



Semnan University of Medical Sciences

# KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

**Volume 21, Issue 2 (Spring 2019), 205- 393**

**ISSN: 1608-7046**

**Full text of all articles indexed in:**

*Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase*

## مقاله مروری

# نقش اتوفاژی وابسته به توکسین‌های VacA و CagA هلیکوباکتر پیلوری در سرطان معده

بهمن یوسفی<sup>۱</sup> (Ph.D)، مجید اسلامی<sup>۲\*</sup> (Ph.D)، پرویز کوچایی<sup>۳</sup> (Ph.D)، سعید ولی زاده<sup>۴</sup> (Ph.D)، عبدالمجید قاسمیان<sup>۵</sup> (Ph.D)

۱- گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۲- گروه باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۳- مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۴- آزمایشگاه ایمنولوژی و ژن‌درمانی، مرکز سرطان کارولینسکا، بیمارستان دانشگاه کارولینسکا، استکهلم، سوئد

۵- گروه میکروبی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۱۷

M.eslami@semums.ac.ir

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۴۰۷۸۶۰۹

## چکیده

هلیکوباکتر پیلوری باکتری میکروآئروفیلیک گرم منفی که به عنوان عامل القای التهاب مخاطی و سرطان معده معرفی شده است. از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای این باکتری فاکتورهای VacA و CagA که در سویه‌های بالینی با افزایش حدت بیماری همراه هستند. اتوفاژی یک مسیر تجزیه لیزوزومی محافظت شده که تخریب‌کننده محتوای سیتوپلاسمی بوده و در دفاع سلولی میزبان، بقا، تمایز و توسعه سلولی دارای اهمیت می‌باشد. اتوفاژی می‌تواند به هر دو شکل فعالیت سرکوب‌کننده توموری و یا کمک به پیشرفت سرطان داشته باشد و نقش مهمی در ایمنی میزبان و نگهداری هومئوستاتیک دارد. هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند مسیر اتوفاژی میزبان را از طریق فاکتورهای ویروالانس VacA و CagA تحت تاثیر قرار دهند و پیامدهای مهمی در سرطان‌زایی هلیکوباکتر پیلوری داشته باشد. افزایش اتوفاژی در سلول‌های تومور مانع انباشت میتوکندری‌های غیرکارآمد می‌شود که می‌توانند تومورزایی را مختل سازند. در این مقاله مروری نتایج به‌دست آمده به این صورت بود که توانایی هلیکوباکتر پیلوری برای دست‌کاری در مسیر اتوفاژی میزبان به عنوان یکی از جنبه‌های مهم پاتوژنز آن در نظر گرفته می‌شود و این که عفونت با هلیکوباکتر پیلوری سبب ایجاد اتوفاژی در هر دو سلول‌های اپیتلیال معده و فاگوسیت‌های حرفه‌ای می‌شود. در سلول‌های اپیتلیال معده VacA فاکتور لازم برای ایجاد اتوفاژی می‌باشد. در حالی که CagA تنظیم‌کننده منفی این پدیده می‌باشد که با حذف این ژن از هلیکوباکتر پیلوری اتوفاژی افزایش یافته و تولید سایتوکین‌های التهابی کاهش پیدا می‌کند.

واژه‌های کلیدی: اتوفاژی، سرطان معده، هلیکوباکتری پیلوری، آنتی ژن باکتریایی، پروتئین‌های باکتریایی

## مقدمه

### هلیکوباکتر پیلوری

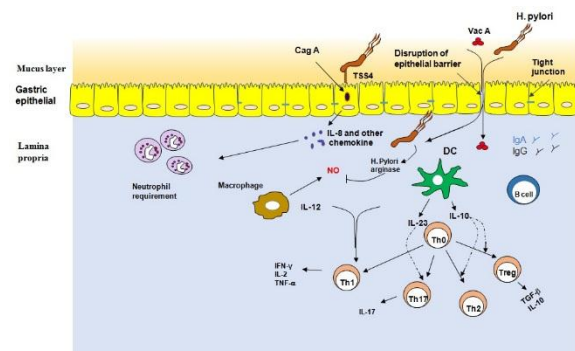
هلیکوباکتر پیلوری باکتری گرم منفی کموارگانوتروف میکروآئروفیلیک که قبلاً تحت عنوان کمپیلوباکتر پیلوری نامیده می‌شد. هلیکوباکتر پیلوری اولین بار توسط مارشال و وارن از معده افراد جداسازی و کشت داده شد و به عنوان باکتری عامل القای التهاب مخاطی معرفی شد [۱]. هنگامی که باکتری تحت شرایط استرسی همچون فقر مواد غذایی، فشار اکسیژن، انکوباسیون طولانی، محیط حاوی مواد ممانعت‌کننده رشد مثل آنتی‌بیوتیک‌ها قرار بگیرد به فرم کوکوئیدی غیرقابل کشت (Viable but nonculturable) تبدیل می‌شود و در مورفولوژی و خصوصیات بیولوژیکی باکتری تغییر ایجاد می‌شود. اشکال کوکوئید به دو فرم دیده می‌شوند: فرمی که قادر به برگشت به

حالت طبیعی است و فرمی که قادر به برگشت نیست. بازگشت اشکال کوکوئید به حالت اسپیرال، سبب عود بیماری و عدم ریشه‌کنی آن می‌گردد [۲].

### اپیدمیولوژی

سرطان معده پنجمین سرطان شایع در جهان بعد از سرطان‌های ریه، سینه، کولورکتال و پروستات است. تقریباً دو سوم موارد سرطان معده در آسیای شرقی، اروپای شرقی و جنوب و مرکز آمریکا رخ می‌دهد نواحی که به عنوان جمعیت‌های در معرض خطر سرطان معده نامیده می‌شوند [۳، ۴]. شیوع عفونت در کشورهای در حال توسعه شامل بیش از ۸۰٪ افراد بزرگسال و در کشورهای توسعه‌یافته ۲۰٪ جمعیت ۳۰ سال و ۵۰٪ افراد مسن را شامل می‌شود. در کشورهای در حال توسعه درصد بالایی از کودکان تا ۱۰ سالگی آلوده می‌شوند، در حالی

به باکتری، درصد کمی (۴/۰-۱) از بیماران آلوده، مبتلا به آدنوکارسینوم معده می‌شوند. اگر چه عوامل تعیین‌کننده این نتیجه متغیر به خوبی شناخته نشده‌اند، توسعه واکنش التهابی و پاسخ ایمنی پایدار به عفونت به نظر می‌رسد برای توسعه بیماری محور اصلی باشند. سلول‌های T در افراد آلوده تولید سایتوکاین-IFN $\gamma$  که نسبت به IL-4 یا IL-5 غالب می‌باشد، نشان‌دهنده قطبیت شدید نسبت به پاسخ‌های ایمنی از نوع Th1 است. فاکتورهای ویروالانس هلیکوباکتر پیلوری نقش تعیین‌کننده‌ای در شروع تعاملات نزدیک با سلول‌های اپی‌تلیال میزبان و القاء التهاب در سطوح مخاطی معده می‌باشند. سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری حاوی cag-PAI همراه با التهاب شدید ناحیه انترال معده، مقدار بالای سایتوکاین‌های مخاطی IL-1 $\beta$  و IL-8، زخم پپتیک و افزایش ترشح اسید در این بیماران می‌باشد. سایر عوامل مستعدکننده ابتلا به بیماری، مانند مدت زمان و بار میکروبی عفونت، ممکن است بر پیامدهای عفونت تأثیرگذار باشند، اما کم‌تر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. بررسی فاکتورهای اولیه عفونت (در کودکان) کم‌تر مورد مطالعه قرار گرفته است، اما نشان می‌دهد که این دوره پاسخ‌های پیش التهابی و سایتوکاین‌های نوع Th1 در پاسخ به عفونت ایجاد می‌گردند. در بزرگسالان ارتشاح سلولی غالب سلول‌های نوتروفیل می‌باشند در حالی که در کودکان یک ارتشاح غالب از سلول‌های تک‌هسته‌ای و تکثیر بیش از اندازه فولیکول‌های لنفی ایجاد می‌شود. مکانیسم‌های اصلی تفاوت‌های آسیب‌شناسی بافتی و الگوی بیماری بین کودکان و بزرگسالان و مراحل اولیه و عفونت هنوز کاملاً مشخص نشده است [۹].



