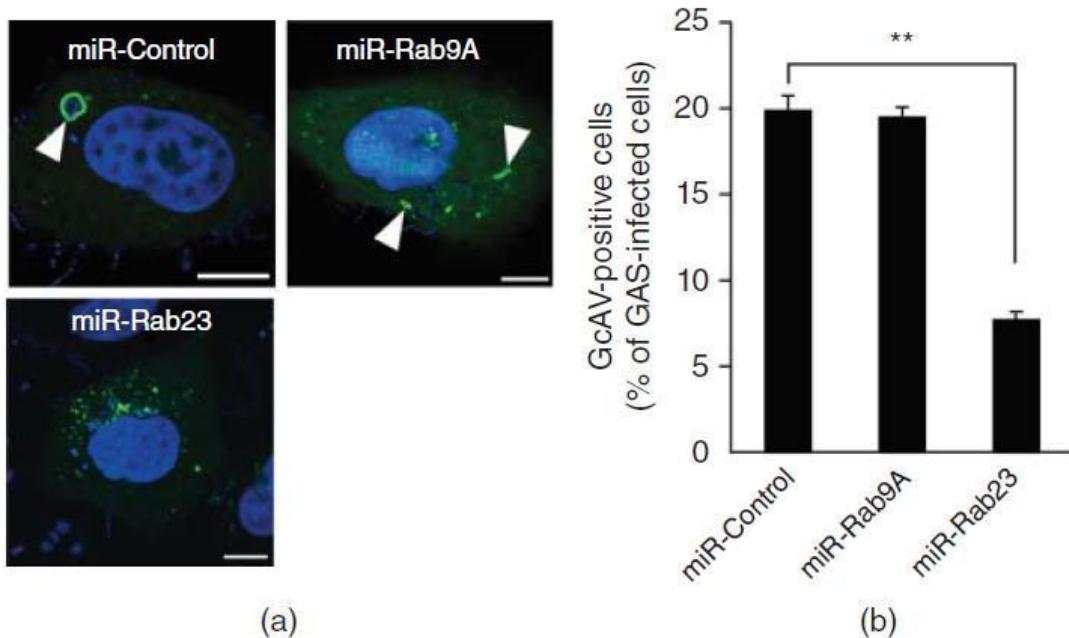


تصویر ۹. ۱ تصویر میکروسکوپ ایمونوفلورسانس از سلول‌های HeLa آلوده به شیگلا¹، این واقعیت را برجسته می‌سازد که شیگلای سیتوزولی می‌تواند دُم‌های اکتینی ایجاد کند یا قفس‌های سپتین² را به کار گیرد. DAPI، F-اکتین (سبز) و SEPT7 (قرمز) نشان داده شده‌اند. به دم شیگلا-اکتین (فلش زرد) و قفس شیگلا-سپتین (فلش سفید و تصویر الحاقی) توجه کنید. نوار مقیاس، ۲ میکرومتر. برگرفته از:

Mostowy, S. Autophagy and bacterial clearance: a not so clear picture. Cell Microbiol 15, 395–402. Copyright© 2013, John Wiley & Sons, Inc.

