

AUTOFAGIA W ZAKAŻENIACH WIRUSOWYCH I BAKTERYJNYCH: MOLEKULARNA RULETKA*

AUTOPHAGY IN VIRAL AND BACTERIAL INFECTIONS: MOLECULAR ROULETTE

Lech MARTYNISZYN**, Piotr ORŁOWSKI***,
Małgorzata KRZYŻOWSKA****, Marek Gabriel NIEMIAŁTOWSKI

Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, Warszawa

Streszczenie: Uruchomienie wrodzonych, antygenowo-nieswoistych efektorowych mechanizmów odpornościowych u ssaków przebiega na różnych poziomach zjawisk molekularnych w zakażonej komórce. Jednym z takich ważnych, choć tylko częściowo poznanych procesów biorących udział w zwalczaniu zakażeń wywoływanych przez wirusy i wewnątrzkomórkowe bakterie, jest autofagia aktywowana przez wymienione czynniki zakaźne – wakuole autofagiczne zamykają w sobie wirusy i bakterie dostarczając je do lizosomów w celu degradacji. Patogeny wykształciły jednak wiele możliwości sprawnej „ucieczki immunologicznej” przed autofagią, co pozwala im na skuteczne omijanie mechanizmów efektorowych zakażonego organizmu.

Słowa kluczowe: autofagia, wirusy, bakterie.

Summary: Activation of innate, antigen-unspecific effector immunological mechanisms in mammals proceeds on different levels of molecular phenomena in an infected cell. One of such an important, although only partly recognized processes which take part in the elimination of infections caused by viruses and intracellular bacteria is autophagy. The process is activated through the above mentioned infectious agents, autophagic vacuoles sequester bacteria, and viruses delivering them to lysosomal degradation. Yet pathogens developed the ability of an efficient „immunological escape” from autophagy which enables them to omit effector mechanisms of an infected organism.

Key words: autophagy, viruses, bacteria

*Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006–2008 jako projekt badawczy nr 2 PO5A 050 30 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Warszawie (dla MGN).

** Doktorant dziennego studium doktoranckiego „Ksenobiotyki oraz biologia czynników zakaźnych i inwazyjnych” (2005–2009) przy Wydziale Medycyny Weterynaryjnej SGGW (kierownik studium oraz promotor: prof. dr hab. M.G. Niemiałtowski).

Magistrant na kierunku Biologia na Wydziale Rolnictwa i Biologii SGGW (promotor: dr M. Krzyżowska). * Obecny adres: Karolinska Institutet, Nobels väg 1, SE-171 77 Sztokholm, Szwecja

Wykaz skrótów: **BIR** (*baculovirus IAP repeat*) – bakulowirusowe powtórzenia IAP; **Beklina-1** (*coiled-coil, myosin-like BCL2-interacting protein*) – białko o strukturze superhelisy, miozyna-podobne białko oddziałujące z białkiem BCL-2; **CCR5** (*chemokine receptor 5*) – receptor 5 dla chemokin; **COP** (*coated proteins*) – białka opłaszczające; **CXCR4** (*chemokine SDF-1 (stromal derived factor CXCL12) receptor*) – receptor dla chemokiny SDF-1 CR1, CR3; **CR4** (*complement receptor 1, 3, 4*) – receptor dla dopełniacza 1, 3, 4; **d.p.z.** – dni po zakażeniu; **EEA1** (*early endosome autoantigen 1*) – wczesny autoantygen endosomalny-1; **FSC** (*forward-scatter channel*) – parametr wielkości komórek; **GABARAP** (*gamma-aminobutyric acid A receptor associated protein*) – białko związane z receptorem A kwasu γ -aminomasłowego; **HHV-1/HSV-1** (*human herpes virus type-1/herpes simplex virus type 1*) – wirus opryszczki pospolitej; **ICP34.5** (*infected cell protein 34.5*) – białko 34.5; **IFN- γ** (*interferon-gamma*); **LRR** (*leucine-rich repeats*) – powtórzenia bogate w leucynę; **LCV** (*Large Cell Variant*) – duży wariant komórkowy; **MA** (*macroautophagy*) – makroautofagia; **MAP 1 LC3-II** (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) – lekki łańcuch białka związanego z mikrotubulami; **MBL** (*mannose-binding lectin*) – lektyna wiążąca mannozę; **MHV** (*mouse hepatitis virus*) – mysi wirus zapalenia wątroby; **mTOR** (*mammalian target of rapamycin*) – ssaczce białko docelowe dla rapamycyny; **NOD** (*nucleotide-binding oligomerization domain*) – domena oligomeryzująca wiążąca nukleotyd; **APAF1** (*apoptotic protease activating factor 1*) – czynnik 1 aktywacji proteaz apoptotycznych; **NSF** (*N-ethylmaleimide sensitive fusion protein*) – białko uczestniczące w transporcie b-arestyny 1; **NS1** (*nonstructural protein-1*) – białko niestrukturalne parwowirusa B19; **PAS** (*pre-autophagosomal structure*) – struktura preautofagosomalna; **PE** (*phosphatidyletanolamine*) – fosfatydyloetanolamina; **PtdIns(4,5)P2** (*phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate*) – 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu; **PtdIns(3,4,5)P3** (*phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*) – 3,4,5-trójfosforan fosfatydyloinozytolu; **PI3K** (*phosphoinositide-3 kinase*) – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu; **PKR** (*protein kinase R*) – kinaza białkowa R; **PV** – polio wirus; **SARS** (*severe acute respiratory syndrome*) – zespół ostrej, ciężkiej niewydolności oddechowej; **SCV** (*Small Cell Variant*) – mały wariant komórkowy; **SEC13p i SEC31p** (*Saccharomyces cerevisiae protein*) – białko 13 i 31 *Saccharomyces cerevisiae*; **SNARE** (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*); **SSC** (*side scatter channel*) – rozproszenie boczne w cytometrze przepływowym; **TEM** (*transmission electron microscopy*) – transmisyjna mikroskopia elektronowa; **VPS** (*vacuolar protein sorting*) – wakuolarnie sortowanie białek; **VAM** (*Vacuolar membrane*) – błona wakuolarna.

DEUS ET NATURA NIHIL FÁCIUNT FRUSTRAT *Bóg i natura nic nie robią na próżno*

1. WSTĘP

Autofagia to proces, w którym z jednej strony dwubłonowa struktura zwana autofagosomem bierze udział w przeżyciu komórki w sytuacjach niedoboru składników odżywczych, dostarczając substraty do degradacji lizosomalnej, a z drugiej proces nazywany typem II śmierci komórkowej m.in. bywa zaangażowany w obumieranie neuronów dopaminergicznych w chorobie Parkinsona [60].

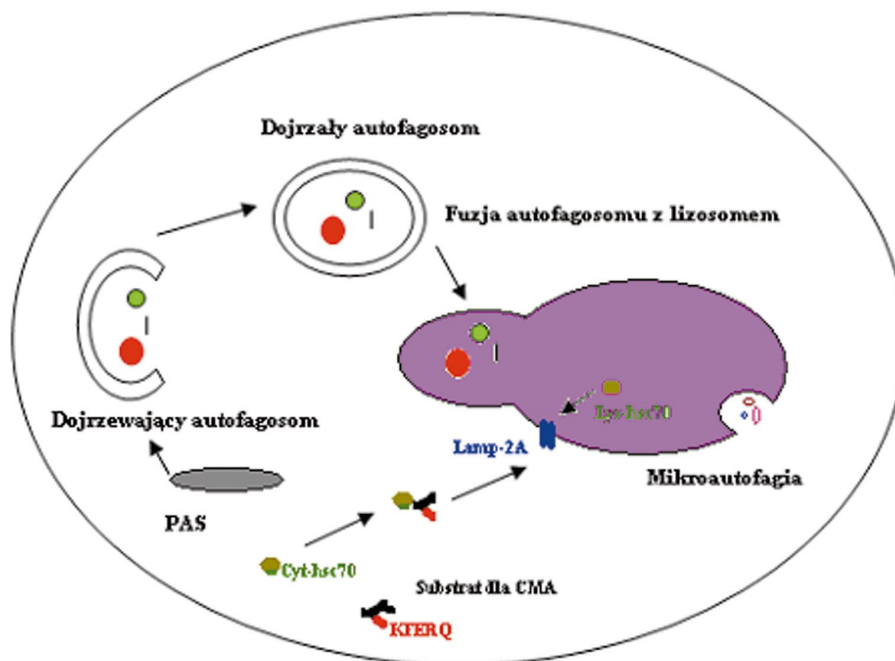
Jest to złożony, wewnątrzkomórkowy proces fizjologiczny występujący zarówno w zdrowych, jak i w zakażonych komórkach, co dowiedli Ashford i Porter w 1962 roku, którego mechanizm molekularny do dnia dzisiejszego stanowi zagadkę [23, 32, 57]. Autofagia jest ewolucyjnie zaadaptowanym procesem występującym nie tylko w komórkach zakażonych wirusami i/lub bakteriami oraz w komórkach grzybów (np. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), ale i u ssaków oraz roślin [23, 32, 57].