شکل ۱. پاتوژنز هلیکوباکتر پیلوری و پاسخ‌های التهابی. هلیکوباکتر پیلوری در لومن معده قرار می‌گیرد و با استفاده از آنزیم اوره از در اپی‌تلیوم معده تکثیر پیدا می‌کند. اتصال هلیکوباکتر پیلوری به سلول‌های اپی‌تلیال و با تزریق CagA منجر به تولید IL-8 و دیگر کموکین‌ها می‌شود و فعال سازی پاسخ‌های سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی را در پی دارد [۹].

اگر چه هلیکوباکتر پیلوری به‌عنوان پاتوژن خارج سلولی تلقی می‌شود شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد که وارد سلول شده و در اتوفازگوزوم‌های ماکروفاژها، سلول‌های اپی‌تلیال معده

که در کشورهای توسعه‌یافته این رقم کم‌تر است. بروز عفونت مستقل از جنس می‌باشد و با افزایش سن، افزایش می‌یابد [۵]. اگر چه راه‌های انتقال عفونت به طور قطعی شناخته نشده، مطالعات اپیدمیولوژیک احتمال انتقال فرد به فرد را بیش‌تر مطرح می‌کند. انتقال توسط حیوانات، آب، مواد غذایی و اندوسکوپی نیز مطرح شده است [۳].

هلیکوباکتر پیلوری به‌عنوان یکی از موفق‌ترین پاتوژن‌های انسانی که تقریباً در معده نیمی از جمعیت جهان کلونیزه شده و در تمام طول عمر میزبان در بدن افراد باقی می‌ماند. کلونیزه شدن باکتری در موکوس معده در دوران بچگی اتفاق می‌افتد و در حدود ۱۰٪ از افراد آلوده بیماری‌های گاستریت و زخم معده تا لنفوم MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) و سرطان معده نشان می‌دهند [۳]. انتقال از راه دهان به دهان احتمالاً بیش‌تر در کشورهای پیشرفته صورت می‌گیرد، ولی انتقال مدفوعی-دهانی بیش‌تر در کشورهای در حال توسعه صورت می‌گیرد. به جز موارد یاد شده، عوامل اجتماعی-اقتصادی هم‌چون فقر بهداشتی، ازدحام جمعیت، آلودگی آب، رفتارهای فردی مثل جویدن غذای کودک توسط مادر از جمله عوامل موثر در میزان آلودگی در بیش‌تر کشورهای در حال توسعه می‌باشد [۶].

#### پاتوژنز هلیکوباکتر پیلوری

به نظر می‌رسد موفقیت هلیکوباکتر پیلوری در پاتوژنز به دلیل استراتژی‌های بقاء منحصراً به فرد آن و توانایی فرار از سیستم ایمنی میزبان باشد. برای رسیدن به این هدف، هلیکوباکتر به تعدادی از فاکتورهای ویروالانس تکامل یافته مجهز شده است [۷]. دو تا از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی این باکتری عبارتند از سم سیتوتوکسین واکوله‌کننده (Vacuolating cytotoxin A, VacA) و پروتئین اجرایی همراه با سیتوتوکسین ژن A (Cytotoxin-associated gene A, CagA) می‌باشد. در سویه‌های بالینی، ژن CagA و VacA به شدت با افزایش حدت همراه هستند و سویه‌ها به دو نوع، نوع I (هر دو ژن CagA و VacA را بیان می‌کنند) و نوع II (فاقد بیان هر دو ژن CagA و VacA) طبقه‌بندی می‌شوند [۸].

هر فردی که حامل هلیکوباکتر پیلوری در معده‌اش می‌باشد، ارتشاح سلولی در مخاط معده خود دارند که در واقع آن را التهاب معده مزمن می‌نامند (شکل ۱) در اکثر بیماران (۸۰٪) هلیکوباکتر پیلوری علائم بالینی را ایجاد نمی‌کند و عفونت می‌تواند در تمام طول زندگی بدون این‌که مشکلی به‌وجود بیاورد همراه فرد باشد. ۱۰ تا ۲۰٪ از بیماران آلوده با تولید بیش از حد اسید معده همراه با زخم‌های گوارشی هستند، اما می‌توانند با آنتی‌بیوتیک درمان شوند. اما با توجه به شرایط عفونت و واکنش ایمنی بدن فرد نسبت

اتوفازی از طریق محرک‌های شیمیایی مثل هیپوکسی، تخلیه انرژی، دما، هورمون‌ها، عوامل دارویی، سیتوکین‌ها و پیشرفت بیماری ایجاد می‌شود. در مقابل اتوفازی ناقص دلالت بر پاتوژن سرطان‌ها، سال‌خوردگی، آسیب نورونی، بیماری‌های عفونی و بیماری التهابی روده (IBD) دارد [۱۶]. در کارسینوزیس، اتوفازی عملکرد سرکوب‌کننده تومور را دارد و از طریق تخریب ارگانل‌های آسیب‌دیده، کاهش عوامل فعال اکسیژن ROS و افزایش پایداری ژنومی انجام می‌شود. علاوه بر این به نظر می‌رسد ROS نقش مکانیکی در اتوفازی داشته باشد [۱۷]. در سلول‌های AGS (Adenocarcinoma gastric cell line) نشان داده شده است که ROSها در القای اتوفازی نقش داشته باشند، که می‌تواند از طریق افزودن آنتی‌اکسیدان N-استیل سیستین قابل پیشگیری باشد. در مقابل، استفاده از یک مهارکننده NADPH اکسیداز (NADPH oxidase, NOX) یا مشابه سوپراکسید دسموتاز (Superoxide dismutase, SOD) میتوکندریایی نمی‌تواند از اتوفازی ناشی از VacA جلوگیری کرد، این در واقع نشان‌دهنده این است که NOX و ROS تولید شده به وسیله میتوکندری در اتوفازی این مسیر درگیر نیستند. ظاهراً افزایش ROS در عفونت هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند منجر به کاهش سطح گلوکاتیبون داخل سلولی با یک مکانیزم ناشناخته از طریق VacA شود [۱۸].

اتوفازی یک مسیر هضم لیزوزومی محافظت شده است که تخریب‌کننده محتوای سیتوپلاسمی بوده و در دفاع سلولی میزبان اهمیت دارد. اتوفازی برای بقا، تمایز و توسعه سلولی ضروری بوده و نقش مهمی در ایمنی میزبان و پایداری سلولی دارد. سه مسیر متمایز در اتوفازی شناسایی شده است که شامل:

۱) ماکرواتوفازی

۲) اتوفازی با واسطه چاپرون

۳) میکرواتوفازی [۱۹]

ماکرواتوفازی

ماکرواتوفازی شناخته شده‌ترین مسیر اتوفازی است که در آن غشای بیرونی اتوفازوزوم با یک لیزوزوم متصل شده تا محتوای خودش را در یک اتولیزوزوم تخلیه کند. ماکرواتوفازی به وسیله فعال شدن یک مجموعه تنظیمی از مولکول‌ها (حاوی Vps34, Beclin 1, Vps15, Ambra1 و Atg14) (Autophagy-related gene) که باعث جذب LC3 به غشای جداسازی اتوفازوزوم می‌شود. حذف انتخابی میتوکندری (میتوفازی؛ فرم خاصی از ماکرواتوفازی) نیاز به کمپلکس پیچیده PINK1-parkin (PTEN-induced putative kinase 1) و فاکتور Bnip3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3) دارد. پروتئین‌هایی که برای تخریب