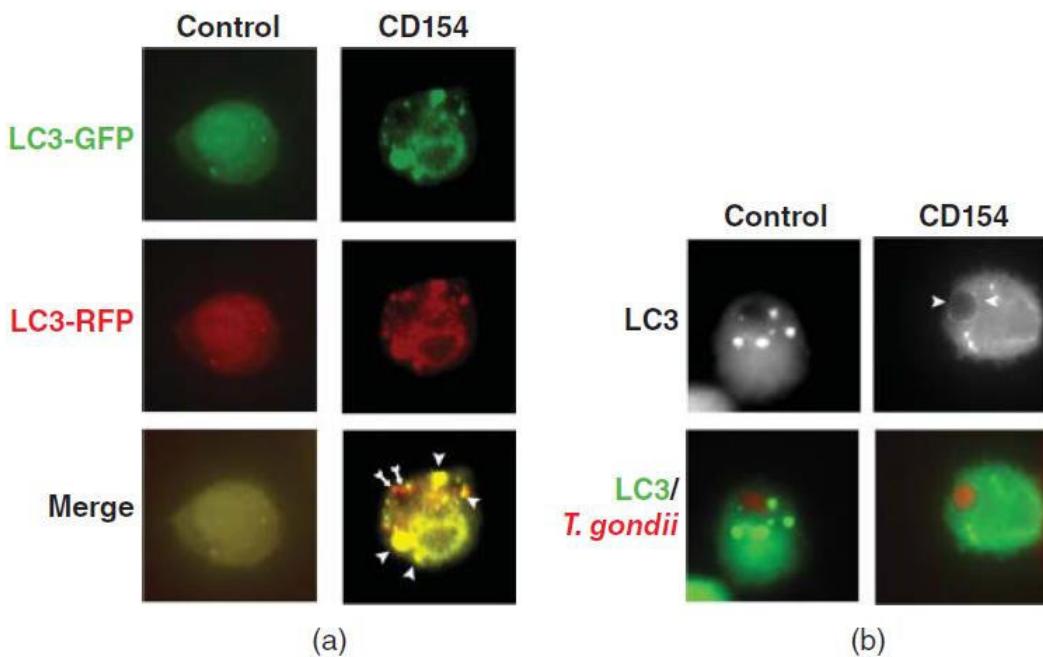
¹ *Shigella*

² septin cages



تصویر ۲.۱۰ Rab23 برای تشکیل GcAV مورد نیاز است. بخش (a): تصاویر میکروسکوپ کانفوکال از GcAVs (سبز) در سلول‌های تخریب شده با Rab23 یا Rab9A. سلول‌های HeLa ترانسfect شده همراه با ناقل‌های تخریب شده با EmGFP-LC3 و miR به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. Rab9A یا Rab23 با GAS در ۱۰۰ MOI ۱۰۰ آلوود گردید و پس از ۴ ساعت تشییت شدند. DNA سلولی و باکتریایی با DAPI رنگ آمیزی گردید. نوک پیکان GcAV‌ها را نشان می‌دهند. مقیاس ۱۰ میکرومتر. بخش (b): اثر تخریبی Rab9A و Rab23 بر کارایی تشکیل GcAV. سرعت تشکیل سلول‌های GcAV مثبت به صورت نسبت سلول‌های GcAV مثبت به سلول‌های آلوده به GAS از تصاویر میکروسکوپ کانفوکال، محاسبه گردید. داده‌های ارائه شده نمایانگر نتایج بیش از ۲۰۰ سلول آلوده بوده و هر درصد نشان دهنده میانگین \pm سه آزمایش مستقل است. ** P < 0.01. اصلاح شده با اجازه از:

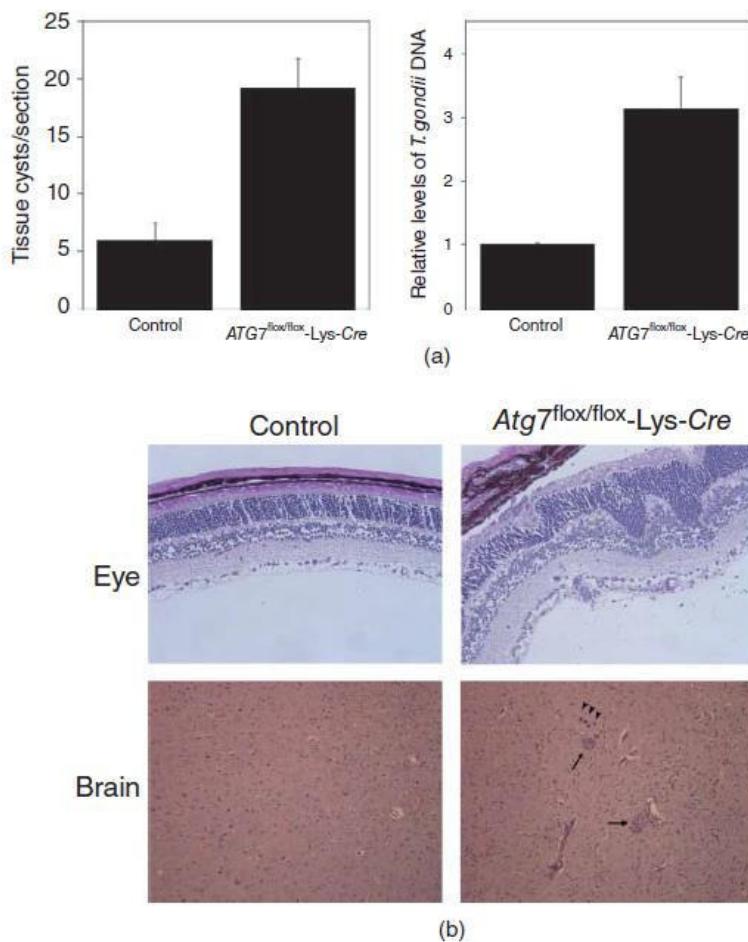
Takashi Nozawa, Chihiro Aikawa, Akira Goda, Fumito Maruyama, Shigeyuki Hamada, Ichiro Nakagawa. The small GTPases Rab9A and Rab23 function at distinct steps in autophagy during Group a Streptococcus infection. *Cellular Microbiology* 2012, 14(8), 1149–1165. Copyright © 2012, John Wiley & Sons, Inc.



تصویر ۱.۱۳ اثاثیه CD40 را افزایش می‌دهد و منجر به هدف گیری *T. gondii* توسط ساختارهای LC3+ می‌شود. پلیت (a): سلول‌های HmCD40-Raw 264.7 با tFLC3 ترانسفکت گردیده و سپس با CD154 به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. تکالیه‌ها به کمک میکروسکوپ فلورسنت و برای تعداد اتوفاگوزوم‌ها (زرد) یا اتولیزوزوم‌ها (قرمز) تشییت گردیده و بررسی شدند. اتوفاگوزوم‌ها و اتولیزوزوم‌ها در سلول‌های تحریک شده با CD154 به ترتیب با نوک پیکان و فلش نشان داده شده‌اند. پلیت (b): سلول‌های HmCD40-Raw 264.7 با LC3-EGFP ترانسفکت گردیده و سپس با CD154 طی یک شب انکوبه شدند. سلول‌ها با تاکیزوئیت^۱ های RH ترازیخته که را بیان می‌کنند به چالش کشیده شدند. ۵ ساعت پس از چالش، تجمع LC3 در اطراف انگل به کمک میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفت (نوک پیکان).

