

The Expression of Innate Immunity Responsible Genes in Human Macrophages Encountering *Mycobacterium Tuberculosis*

Farhang Babamahmoodi¹,
Hadiseh Saberi²,
Farzaneh Rabiaei²,
Hossein Jalali³,
Mohammad Reza Mahdavi⁴

¹ Professor, Antimicrobial Resistance Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² MSc in Genetics, Sinaye Mehr Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Thalassemia Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Associate Professor, Thalassemia Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received June 28, 2022; Accepted October 23, 2024)

Abstract

Background and purpose: Macrophages are the primary cells that encounter this pathogen, and *Mycobacterium tuberculosis* (MT) has developed several strategies to survive within the macrophage cytoplasm. One of the primary cellular targets of *Mycobacterium* species are macrophages. These bacteria employ various strategies to survive and proliferate within phagosomes, including inhibiting phagosome acidification and preventing phagosome-lysosome fusion. On the other hand, the significance of macrophage polarization and plasticity in response to infectious agents is well-established, particularly in distinguishing between M1 and M2 macrophages. The DUSP14 gene regulates the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway, while RAP2A is a member of the GTPase family. Considering the roles of the DUSP14 and RAP2A genes in innate immunity, the aim of this study is to investigate the expression of these genes in macrophages from healthy individuals infected with PB8, H37Rv, and MTBRiIs strains. This analysis seeks to provide a more comprehensive understanding of the mechanisms underlying innate immune function.

Materials and methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 40 cc of peripheral blood drawn from five healthy individuals with negative PPD test results, using Ficoll density gradient centrifugation. The extracted cells were counted using a cell counter and cultured in StemSpan medium supplemented with 2 ml of lipid cholesterol and 5 ml of Pen/Strep (10x) per 500 ml of culture medium. After nine days, the cells were infected with two MT strains: H37Rv, MTBRiIs, and PB8. Total RNA was extracted from the infected cells 8, 18, and 48 hours post-infection. cDNA synthesis was performed, and real-time PCR was conducted using Takara master mix to analyze RAP2A and DUSP14 gene expression. The relative fold changes in gene expression were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, with statistical analyses performed using GraphPad Prism version 8 and SPSS version 20.

Results: The results showed that 4 hours after infection with the H37Rv strain, the expression of the RAP2A gene was higher than in groups infected with the other two strains, although the differences were not statistically significant. Additionally, while DUSP14 expression was not significantly increased 4 hours after infection with any of the three strains, its expression was higher in cultures infected with the PB8 strain. After 48 hours of MT infection, RAP2A gene expression decreased in macrophages infected with the H37Rv and MTBRiIs strains compared to the control and PB8-infected cells. Similarly, DUSP14 gene expression was significantly decreased in cells infected with the H37Rv and MTBRiIs strains compared to PB8-infected cells and controls.

Conclusion: The observed decrease in RAP2A gene expression in macrophages infected with the H37Rv and MTBRiIs strains is associated with reduced GTPase activity, suggesting that these strains may disrupt phagosome function, potentially shifting responses towards M2 macrophage polarization. Further studies investigating the role of RAP2A and DUSP14 gene polymorphisms in MT survival are recommended.

Keywords: mycobacterium tuberculosis, gene expression, innate immunity, RAP2A gene, DUSP14 gene

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (238): 58-65 (Persian).

Corresponding Author: Mohammad Reza Mahdavi - Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran. (E-mail: Mahdavi899@gmail.com)

بررسی بیان ژن‌های دخیل در ایمنی ذاتی در سلول‌های ماکروفاژ انسانی در مواجهه با باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