و سلول‌های دندریتیک نیز تکثیر می‌کند [۱۱،۱۰]. عفونت با هلیکوباکتر پیلوری منجر به القای پاسخ‌های ایمنی ذاتی و انعطاف‌پذیری در میزبان می‌شود و پپتیدهای ضد میکروبی، تنظیم‌کننده‌های التهابی و انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن (Reactive oxygen species, ROS) تولید می‌شوند [۱۲]. سیتوکین‌ها توسط سلول‌های اپیتلیال به لامینا پروپریا آزاد می‌شوند که باعث فعال شدن ماکروفازها، سلول‌های دندریتیک و دیگر واسطه‌های التهابی می‌شوند. سپس این پاسخ، ایمنی اولیه لنفوسیت‌های T، لنفوسیت‌های T تنظیمی، لنفوسیت‌های B و نوتروفیل‌ها را فعال می‌کند [۱۳]. تقریباً تمام افراد مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری مبتلا به گاستریت مزمن می‌شوند. با این حال، فقط ۱۰ تا ۱۵٪ به بیماری زخم معده مبتلا می‌شوند و در ۱ تا ۳٪ هم سرطان معده ایجاد می‌شود. بنابراین، یک پارچگی پیچیده‌ای میان میزبان، محیط رشد و فاکتورهای باکتریایی وجود دارد که می‌تواند بر سرطان‌زایی این عفونت تاثیرگذار باشند [۱۳]. در سال‌های اخیر نشان داده شده است هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند مسیر اتوفازی میزبان را تحت تاثیر قرار داده، که یک فرایند حفاظت شده می‌باشد که در آن پروتئین‌های سیتوزولی، اندامک‌ها و پاتوژن‌ها در درون سلول جدا شده، هضم و تجزیه می‌گردند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که VacA می‌تواند مسیر اتوفازی میزبان را دچار تغییراتی بکند که نتیجه آن ممکن است پیامدهای مهمی در سرطان‌زایی هلیکوباکتر پیلوری داشته باشد [۱۴].

اتوفازی در عفونت هلیکوباکتر پیلوری

اتوفازی، به معنای واقعی کلمه، خوردن خود می‌باشد، فرایندی است که در آن پروتئین‌های سلولی، اندامک‌ها و پاتوژن‌های درون سلولی داخل یک هلال غشایی جداسازی می‌شوند که به تدریج به طول آن اضافه شده و ساختار دو لایه غشایی متصل به هم را ایجاد می‌کنند که به آن اتوفازوزوم گفته می‌شود. فیوز و اتصال اتوفازوزوم با لیزوزوم، تشکیل یک اتوفازولیزوزومی را می‌کند که آنزیم‌های تجزیه‌کننده را به داخل محفظه می‌رساند و منجر به تجزیه و هضم محتوای اتولیزوزوم می‌شود. این فرآیند می‌تواند به صورت انتخابی یا غیر انتخابی باشد. اتوفازی غیر اختصاصی تحت شرایط استرس و گرسنگی افزایش پیدا می‌کند و شامل تخریب حجم قابل توجهی از اجزای سیتوزولی برای فراهم کردن مواد مغذی سلولی می‌باشد. در مقابل، اتوفازی انتخابی شامل هدف‌گذاری اختصاصی برای اندامک‌های آسیب‌دیده و یا پاتوژن‌های مهاجم می‌باشد. برای اتوفازی انتخابی معمولاً "برچسب (Tag)" (به عنوان مثال از بیویکوئیتین) برای شناسایی محموله برچسب زده شده برای تخریب اتوفازیک مورد نیاز است [۱۵].

از جمله یک ناحیه N-انتهایی که واسطه بر هم کنش با-Atg12 و Atg5 کونژوگه بوده و دومین پیچ در پیچ (Coiledcoil) که واسطه دایریزاسیون Atg16L1 است. اتوفازی ناقص، در منوسیت‌ها اتفاق می‌افتد جایی که افراد پلی‌مورفیسم در ژن اتوفازی Atg16L1 دارند که نسبت به توسعه بیماری کرون حساسیت دارند. این افراد آل‌هایی دارند که حساسیت اکتسابی نسبت به عفونت‌های هلیکوباکتر پیلوری را افزایش می‌دهند. در بررسی‌های انجام شده حضور ریسک فاکتور شناخته شده بیماری کرون، Atg16L1 rs 2241880 است که خطر عفونت هلیکوباکتر پیلوری در افراد سفید پوست آلمانی و اسکاتلندی را افزایش می‌دهد [۲۴].

#### اتوفازی با واسطه چاپرون (Chaperone-mediated autophagy, CMA)

پروتئین‌هایی که توسط عوامل مختلف مانند گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) آسیب دیده‌اند، توالی مشخصی از اسید آمینه (KFERQ) آن‌ها آشکار می‌شود که توسط چاپرون Hsc70 (Heat Shock cognate protein 70KDa) شناخته می‌شوند، که به نوبه خود از طریق تعامل با گیرنده‌های Lamp2a (Lysosome-associated membrane protein 2) آن‌ها را به لیزوزوم انتقال می‌دهند [۲۵].

یکی از ویژگی‌های متمایز اتوفازی با واسطه چاپرون این است که پروتئین‌هایی که از طریق این مسیر اتوفازی تحت شرایط تخریب قرار می‌گیرند و به صورت منحصر به فرد از طریق یک روند تشخیص موتیف توالی اسیدهای آمینه انتخاب می‌شوند. این اجازه را می‌دهد تا به صورت یک سیستم کارآمد پروتئین‌های آسیب‌دیده و غیر طبیعی را بدون اختلال در پروتئین‌های همسایه و یا حتی یک پروتئین از یک مجموعه چند پروتئینی را برداشت و حذف نماید. علاوه بر این، این مکانیسم انتخابی اجازه می‌دهد تا اتوفازی با واسطه چاپرون نقش نظارتی در فرآیندهای چندسلولی از طریق کمک به تعدیل سطوح داخل سلولی آنزیم‌ها، عوامل رونویسی و پروتئین‌هایی که در بقاء سلول نقش دارند، داشته باشند. CMA یک فرآیند چند مرحله‌ای است که شامل: (I) شناسایی سوبسترا و هدف‌گیری لیزوزومی؛ (II) اتصال سوبسترا و از هم باز شدن آن؛ (III) جابه‌جایی سوبسترا و تجزیه سوبسترا در لومن لیزوزوم. شناسایی پروتئین‌های سوبسترا در سیتوزول به وسیله اتصال یک پروتئین چاپرون سازنده، پروتئین hsc70، به یک توالی تکراری از توالی اسیدهای آمینه صورت می‌گیرد که در تمام سوبستراهای CMA وجود دارند (شکل C۲- [۲۶، ۲۱، ۹]).

لیزوزومی متعهد هستند (از جمله Bcl-2 associated BAG3 (athanogene 3) و فیلامن) با زنجیره‌های پلی‌یوئیکوتین برچسب‌گذاری شده و به اتوفازوم توسط پروتئین داربست p62 تحویل داده می‌شوند (شکل A-۲ [۲۰، ۲۱]).