Ogolla, P., Portillo, J.-A. C., White, C. L., Patel, K., Lamb, B., Sen, G. C., and Subauste, C. S. (2013). PLoS Pathog. 9, e100557

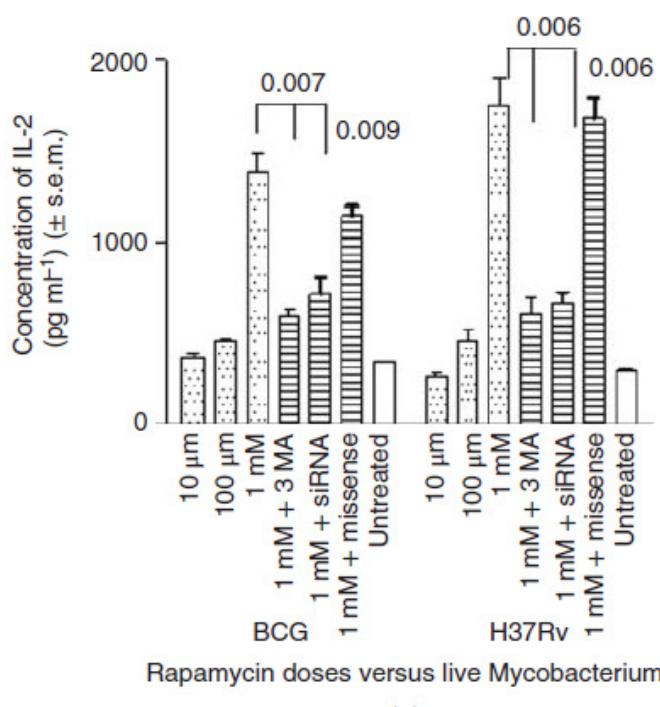
¹ tachyzoite



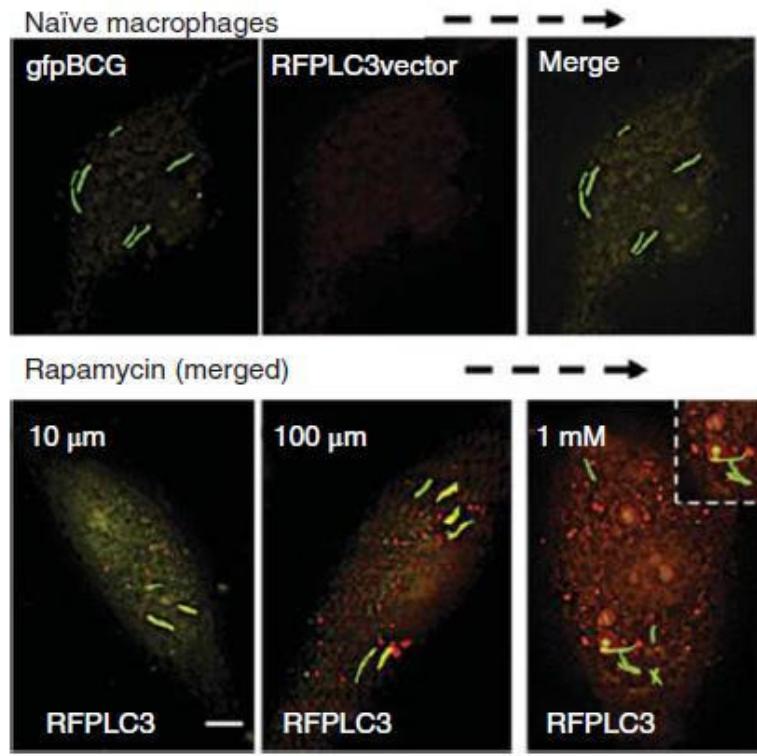
تصویر ۱۳. ۲ موس‌های دارای کمبود اتوفاژی، مستعد ابتلا به توکسoplasmоз^۱ مغزی و چشمی هستند. Atg7^{flox/flox}-Lyz-Cre و موس‌های شاهد (*Atg7^{flox/flox}*) با استفاده از PCR کمی مورد بررسی قرار گرفت. آلدگی کشته شدند. پلیت a: سطح زن *T. gondii*B1 در چشم با استفاده از PCR کمی مورد بررسی قرار گرفت. تعداد کیست‌های بافتی در مغز در میدان میکروسکوپی با درشتنمایی بالا ۱۰۰ تعیین گردید. موس‌های Atg7^{flox/flox}-Lyz-Cre نسبت به موس‌های شاهد مقدار انگل بیشتری را در چشم و مغز نشان می‌دهند. پلیت b: چشم‌های موس‌های شاهد آلدگ، هیستوپاتولوژی خفیفی را نشان دادند. چشم‌های موس‌های آلدگ Atg7^{flox/flox}-Lys-Cre اختلال در ساختار شبکیه و التهاب برجسته‌تری را به نمایش گذاشتند. PASH; X200. مغز موس‌های شاهد آلدگ، التهاب خفیفی را نشان داد. مغز موس‌های آلدگ Atg7^{flox/flox}-Lyz-Cre نواحی برجسته‌ای از التهاب (فلش) و کیست‌های بافتی مکرر (نوک پیکان) را نشان می‌دهد. PASH X100.

Portillo, J.-A. C., Okenka, G., Reed, E., Subauste, A., Van Grol, J., Gentil, K., Komatsu, M., Tanaka, K., Landreth, G., Levine, B., and Subauste, C. S. (2010). Plos One e14472.