W procesie tym, w przeciwieństwie do proteasomalnej degradacji niewielkich peptydów, dochodzi do trawienia lizosomalnego białek, kompleksów białkowo-lipidowych oraz całych organelli (np. mitochondriów). Uwolnione w ten sposób związki mogą być ponownie wykorzystane do wewnątrzkomórkowych syntez indukowanych działaniem stresora (np. usunięciem czynników wzrostowych, surowicy lub aminokwasów, jak również oddziaływaniem reaktywnych form tlenu). O tym, iż jest to proces fizjologiczny świadczyć może fakt, że mutacja w genie ATG5, uniemożliwiająca uruchomienie procesu autofagii, jest przyczyną śmierci mysich noworodków, które giną tuż po urodzeniu [34, 32, 57].

2. RODZAJE AUTOFAGII

Wyróżnia się trzy rodzaje autofagii, to jest:

- (i) autofagię zależną od białek szoku cieplnego – CMA (ang. *Chaperone Mediated Autophagy*) występującą tylko u wyższych eukariontów,
- (ii) mikroautofagię oraz
- (iii) makroautofagię – MA (ang. *Macroautophagy*).



RYCINA 1. Rodzaje autofagii [makroautofagia, mikroautofagia i autofagia zależna od białek opiekuńczych (CMA)]: PAS – struktura preautofagosomalna, KFERQ –pentapeptydowy motyw degradacji lizosomalnej, Lamp-2A – białko transbłonowe związane z lizosomem (opracowanie własne wg: www.aecom.yu.edu/cuervo/chaperone.htm, en.wikipedia.org/wiki/Autophagy)

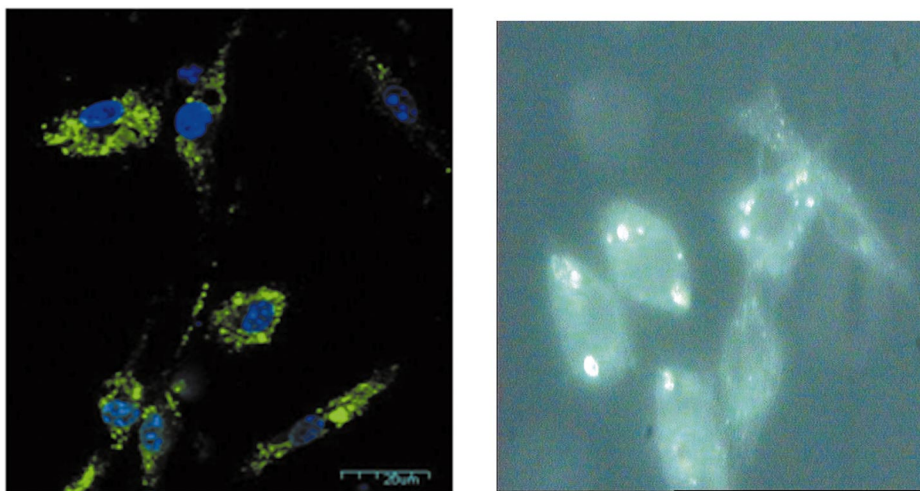
Podziału tego dokonano na podstawie wielkości degradowanych substratów: w trakcie zachodzenia CMA trawione są pojedyncze białka i peptydy z terenu cytoplazmy, a jedynym organellum w nim uczestniczącym jest lizosom. Podczas mikroautofagii degradowane są związki rozproszone w cytoplazmie, fragmenty jądra komórkowego i małe organella, np. peroksosomy w komórkach *P. pastoris*, również i w tym przypadku jedynym organellum niezbędnym do degradacji substratu jest lizosom. Natomiast w czasie zachodzenia MA degradowane są kompleksy białkowe, białkowo-lipidowe z terenu cytoplazmy, ale i struktury błoniaste oraz całe organella, np. mitochondria. Indukcja makroautofagii wymaga powstania swoistego organellum – autofagosomu zbudowanego z podwójnej błony oraz lizosomu [27, 38, 32, 33].

2.1. Makroautofagia

Makroautofagia jest najwcześniej zaobserwowanym typem autofagii, głównie za sprawą powstających na terenie cytoplazmy charakterystycznych struktur nazywanych autofagosomami [29,30]. Stąd też mianem autofagia przyjęto zwyczajowo określać makroautofagię. Jest to typ autofagii mający największe znaczenie w zakażeniach bakteryjnych i wirusowych, dlatego też w niniejszej pracy skupiliśmy się na charakterystyce tego procesu. Autofagosomy to pęcherzyki o podwójnej błonie, których pochodzenie nie jest do końca znane. Istnieją dwie teorie co do pochodzenia błony, z której jest zbudowany autofagosom. Pierwsza mówi, iż pochodzi ona z błon retikulum endoplazmatycznego (RE) lub aparatu Golgiego, o czym może świadczyć obecność izomerazy dwusiarczkowej na jej powierzchni; druga, iż błona syntetyzowana jest *de novo* na terenie cytoplazmy [71, 53]. Jednakże, zanim powstanie dojrzały autofagosom, istnieje struktura przejściowa, tzw. PAS (ang. *Pre-Autophagosomal Structure*) zbudowana z pojedynczej błony, która po elongacji i wpukleniu wokół substratu zamyka się i tworzy autofagosom. Zewnętrzna błona autofagosomu kolejno łączy się z błoną lizosomu uwalniając do jego wnętrza substrat otoczony wewnętrzną błoną. Wewnętrzna błona wraz z substratem ulega degradacji. Połączenie autofagosomu z lizosomem odbywa się dzięki typowym białkom odpowiedzialnym za łączenie pęcherzyków, tj. białkom z rodziny SNARE: m.in. VAM3, VAM7, VTI1i NSF, białkom VPS – SEC17, SEC18, SEC19 [30].

U drożdży wyróżniono 27 genów kodujących białka zaangażowane w autofagię na różnych jej etapach. Nazwano je *atg* (ang. *autophagy-related genes*), a ich produkty białkami ATG. Funkcja niektórych z nich jest nadal nieznana. Białka podzielono na cztery funkcjonalne grupy: białkowe kinazy serynowo-treoninowe, reagujące na aktywność kinazy TOR: ATG1, ATG13, ATG17, lipidowe kinazy pośredniczące w nukleacji pęcherzyków: ATG6, ATG14, VPS34, ubikwityno-podobne systemy koniugacyjne pośredniczące we wzroście pęcherzyków: ATG8-PE, ATG12-ATG5 oraz białka uczestniczące w recyrkulacji ATG zaangażowanych w powstawanie autofagosomu: ATG2, ATG9, ATG18 [33]. Homologi genów *atg* obecne są w wyższych organizmach eukariotycznych, choć jeszcze nie wszystkie zostały zidentyfikowane [68].