انتقال مطالعات اتوفازی از مورفولوژی به ماشین‌های مولکولی بر اساس شناسایی ژن‌های Atg متکی بود و منجر به شناسایی بیش از ۳۰ ژن از Atg ها شد. در میان این ژن‌های Atg، یک زیرگروه شامل تقریباً ۱۸ ژن در میان انواع مختلف اتوفازی، از جمله ماکرو اتوفازی غیر انتخابی، مسیر سیتوپلاسم به سمت واکوئله شدن (یک مسیر شبه اتوفازی بیوسنتتیک)، میتوفازی و پکسوفازی می‌باشد. به طور خاص، محصولات مربوط به این زیرگروه ژنی برای تشکیل اتوفازوم مورد نیاز هستند، و از اجزای اصلی تشکیل هسته اتوفازی محسوب می‌شوند. این پروتئین‌های هسته اتوفازی را می‌توان به زیر گروه‌های عملکردی مختلفی تقسیم کرد: (A) کمپلکس ULK1/Atg1 (Atg11, Atg13, Atg17, Atg29, Atg31) که در تنظیم القاء تشکیل اتوفازوم نقش دارند. Atg9 (B) و سیستم cycling آن (Atg2, Atg9, Atg18) پس از موتناژ مجتمع Atg1 در PAS (Phagophore Assembly Site)، نقش مهمی در تحویل غشا به فاگوفور در حال گسترش بعد از تشکیل کمپلکس Atg1 و PAS دارند. PtdIns 3-kinase (C) کمپلکس (Vps30/Atg6, Vps15, Vps34) (Atg14 و Atg15) در مرحله هسته‌زایی و زیکول عمل می‌کند و در به‌کارگیری پروتئین‌های پیوند متصل به PtdIns3P به PAS نقش دارند؛ (D) دو سیستم شبه یوئیکوتین (Ubiquitin-like, Ubl) برای کونژوگه شدن: Atg5, Atg7, Atg10, Atg12, Atg16 و Atg8 (Atg3, Atg4, Atg7) که Atg8 در گسترش و زیکول نقش دارد. کمپلکس Atg5-Atg12-Atg16L1 با پروتئین مرتبط با میکروتوبول جفت شده (با زنجیره سبک ۳ LC3) و کمپلکس ایجاد می‌کند که برای شکل‌گیری و پیدایش اتوفازوم نیاز است. کونژوگاسیون این کمپلکس با غشای اتوفازوم به باز پس‌گیری دیگر پروتئین‌های اتوفازی برای بلوغ کمک می‌کند. LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) در سیتوپلاسم فیوز می‌شود. با القای اتوفازی LC3 تغییر می‌یابد، LC3-II لیپیدی می‌شود و در غشاهای داخلی و خارجی اتوفازوم لوکالیزه می‌شود. LC3-II در سلول‌های پستانداران به عنوان مارکر گلد استاندارد فعالیت اتوفازیک محسوب می‌شود [۲۳، ۲۲].

از بین ژن‌های Atg، ژن Atg16L1 در کروموزوم ۲ q37.1 قرار گرفته که کدکننده یک پروتئین حاوی ۶۳۰-۵۸۰ اسید آمینه

میکروپکسوفازی، میکرواتوفازی قطعه قطعه‌ای از هسته تحت شرایط خاصی فعال می‌شوند (شکل ۲- B) [۲۷، ۲۱].

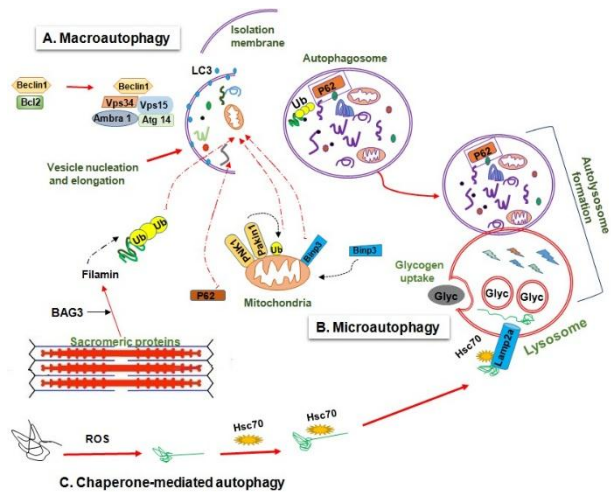
### نقش اتوفازی در سرطان

شواهد موجود نشان می‌دهد اتوفازی نقش خاصی در سرطان داشته باشد که می‌تواند به هر دو شکل فعالیت سرکوب‌کننده توموری و یا کمک به پیشرفت سرطان داشته باشد. اتوفازی عملکرد مهمی در محدود کردن التهاب، آسیب بافتی و بی‌ثباتی ژنوم دارد که این عوامل موثر در سرطان‌زایی هستند. در سلول‌هایی که دچار نقص در اتوفازی هستند، این اختلال منجر به تجمع ROSها و چاپرون‌های P62ها، شبکه اندوپلاسمی و میتوکندری‌های آسیب‌دیده سلولی می‌شود. این فنوتیپ با سلول‌هایی همراه است که دیگر قادر به حفظ هموستاز داخل سلولی از طریق حذف پروتئین‌ها و اندامک‌های آسیب‌دیده نیستند [۲۸، ۲۹].

به طور اجتناب‌ناپذیری، سلول‌هایی که دچار اختلال و نقص در اتوفازی هستند، تجمع مواد سیتوتوکسیک را در پی دارند که منجر به افزایش جهش در DNA شده که از این طریق ایجاد سرطان را تقویت می‌کنند. عملکرد اتوفازی در سرکوب‌کنندگی تومور به طور مستقیم با جهش در ژن‌های مرتبط با اتوفازی و یا حذف تک آلی در بسیاری از سرطان‌ها مرتبط می‌باشد. به عنوان مثال، حذف منو آلی ژن BECN1 در سرطان سینه، تخمدان، پروستات و سایر سرطان‌ها گزارش شده است [۳۰].

با این حال، در بعضی موارد، اتوفازی هم‌چنین می‌تواند احتمال ایجاد تومور را تقویت کند. ریز محیط کنترلی تومور به طور معمول دارای کمبود مواد مغذی، اکسیژن و عوامل رشد (ایسکمی) می‌باشد [۳۱]. در این شرایط، اتوفازی تنظیم شده می‌تواند بقای سلول‌های تومور را افزایش دهد. افزایش اتوفازی در سلول‌های تومور هم‌چنین مانع انباشت میتوکندری‌های غیرکارآمد می‌شود که می‌توانند تومورزایی را مختل سازند. در واقع، به همین علت، اتوفازی برای القای تومور مغزی که به وسیله انکوژن Ras راه‌اندازی می‌شود، ضروری می‌باشد [۳۲]. اگر چه التهاب، ROSها و DNA آسیب‌دیده، همگی جزء عواملی هستند که در بروز تومور نقش دارند، با این حال می‌توانند برای خود تومور نیز مضر باشند. بنابراین، اتوفازی ممکن است بقای تومور را با محدود کردن التهاب بیش از حد، ROS و آسیب DNA افزایش دهد [۳۳، ۳۴].

بر اساس مطالعات انجام گرفته نقش ضد توموری اتوفازی و مولکول‌های دخیل در این پروسه تا حدودی مشخص شده‌اند از جمله UVRAG و Bif-1 (Bax-interacting factor-1)، Atg4C (UV radiation resistance-associated gene) که سرکوب‌کننده‌های تومور هستند [۳۵]. شناسایی مسیرهای



شکل ۲. ماکرواتوفازی، میکرواتوفازی و اتوفازی وابسته به چاپرون و مشارکت آنها در تجزیه و هضم پروتئین‌ها و ارگانل‌های داخل سیتوپلاسمی: (A) فعالیت ماکرواتوفازی به کمک یک کمپلکس تنظیمی (شامل Beclin 1, Vps34, Vps15, Ambra1, و Atg14) است که باعث فراخوانی پروتئین LC3 به اتوفاگوزوم اولیه (جدا شده از غشا) می‌شود. حذف انتخابی میتوکندری (میتوفازی)؛ یکی از مکانیسم‌های اختصاصی ماکرواتوفازی محسوب می‌گردد که نیازمند کمپلکس پروتئینی PINK1-parakin و فاکتورهای Bnip3 می‌باشد. پروتئین‌هایی که برای تخریب لیزوزومی متعهد هستند (از جمله filamin و BAG3) توسط زنجیره‌های یوبیکوئیتین برچسب می‌خورند و توسط پروتئین p62 به اتوفاگوزوم منتقل می‌شوند. (B) میکرواتوفازی درگیر در بلع مستقیم پروتئین‌های کوچک داخل سیتوپلاسمی به لیزوزوم می‌باشد. (C) در اتوفازی وابسته به چاپرون (CMA) پروتئین‌های آسیب‌دیده به وسیله فاکتورهای مختلف از قبیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن، توالی خاصی از اسیدهای آمینه را (به نام موتیف KFERQ) در معرض قرار می‌دهند که توسط چاپرون Hsc70 شناسایی شده و به کمک گیرنده Lamp2a به داخل لیزوزوم منتقل می‌شوند [۲۱].