¹ toxoplasmosis



(a)

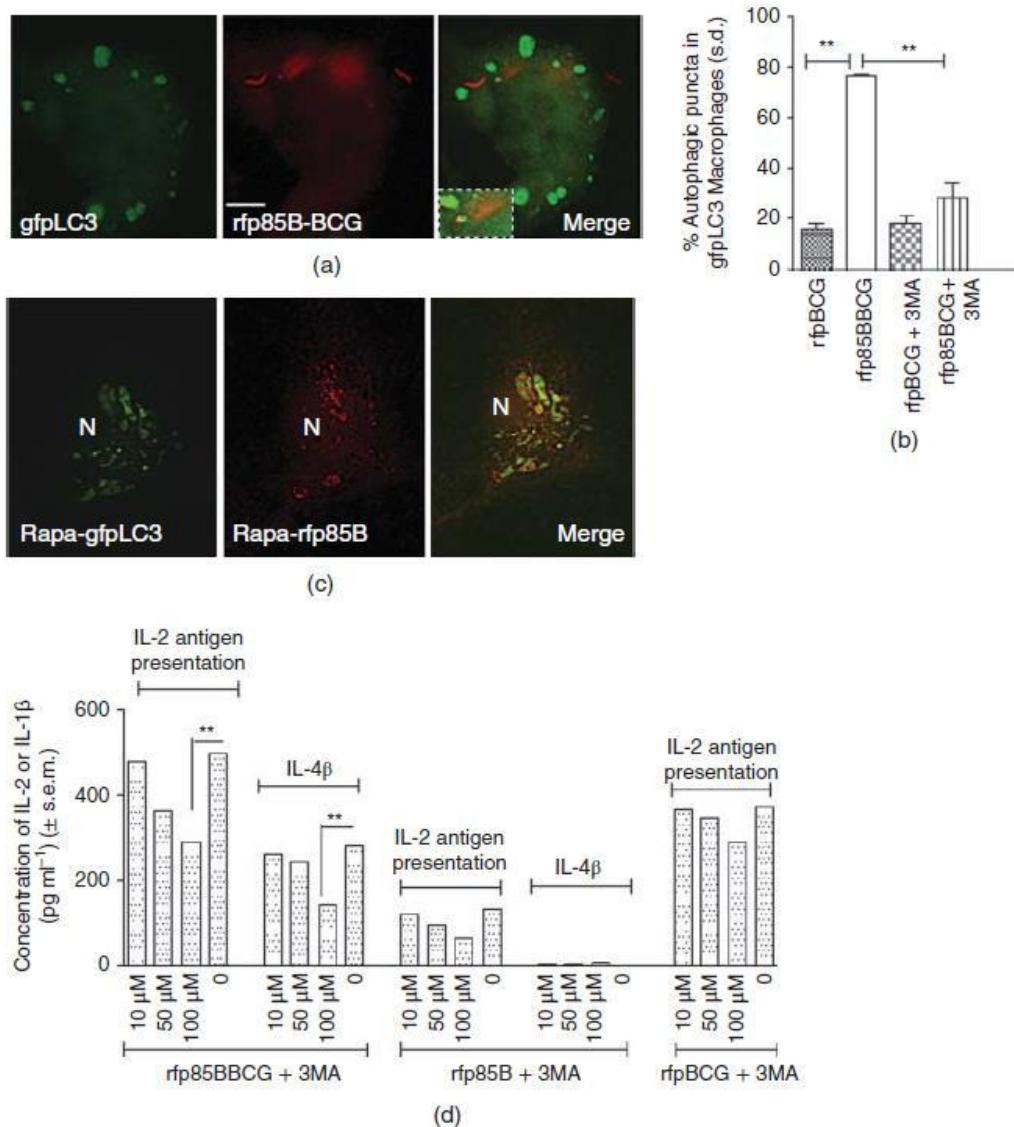


تصویر ۱۵. ۱ راپامایسین فرآوری و ارائه آنتی ژن مایکوباتریایی (Ag85B) را در ماکروفاژها افزایش می‌دهد. ماکروفاژها با منشا مغز استخوان (C57BL/6) در حضور یا عدم حضور راپامایسین و با افزودن قبلی ۳-متیل آدنین (3MA) در برابر siRNA Beclin 1 یا کنترل نادرست آن یا بدون انجام این موارد، انکوبه شدند و سپس آلودگی با مایکوباتری های زنده انجام گرفت (مقادیر p برای گروه های مقایسه ای که در بالای میله ها نشان داده شده، ارائه گردیده اند؛ آزمون t Student میکروفاژها به Mycobacterium tuberculosis) و واکسن BCG (سویه پاستور^۱) (MOI 1:5) به مدت ۴ ساعت) آلوده گردیده و سپس با هیبریدوم سلول T CD4 BB7 اختصاصی برای اپی توپ Ag85B پوشانده شدند. ۲ IL-2 آزاد شده از چاهک های سه تکراری کشت همزمان ماکروفاژ T-سلول، با استفاده از ساندویچ الایزا تعیین گردید (\pm SEM، چهار آزمایش). راپامایسین افزایش یافت اما ۳MA و siRNA در برابر MΦ های درمان شده با ۱ Beclin سطوح پایین تری از IL-2 را القا کردند. (b) ماکروفاژها با DNA پلاسمید کدکننده مارکر اتوفاگوزوم rfp-LC3 ترانسفکت گردیده و سپس با BCG با نشاندار شده با gfp آلوده شدند. MΦ های ثبت شده، با استفاده از میکروسکوپ کانفوکال لیزری (LCM) و مقاطع Z به کمک نرم افزار دکانولوشن^۲ دو بعدی آنالیز گردیدند. تصاویر نماینده (چهار آزمایش) نشان می‌دهند که gfpBCG در MΦ های بکر برای اتوفاگوزوم ها (بخش بالایی) رنگ نمی‌گیرند و راپامایسین باعث القای وابسته به دوز اتوفاگوزوم های نقطه گذاری شده rfp-LC3 مثبت می‌شود که با (ورودی) (بخش پایینی) همپوشانی دارد (نوار سفید = ۵ میکرومتر).