Mechanizm tworzenia się autofagosomu zaczyna się od aktywacji 186-amino-kwasowego białka ATG12 poprzez jego C-końcową glicynę, co dzieje się za sprawą białka ATG7 wykazującego homologię do enzymu aktywującego ubiquitytację E1, ATG12 jest następnie przenoszona na ATG10, którego funkcja jest równoznaczna z funkcją enzymów koniugacyjnych ubiquitytacji E2, związane ATG10, ATG12 przyłącza się do ATG5 wchodząc z ATG16L w skład 800 kDa kompleksu białkowego, którego obecność jest niezależna od indukcji autofagii [41, 40]. Wiadomo również, że po utworzeniu dojrzałego autofagosomu dochodzi do dysocjacji kompleksu ATG12-ATG5 wraz z ATG16, co m.in. uniemożliwia branie ich pod uwagę jako markerów omawianego procesu. Drugim równie ważnym systemem koniugacyjnym jest ATG8, którego ssaczym odpowiednikiem jest MAP-LC3 (*Microtubule Associated Protein-Light Chain 3*). Cytozolowa postać LC3 jest przekształcana przez proteazę cysteinową ATG4, która u ssaków występuje przynajmniej w czterech różnych formach (hAtg4A,B,C odpowiednio autofagina-2,1,3,4, natomiast w modyfikacji LC3 udział bierze jedynie autofagina-2) eksponując C-końcową glicynę, a następnie jest aktywowana przez ATG 7 (E1), transportowana na ATG 3 (E2), przekształcana do formy LC3II, aby następnie połączyć się z fosfatydyloetanoliną (PE)-MAP-LC3II-PE. Kompleks ten występuje po obu stronach błon autofagosomu, będąc jednym z dwóch markerów dojrzałego pęcherzyka autofagosomalnego (drugim jest ATG 19 występujący jedynie w komórkach drożdży). Należy dodać, że u ssaków występują różne homologie MAP-LC3, takie jak: GABARAP (*gamma-aminobutyric acidA receptor associated protein*) GATE 16 (*Golgi-associated ATPase enhancer*) o masie 16kDa, Atg 8L (o nieznannej dotąd roli) [65].



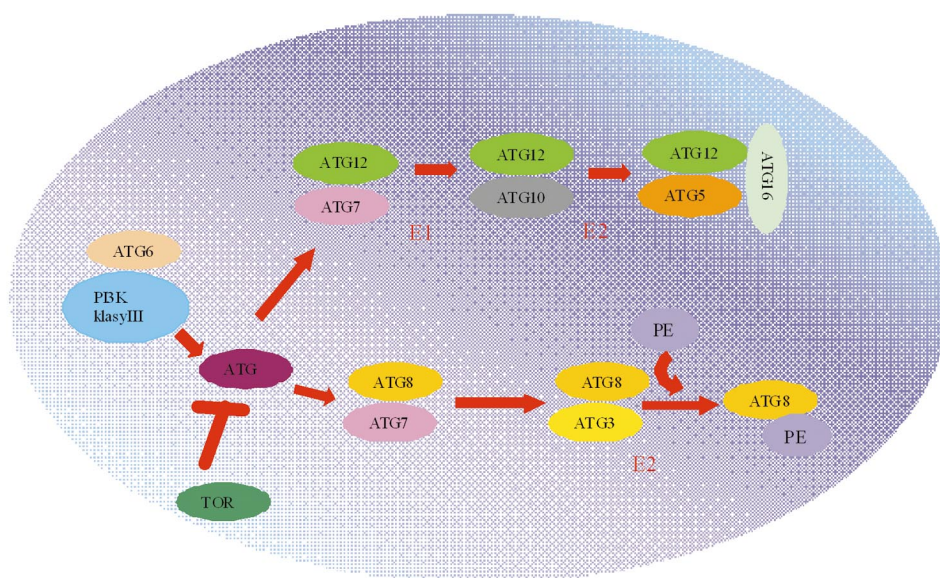
RYCINA 2. Obraz mikroskopowy: (A) ekspresji białka MAP-LC3 w hodowli pierwotnej MØ uzyskany w mikroskopie konfokalnym Olympus FV1000 uprzejmie udostępnionym przez prof. Ewę Sawosz, SGGW (A) oraz (B) komórek linii Raw 264.7 wybarwionych monodansylkadaweryną do niedawna uznawaną za marker autofagii (mikroskop fluorescencyjny Olympus BX60), badania własne

Do zainicjowania tworzenia autofagosomu niezbędna jest obecność kinazy 3-fosfatydyloinozytolu. U wyższych organizmów wyróżniono trzy kompleksy, w skład których wchodzi wymieniona kinaza: klasy I, klasy II i klasy III. Dla autofagii ważne są kompleksy klasy I i III. Kompleks klasy I wchodzi w skład błony komórkowej i odpowiada za fosforylację PtdIns(4,5)P₂ do PtdIns(3,4,5)P₃, tym samym jest częścią szlaku transdukcji sygnału, który prowadzi do aktywacji kinazy TOR i innych kinaz oraz pełni rolę inhibitorową dla autofagii. Kompleks III (u drożdży I) zbudowany jest z kinazy 3-fosfatydyloinozytolu, VPS15, VPS34 (ATG6) i ATG14 (VPS ang. *Vacuolar Protein Sorting*). Nie wszystkie składowe tego kompleksu zostały zidentyfikowane u wyższych eukariota np. ATG14. Kompleks ten uczestniczy w nukleacji błony, z której powstaje PAS [32, 71, 40]. 3-metyloadenina (3-MA) jest specyficznym inhibitorem kinazy 3-fosfatydyloinozytolu stosowanym w warunkach laboratoryjnych w celu zahamowania autofagii.

Regulacja MA odbywa się na wielu poziomach. Głównym i dobrze poznanym regulatorem autofagii na poziomie molekularnym jest kinaza TOR (ang. *Target Of Rapamycin*), u ssaków aktywność mTOR hamuje zachodzenie MA. Kinaza ta stanowi swoisty sensor zawartości aminokwasów na terenie komórki. Podczas usunięcia aminokwasów ze środowiska komórki, postępujący spadek ich zawartości zdolnych do tworzenia nowych związków na terenie komórki inaktywuje działanie kinazy TOR i tym samym prowadzi do znacznie większej aktywności MA. U drożdży *Sacharomyces cerevisiae* TOR kontroluje fosforylację ATG13: w warunkach z nieograniczonym dostępem do substancji odżywczych ATG13 jest silnie fosforylowane przez TOR i ma małe powinowactwo do kinazy ATG1, będącej głównym składnikiem hipotetycznego kompleksu indukującego powstawanie fagosomu. Odwrotna sytuacja następuje w sytuacji głodu, ATG13 jest defosforylowane i łatwo tworzy kompleksy z ATG1. Poza ATG13 i ATG1 w skład kompleksu regulatorowego wchodzi Vac8, ATG11, ATG17, ATG20 i ATG24 [30, 71, 45, 15]. Należy dodać, że rapamycyna będąca inhibitorem kinazy TOR działa właśnie poprzez stymulację defosforylacji ATG13, a co za tym idzie jego interakcji z ATG1. Właśnie te właściwości powodują, iż rapamycyna jest powszechnie uznanym związkiem farmakologicznym stosowanym do indukcji autofagii.

U ssaków nie wykryto jednak do tej pory homologów ATG13 i ATG17, natomiast rolę regulatorową autofagii na szlaku poniżej mTOR przypisuje się kinazie p70s6k, dla której substratem jest rybosomalna podjednostka S6 hamująca autofagię w przypadku jej fosforylacji zależnej od aminokwasów [4]. Jednakże indukcja MA u ssaków ma ścisły związek z obecnością wolnych aminokwasów na terenie komórki lub, jak pokazują niektóre badania, również w środowisku zewnątrzkomórkowym. Podanie aminokwasów do środowiska głodzonych komórek hamuje MA. Jednak jedynie osiem aminokwasów wykazuje zauważalne działanie hamujące: Leu, Gln, Tyr, Phe, Pro, Met, His i Trp. Komórki pochodzące z różnych tkanek różnie reagują na brak lub obecność konkretnych aminokwasów, np. komórki mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych hamują aktywność autofagii jedynie w obecności Leu, a w hepatocytach regularnie żywionych szczurów kombinacja Leu i Gln dawała najsilniejszy efekt. Obecnie nie jest jasne, w jaki sposób aminokwasy wpływają na aktywność

mTOR. Zaproponowano istnienie receptora (receptorów) na zewnętrznej błonie komórkowej odbierającego informację o zawartości wolnych aminokwasów. Dobrym kandydatem do roli receptora dla Leu jest CD28, pełniące bardzo wiele funkcji w zależności od typu komórki czy fazy cyklu komórkowego. Jednak mimo iż jego obecność obserwowana jest m.in. na powierzchni hepatocytów i komórek nerki, to nie obserwowana jest na komórkach mięśni szkieletowych i kardiomiocytach, co poddaje w wątpliwość jego rolę w procesie aktywacji autofagii [17, 18].