### میکرواتوفازی

میکرواتوفازی شامل جذب مستقیم پروتئین‌های کوچکی از سیتوپلاسم به لیزوزوم‌ها می‌باشد. این فرایند تجزیه به طور کلی غیرانتخابی و انتخابی لیزوزومال می‌باشد، مستلزم جذب مستقیم محموله‌های سیتوپلاسمی در یک غشاء مرزی با استفاده از لوله‌های اتوفازی می‌باشد، که هر دو واکنش پیوستن و از هم‌گسیختگی و رهاسازی آن در داخل و لومن انجام می‌شود. با ویژگی‌های سازنده آن، میکرواتوفازی سوبستراهای محلول می‌تواند از طریق فقر نیتروژن و یا ریپامایسین از طریق راه‌های پیچیده سیگنالینگ تنظیمی راه‌اندازی شود. عملکرد اصلی میکرواتوفازی در جهت حفظ اندازه اندامک‌های سیتوپلاسمی، هموستاز غشاء و بقای سلولی تحت محدودیت نیتروژن، می‌باشد. علاوه بر این، میکرواتوفازی، ماکرواتوفازی و اتوفازی با واسطه چاپرون و دیگر مسیرهای خوردن خود با هم‌دیگر هماهنگ شده‌اند. سه فرم از میکرواتوفازی انتخابی، از جمله

سلول‌های اپی‌تلیال است که باعث از بین رفتن سدهای سلولی و انتشار راحت‌تر مواد غذایی برای کسب توسط باکتری است [۴۰، ۳۹].

یکی از ویژگی‌های کلیدی CagA توانایی برقراری ارتباط با کینازهای سلولی میزبان و ایجاد تغییرات در فسفوریلاسیون تیروزین می‌باشد. جایگاه‌های فسفوریلاسیون تیروزین در CagA حاوی توالی حفاظت شده‌ای از اسیدهای آمینه در انتهای ترمینال کربوکسیل شامل Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala به اصطلاح (EPIYA) می‌باشد. بر اساس توزیع جغرافیایی گونه‌های هلیکوباکتر پیلوری که CagA را دارند و بر هم تابیدگی توالی اسیدهای آمینه، چهار نوع متمایز از موتیف‌های EPIYA شناسایی شده‌اند به نام EPIYA-A، B، C و D [۴۱].

به عنوان مثال، ترانسفکشن در شرایط آزمایشگاهی سلول‌های اپیتلیوم معده انسان (AGS) با نوع ABCCC نوع هلیکوباکتر پیلوری CagA که دارای سه تکرار متوالی از EPIYA-C در ناحیه C- ترمینال می‌باشد که می‌تواند به طور قابل توجهی رونویسی از ژن‌های متعدد درگیر در سرطان معده را راه‌اندازی کند و به همین ترتیب در مقایسه با نوع Cag-AABC می‌تواند تولید اینترلوکین ۸ و دست‌کاری پروتئین‌های مربوط به Crk (CT10 regulator of kinase) و دیگر پروتئین‌های مرتبط با مسیر آپوپتوز سلولی (از طریق اثر ضد آپوپتوزی آن) را تحریک نماید [۴۲].

ساختار این پروتئین در برخی گونه‌های هلیکوباکتر با بقیه متفاوت می‌باشد مثلاً بین صفر تا ۵ ریشه تیروزین برای فسفریله شدن در انواع مختلف این پروتئین وجود دارد که بیش‌تر بودن جایگاه‌های فسفوریلاسیون تغییرات اسکلت سلولی وسیع‌تری را در سلول‌های اپی‌تلیالی باعث می‌شود. سویه‌های با این نوع از پروتئین CagA از بیماران مبتلا به سرطان معده بیش‌تر جدا شده است. سطوح بالای IL-8 در سلول‌های اپی‌تلیالی سویه‌های Cag+ نسبت به سویه‌های Cag- دیده می‌شود. این دیده به دلیل حضور پروتئین CagA نیست بلکه به دلیل ترکیباتی نظیر مورامیل دی پپتید است که از طریق سیستم ترشحی تیپ ۴ به سیتوپلاسم ترشح می‌شود [۴۳، ۴۴].

اثر عمیق CagA بر روی مسیرهای متعدد داخل سلولی موجب عواقب عمده‌ای مانند اختلال در حمل و نقل آنتین داخل سلولی، تحریک پاسخ‌های التهابی و اختلال در اتصالات محکم سلولی می‌شود. چنین فعالیت‌هایی از CagA بیش‌تر در توسعه سرطان معده نقش دارد [۴۵].

#### اتوفازی و CagA

اثر فاکتور ویروانس CagA در اتوفازی که در ابتدا توصیف شده بود توسط تربیزنیک (Terebiznek) در سال ۲۰۰۹ حذف

پیام‌رسانی ضد توموری از جمله PTEN (Phosphatase and TSC1/2 (Tuberous sclerosis proteins, tensin homolog) and 2)، LKB1 (Liver kinase B1) و P53 که تحریک‌کننده اتوفازی هستند. گزارش شده است که سلول‌های توموری تحت فشار انتخابی از مداخلات درمانی احتمالاً از اتوفازی محافظت می‌شوند که این به عنوان پاسخ سلولی سازگار عمل کرده و منجر به مقاومت شیمیایی و بقای سلول سرطانی می‌شود [۳۶].

در زمینه سرطان‌زایی معده مطالعات اخیر نشان داده که افزایش بیان Beclin-1 با پیش‌آگهی مطلوب سرطان معده در ارتباط است. اتوفازی با اثر محافظتی ماترین یک ماده مخدر طبیعی که در سوپورا فلاوسنس یافت می‌شود مرتبط است. علاوه بر این نشان داده شده است که IFN- $\gamma$  با القای اتوفازی سلول‌های اپیتلیال و آپوپتوز سلول T در یک مدل موشی سرطان‌زایی در معده را مهار می‌کند [۳۷].

نکته جالب توجه ارتباط بین پلی‌مورفیسم IRGM (Immunity-related GTPase family M protein) (rs 4958847 و rs 13361189) و سرطان معده در جمعیت قفقازی است که توسط بورادا و همکاران انجام گرفت. نشان داده شد که IRGM rs 4958847 خطر سرطان معده در این افراد را کاهش می‌دهد. IRGM روی کروموزوم ۵ q33.1 واقع شده و پروتئین M خانواده GTPase مرتبط با ایمنی را کد می‌کند که در شکل‌گیری واکوئل اتوفازی درگیر است [۳۸].

#### سایتوتوکسین (CagA)

CagA انکوپروتئین باکتریایی و شاخص ایمونوزنیک ۱۴۰- ۱۲۰ کیلودالتونی است که توسط جزایر پاتوژن Cag کد می‌شود و از طریق سیستم ترشحی تیپ ۴ (Type IV Secretion System, T4SS) وارد سلول میزبان می‌شود. جزیره پاتوژن Cag تقریباً شامل ۳۰ ژن که در طی دوره تکامل از یک منشا ناشناخته توسط باکتری کسب شده و در داخل ژن گلوتامات راسماز وارد شده است. سویه‌های باکتری ممکن است کل جزیره پاتوژن Cag را از دست داده باشند. پروتئین CagA از طریق سیستم ترشحی تیپ ۴ مستقیماً وارد سیتوپلاسم سلول‌های اپی‌تلیال می‌شود و در آنجا ریشه تیروزین آن توسط خانواده Src کیناز فسفریله می‌شود و مسیرهای انتقال پیام سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. اولین اثر فنوتیپی قابل مشاهده این توکسین تغییر شکل موفولوژیکی سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. این اثرات به حالت دراز شدن و پیدا کردن زواید بلند در سلول‌ها قابل مشاهده است که فنوتیپ مرغ مگس‌خوار (Hummingbird phenotype) نامیده می‌شود. دومین اثر مهم Cag تحریک انواع مختلف فاکتورهای رونویسی دخیل در کنترل اعمال ضروری سلولی نظیر تکثیر سلولی از طریق فاکتورهای نظیر c-jun و c-fos است. سومین عمل این پروتئین تحریک اتصالات بین

شده است. این فاکتور اخیراً به عنوان یک تنظیم‌کننده منفی اتوفازی در موکوزای معده بیماران و سلول‌های AGS عفونی شده با یک سویه VacA غیر فانکشنال (VacA s1m2) شناسایی شده است. در نتیجه CagA ممکن است باعث مهار اتوفازی از طریق مسیر سیگنالینگ c-Met-PI3k/Akt-mTOR (Mammalian Target of Rapamycin, mTOR) شود. علاوه بر این، این نویسندگان هم‌چنین دریافتند که P62 در بیوپسی معده بیماران عفونی شده با سویه‌های CagA+ در مقایسه با عفونی شده با سویه‌های CagA- بیان بیش‌تری دارند [۴۶].