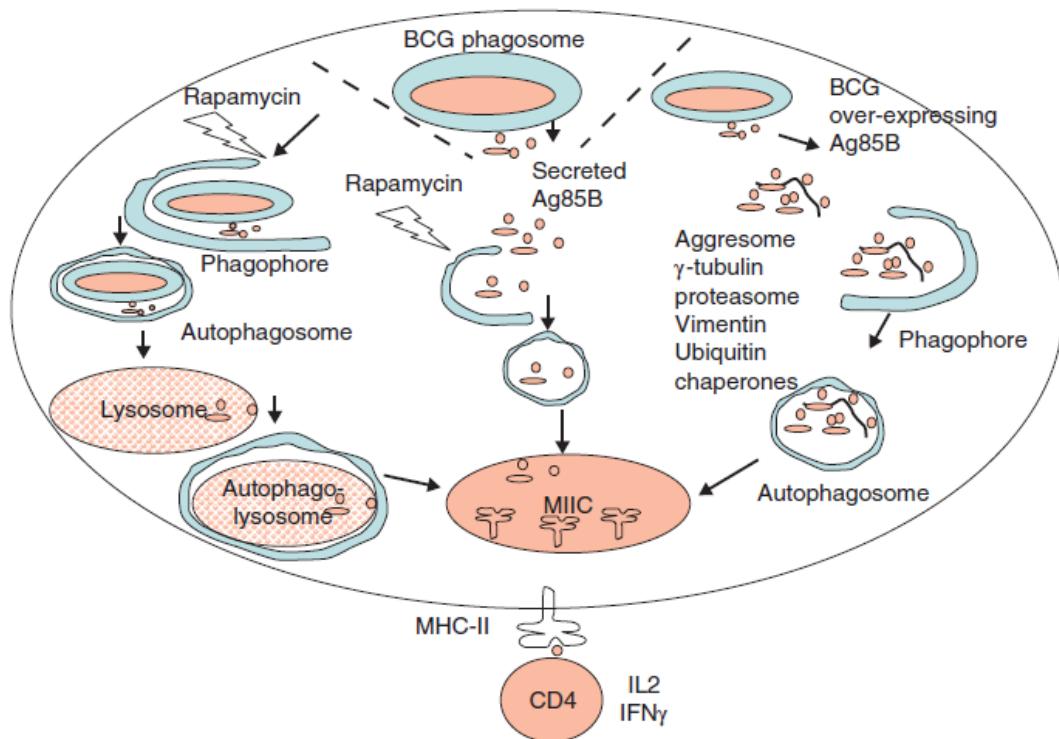
Jagannath, C., Lindsey, D. R., Dhandayuthapani, S., Xu, Y., Hunter, R. L., Jr., and Eissa, N. T. (2009). Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. Nat Med 15, 267–276.