RYCINA 3. Schemat dwóch procesów koniugacyjnych niezbędnych do zajścia procesu autofagii ATG12-5 oraz ATG8-PE: *Atg* (autophagy-related genes), PE (Phosphatidylethanolamine) (opracowanie własne wg: www.nature.com/.../v6/n6/fig_tab/nrm1666_F1.html.)

3. AUTOFAGIA W ZAKAŻENIACH WIRUSOWYCH

W celu zintensyfikowania procesu replikacji w zakażonej wirusem komórce permissywnej tworzą się wewnątrzkomórkowe struktury, tzw. fabryki wirusów (wiropłazma), w których powstanie zaangażowany jest m.in. cytoszkielet. Podobny mechanizm jest uruchamiany podczas agregacji białek w komórkach, w których tworzą się autofagosomy i agresomy w celu zwiększenia degradacji białek. Według Wilemana [69] wirusy, przynajmniej niektóre, mogą indukować powstawanie autofagosomów i agresomów jako miejsc ich replikacji.

W zaatakowanych przez wirusy komórkach często obserwuje się charakterystyczne struktury składające się, między innymi, z zaanektowanych przez czynnik zakaźny kompartmentów komórkowych (np. RER, AG). Wirusy, tak jak bakterie,

są zdolne wchodzić w interakcje ze strukturami i molekularnymi mechanizmami autofagii wykorzystując często ten proces do, chociażby, ucieczki immunologicznej przed komórkami efektorowymi zakażonego organizmu – wiele wirusów w toku ewolucji wykształciło możliwość syntezy białek zdolnych do modulacji procesu autofagii, jak na przykład do: (i) indukowania struktur autofagosomalnych, które później wykorzystują (czynią tak, na przykład, wirusy polio) lub (ii) hamowania tego procesu (np. HHV-1/HSV-1).

W dalszej części pracy opisano przykłady wirusów interferujących z mechanizmami autofagii, to jest wirusów zawierających w swoim genomie: (i) DNA, jak parwovirusy, HHV-1/HSV-1 i pokswirusy lub (ii) RNA, np. poliovirusy, wirusy nabytego zespołu braku odporności (HIV-1), koronawirusy i togawirusy oraz wirus pryszczycy – FMDV (*foot-and-mouth disease virus*). Zakażenie wirusami ps-RNA (*positive-strand-RNA*) skutkuje rearanżacją architektury zakażonej komórki i tworzeniem wirusowych kompleksów replikacyjnych – VRC (*viral replication complex*). Autofagia jest wielce prawdopodobnym mechanizmem biorącym udział w ustalaniu nosicielstwa wirusa i umożliwiającym nielityczne jego uwalnianie z zakażonych komórek. W dalszej części pracy omówiono rolę autofagii w najlepiej poznanych dotąd zakażeniach wirusowych.

Wirusy DNA

Parwovirusy. Do parwovirusów (rodzina *Parvoviridae*; średnica 18–26 nm) zaliczamy dwie podrodziny: (i) *Parvovirinae* oraz (ii) *Densovirinae*. Patogen komórek linii erytrocytarnej erytrowirus B19V należy do rodzaju *Erythrovirus*, podrodziny *Parvovirinae*. Jest to jeden z najmniejszych wirusów zawierający w strukturze ss-DNA. Zakażone komórki B19 charakteryzują się zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G1 lub G2/M [45]. Dzięki kodowanemu przez genom wirusa białku NS1 jest w stanie hamować apoptozę zakażonych komórek [45]. Podczas analizy cytometrycznej wyróżniono dwie grupy zakażonych komórek: o wysokich parametrach SSC (*side-scatter channel*) i FSC (*forward-scatter channel*) oraz grupę o niskiej wartości SSC i średniej FSC. Analiza zawartości wirusowego białka NS1 w tych dwóch populacjach wykazała, iż zawartość NS1 w komórkach o obu wysokich parametrach sięga 84,6%, natomiast w populacji o niskiej wartości SSC i średniej FSC wynosi 28,8% [46]. Analiza cyklu komórkowego wykazała, iż wysoka zawartość NS1 determinuje zatrzymanie cyklu w fazie G2/M, a niższa w fazie G1. Komórki o wysokich wymienionych parametrach charakteryzują się ponadto innym fenotypem: mają większą średnicę, zauważalna jest też mniejsza elektronogęstość jąder komórkowych, które są powiększone i mają pofałdowaną błonę, a komórki zawierają więcej cytoplazmy i mają równomiernie rozmieszczone struktury, wewnątrz których często znajdują się mitochondria. W 5 d.p.z. obserwuje się nasilenie cech wskazujących na autofagię w komórkach o wysokich parametrach SSC i FSC [46]. Badania nad zawartością LC3-II (charakterystycznego markera autofagosomów) wykazały, że w 96 g.p.z. znacznie rośnie jego zawartość. Porównawcza analiza zawartości NS1 ukazała, iż właśnie w 96 g.p.z. jego stężenie

osiąga maksymalny poziom. Znaczny wzrost zawartości LC3-II skorelowany jest z wysokim stężeniem NS1 (nie obserwowano wzrostu jego zawartości w komórkach z małym stężeniem NS1). Użycie inhibitorów MA względem komórek o mniejszej zawartości NS1 powodowało 27-procentowy wzrost śmiertelności, a ponadto wykazano, iż użyty inhibitor (3-MA) nie ma wpływu na aktywność NS1. Przedstawione powyżej wyniki badań uzyskane przez Nakashima i wsp. [46] jednoznacznie wskazują na udział autofagii w zakażeniu erytrowirusem. Nie jest jednak pewne, czy MA jest aktywowany przez wirus i sprzyja jego replikacji, czy też jest to proces aktywowany przez samą komórkę w celu ochrony przed patogenem. Za drugą możliwością przemawia fakt, iż podanie 3-MA powoduje wzrost śmiertelności zakażonych komórek [46].

Herpeswirusy. Wirus opryszczki (Human *herpesvirus* typu 1, *HHV-1/Herpes simplex typu 1*, HSV-1; Rodzina *Herpesviridae*; DNA; wielkość 100–200 nm) oddziałuje na komórkę dwojako, a mianowicie poprzez: (i) genom, którym jest ds-DNA, indukuje syntezę białek stresowych aktywując kinazę czynnika inicjującego translację eIF2 α (PKR), (ii) translację wirusowego genu neurowirulencji, którego produktem jest białko ICP34.5, hamujące aktywność PKR, a tym samym blokujące eIF2 α [60]. Z kolei eIF2 α – jako czynnik inicjujący w komórkach transkrypcję genów, których produktami są białka odpowiedzi na stres – odpowiada również pośrednio za rozpoczęcie syntezy białek kluczowych dla autofagii [17]. Zatem HHV-1/HSV-1 wykształcił w toku ewolucji mechanizm, który chroni jego genom przed degradacją. Przypuszczenia te poparto doświadczeniem, w którym dwie linie komórkowe: jedną pozbawioną możliwości syntezy PKR, a drugą niezmodyfikowaną po uprzednim potraktowaniu IFN- α (by zoptymalizować indukcję aktywności PKR w odpowiedzi na ds-DNA wirusa) zakażono mutantem HHV-1/HSV-1 charakteryzującym się brakiem sekwencji odpowiedzialnej za syntezę ICP34.5 lub typem dzikim, po czym jako metodę mierzenia intensywności zachodzenia autofagii zastosowano badanie ilości białek o długim okresie półtrwania [60]. Komórki niezmodyfikowane zakażone typem dzikim HHV-1/HSV-1 charakteryzowały się znacznym spadkiem degradacji białek o długim okresie półtrwania w porównaniu z komórkami zakażonymi wirusem atenuowanym. W komórkach niezdolnych do syntezy PKR zakażonych mutantem wirusa nie obserwowano spadku degradacji białek, podobnie jak w komórkach niezdolnych do syntezy kinazy zakażonych typem dzikim wirusa. Dane te pozwalają stwierdzić, iż obecność ICP34.5 jest niezbędna do zahamowania autofagii i jednocześnie przyczynia się do przetrwania wirusa [33, 34].