### VAC A

ستوتوکسین واکوئل‌زا (VacA) به وزن ۸۸/۲ کیلودالتون بوده و الفاکنده ایجاد واکوئل در سلول‌های کشت بافتی است. واجد ناحیه N- انتهایی P33 و C- انتهایی P55 که به غشای پلاسمایی اتصال و وارد سلول‌های میزبان می‌گردد. این پروتئین تسهیل‌کننده شکل‌گیری بقای داخل سلولی در سلول‌های معده و افزایش‌دهنده شدت بیماری است که باعث اتوفازی در سلول‌های اپی‌تلیال معده می‌شود. اتوفازی القا شده توسط VacA سبب کاهش سطوح VacA شده و بقای هلیکوباکتر پیلوری را کاهش می‌دهد. قرار گرفتن طولانی‌مدت در معرض VacA اتوفازی را مختل کرده که این عمل توسط آنزیم کاتپسین D انجام می‌شود [۲۴]. VacA توکسین چند عملکردی که در کمپلکس اولیگومری بزرگ سر هم‌بندی شده و کانال‌های آنیونی را تشکیل می‌دهد. فعال‌کننده Calpain-1 در سلول‌های پاریتال که ترشح‌کننده اسید مناسب بوده و اسدیته معده را کاهش می‌دهد. VacA روی مرگ سلولی اثر کرده و به دنبال اندوسیتوز در میتوکندری جایگزین می‌شود که الفاکنده آپوپتوز در سلول‌های اپی‌تلیال معده است. VacA از طریق فعال‌سازی تشکیل پور در غشای داخلی میتوکندری، الفاکنده رهاسازی سیتوکروم C و باز پس‌گیری پروتئین ۱- مرتبط با Dynamin است. VacA هم‌چنین افزایش‌دهنده تکثیر و تزاید سلولی با تعدیل مسیرهای مرتبط با رشد مثل P38 و بتا-کاتینین می‌باشد. این ذاتی و اکتسابی میزبان را تغییر داده و تحریک‌کننده آزادسازی گرانول‌های ترش‌حی از ماست سل و رهاسازی سایتوکین‌های پیش‌التهابی در منوسیت و ائوزینوفیل‌ها می‌باشد. VacA سرکوب‌کننده این با واسطه سلول‌های T و B و مهارکننده عرضه آنتی‌ژن و افزایش‌دهنده کلونیزاسیون H پیلوری است. VacA افزایش‌دهنده بقای داخل سلولی هلیکوباکتر پیلوری است که مسیر اندوسیتی میزبان را تعدیل کرده و نیچ تکثیری ایجاد می‌کند. VacA ساختارهای واکوئلی ایجاد کرده و به‌عنوان یک مخزن داخل سلولی عمل می‌کند و به دنبال عفونت چنین ساختارهای واکوئلی ایجاد می‌گردد و نقش مهمی در نگه‌داری عفونت دارند. این واکوئل‌ها منشا اندوزومی تاخیری دارند و با حضور مارکرهای این اندوزومال تاخیری مثل Rab7, CD63, LAMP1 همراه است. حضور این مارکرها و کاهش PH در واکوئل‌های هلیکوباکتر پیلوری که با کاهش چشمگیر پروتئاز کاتپسین D در واکوئل‌های ایجاد شده توسط تیپ وحشی هلیکوباکتر پیلوری همراه بود [۵۰، ۴۹].

### VacA و اتوفازی

مشخص شده است که اتوفازی در بافت‌های موکوزال معده عفونی شده با هلیکوباکتر پیلوری CagA+ نسبت به سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری CagA- کم‌تر تولید می‌شود که با تجمع SQSTM1 (Sequestosome 1) و کاهش بیان LAMP1 همراه می‌باشد. SQSTM1 محموله اصلی رسپتور متصل به بیوبیوتین در سلول‌ها است که توسط اتولیزوزوم‌ها تخریب شده که نقص در اتوفازی منجر به تجمع SQSTM1 می‌گردد، بنابراین SQSTM1 نقش مفیدی در تولید سایتوکین‌های وابسته به NF-kB دارد. در شرایط آزمایشگاهی حذف ژن CagA با افزایش فعالیت اتوفازی، کاهش بیان SQSTM1 و سایتوکین‌ها همراه بود در حالی که بیان بیش از حد CagA سبب تنظیم‌کاهشی اتوفازی القا شده در اثر گرسنگی می‌گردد. بنابراین تولید سایتوکین‌ها با مهار اتوفازی افزایش یافته در حالی که با افزایش اتوفازی کاهش می‌یابد. نتایج حاکی از آن است که اتوفازی مهار شده توسط CagA منجر به تجمع SQSTM1 شده که این نیز خود منجر به رهاسازی سایتوکین‌های وابسته به NF-kB می‌گردد [۴۷].

حذف CagA توانایی فعالیت Akt کیناز در سایت Ser-473 را کاهش و اتوفازی را افزایش می‌دهد. C-Met siRNA به طور چشمگیری روی اتوفازی میانجی‌گری شده توسط CagA اثر می‌گذارد و سطوح p-Akt, p-mTOR, p-S6 را کاهش می‌دهد. هر دوی siRNA C-Met و داروی MK-2206 می‌توانند پاسخ‌های التهابی را معکوس کنند. این یافته‌ها نشان می‌دهند که احتمالاً CagA به عنوان تنظیم‌کننده منفی اتوفازی در پاسخ التهابی القا شده توسط هلیکوباکتر پیلوری عمل می‌کند مخصوصاً این‌که التهاب و اتوفازی مشخصه‌های اصلی بدخیمی معده هستند. هم‌چنین راه درمان جدیدی در مورد بدخیمی‌های معده به خصوص پروفیلاکسی و درمان باز می‌کند [۴۸].

CagA فعال‌کننده C-Met از طریق موتیف CRPIA (تکرار محافظت شده مسئول برای فعالیت مستقل از فسفوریل‌اسیون) که برای فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ PI3k/Akt و پاسخ‌های رونویسی پلئوتروپیک عفونت هلیکوباکتر پیلوری حیاتی می‌باشد از جمله فعال‌سازی NF-kB و بتا-کاتینین مسیر پیام‌رسانی



گرفته می‌شود تا سلول از پاتوژن‌های مهاجم خلاص شود. مطالعات نشان داد که VacA اتوفازی را در داخل بدن و شرایط آزمایشگاهی تغییر می‌دهد. بنابراین یک نقش محافظت سلولی ایفا می‌کند. در معرض قرار گرفتن VacA منجر به تجمع اتوفاگوزوم‌های ناقص و کاهش کاتپسین D می‌شود. فعالیت پورفورمینگ توکسین جهت اتوفازی لازم است مثل لیستریولیزین O لیستریا منوسیوتوز و سیتولیزین و بیروکلرا که می‌توانند سبب اتوفازی گردند. اتوفازی با عملکردهای سرکوب‌کننده تومور مرتبط است که سطوح تولید عوامل فعال اکسیژن (ROS) را مهار می‌کند. اتوفازی ناقص سبب افزایش ROS می‌شود و سبب ناپایداری ژنومی که منجر به تغییر شکل سرطانی می‌گردد [۱۸].