¹ Pasteur strain

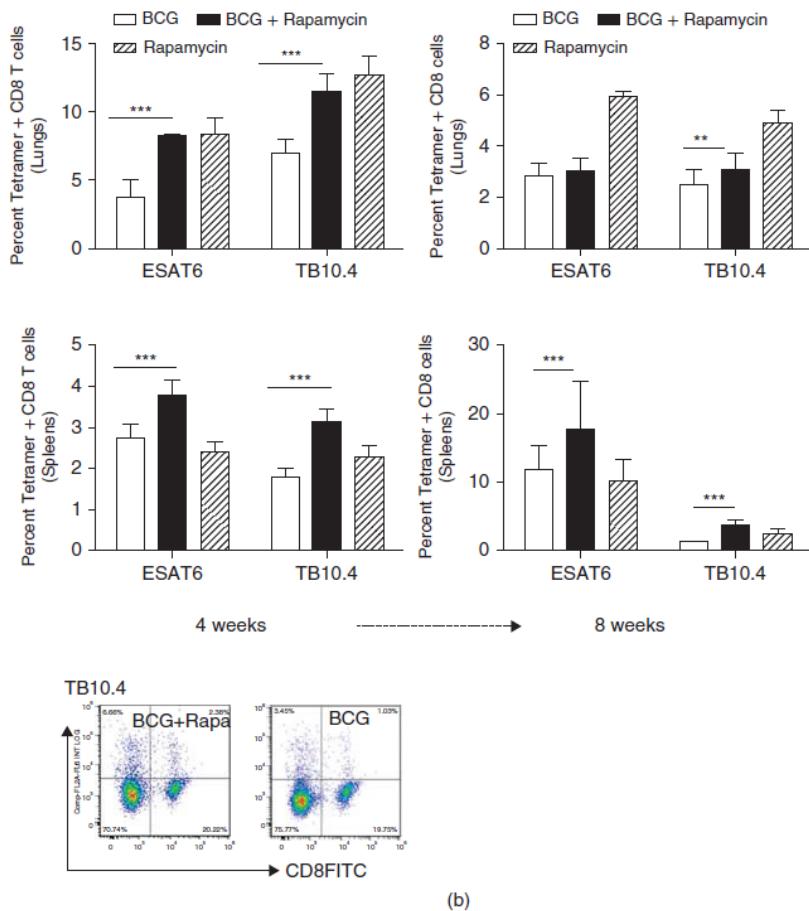
² deconvolution: واهمامیخت



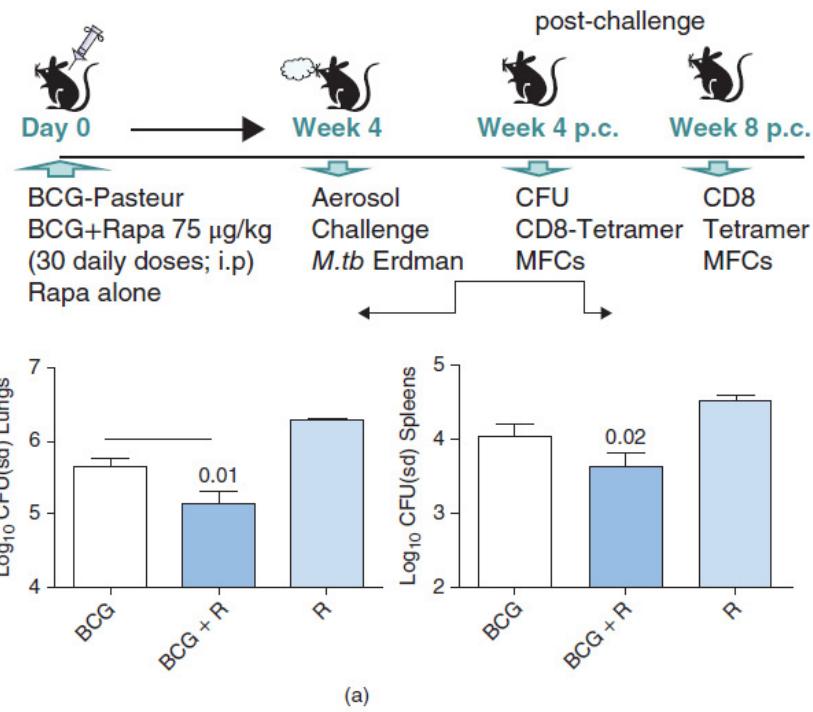
تصویر ۱۵. ۴. Ag85B بیش از حد از واکسن BCG آگرزوومی را تشکیل می‌دهد که باعث القای اتوفاژی مرتبط با افزایش ارائه آنتی ژن می‌شود. (a) ماکروفاژهای RAW ترانسفکت شده با gfp-LC3، با 3MA درمان گردیده و یا درمان نشده، سپس با rfpBCG و rfpAg85B-BCG آلوده شدند. بخش (a) نشان می‌دهد که rfpAg85B-BCG نقاط اتوفاژی قوی را القا می‌کند که با پروتئین rfpAg85B ترشح شده از واکسن همپوشانی دارد. بخش (c) نشان می‌دهد که اتوفاگوزومهای ماکروفاژهای gfp-LC3 فعال شده با راپامایسین، با آنتی ژن محلول rfpAg85B همپوشانی می‌کنند. (b) درصد همپوشانی (\pm SD) با شمارش rfpBCG در ۵۰ ۱۰ ۵۰ ۱۰۰ μ M rfpBCG در هر چاهک سه تکراری برای هر آزمایش تعیین گردید (\pm SD دو آزمایش جداگانه، < 0.01). (d) ماکروفاژها با 3MA تحت درمان قرار گرفته و سپس با rfpBCG یا rfpAg85B-BCG پوشانده شدند و IL-2 پس از جمع آوری آنتی ژن یا مواد رویی ۱۸ ساعت بعد از آزمایش برای IL-1 β ، با استفاده از ساندویچ الایزا اندازه گیری گردید (\pm SD دو آزمایش جداگانه، < 0.01).