Pokswirusy. Do rodziny *Poxviridae* należą dsDNA wirusy zaliczane do największych wirusów o rozmiarach 220–450 nm $\times$ 140–260 nm, w tym między innymi zaklasyfikowane do rodzaju *Orthopoxvirus*: wirus ospy ludzkiej, prawdziwej (*variola virus*, VARV) oraz wirus krowianki (*vaccinia virus*, VACV), które charakteryzują się tym, iż ich cykl replikacyjny przebiega na terenie cytoplazmy. Charakterystyczne dla, między innymi, VACV jest to, iż w trakcie cyklu replikacyjnego występuje w postaci różnych form, jak IV (*immature virion*) otoczony jednoblonową lipoproteinową błoną, której pochodzenie nie jest do dziś wyjaśnione

(postulowane było jej pochodzenie z ER lub produkcja *de novo*). Natomiast w jednej z ostatnich publikacji Zhang i wsp. [72] podkreślają ewentualny udział autofagii w dostarczaniu pierwotnej błony dla formy IV. Wykonano w tym celu szereg doświadczeń, włącznie z delecją kluczowych w przypadku autofagii genów ATG6/Beklina-1, ATG5, co doprowadziło do konkluzji o braku związku omawianego procesu z cyklem replikacyjnym VACV (brano pod uwagę morfologię wirusów w TEM oraz wydajność replikacji wirusa porównując komórki *atg5^{+/+}* i *atg5^{-/-}* oraz *beklina1^{+/+}* i *beklina1^{-/-}*).

Wirusy RNA

Pikornawirusy. Wirus polio (*poliovirus*, PV; rodzina *Picornaviridae*, rodzaj *Enterovirus*; RNA; średnica 22–30 nm) wywołuje chorobę Heinego-Medina (*poliomyelitis*) atakując komórki nerwowe rdzenia kręgowego, w wyniku czego może dochodzić do uszkodzeń neuronów ruchowych, a tym samym do trwałego paraliżu kończyn. Zakażone wirusem komórki wykazują charakterystyczną rearanżację i silne nagromadzenie błon (wśród nich są, między innymi, pęcherzyki zbudowane z podwójnej błony). Co ciekawe, podanie do środowiska zakażonych PV komórek brefeldyny A (zakłóca transport pęcherzyków, na powierzchni których obecne są COPI [*coat proteins*]) skutkuje zahamowaniem replikacji wirusa, a co więcej na powierzchni błon, na których odbywa się replikacja wirusa, zlokalizowane są białka SEC13p i SEC31p należące do rodziny białek COPII [25]. Sugerowałoby to, iż nagromadzone błony pochodzą z pęcherzyków transportujących, a nie z błon retikulum endoplazmatycznego (ER), skąd prawdopodobnie pochodzą błony autofagosomu. Co ciekawe, u drożdży produkty genów *sec12*, *16*, *23* oraz *24* (również należące do rodziny COPII) wymagane są w procesie autofagii [62].

Aby potwierdzić autofagosomalne pochodzenie błon, będących miejscem replikacji wirusa, Jacson i wsp. [25] wykonali badanie kolokalizacji GFP-LC3 i wirusowego białka 3A (lokalizującego się na błonach ER), świecenie GFP-LC3 pokryło się ze świeceniem fluorochromu sprzęgniętego z przeciwciałem skierowanym przeciwko 3A. Ponadto, wykonano doświadczenie, w którym wykorzystano zjawisko wspólnej lokalizacji LC3 i LAMP1, która zachodzi pod wpływem stymulatorów MA, jednak w doświadczeniu tym jako stymulatora użyto PV. Również w tym przypadku stwierdzano wspólną lokalizację obu markerów. Udowodniono zatem, iż błony indukowane obecnością PV mają podłoże autofagosomalne. Zastosowanie indukatorów MA wpływało na liczbę nowopowstałych cząsteczek wirusa, zastosowanie tamoksifenu (w komórkach z receptorem dla estrogenów) zwiększyło czterokrotnie, a rapamycyny trzykrotnie, zawartość cząsteczek PV wewnątrz zakażonych komórek w odniesieniu do kontroli [25]. Z kolei, zastosowanie 3-MA w znaczny sposób zmniejszyło liczbę cząsteczek wirusa w zakażonych komórkach. Ponadto, zastosowanie siRNA przeciwko mRNA dla ATG12 zmniejszyło liczbę nowopowstałych cząsteczek PV trzykrotnie, a zastosowanie interferencji mRNA dla LC3 nawet czterokrotnie. Podczas interferencji białek ATG12 i LC3 zaobserwowano również odpowiednio dziewięciokrotne i dwudziestokrotne zmniejszenie liczby cząsteczek

wirusa uwalnianych do środowiska pozakomórkowego. Ta ostatnia zależność skłania do przypuszczeń, iż MA może się przyczyniać do nielitycznego uwalniania wirusa z zakażonych komórek. Poparciem tej tezy są mikroskopowe obserwacje zakażonych PV komórek permissywnych, które uwidoczniły cząsteczki wirusa (oraz inny materiał cytoplazma-tyczny) wewnątrz indukowanych przez wirus pęcherzyków [32]. Zatem PV jest przykładem czynnika patogenego, który w wyniku procesów przystosowawczych nabył zdolności do indukowania autofagii w celu ułatwienia replikacji. Niemniej precyzyjne mechanizmy opisanych powyżej procesów nie są znane i wymagają dalszych prac badawczych.

Autofagia odgrywa też ważną rolę w molekularnym mechanizmie replikacji innego ważnego przedstawiciela pikornawirusów – wirusa pryszczycy (FMDV, *Foot-and-Mouth Disease Virus*) zaliczanego do rodzaju *Aphthovirus* i występującego w 7 serotypach na terenie Europy, Azji, Afryki i Południowej Ameryki.

Retrowirusy. W przypadku HIV-1 (wirus nabytego zespołu braku odporności typu 1 [*Human immunodeficiency virus type 1*]; rodzina *Retroviridae*; rodzaj *Lentivirus*; ss-RNA; czynnik etiologiczny AIDS; średnica 100–120 nm) zmniejszenie odsetka limfocytów T CD4⁺ związane jest ze wzmożoną apoptozą zakażonych komórek, jak również ze śmiercią niezakażonych limfocytów T CD4⁺ w wyniku tzw. aktywacji niespecyficznej. Zakażenie komórki permissywnej przez HIV-1 to proces, w którym glikoproteina otoczkowa (Env) gp120 i gp141 przyłącza się do receptora CD4 i koreceptorów, z których najważniejszymi są CCR5 i CXCR4 na powierzchni zakażonych komórek [17,18]. Dowiedziono, że zakażone komórki prezentujące na swojej powierzchni Env wiążąc się z CXCR4 (niezależnie od receptorów CD4) na powierzchni komórki niezakażonej wywołuje apoptozę tej drugiej oraz indukcję autofagii cechującej się nagromadzeniem pęcherzyków autofagosomalnych oraz bekliny-1 w komórkach niezakażonych. Równie ważny jest fakt, iż zahamowanie apoptozy jest możliwe w tym przypadku dopiero po zahamowaniu autofagii, co wskazuje na ważną rolę tego procesu w indukcji apoptozy [17,18].

Koronawirusy i togawirusy. Należący do rodziny *Coronaviridae* (ss-RNA; wielkość 120–160 nm) mysi wirus wywołujący zapalenie wątroby MHV (*Murine hepatitis virus*) prawdopodobnie również wykorzystuje proces autofagii w swoim cyklu replikacyjnym, gdyż zaobserwowano kolokalizację LC3 oraz białek odpowiedzialnych za replikację wirusa, ponadto zanotowano znaczny spadek wydajności replikacji (około 1000 razy) w komórkach embrionalnych myszy Atg 5^{-/-} [17]. W należącym do tej samej rodziny, co MHV, koronawirusie wywołującym SARS (*severe acute respiratory syndrome*) nie zaobserwowano jednak podobnego związku autofagii z replikacją wirusa [17].

Rola bekliny-1, którą można utożsamiać również z rolą autofagii, została wykazana w przypadku zakażenia wirusem Sindbis (SINV; ss-RNA; rodzina *Togaviridae*; rodzaj *Alphavirus*; wielkość 70 nm), którego cykl replikacyjny wywołuje apoptozę komórek centralnego układu nerwowego [16]. Do tego celu skonstruowano rekombinowany wirus z ekspresją bekliny-1, którego interakcje z antyapoptotycznym białkiem Bcl-2 hamują apoptozę neuronów mysich, jak również wydajność replikacji

w stosunku do komórek zakażonych wirusem wykazującym ekspresję bekliny-1 bez jej domeny, która wchodzi w interakcję z Bcl-2 [9].