در عفونت هلیکوباکتر پیلوری اتوفازی در پاسخ به فاکتور ویرولانن VacA القا شده و نقش محافظتی سلولی را ایفا می‌کند بنابراین در معرض قرار گرفتن طولانی با VacA اتوفازی را مختل می‌کند که با استفاده از اتوفاگوزوم‌ها کاتپسین D کاهش یافته و فعالیت سوخت و ساز نیز کاسته می‌شود [۱۸].

مطالعات متعددی در مورد مشخص شدن وقایع پیام‌رسانی که موجب شروع اتوفازی توسط VacA می‌شود انجام شده است. تسوگاوا و همکاران از جمله کسانی بودند که شروع به روشن کردن این مساله پرداختند، مطالعات آن‌ها نشان می‌دهد p53 که یک فعال‌کننده mTOR می‌باشد، در این مسیر درگیر است. این محققان نشان دادند که ROS القاء شده توسط VacA فسفوریلاسیون AKT را تحریک می‌کند که پس از آن فسفوریلاسیون مولکول دیگری به نام MDM2 (Murine Double Minute 2)، را موجب می‌شود که جزء اصلی E3 یوبیکوئیتین لیگاز درگیر در تخریب P53 می‌باشد. این گروه نشان دادند که افزایش سطح MDM2 فسفوریله همراه با کاهش p53 پس از آلودگی با هلیکوباکتر پیلوری اتفاق می‌افتد. سطح MDM2 فسفوریله تنها در پاسخ به VacA s1m1 افزایش یافته است، در نتیجه این یافته القای اتوفازی منحصراً با VacA s1m1 انجام می‌شود. بنابراین، سیگنالینگ از طریق تخریب P53 به نظر می‌رسد حداقل یکی از مکانیسم‌هایی باشد که توسط VacA باعث القای اتوفازی در سلول‌های معده می‌شود. با توجه به این که درمان از طریق VacA موجب کاهش سطح ATP می‌شود، این طور تصور می‌شود که اتوفازی ناشی از VacA ممکن است از طریق مسیرهای سیگنالینگ Adenosine (AMPK) (Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase) نیز القاء گردد. با این حال، برای چنین احتمالی تحقیقات بیش‌تری ضروری می‌باشد [۲۹].

VacA هلیکوباکتر پیلوری القاکننده مرگ سلول اتوفازی در سلول‌های اپی‌تلیال معده از طریق مسیر استرس رتیکولوم اندوپلاسمیک است و می‌تواند با واکوتلاسیون پیش‌رفته و زخم معده و احتمالاً سرطان معده مرتبط باشد. شواهد نشان می‌دهد که اتوفازی در مرگ سلولی القا شده توسط VacA دخالت دارد [۵۱].

VacA باعث القای اتوفازی و افزایش مرگ سلول در کشت سلول سرطان معده در انسان می‌گردد. مهار اتوفازی می‌تواند مرگ سلول ناشی از VacA را در سلول‌های AGS کاهش دهد. علاوه بر این تعداد زیادی رتیکولوم اندوپلاسمیک (ER) مشاهده شده و فسفوریلاسیون یک زیر واحد از فاکتور ۲ آغاز ترجمه یوکاریوتی (زیر واحد ۱) در سلول‌های AGS تیمار شده با VacA افزایش می‌دهد. در حالی که سرکوب استرس ER می‌تواند باعث کاهش اتوفازی و مرگ سلولی از طریق نابودی فاکتور ۴ فعال‌کننده رونویسی و فاکتور رونویسی - ۳ القاکننده آسیب به DNA (DNA-Damage- inducible transcript 3) شود [۵۲].

علاوه بر این بیان سودوکیناز سه گانه همولوگ ۳ (tribbles homolog 3, TRIB3) که توسط VacA بر استرس ER به وجود می‌آید هم‌چنین نابودی TRIB3 می‌تواند مرگ سلولی ناشی از VacA را کاهش دهد. در نهایت مهار اتوفازی می‌تواند مرگ سلولی ناشی از VacAs1m1 و آپوپتوز را کاهش دهد. مهار آپوپتوز Z-VAD (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone) تأثیر معنی‌داری بر روی اتوفازی القا شده توسط VacAs1m1 نداشته به این ترتیب نتایج نشان داد که VacA باعث مرگ سلول‌های اتوفازی یکی از طریق استرس ER در سلول‌های اپی‌تلیال معده می‌شود [۵۲].

اتوفازی یک مکانیسم دفاعی میزبان علیه ارگانسیم‌های داخل سلولی مهاجم می‌باشد. هلیکوباکتر پیلوری با فرار از این سیستم پاسخ بقای داخل سلولی را افزایش می‌دهد. تغییر LC3-I سیتوزولیک به LC3-II و جایگزینی در غشای اتوفاگوزوم کلید اصلی القای اتوفازی است. اتوفازی پایداری داخل سلولی VacA را تعدیل می‌کند تا بقای هلیکوباکتر پیلوری را محدود کند. اتوفازی در سلول‌های میزبان شروع می‌شود تا توکسین‌های میکروبی را حذف کند. بنابراین از سلول در برابر آسیب‌های با واسطه توکسین محافظت می‌کند [۵۳].

سیتوتوکسین ایجادکننده واکوتل هلیکوباکتر پیلوری القاکننده اتوفازی ناقص است. هلیکوباکتر مکانیسم‌های اندوسیتیک میزبان را غصب کرده تا در واکوتل‌های بزرگ نیچ‌های داخل سلولی ایجاد کند تا این‌که بقای خودش را افزایش دهد. اتوفازی مسیر کلیدی تخریب اندوسیتی است که به طور معمول به کار

## تشکر و قدردانی

از همکاری گروه ایمنولوژی و گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی دانشگاه علوم پزشکی سمنان تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

## منابع

- [1] Steensma DP, Kyle RA, Shampo MA, Robin Warren J. Helicobacter pylori and peptic ulcer. *Mayo Clin Proc* 2016; 91: e129-130.
- [2] Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani GP, Shinoda S. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Front Public Health* 2014; 2: 103.
- [3] M Brown L. Helicobacter Pylori: Epidemiology and Routes of Transmission; 2000; 22: 283-297.
- [4] Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V. Epidemiology of stomach cancer. *Methods Mol Biol* 2009; 472: 467-477.
- [5] EL H, ZR M, Franco B. Epidemiology of helicobacter pylori Infection. *Helicobacter* 2014; 19: 1-5.
- [6] Vale FF, Vitor JM. Transmission pathway of Helicobacter pylori: does food play a role in rural and urban areas? *Int J Food Microbiol* 2010; 138: 1-12.
- [7] Salama NR, Hartung ML, Muller A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen Helicobacter pylori. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11: 385-399.
- [8] Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, Covacci A. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of Helicobacter pylori reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 1995; 63: 94-98.
- [9] Portal-Celhay C, Perez-Perez GI. Immune responses to Helicobacter pylori colonization: mechanisms and clinical outcomes. *Clin Sci* 2006; 110: 305-314.
- [10] Chu YT, Wang YH, Wu JJ, Lei HY. Invasion and multiplication of Helicobacter pylori in gastric epithelial cells and implications for antibiotic resistance. *Infect Immun* 2010; 78: 4157-4165.
- [11] Wang YH, Wu JJ, Lei HY. The autophagic induction in Helicobacter pylori-infected macrophage. *Exp Biol Med* (Maywood) 2009; 23: 178-180.
- [12] Sepulveda AR. Helicobacter, inflammation, and gastric cancer. *Curr Pathobiol Rep* 2013; 1: 9-18.
- [13] Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest* 2007; 117: 60-69.
- [14] Tang B, Li N, Gu J, Zhuang Y, Li Q, Wang HG, et al. Compromised autophagy by MIR30B benefits the intracellular survival of Helicobacter pylori. *Autophagy* 2012; 8: 1045-1057.
- [15] Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem* 2011; 80: 125-156.
- [16] Choi KS. Autophagy and cancer. *Exp Mol Med* 2012; 44: 109-120.
- [17] Greenfield LK, Jones NL. Modulation of autophagy by Helicobacter pylori and its role in gastric carcinogenesis. *Trend Microbiol* 2013; 21: 602-612.
- [18] Tsubawa H, Suzuki H, Saya H, Hatakeyama M, Hirayama T, Hirata K, et al. Reactive oxygen species-induced autophagic degradation of Helicobacter pylori CagA is specifically suppressed in cancer stem-like cells. *Cell Host Microbe* 2012; 12: 764-777.
- [19] Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. Helicobacter pylori infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis 2016; 39: 14-23.
- [20] Morris DH, Yip CK, Shi Y, Chait BT, Wang QJ. Beclin 1-VPS34 complex architecture: understanding the nuts and bolts of therapeutic targets. *Front Biol* (Beijing) 2015; 10: 398-426.
- [21] Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech* 2013; 6: 25-39.
- [22] Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 2005; 12: 1542-1552.
- [23] Zens B, Sawa-Makarska J, Martens S. In vitro systems for Atg8 lipidation. *Methods* 2015; 75: 37-43.