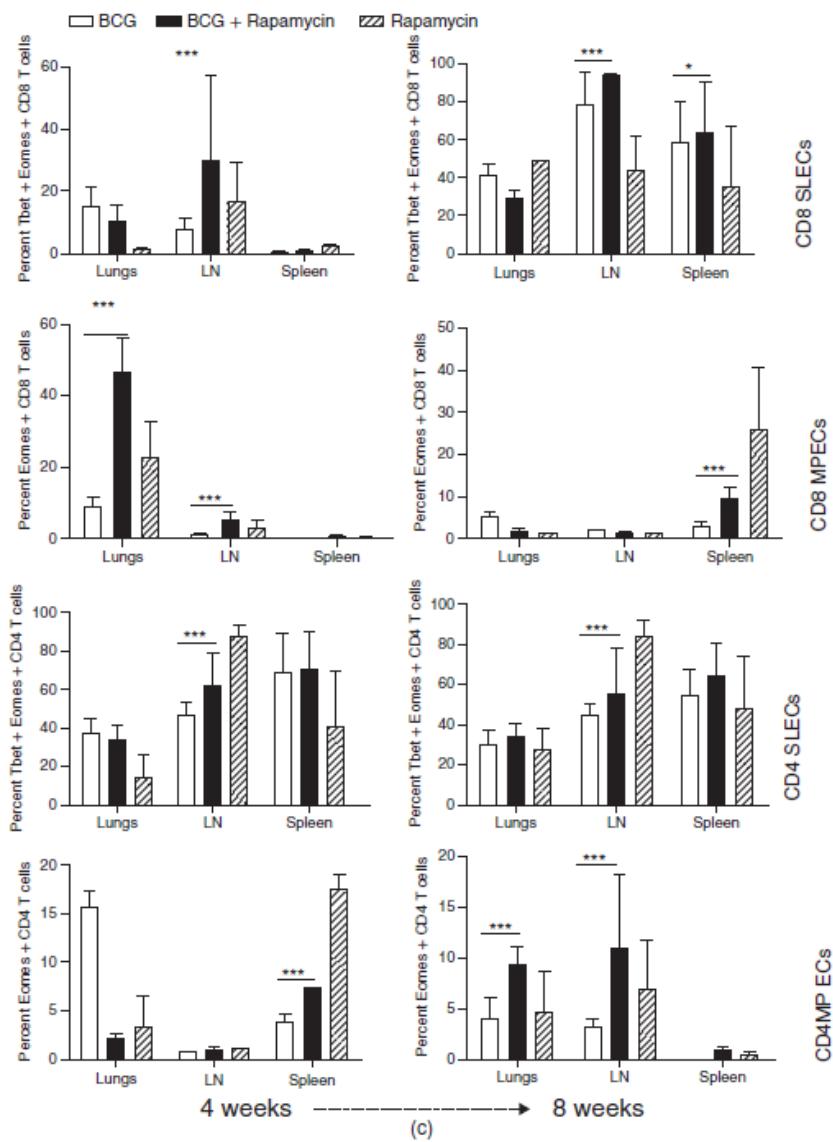


تصویر ۱۵. ۵ این شکل مصور نشان دهنده مکانیسم‌های اتوفازی تقویت کننده آنتی ژن وابسته به MHC-II در سلول‌های دندریتیک و ماکروفازهای آلوده به واکسن BCG می‌باشد. واکسن نوع وحشی BCG در فاگوزوم نابالغ ماکروفازها جدا گردیده و در لیزوژوم ادغام نمی‌شود. توقف بلوغ با یک خط شکسته نشان داده شده است. با این حال BCG Ag85B را ترشح می‌کند که به سیتوزول می‌گریزد. Ag85B ترشح شده به یک اپی توپ پیتید-۲۵ فرآوری می‌گردد که در MHC-II بارگیری شده و به سلول‌های T BB7 ارائه می‌شود. آنها پس از شناسایی آنتی ژن از طریق گیرنده سلول T (TCR)، IL-2 را ترشح می‌کنند. راپامایسین بر ارائه Ag85B دو تأثیر می‌گذارد: ۱- می‌تواند اتوفازی را القاء کند و اتوفاغوزوم‌ها و واکسن BCG را می‌بلعند و آنها را هدف اتوفازی-لیزوژوم‌ها قرار می‌دهند؛ ۲- غشای فاگوفور القا شده توسط راپامایسین، Ag85B سیتوزولی را جدا ساخته و آنها را در قسمت‌های حاوی MHC-II (MIIC) مستقل از راپامایسین، بیان بیش از حد Ag85B باعث تشکیل ساختارهای شبیه آگرزوم (ALIS) می‌شود که برای شناسایی ۷-توبولین، ویمتین، یوبی کوئیتین، پروتئازوم و شاپرون‌ها رنگ می‌شوند. آگرزوم‌ها از طریق یک فرآیند وابسته به وابسته به چاپرون یا یوبی کوئیتین، تشکیل فاگوفور و اتوفاغوزوم‌ها را القا می‌کنند که در لیزوژوم‌ها ادغام شده و تخریب Ag85B و افزایش ارائه پیتید را تسهیل می‌نمایند.



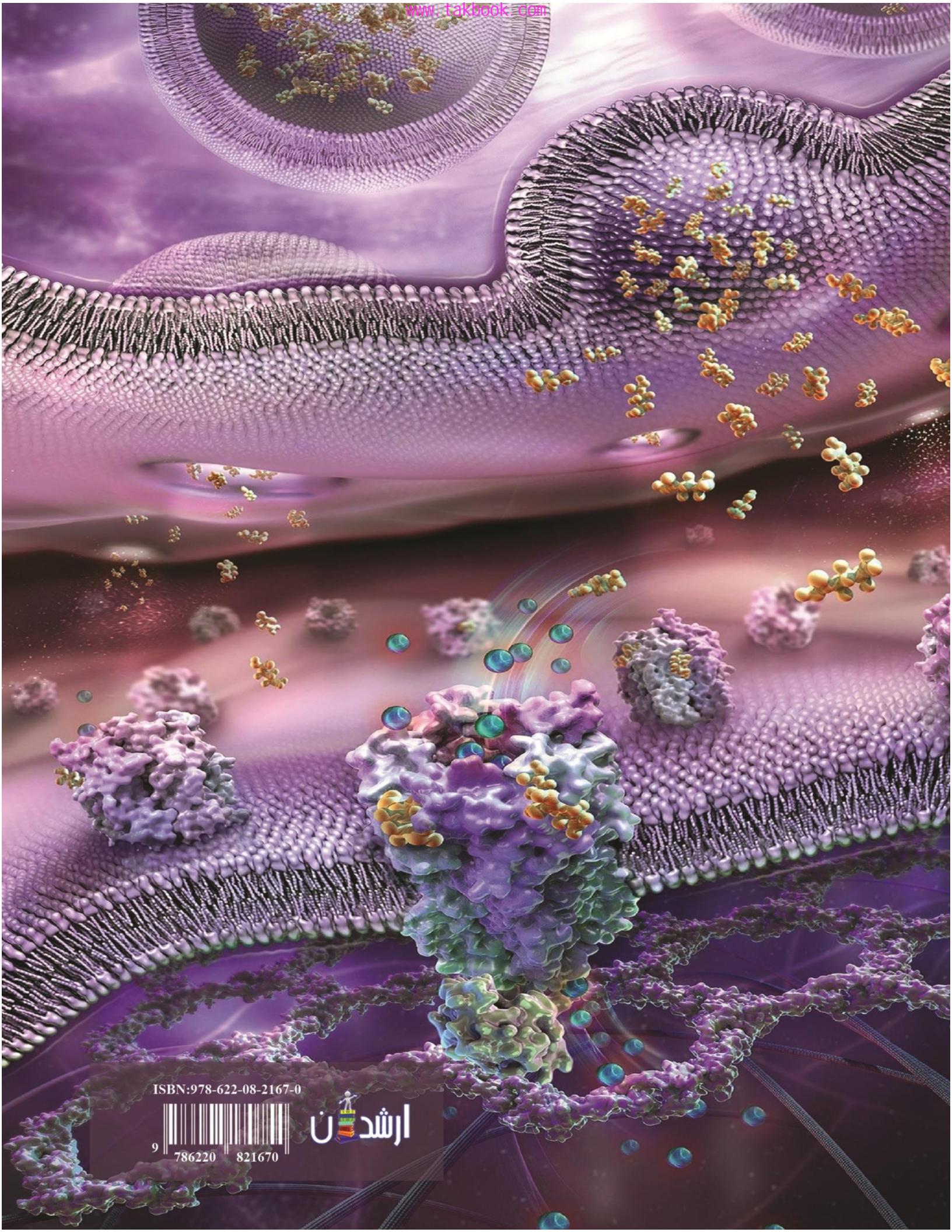
(b)