فرهنگ بابامحمودی^۱

حدیثه صابری^۲

فرزانه ربیعی^۲

حسین جلالی^۳

محمد رضا مهدوی^۴

چکیده

سابقه و هدف: یکی از اهداف سلولی اولیه مایکوباکتریوم‌ها، ماکروفاژها هستند که باکتری استراتژی‌های مختلفی برای زنده ماندن و تکثیر در داخل فاگوزوم‌ها از جمله مانند ممانعت از اسیدیفیکاسیون فاگوزوم و ممانعت از ادغام فاگوزومی دارند. از طرفی اهمیت polarization و plasticity ماکروفاژها در مواجهه با عوامل عفونی، بین ماکروفاژهای M1 و M2 کاملاً شناخته شده است. با توجه به نقش دو ژن *DUSP14* و *RAP2A* در فرایندهای ایمنی ذاتی، هدف از این مطالعه بررسی بیان این ژن‌ها در ماکروفاژهای افراد سالم آلوده شده با سویه‌های PB8، H37Rv و MTBRiIs است تا بتوان درک جامع‌تری از چگونگی عملکرد ایمنی ذاتی به دست آید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، پنج فرد سالم که نتیجه تست PPD آن‌ها منفی بوده است و سابقه ابتلا به بیماری سل را نداشتند انتخاب شدند. سپس PBMC ها با استفاده از گرادینت فایکول جدا شده و با دستگاه Cell Counter تعداد سلول‌های موجود در رسوب شمارش گردید در ساخت محیط کشت به ازای ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط stem span، ۲ میلی‌لیتر لپید کلسترول و ۵ میلی‌لیتر Pen/Strep (10x) به محیط اضافه شد و پس از ۹ روز در محیط کشت غنی شده، تمایز و در نهایت بیان ژن‌های *DUSP14* و *RAP2A* پس از مواجهه با سه سویه H37Rv، PB8 و MTBRiIs طی ۴، ۱۸ و ۴۸ ساعت پس از آلوده کردن سلول‌ها در محیط کشت، با روش ریل تایم بررسی گردید. بدین صورت که در ابتدا mRNA از محیط استخراج شد و از روی آن cDNA ساخته شد و PCR با مستر میکس Takara صورت پذیرفت. جهت اندازه‌گیری میزان نسبی بیان تک تک ژن‌ها از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد. به همین منظور میزان بیان هر ژن در مقایسه با ژن رفرنس برای هر بیمار در سه مرحله بررسی شد. جهت بررسی آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و GraphPad Prism نسخه ۸ استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ۴ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با سویه H37Rv بیان ژن *RAP2A* نسبت به دو سویه دیگر بیان بیش‌تری داشته است، اگر چه افزایش بیان معنی‌دار نیست. هم‌چنین بیان ژن *DUSP14* در ۴ ساعت پس از آلوده شدن با همه سویه‌ها اگرچه افزایش معنی‌داری پیدا نکرد؛ اما در سویه PB8 افزایش بیان بیش‌تری نسبت به سویه‌های دیگر داشت. در این مطالعه نشان داده شد که بیان ژن *RAP2A* پس از گذشت ۴۸ ساعت از آلودگی ماکروفاژها، سویه‌های H37Rv و MTBRiIs نسبت به PB8 و گروه کنترل کاهش نشان داد. بیان ژن *DUSP14* نیز در همه زمان‌ها در گروه H37Rv و MTBRiIs نسبت به PB8 و گروه کنترل کاهش معنی‌داری دیده شد. **استنتاج:** کاهش بیان ژن *RAP2A* در دو سویه مایکوباکتریوم H37Rv و MTBRiIs نشان می‌دهد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با کاهش فعالیت GTPase، سعی در اختلال در روند فاگوزوم و شیف‌ت پاسخ‌ها به سمت ماکروفاژهای M2 دارد. مطالعات آتی بر روی نقش پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های *RAP2A* و *DUSP14* توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، بیان ژن، ایمنی ذاتی، ژن *RAP2A*، ژن *DUSP14*

E-mail: Mahdavi899@gmail.com

مؤلف مسئول: محمد رضا مهدوی - ساری: مرکز تحقیقات تالاسمی

۱. استاد، مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی، پژوهشکده بیماری‌های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه پژوهشی سینا مهر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. استادیار، مرکز تحقیقات تالاسمی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. دانشیار، مرکز تحقیقات تالاسمی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۱/۷/۱۰ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۸/۲