Powyższe doniesienia o roli autofagii w zakażeniach wirusowych, jak i te o kolokalizacji LC3 z rotawirusowym białkiem NSP4 (*nonstructural protein 4*) [13] muszą zostać jednak dokładnie wyjaśnione w związku z ograniczonym stanem wiedzy na ten temat.

4. AUTOFAGIA W ZAKAŻENIACH BAKTERYJNYCH

Autofagia jest procesem, który umożliwia niektórym bakteriom uzyskanie sprzyjającego środowiska wewnątrz zakażonych komórek, a niektóre bakterie mogą unikać mechanizmów molekularnych autofagii drogą ucieczki immunologicznej [47]. Do tej grupy bakterii należą, między innymi: przedstawiciele rodziny *Mycobacteriaceae* (*Mycobacterium tuberculosis*), *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila* i *Coxiella burnetii*.

4.1. Prątki gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*)

W *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [6] prątki gruźlicy umiejscowiono w rodzinie IV *Mycobacteriaceae* i rodzaju I *Mycobacterium*. Pierwotnym środowiskiem bytowania prątków gruźlicy są makrofagi (MØ) pęcherzykowe płuc. Szacuje się, iż około 90% bakterii, które wniknęły do płuc, zostaje unicestwiona, natomiast pozostałe 10% namnaża się w nieaktywnych MØ i stanowi późniejsze źródło zakażenia. Prątki zyskują dostęp do MØ przez m.in. receptory dopełniacza: CR1, CR3, CR4, receptor mannozowy i receptory integrynowe. Fagocytozę *M. tuberculosis* ponadto ułatwiają kolektyny, takie jak: MBL, białko A surfaktantu płuc i składnik dopełniacza C1q [57].

W nieaktywnych MØ dochodzi do zahamowania przez prątki dojrzewania fagosomu (endosomu) i jego połączenia z lizosomem. Zahamowanie dojrzewania pęcherzyka zachodzi dzięki wytwarzaniu przez prątki lipidu, podobnego do fosfatydyloinozytoli gospodarza – EEA1, który wchodzi w interakcje z odpowiedzialnymi za dojrzewanie endosomu małymi GTPazami Rab. Na zajętych przez *Mycobacterium* endosomach brak Rab5 obecnego na wczesnych endosomach. Ponadto, EEA1 wraz z Hrs (innym lipidem podobnym do fosfatydyloinozytoli gospodarza) konkurują wraz z 3-fosfatydyloinozytolem o centrum aktywne jego fosfatazy. EEA1 i Hrs rozpoznają i łączą się z enzymem dzięki swoim domenom FYVE. Zablockowanie właściwej aktywności fosfatazy prowadzi do zablockowania transportu z AG do lizosomu podjednostki V0H⁺-ATPazy, który zależny jest od tej aktywności. W ten sposób dochodzi do ustalenia przez prątki pH endosomu na poziomie 6,3, co z kolei jest optymalną dla nich wartością *in vivo* [68].

Badania Gutierrez i wsp. [22] wykazały, iż indukcja autofagii wywołana niedoborem składników odżywczych w medium hodowlanym powoduje wzrost ekspresji LC3 o ok.

30% na powierzchni zajętych fagosomów, a ponadto ich stopniowe zakwaszenie. Przeżywalność prątków w „głodzonych” komórkach jest znacznie niższa, a indukcja autofagii sposobem farmakologicznym wywołuje podobne efekty. Lokalizacja na powierzchni fagosomu białek charakterystycznych dla MA powoduje, iż staje się on suborganellum przejściowym, które można umieścić między autofagosomem a endosomem. Obecność markerów MA na powierzchni zaanektowanego przez prątki fagosomu przełamuje blokadę jego dojrzewania, co w konsekwencji prowadzi do połączenia z lizosomem i strawienia patogenów. Użycie IFN- γ w stosunku do zakażonych MØ wywoływało podobny efekt, a nawet silniejszy od tego, jaki wynikał z głodzenia i wpływu induktorów MA, co świadczy, iż MA może być mechanizmem immunologicznym odpowiedzialnym za hamowanie rozwoju *Mycobacterium* [22].

4.2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes jest zaliczane w *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [6] do rodziny IV *Listeriaceae* i rodzaju I *Listeria*. Komórkami, dzięki którym *Listeria monocytogenes* zyskuje dostęp do środowiska wewnątrzkomórkowego są komórki M umiejscowione między komórkami nabłonkowymi jelita. Po sfagocytowaniu m.in. przez MØ *Listeria* dzięki produkcji toksyny (listeriolizyny O) wydostaje się z fagosomu do cytosolu, tam zyskuje dostęp do bogatego w substancje odżywcze środowiska i ulega szybkim podziałom. *Listeria* jest zdolna do aktywnego przemieszczania się wewnątrz i pomiędzy komórkami dzięki polimeryzacji aktyny rozproszonej w cytoplazmie komórek gospodarza, co czyni z niej bardzo dynamicznego i groźnego dla organizmu patogena [53].

Obserwacje dokonane po zablokowaniu metabolizmu komórek bakteryjnych (niezdolnych do aktywnego ruchu) znajdujących się już na terenie cytoplazmy, uwiarygodniły gromadzenie się wokół bakterii podwójnie błoniastych pęcherzyków. Po 21 godzinach od podania chloramfenikolu do środowiska zakażonych komórek, 90% bakterii znalazło się ponownie w pęcherzykach mających znamiona połączenia z lizosomem. Analiza w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM) materiału pobieranego w równych odstępach czasu uwiarygodniła stopniowe gromadzenie się wpuklających wokół bakterii błon. Zastosowanie 3-MA spowodowało znaczny spadek ponownej lokalizacji bakterii w pęcherzykach. Usunięcie czynników wzrostu (wraz z surowicą) ze środowiska zakażonych hodowli komórkowych wzmacniało proces usuwania bakterii z terenu cytoplazmy w opisany powyżej sposób. Obserwacje te jednoznacznie potwierdzają, iż *Listeria*, po zablokowaniu szlaków metabolicznych, może być substratem dla degradacji autofagosomalnej [53].

4.3. *Legionella pneumophila*

Według *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [6] *Legionella pneumophila* należy do rzędu VI *Legionellales*, rodziny I *Legionellaceae* i rodzaju I *Legionella*. Szacuje się, iż *Legionella pneumophila* jest przyczyną około 16% pozaszpitalnych przypadków zapalenia płuc i nawet 50% wewnątrzszpitalnych. Głównym ogniskiem zapalnym, podobnie jak w przypadku *M. tuberculosis*, są zakażone, nieaktywne

MØ. *Legionella* jest w stanie zablokować dojrzewanie fagosomu i jego połączenie z lizosomem w drodze sekrecji toksyn typu IV. Toksyny wydzielane przez tego patogena zmieniają gęstość błony zajętego fagosomu, a następnie z lizosomem łączą się pęcherzyki pochodzące z ER i tak zbudowany pęcherzyk nosi nazwę fagosomu replikacyjnego. Po 15 godzinach (czas potrzebny na zmianę aktywności metabolizmu) dochodzi do połączenia fagosomu replikacyjnego z lizosomem i komórki bakteryjne wchodzą w fazę logarytmicznego wzrostu [52, 1].