تصویر ۷. تجویز همزمان واکسن BCG و راپامایسین باعث محافظت بهتر در برابر سل می‌شود که با افزایش پاسخ سلول‌های CD8 T CD4 و ارتباط دارد. موش‌های C57BL/6 با BCG به تنها یکی یا با واکسن همزمان شدند و سپس ۳۰ تزریق روزانه راپامایسین برای آنها انجام گرفت (دوزهای داخل صفاقی: ۷۵ میکروگرم بر کیلوگرم). در روز ۳۲، تعداد ۱۰۰ واحد تشکیل دهنده کلی بакتریایی (CFU) برای هر موش *M. tuberculosis* قرار گرفتند. چهار هفته بعد، موش‌ها کشته شدند و اندام‌ها (مشخصاً ریه‌ها، غدد لنفاوی (LN)، طحال) همگن گردیده و برای واحد تشکیل دهنده کلی بакتریایی (CFU) با آبکاری بر روی آگار 7H11 قرار گرفتند که به صورت \log_{10} CFU در هر اندام بیان می‌شد. سلول‌های T حاصل از اندام‌های موش کشته شده در هفته‌های ۴ و ۸ نیز با استفاده از فلوسیتومتری آنالیز شدند. (a) درمان همزمان راپامایسین به دنبال واکسن BCG باعث پاکسازی بیشتر *M. tuberculosis* از هر دو اندام شد (مقدار p با استفاده از ANOVA دو طرفه در مقابل گروه BCG تنها، تعیین گردید؛ n = 5 موش در هر گروه).

درمان صرفاً با راپامايسين، هیچ اثر باکتری گشی بر تعداد اندام‌های *M. tuberculosis* ندارد زира اين موش‌ها رشد بيشتر از $6\log_{10}$ را برای *M. tuberculosis* در ريء‌ها و بيشتر از $4/5\log_{10}$ در طحال نشان مي‌دهند. (b) سلول‌های T ۴ و ۸ هفته پس از چالش، با استفاده از تترامرهاي اختصاصي برای آنتى زن‌های ESAT6 و TB10.4 *M. tuberculosis* آنالیز شدند (تاسیسات Tetramer، مرکز واکسن Emory، جورجیا، ایالات متحده آمریکا). در هفته چهارم، هم ريء‌ها و هم طحال موش‌های واکسینه شده با BCG-راپامايسين حاوی تعداد بيشتری از سلول‌های CD8 T اختصاصی تترامر (TB10.4 و ESAT6) بودند (چهار موش در هر گروه؛ *** p<0.009، ** <0.01، * <0.05). سلول‌های CD8 T اختصاصی تترامر در هفته هشتم در ريء‌ها کاهش می‌و در طحال افزایش می‌یابند. نمودارهای نقطه ای سلول‌های CD8 اختصاصی TB10.4 را در ريء‌ها نشان می‌دهند. (c) سلول‌های T برای سلول‌های CD8 و CD4 T و Eomes Rnگ‌آمیزی شدند که T-bet و درون سلولی را بیان می‌کنند، و به ترتیب مارکرهای سلول‌های T موثر کوتاه‌عمر (T-bethi SLECs) و سلول‌های T موثر پیش‌ساز حافظه (Eomes hi) می‌باشند. در هفته چهارم، BCG-راپامايسين باعث افزایش سطح CD8-MPECها در ريء‌ها شد، اما CD4-SLECها را در طحال و غدد لنفاوی در اندام‌های لنفاوی افزایش داد. علاوه بر اين، BCG-راپامايسين تعداد CD4-SLECها در غدد لنفاوی و تعداد CD4-MPECها در ريء و غدد لنفاوی را تا هفته هشتم افزایش داد که نمایانگر افزایش بازگشت به ريء هاست.



ISBN:978-622-08-2167-0

9 786220 821670

ارشاد