مقدمه

سل ریوی (Pulmonary TB) ناشی از عفونت با میکوباکتریوم درون سلولی می‌باشد که تظاهرات عفونت به میزان واکنش سیستم دفاعی میزبان بستگی دارد (۱-۳). ماکروفاژها یکی از عوامل سیستم ایمنی ذاتی هستند که در پاتوژن MTB نقش مهمی بر عهده دارند. آن‌ها یکی از اهداف سلولی اولیه میکوباکتریوم‌ها هستند که استراتژی‌های مختلفی برای زنده ماندن و تکثیر در داخل فاگوزوم‌ها از جمله مانند ممانعت از اسیدیفیکاسیون فاگوزوم و ممانعت از ادغام فاگوزومی دارند (۴). ماکروفاژهای M2، گروهی از ماکروفاژها هستند در پاسخ به IL-4 و IL-13 از مسیر سیگنالینگ STAT6 تحریک و فعال می‌شوند و فنوتیپ ضد التهابی دارند که باعث تحریک remodeling و ترمیم بافتی می‌شوند (۵). علاوه بر این فاگوزوم‌ها نقش مهمی در تعیین نتیجه عفونت با سازماندهی گرانولوم‌ها و کشتن باسیل‌ها با فعال‌سازی IFN- γ (ایترفرون گاما) دارند (۶-۸). تحقیقات صورت گرفته نشان می‌دهد که ژن *DUSP14* یکی از ژن‌های دخیل در تعیین سرنوشت سل ریوی است که مسیر آبشار The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) را کنترل می‌کنند (۹). *RAP2A* ژن دیگری است که عضوی از خانواده GTPase بوده که در فرآیند کشته شدن باکتری‌های فاگوسیتوز شده در فاگوزوم، طی بلوغ فاگوزوم دخیل می‌باشند (۱۰).

میکوباکتریوم قادر است درون ماکروفاژها با توجه به واکنش‌های پیچیده بین فاکتورهای ترشح شده توسط باکتری و فاکتورهای ایمنی میزبان زنده بماند. در این بین، ژن *RAP2A* یکی از ژن‌های مهم دخیل در ایمنی ذاتی محسوب می‌شود و گزارش شده است که بیان این ژن پس از مواجهه با باکتری میکوباکتریوم توبرکلوزیس افزایش پیدا می‌کند و ژن *DUSP14* یکی دیگر از ژن‌های مسیر سیگنالینگ MAPK می‌باشد (۳). این ژن نیز یک کنترل کننده و تنظیم کننده ایمنی ذاتی محسوب می‌شود و در مواجهه با عفونت‌ها بیان آن می‌تواند تغییر کند (۱۱). هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن‌های *DUSP14* و *RAP2A* دخیل

در ایمنی ذاتی در ماکروفاژهای افراد سالم است که در محیط کشت با سویه‌های متفاوت میکوباکتریوم که در بازه زمانی متفاوت آلوده شده‌اند، می‌باشد تا درک جامع‌تری از چگونگی عملکرد ایمنی ذاتی در مقابله با سل به دست آید.