Badania przeprowadzone przez Amer i Swanson [2] wykazały, iż natychmiast po internalizacji 50% bakterii osiadało w pęcherzykach, wokół których gromadziło się ATG7 (jeden z czynników niezbędnych do zainicjowania powstawania autofagosomu). Co ciekawe, białko to gromadziło się wokół fagosomów niosących tylko patogenne szczepy *L. pneumophila*. Podobne wyniki uzyskano badając lokalizację ATG8 (MAP1-LC3). Wykazano ponadto, iż proces aktywacji autofagii jest niezależny od fagocytozy komórek bakteryjnych. Aktywacja autofagii zachodziła również po podaniu supernatantu z hodowli bakteryjnej (zjawisk tych nie wykazano po podaniu świeżej, sterylnej pożywki lub supernatantu z hodowli szczepów niepatogennych). Obserwacje te doprowadziły do odkrycia kompleksu złożonego z 9 białek o masie między 10 kD a 30 kD, które są odpowiedzialne za indukcję autofagii w zakażonych komórkach (kompleks ten jest prawdopodobnie wydzielany za pomocą sekrecji toksyn typu IV). Autofagia w przypadku *Legionella* zdaje się być procesem sprzyjającym zakażeniu. Dalsze badania na hodowlach mysich MØ doprowadziły do odkrycia przyczyny permissywności niektórych linii mysich komórek. Myszy podatne na zakażenie *L. pneumophila* mają mutację w genie kodującym białko Naip5. Białko to znane jest ze swojej roli hamującej apoptozę w neuronach, należy do dużej rodziny inhibitorów kaspaz mających domeny BIR, NOD i LRR. Domena BIR odpowiada za przyłączenie kaspaz 3 i 7, a tym samym za zahamowanie ich aktywności. Prawdopodobnie zahamowanie aktywności kaspazy 3 przyspiesza dojrzewanie autofagosomu. Zauważono, że od stężenia aktywnej kaspazy 3 zależy nie tylko aktywacja autofagii (przy niskiej aktywności), ale również aktywacja mechanizmu apoptozy (przy wysokiej aktywności). Zatem rola Naip5 może być decydująca dla strategii walki z patogenem, a mutacja w genie go kodującym może decydować o losie zakażonego organizmu [2].

4.4. *Coxiella burnetii*

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [6] umieszcza *Coxiella burnetii* w rzędzie VI *Legionellales*, rodzinie II *Coxiellaceae*, rodzaju I *Coxiella*. Badania nad rozwojem i patogennością *Coxiella burnetii* pozwoliły wyróżnić dwie, odmienne pod względem metabolizmu postacie tej bakterii, to jest: (i) SCV (*Small Cell Variant*) oraz (ii) LCV (*Large Cell Variant*). SCV jest pałeczką o wymiarach 0,2–0,5 µm, zawierającą elektronogęstą chromatynę, złożony system wewnętrznych błon, jej metabolizm jest silnie zahamowany, rzadko się dzieli i jest odporna na warunki środowiskowe. LCV ma długość 1 µm i nie odbiega wyglądem od innych Gram (–) pałeczek, jest aktywna metabolicznie, często się dzieli, jednak jest dużo mniej odporna na warunki środowis-

kowe [9]. Obie postacie są zdolne do zakażenia komórek permissywnych, jednak zakażenia mało odpornym na mechanizmy efektorowe organizmu LCV stanowią mały procent ogólnej liczby zakażeń wywoływanych przez *C. burnetii*. Po sfagocytowaniu patogenu wokół fagosomu gromadzą się liczne błoniaste struktury, które po połączeniu z fagosomem tworzą pęcherzyk na kształt tego, jaki indukuje w komórkach *L. pneumophila*. We wnętrzu zajętego pęcherzyka SCV zmienia charakter metabolizmu i różnicuje się w LCV. Uformowany wokół patogenu pęcherzyk zawiera markery autofagii, w tym, między innymi, LC3. Badania Gutierrez i Colombo [21] wykazały, iż indukcja autofagii w zakażonych komórkach sprzyja rozprzestrzenianiu zakażenia (komórki z nadekspresją LC3 i Rab24 sprzyjały szybkiemu rozwojowi patogenu i rozprzestrzenieniu zakażenia) [21]. W hodowli komórkowej z ograniczonym dostępem do substancji odżywczych (gdzie autofagia zachodzi na znacznie wyższym poziomie) liczba komórek bakteryjnych była znacznie większa, a dominującą formą bakterii była forma LCV (było jej więcej o 50–70% niż w komórkach kontrolnych). Zasugerowano zatem, iż łączące się z zajęтым fagosomem autofagosomy mogłyby dostarczać substancji odżywczych produkowanych na terenie cytoplazmy lub nieznanymi czynnikami indukującymi przejście z formy SCV na LCV. Szczegółowy mechanizm tego zjawiska jest jednak mało znany i wymaga dalszych badań. Prawdopodobnie *C. burnetii*, również poprzez sekrecję nieznanymi dotąd czynników, jest w stanie indukować mechanizmy MA, które jej sprzyjają [21].

5. PODSUMOWANIE

Nasza wiedza na temat roli autofagii w przebiegu zakażeń wirusowych i bakteryjnych jest stosunkowo niewielka ze względu na, między innymi, brak sprawdzonych technik badawczych używanych do poznania tego procesu, a co za tym idzie również udziału autofagii w interakcjach z mikroorganizmami, dlatego też w tytule niniejszej pracy zasygnalizowano odniesienie się do mechanizmów warunkujących ten proces w kontekście molekularnej gry o wielu niewiadomych, co obrazuje, w pewnym stopniu, porównanie do molekularnej ruletki. Z jednej strony mamy bowiem do czynienia z działaniem cytoprotekcyjnym czy wręcz zaangażowaniem autofagii w mechanizmy efektorowe odpowiedzi immunologicznej (najprawdopodobniej ma to miejsce, na przykład, w przypadku zakażenia prątkami gruźlicy), a z drugiej strony autofagia niejednokrotnie umożliwia przeżycie patogenów (np. *Coxiella burnetii*) wewnątrz zakażonych komórek stanowiąc jeden z przykładów wyrafinowanych mechanizmów ucieczki immunologicznej czynników zakaźnych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AMER A, FRANCHI L, KANNEGANTI TD, BODY-MALAPEL M, OZOREN N, BRADY G, MESHINCHI S, JAGIRDAR R, GEWIRTZ A, AKIRA S, NUNEZ G. Regulation of *Legionella* phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J Biol Chem* 2006; **281**: 35217–35223.
- [2] AMER AO, SWANSON MS. Autophagy is an immediate macrophage response to *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* 2005; **7** (6): 765–778.
- [3] BERKOVA Z, CRAWFORD SE, TRUGNAN G, YOSHIMORI T, MORRIS AP, ESTES MK. Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasm. *J Virol* 2006; **80**: 6061–6071.
- [4] BLOMMAART EF, LUIKEN JJ, BLOMMAART PJ, van WOERKOM GM, MEIJER AJ. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1995; **270**(5): 2320–2326.
- [5] BOYA P, GONZÁLEZ-POLO RA, CASARES N, PERFETTINI JL, DESSEN P, LAROCLETTE N, MÉTIVIER D, MELEY D, SOUQUERE S, YOSHIMORI T, PIERRON G, CODOGNO P, KROEMER G. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* 2005; **25**:1025–1040.
- [6] BRENNER DJ, KRIEG NR, STALEY JT. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed., Editor-in-Chief: George M. Garrity. Springer. New York, Berlin, Heidelberg, Barcelona, Hong Kong, London, Milan, Paris, Singapore, Tokyo.
- [7] CASTEDO M, FERRI KF, KROEMER G. Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic. *Cell Death Differ* 2002; **9**: 99–100.
- [8] CODOGNO P, MEIJER AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 2005; **12**: 1509–1518.
- [9] COLOMBO MI, GUTIERREZ MG, ROMANO PS. The Two Faces of Autophagy *Coxiella* and *Mycobacterium*. *Autophagy* 2006; **2**: 162–164.
- [10] COLOMBO MI. Pathogens and autophagy: subverting to survive. *Cell Death Differ* 2005; **2**:1481–1483.
- [11] CUERVO AM. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol* 2004; **14**:70–77.
- [12] DERETIC V, SINGH S, MASTER S, HARRIS J, ROBERTS E, KYEI G, DAVIS A, DE HARO S, NAYLOR J, LEE HH, VERGNE I. *Mycobacterium tuberculosis* inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell Microbiol* 2006; **8**:719–727.
- [13] DERETIC V. Autophagy in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2005; **26**:523–528.
- [14] DORN BR, DUNN WA JR, PROGULSKE-FOX A. Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol* 2002; **4**:1–10.
- [15] DUBOULOZ F, DELOCHE O, WANKE V, CAMERONI E, DE VIRGILIO C. The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Mol Cell* 2005; **19**: 15–26.
- [16] ESKELINEN EL. Doctor Jekyll and Mister Hyde: autophagy can promote both cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 2005; **12**:1468–1472.
- [17] ESPERT L, CODOGNO P, BIARD-PIECHACZYK M. Involvement of autophagy in viral infections: antiviral function and subversion by viruses. *J Mol Med* 2007, [Epub ahead of print]
- [18] ESPERT L, DENIZOT M, GRIMALDI M, ROBERT-HEBMANN V, GAY B, VARBANOV M, CODOGNO P, BIARD-PIECHACZYK M. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest* 2006; **116**: 2161–2172.
- [19] FENG Z, ZHANG H, LEVINE AJ, JIN S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 8204–8209.
- [20] GOZUACIK D, KIMCHI A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004; **23**: 2891–2906.
- [21] GUTIERREZ MG, COLOMBO MI. Autophagosomes: A fast-food joint for unexpected guests. *Autophagy* 2005; **1**:179–181.
- [22] GUTIERREZ MG, MASTER SS, SINGH SB, TAYLOR GA, COLOMBO MI, DERETIC V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 2004; **119**: 753–766.
- [23] HEJNOWICZ Z. Anatomia i histogeneza roślin naczyniowych. Organy wegetatywne. Wydawn. Nauk. PWN 2002.
- [24] http://www.wsse.krakow.pl/pages/wsse_document.php?nid=505&did=1313.