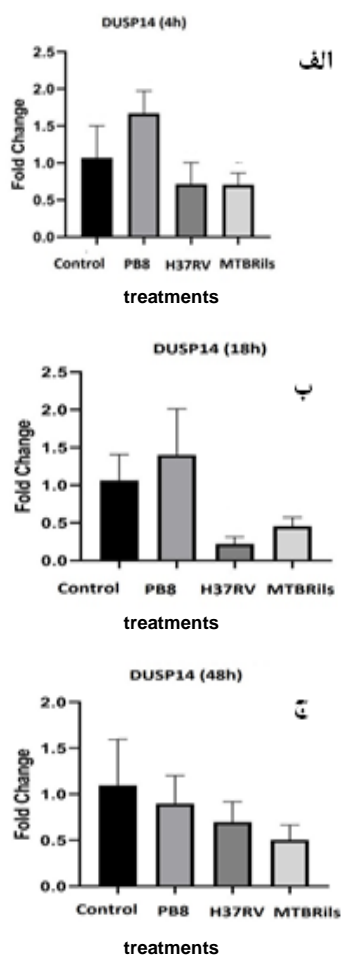
مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی، در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد IR.MAZUMS.REC.1395.2720 تصویب شده است. در ابتدا PBMC‌ها در ۵ فرد سالم که نتیجه تست PPD آن‌ها منفی بوده است با استفاده از گرادیان‌ت فایکول جدا شدند و در محیط Stem span کشت داده شدند. در روز ۹-۷ ماکروفاژهای چسبیده به کف فلاسک جدا گردید و با دستگاه فلوسایتومتری و آنتی‌بادی CD14-FITC anti-human mouse و PE anti-human mouse CD11b وجود ماکروفاژها تایید شد و با دستگاه Cell Counter تعداد ماکروفاژها نیز اندازه‌گیری شد. سپس به آن‌ها 10 DOI از سویه‌های مورد نظر باکتری PB8 (نوعی پروبیوتیک)، H37Rv (سویه آزمایشگاهی میکوباکتریوم توبرکلوزیس) و MTBRils (سویه حاوی میکوباکتریوم به صورت کمپلکس) اضافه گردید. قبل از آلوده کردن ماکروفاژها، سلول‌ها به ۱۳ ویال کوچک تقسیم و یک ویال بدون هیچ سوش باکتری به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. RNAها به ترتیب ۴، ۱۸ و ۴۸ ساعت بعد از اضافه کردن سوش باکتری می‌باشد جدا شدند. جهت انجام استخراج RNA ژنومی از کیت تجاری Favor Gene (ساخت کشور تایوان) و جهت ساخت cDNA از کیت cDNA سازی شرکت، Thermo Scientific استفاده گردید. به منظور بررسی بیان ژن‌ها از مسترمیکس حاوی سایر گرین ساخت شرکت Takara (ژاپن) و با استفاده از پرایمرهای تخصصی برای انجام واکنش PCR استفاده شد. از ژن *GAPDH* به عنوان ژن رفرانس استفاده شد. جهت اندازه‌گیری میزان نسبی بیان تک تک ژن‌ها از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد. جهت بررسی آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و GraphPad Prism نسخه ۸ استفاده شد.

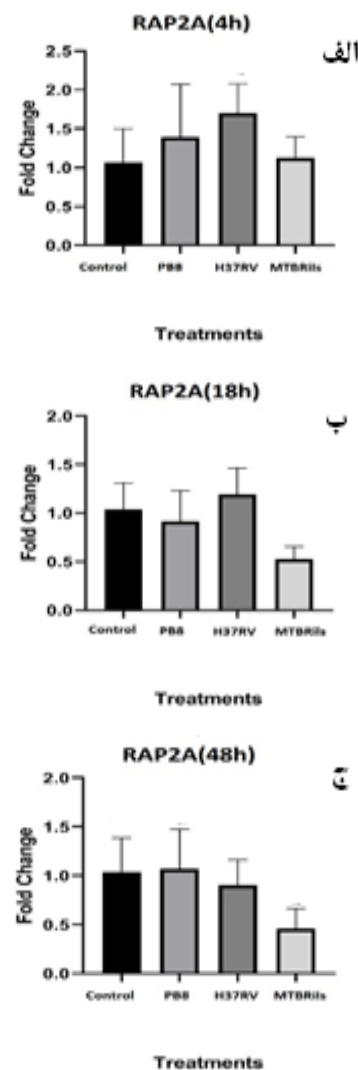
یافته‌ها و بحث

نتایج نشان داد که ۴ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با سویه H37Rv بیان ژن *RAP2A* نسبت به دو سویه دیگر بیان بیش‌تری داشته است، اگرچه افزایش بیان معنی‌دار نیست. هم‌چنین بیان ژن *RAP2A* بعد از ۱۸ ساعت در همه‌ی سویه‌ها تغییر معنی‌داری پیدا نکرد. پس از گذشت ۴۸ ساعت بیان ژن *RAP2A* در همه‌ی سویه‌ها تغییر معنی‌داری نداشت. اگرچه بیان ژن *RAP2A* در محیط کشت آلوده شده با *MTBRiIs* کاهش بیش‌تری داشته است (تصویر شماره ۱).

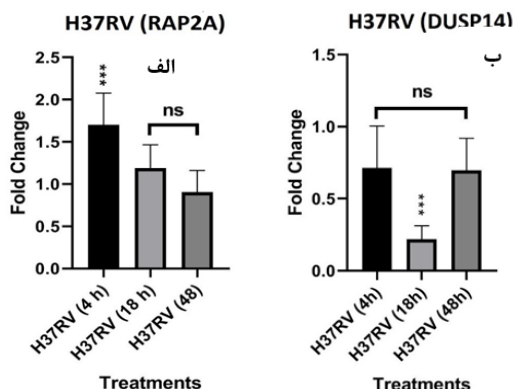
همان‌طور که در تصویر شماره ۲ (الف) مشخص است بیان ژن *DUSP14* در ۴ ساعت پس از آلوده شدن اگرچه افزایش معنی‌داری پیدا نکرد اما در سویه PB8 افزایش بیان بیش‌تری نسبت به سویه‌های دیگر داشت. هم‌چنین در تصویر شماره ۲ (ب) مشخص است پس از گذشت ۱۸ ساعت از آلوده کردن محیط کشت با سه سویه از باکتری بیان ژن *DUSP14* کاهش پیدا کرده است. لازم به ذکر است کاهش بیان ژن *DUSP14* در محیط کشت آلوده شده با سویه H37Rv و *MTBRiIs* نسبت به سویه PB8 بیش‌تر بوده است. همان‌طور که در تصویر شماره ۲ (ج) مشخص است پس از گذشت ۴۸ ساعت از آلوده کردن محیط کشت با سه سویه از باکتری بیان ژن *DUSP14* تغییر معنی‌داری نداشته است.



تصویر شماره ۲: بیان ژن *DUSP14* در اثر تیمار با سه سویه مختلف و در مقایسه با گروه کنترل، الف: ۴ ساعت پس از تیمار، ب: ۱۸ ساعت پس از تیمار، ج: ۴۸ ساعت پس از تیمار

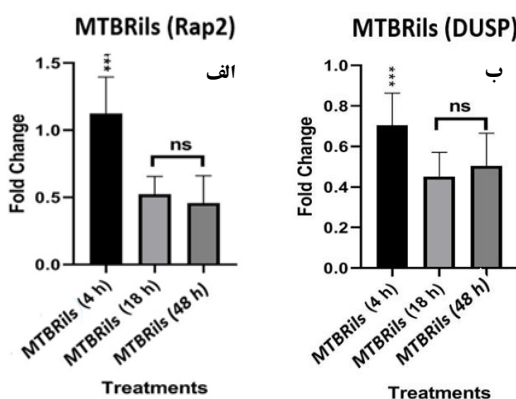


تصویر شماره ۱: بیان ژن *RAP2A* در اثر تیمار با سه سویه مختلف و در مقایسه با گروه کنترل، الف: ۴ ساعت پس از تیمار، ب: ۱۸ ساعت پس از تیمار، ج: ۴۸ ساعت پس از تیمار



تصویر شماره ۴: بیان ژن‌های *RAP2A* و *DUSP14* در محیط کشت آلوده شده با سویه H37Rv

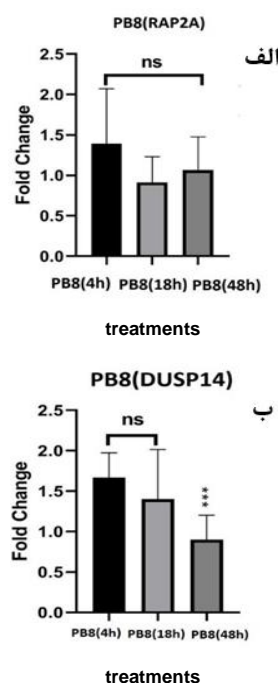
همان‌طور که در تصویر شماره ۵ (الف) مشخص است بیان ژن *RAP2A* در محیط کشت آلوده شده با سویه MTBRils پس از گذشت ۴ ساعت افزایش یافته است در صورتی که به مرور با گذشت ۱۸ ساعت و ۴۸ ساعت بیان آن کاهش یافته است. همچنین بیان ژن *DUSP14* آلوده شده با سویه MTBRils با گذشت ۴ ساعت کاهش یافته است. سپس با گذشت ۱۸ و ۴۸ ساعت تغییر معنی‌داری مشاهده نشده است (تصویر شماره ۵ (ب)).