- [25] JACKSON WT, GIDDINGS TH, TAYLOR MP, MULINYAWE S, RABINOVITCH M, KOPITO RR, KIRKEGAARD K. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PloS Biol* 2005; **3**: 861–871.
- [26] KADOWAKI M, KARIM R, CARPI A. Nutrient control of macroautophagy in mammalian cells. *Mol Aspects Med* 2006; **27**: 426–443.
- [27] KAUSHIK S, CUERVO AM. Autophagy as a cell-repair mechanism: Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2006; **27**: 444–454.
- [28] KIFFIN R, CHRISTIAN C, KNECHT E, CUERVO AM. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 4829–4840.
- [29] KLIONSKY DJ, EMR SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000; **290**: 1717–1721.
- [30] KLIONSKY DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* 2005; **118**: 7–18.
- [31] LEE HK, LUND JM, RAMANATHAN B, MIZUSHIMA N, IWASAKI A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* 2007; **315**: 1398–1401.
- [32] LEVINE B, KLIONSKY DJ. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; **6**: 463–477.
- [33] LEVINE B, YUAN J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 2005; **115**: 2679–2688 {9}.
- [34] LOCKSHIN RA, ZAKERI Z. Apoptosis autophagy, and more. *IJBCB* 2004; **36**: 2405–2419.
- [35] LOCKSHIN RA, ZAKERI Z. Caspase-independent cell death? *Oncogene* 2004; **23**: 2766–2773.
- [36] LORENZO HK, SUSIN SA. Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death. *FEBS Lett* 2004; **557**: 14–20.
- [37] LUM JJ, BAUER DE, KONG M, HARRIS MH, LI C, LINDSTEN T, THOMPSON CB. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 2005; **120**: 237–248.
- [38] MAJESKI AE, DICE JF. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 2435–2444.
- [39] MEIJER AJ, CODOGNO P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 2445–2462.
- [40] MIZUSHIMA N, OHSUMI Y, YOSHIMORI T. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 2002; **27**: 421–429 .
- [41] MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, OHSUMI Y. Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; **35**: 553–561.
- [42] MUNAFO DB, COLOMBO MI. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J Cell Sci* 2001; **114**: 3619–3629.
- [43] MÜNZ C. Autophagy and antigen presentation. *Cell Microbiol* 2006; **8**: 891–898.
- [44] MÜNZ C. Viral evasion of autophagy. Preview. *Cell Host Microb* 2007; **1**: 9–11.
- [45] NAIR U, KLIONSKY DJ. Molecular mechanisms and regulation of specific and nonspecific autophagy pathways in yeast. *J Biol Chem* 2005; **280**: 41785–41788 {12}.
- [46] NAKASHIMA A, TANAKA N, TAMAI K, KYUUMA M, ISHIKAWA Y, SATO H, YOSHIMORI T, SAITO S, SUGAMURA K. Survival of parvovirus B19-infected cells by cellular autophagy. *Virology* 2006; **349**: 254–263.
- [47] OGAWA M, YOSHIMORI T, SUZUKI T, SAGARA H, MIZUSHIMA N, SASAKAWA C. Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science* 2005; **307**: 727–731.
- [48] OGIER-DENIS E, CODOGNO P. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003; **2**: 113–128.
- [49] ORVEDAHL A, ALEXANDER D, TALLÓCZY Z, SUN Q, WEI Y, ZHANG W, BURNS D, LEIB DA, LEVINE B. HSV-1 ICP34.5 Confers Neurovirulence by Targeting the Beclin 1 Autophagy Protein. *Cell Host Microb* 2007; **1**:
- [50] PETIOT A, PATTINGRE S, ARICO S, MELEY D, CODOGNO P. Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 2002; **27**: 431–441.
- [51] PIACENTINI M, EVANGELISTI C, MASTROBERARDINO PG, NARDACCI R, KROEMER G. Does prothymosin- α act as molecular switch between apoptosis and autophagy? *Cell Death Differ* 2003; **10**: 937–939.
- [52] PŁUSA T. Legionellozowe zapalenie płuc. *Nowa Klinika Pulmonologia* 1999; **3**: 347–349.

- [53] RICH KA, WEBSTER P. Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cell Microbiol* 2003; **5** (7): 455–468.
- [54] RODRIGUEZ-ENRIQUEZ S, HE L, LEMASTERS JJ. Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 2463–2472.
- [55] ROSZEK K, GNIOT-SZULŻYCKA J. Budowa i funkcje białek błony lizosomalnej. 2003; **2–3**: 173–184.
- [56] RUBINSZTEIN DC, DIFIGLIA M, HEINTZ N, NIXON RA, QIN ZH, RAVIKUMAR B, STEFANIS L, TOLKOVSKY A. Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy* 2005 **1**: 11–22.
- [57] RUDNICKA W. Molekularne mechanizmy odporności na gruźlicę. *Post Mikrobiol* 2004; **43**, 1: 107–127.
- [58] SCHMID D, DENGJEL J, SCHOOR O, STEVANOVIC S, MÜNZ C. Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. *J Mol Med* 2006; **84**: 194–202.
- [59] SCHMID D, MÜNZ C. Immune surveillance of intracellular pathogens via autophagy. *Cell Death Differ* 2005; **2**: 1519–1527.
- [60] SHINTANI T, KLIONSKY DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 2004; **306**: 990–995.
- [61] SINGH SB, DAVIS AS, TAYLOR GA, DERETIC V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 2006; **313**: 1438–1441.
- [62] SUHY DA, GIDDINGS TJ, KIRKEGAARD K. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J Virol* 2000, **74**: 8953–8965.
- [63] TALLÓCZY Z. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 α kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**: 190–195.
- [64] TANIDA I, NISHITANI T, NEMOTO T, UENO T, KOMINAMI E. MAMMALIAN Apg12p, but not the Apg12p.Apg5p conjugate, facilitates LC3 processing. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **296**: 1164–1170.
- [65] TANIDA I, UENO T, KOMINAMI E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 2503–2518.
- [66] TOLKOVSKY AM, XUE L, FLETCHER GC, BORUTAITE V. Mitochondrial disappearance from cells: a clue to the role of autophagy in programmed cell death and disease? *Biochimie* 2002; **84**: 233–240.
- [67] TSUJIMOTO Y, SHIMIZU S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ* 2005; **12**: 1528–1534.
- [68] VERGNE I, SINGH S, ROBERTS E, KYEIG, MASTER S, HARRIS J, DE HARO S, NAYLOR J, DAVIS A, DELGADO M, DERETIC V. Autophagy in Immune Defense Against *Mycobacterium tuberculosis*. *Autophagy* 2006; **2**: 175–178.
- [69] WILEMAN T. Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication. *Science* 2006; **312**: 875–878.
- [70] YORIMITSU T, KLIONSKY DJ. Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 1593–1605.
- [71] YORIMITSU T, KLIONSKY DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 2005; **2**: 1542–1552.
- [72] ZHANG H, MONKEN CE, ZHANG Y, LENARD J, MIZUSHIMA N, LATTIME EC, JIN S. Cellular autophagy machinery is not required for vaccinia virus replication and maturation. *Autophagy* 2006; **2**: 91–95.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 07.04. 2008 r.

Przyjęto: 30.08. 2008 r.

Prof. M. G. Niemiałtowski SGGW

ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

e-mail: knp@sggw.pl