تصویر شماره ۵: بیان ژن‌های *RAP2A* و *DUSP14* در محیط کشت آلوده شده با سویه MTBRils

ژن *RAP2A* یکی از اعضای خانواده RAS Oncogene Family می‌باشد که در مسیرهای ERK Signaling و Activation of cAMP-Dependent PKA نقش دارد. در حالت فعال این ژن‌ها با افکتورهای

همان‌طور که در تصویر شماره ۳ (الف) مشخص است بیان ژن *RAP2A* در سه زمان تغییر معنی‌اری پیدا نکرده است. اگرچه افزایش بیان در ۴ ساعت پس از آلوده شدن با سویه PB8 بیش‌تر از ۱۸ ساعت و ۴۸ ساعت بوده است. همچنین بیان ژن *DUSP14* در محیط کشت آلوده شده با سویه PB8 با گذشت ۴ ساعت افزایش یافته و به مرور با گذشت ۱۸ ساعت تغییر محسوسی مشاهده نشد؛ اما با گذشت ۴۸ ساعت بیان ژن کاهش یافته است (تصویر شماره ۳ (ب)).



تصویر شماره ۳: بیان ژن‌های *RAP2A* و *DUSP14* در محیط کشت آلوده شده با سویه PB8

همان‌طور که در تصویر شماره ۴ (الف) مشخص است بیان ژن *RAP2A* در ۴ ساعت پس از آلوده شدن با سویه H37Rv افزایش یافته و سپس به مرور با گذشت ۱۸ ساعت و ۴۸ ساعت بیان ژن کاهش یافته است. همچنین همان‌طور که در تصویر شماره ۴ (ب) مشخص است بیان ژن *DUSP14* در محیط کشت آلوده شده با سویه H37Rv پس از گذشت ۴ ساعت کاهش یافته، سپس با گذشت ۱۸ ساعت بیان ژن کاهش بیش‌تری پیدا کرده است و با گذشت ۴۸ ساعت دوباره بیان ژن افزایش یافته است.

MAPKها نقش اساسی در ایجاد سیگنال‌های سلولی و پاسخ سلولی ایفا می‌کنند. ژن‌های DUSP نیز نقش مهمی در دفسفریله کردن MAPKها دارند و در نتیجه فعالیت‌های آن‌ها را کنترل و تنظیم می‌کنند. ژن *DUSP14* که یکی از اعضای خانواده DUSPها می‌باشد که در بلوغ سلول‌های لنفوسیت T و تولید سیتوکین‌ها از طریق دفسفریله کردن یکسری از پروتئین‌ها نقش دارند (۱۸، ۱۹).

کاهش بیان ژن *DUSP14* از طریق siRNA در ماکروفاژ موش‌ها منجر به کاهش شمارش باکتری توپریکلوزیس شده است؛ اما در بعضی از مطالعات بیان این ژن در مواجهه با باکتری مایکوباکتریوم توپریکلوزیس تغییری پیدا نکرده است (۲۰). مطالعه حاضر، نشان داد بیان ژن *DUSP14* در هر سه زمان به‌ویژه ۴ ساعت و ۱۸ ساعت پس از آلوده کردن با سویه‌های میکروبی، کاهش قابل توجهی در دو سویه از باکتری مایکوباکتریوم به نسبت PB8 و گروه control دارد. یک بررسی در سال ۲۰۱۶ نشان داد که وجود پلی مورفیسم rs1051838 در ژن *DUSP14* که باعث کاهش فعالیت این ژن می‌شود با افزایش پاسخ‌های ماکروفاژ M1 و ژن‌های مرتبط با Th1 همراه است (۲۱). از طرفی، پلی مورفیسم دیگری که در ناحیه 3'-UTR ژن *DUSP14* بنام rs1051849 شناسایی شد که احتمال می‌رود در اتصال miRNAها نقش داشته باشد و باعث کاهش بیان ژن *DUSP14* می‌شود؛ اما با افزایش ریسک ابتلا به cutaneous melanoma همراه است که در متضاد با شیفت پاسخ‌های ایمنی به سمت Th1 می‌باشد (۲۲). بنابراین توصیه می‌گردد تا در مطالعات آتی به نقش این پلی مورفیسم‌ها در ژن‌های *DUSP14* و *RAP2A* و به بیان ژن‌های دخیل در شیفت پاسخ‌ها به سمت ماکروفاژهای M1 و پاسخ‌های Th1 و هم‌چنین سنجش غلظت سیتوکین‌های پیش‌التهابی در سوپ رویی محیط کشت پس از تحریک با سویه‌های میکروبی پرداخته شود.

مختلفی از قبیل MAP4K4، MINK1 و TNIK اتصال برقرار می‌کنند که در فعالیت‌های مختلفی از قبیل بازسازی اسکلت سلولی، مهاجرت سلولی و چسبندگی سلولی و اتصال سلول‌ها به یکدیگر نقش دارند (۱۳، ۱۲). مشخص شده است که باکتری سل، قابلیت تغییر polarization ماکروفاژها بین M1 و M2 را دارد و هم‌چنین پس از ورود به بدن با مختل کردن سیستم ایمنی ذاتی می‌تواند در درون ماکروفاژ زنده بماند (۱۴).

اکثر باکتری‌ها از طریق عملکرد پمپ پروتون و ویزیکولار که منجر به کاهش PH درون فاگوزوم می‌شود از بین می‌روند. این پروسه از طریق تغییر بیان یک سری از GTPase Rabها صورت می‌گیرد از قبیل افزایش بیان Rap22a و Rap2a و کاهش بیان Rab3a و Rab33a، تا از این طریق بتواند در سلول زنده بماند (۱۷-۱۵).

براساس نتایج مطالعه حاضر بیان ژن *Rap2a* در ۴ ساعت ابتدایی مواجهه با سه سویه از باکتری افزایش پیدا کرده است که تاییدکننده نتایج سایر مطالعات است که موجب افزایش بیان GTPase می‌گردد تا منجر به کاهش PH درون فاگوزوم و حذف عوامل فاگوسیتوز شده می‌شود؛ اما در زمان‌های ۱۸ ساعت و ۴۸ ساعت، کاهش بیان این ژن در دو سویه مایکوباکتریوم H37Rv و MTBRils مشاهده شد که نشان می‌دهد مایکوباکتریوم توپریکلوزیس با کاهش فعالیت GTPase، سعی در اختلال در روند فاگوزوم و شیفت پاسخ‌ها به سمت ماکروفاژهای M2 دارد. در مطالعه‌ای Carvalho و همکاران در سال ۲۰۱۹ با کاهش بیان ژن *RAP2A* با siRNA، نشان دادند که پاسخ‌دهی ماکروفاژها به (LPS) Lipopolysaccharides و ترشح سیتوکین پیش‌التهابی IL-6 و حتی کموکاین CXCL1 به دلیل عدم فعالیت مسیر NFκB کاملاً مختل می‌شود (۱۰). *DUSP14*ها در تنظیم پاسخ ایمنی نسبت به باکتری‌ها نقش ایفا می‌کنند و فسفاتازهای DUSP14-MAPK نقش اساسی در پاسخ آنتی‌میکروبیال سیستم ایمنی ذاتی به عهده دارند.

References

1. Metanat M, Sharifi-Mood B, Alavi-Naini R, Aminianfar M. The epidemiology of tuberculosis in recent years: Reviewing the status in south-eastern Iran. *Zahedan J Res Med Sci* 2012; 13(9): e93704 (Persian).
2. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 2003;16(3): 463-96. PMID: 12857778.
3. Blischak JD, Tailleux L, Mitrano A, Barreiro LB, Gilad Y. Mycobacterial infection induces a specific human innate immune response. *Sci Rep* 5(1):1-16. PMID: 26586179.
4. Simeone R, Sayes F, Song O, Groeschel MI, Brodin P, Brosch R, et al. Cytosolic access of *Mycobacterium tuberculosis*: critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence in vivo. *PLoS Pathog* 11(2): e1004650. PMID: 25658322.
5. Marino S, Cilfone NA, Mattila JT, Linderman JJ, Flynn JL, Kirschner DE. Macrophage polarization drives granuloma outcome during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 2015; 83(1): 324-338. PMID: 25368116.
6. Huang D, Bao L. *Mycobacterium tuberculosis* EspB protein suppresses interferon- γ -induced autophagy in murine macrophages. *J Microbiol Immunol Infect* 2016; 49(6): 859-865. PMID: 25641595.
7. Azad AK, Sadee W, Schlesinger LS. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infect Immun* 2012; 80(10): 3343-3359. PMID: 22825450.
8. Tang NL, Wang X, Chang KC, Chan CY, Szeto NW, Huang D, et al. Genetic susceptibility to Tuberculosis: Interaction between HLA-DQA1 and age of onset. *Infect Genet Evol* 2019; 68: 98-104. PMID: 31238250.
9. Cho SS, Han J, James SJ, Png CW, Weerasooriya M, Alonso S, et al. Dual-specificity phosphatase 12 targets p38 MAP kinase to regulate macrophage response to intracellular bacterial infection. *Front Immunol* 2017; 8: 1259. PMID: 29018430.
10. Carvalho BC, Oliveira LC, Rocha CD, Fernandes HB, Oliveira IM, Leão FB, et al. Both knock-down and overexpression of Rap2a small GTPase in macrophages result in impairment of NF- κ B activity and inflammatory gene expression. *Mol Immunol* 2019; 109: 27-37. PMID: 30851634.
11. Barreiro LB, Tailleux L, Pai AA, Gicquel B, Marioni JC, Gilad Y. Deciphering the genetic architecture of variation in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(4): 1204-1209. PMID: 22233810.
12. He Y, Li W, Liao G, Xie J. *Mycobacterium tuberculosis*-specific phagosome proteome and underlying signaling pathways. *J Proteome Res* 2012; 11(5): 2635-2643. PMID: 22443300.
13. Petiot A, Pattingre S, Arico S, Meley D, Codogno P. Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 2002; 27(6): 431-441. PMID: 12576636.
14. Mily A, Kalsum S, Loreti MG, Rekha RS, Muvva JR, Lourda M, et al. Polarization of M1 and M2 human monocyte-derived cells and analysis with flow cytometry upon *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Vis Exp* 2020; (163): e61807. PMID: 33016941.
15. Dhanasekaran S, Jenum S, Stavrum R, Ritz C, Faurholt-Jepsen D, Kenneth J, et al.

- Identification of biomarkers for Mycobacterium tuberculosis infection and disease in BCG-vaccinated young children in Southern India. *Genes Immun* 2013; 14(6): 356-364. PMID: 23676757.
16. Jacobsen M, Repsilber D, Gutschmidt A, Neher A, Feldmann K, Mollenkopf HJ, et al. Ras-associated small GTPase 33A, a novel T cell factor, is down-regulated in patients with tuberculosis. *J Infect Dis* 2005; 192(7): 1211-1218. PMID: 16136464.
17. Seto S, Tsujimura K, Koide Y. Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. *Traffic* 2011; 12(4): 407-420. PMID: 21255211.
18. Yang CY, Chiu LL, Tan TH. TRAF2-mediated Lys63-linked ubiquitination of DUSP14/MKP6 is essential for its phosphatase activity. *Cell Signal* 2016; 28(1): 145-151. PMID: 26521044.
19. Lang R, Raffi FAM. Dual-specificity phosphatases in immunity and infection: an update. *Int J Mol Sci* 2019; 20(11): 2710. PMID: 31159473.
20. Jayaswal S, Kamal MA, Dua R, Gupta S, Majumdar T, Das G, et al. Identification of host-dependent survival factors for intracellular Mycobacterium tuberculosis through an siRNA screen. *PLoS Pathog* 2010; 6(4): e1000839. PMID: 20419122.
21. Hijikata M, Matsushita I, Le Hang NT, Thuong PH, Tam DB, Maeda S, et al. Influence of the polymorphism of the DUSP14 gene on the expression of immune-related genes and development of pulmonary tuberculosis. *Genes Immun* 2016; 17(4): 207-212. PMID: 26938665.
22. Liu H, Wang LE, Liu Z, Chen WV, Amos CI, Lee JE, et al. Association between functional polymorphisms in genes involved in the MAPK signaling pathways and cutaneous melanoma risk. *Carcinogenesis* 2013; 34(4): 885-892. PMID: 23291271.