توانایی هلیکوباکتر پیلوری برای دست‌کاری در مسیر اتوفازی میزبان به عنوان یکی از جنبه‌های مهم پاتوژن آن در نظر گرفته می‌شود. در حال حاضر مطالعات متعددی نشان‌دهنده این موضوع می‌باشد که عفونت با هلیکوباکتر پیلوری سبب ایجاد اتوفازی در هر دو سلول‌های اپی‌تلیال معده و فاگوسیت‌های حرفه‌ای می‌شود. در سلول‌های اپی‌تلیال معده VacA فاکتور لازم و کافی برای ایجاد اتوفازی می‌باشد. اخیراً یاهيرو و همکارانش نشان داده‌اند که اتوفازی ناشی از VacA، از طریق اتصال VacA به پروتئین ۱ مرتبط با گیرنده لیوپروتئین (Low density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP1) شروع می‌شود. این مسیر با خاموش کردن بیان ژن LRP1 به کمک siRNA اینترنالیزه شده مورد تأیید قرار گرفته است. علاوه بر این، اتوفازی ناشی از VacA به نظر می‌رسد وابسته به اینترنالیزه شدن این توکسین باشد. جالب توجه است، فقط VacA S1m1 و نه VacA S1m2 با LRP1 واکنش داده و در اتوفازی نقش دارد و منطقیه VacAm2 در اتصال VacA-LRP1 دخالتی ندارد. همچنین این مطالعه نشان داد که با استفاده از siRNA خاموش کردن بیان LRP1 که اتوفازی متصل به LRP1 مستقل از دیگر گیرنده‌های VacA، از جمله RPTP<sup>β</sup> (Receptor Protein Tyrosine Phosphatase) و فیروکتین می‌باشد [۱۷].

## نتیجه‌گیری

اتوفازی از طریق محرک‌های شیمیایی مثل هیپوکسی، تخلیه انرژی، دما، هورمون‌ها، عوامل دارویی، سیتوکین‌ها و پیشرفت بیماری ایجاد می‌شود. به طور اجتناب‌ناپذیری، سلول‌هایی که دچار اختلال و نقص در اتوفازی هستند، تجمع مواد سیتوتوکسیک را در پی دارند که منجر به افزایش جهش در DNA شده که از این طریق ایجاد سرطان را تقویت می‌کنند. توانایی هلیکوباکتر پیلوری برای دست‌کاری در مسیر اتوفازی میزبان به عنوان یکی از جنبه‌های مهم پاتوژن آن می‌باشد. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که عفونت با هلیکوباکتر پیلوری سبب ایجاد اتوفازی در هر دو سلول‌های اپی‌تلیال معده و فاگوسیت‌های حرفه‌ای می‌شود. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که برای ایجاد اتوفازی در سلول‌های اپی‌تلیال معده، VacA فاکتور لازم و کافی بوده که باعث مرگ سلول‌های اتوفازی از طریق استرس ER در سلول‌های اپی‌تلیال معده می‌شود. در حالی که CagA تنظیم‌کننده منفی این پدیده می‌باشد که با حذف این ژن از هلیکوباکتر پیلوری اتوفازی افزایش یافته و تولید سایتوکین‌های التهابی کاهش پیدا می‌کند.

- [41] Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S, Yuasa H, Saadat I, et al. EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 23130-23137.
- [42] Vaziri F, Peerayeh SN, Alebouyeh M, Maghsoudi N, Azimzadeh P, Siadat SD, Zali MR. Novel effects of *Helicobacter pylori* CagA on key genes of gastric cancer signal transduction: a comparative transfection study. *Pathog Dis* 2015; 73.
- [43] Fazeli Z, Alebouyeh M, Rezaei Tavirani M, Azimirad M, Yadegar A. *Helicobacter pylori* CagA induced interleukin-8 secretion in gastric epithelial cells. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2016; 9: S42-S46.
- [44] Peters T, Owen R, Slater E, Varea R, Teare E, Saverymuttu S. Genetic diversity in the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island and effect on expression of anti-CagA serum antibody in UK patients with dyspepsia. *J Clin Pathol* 2001; 54: 219-223.
- [45] Lee KE, Khoi PN, Xia Y, Park JS, Joo YE, Kim KK, et al. *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 8192-8202.
- [46] Li N, Tang B, Jia YP, Zhu P, Zhuang Y, Fang Y, et al. *Helicobacter pylori* CagA Protein Negatively Regulates Autophagy and Promotes Inflammatory Response via c-Met-PI3K/Akt-mTOR Signaling Pathway. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7: 417.
- [47] Li N, Tang B, Jia YP, Zhu P, Zhuang Y, Fang Y, et al. *Helicobacter pylori* CagA protein negatively regulates autophagy and promotes inflammatory response via c-Met-PI3K/Akt-mTOR signaling pathway. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7: 417.
- [48] Gunn MC, Stephens JC, Stewart JA, Rathbone BJ, West KP. The significance of cagA and vacA subtypes of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of inflammation and peptic ulceration. *J Clin Pathol* 1998; 51: 761-764.
- [49] Palframan SL, Kwok T, Gabriel K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2: 92.
- [50] Borlace GN, Jones HF, Keep SJ, Butler RN, Brooks DA. *Helicobacter pylori* phagosome maturation in primary human macrophages. *Gut Pathogens* 2011; 3: 3-6.
- [51] Zhu P, Xue J, Zhang ZJ, Jia YP, Tong YN, Han D, et al. *Helicobacter pylori* VacA induces autophagic cell death in gastric epithelial cells via the endoplasmic reticulum stress pathway. *Cell Death Disease* 2017; 8: 3207.
- [52] Zhang K, Kaufman RJ. Identification and characterization of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in vivo. *Methods Enzymol* 2008; 442: 395-419.
- [53] Terebiznik MR, Raju D, Vazquez CL, Torbricki K, Kulkarni R, Blanke SR, et al. Effect of *Helicobacter pylori*'s vacuolating cytotoxin on the autophagy pathway in gastric epithelial cells. *Autophagy* 2009; 5: 370-379.
- [24] Castano-Rodriguez N, Kaakoush NO, Goh KL, Fock KM, Mitchell HM. Autophagy in *Helicobacter pylori* infection and related gastric cancer. *Helicobacter* 2015; 20: 353-369.
- [25] Tekirdag K, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Joint by a chaperone. *J Biol Chem* 2018; 293: 5414-5424.
- [26] Chiang HL, Dice JF. Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J Biol Chem* 1988; 263: 6797-6805.
- [27] Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69: 1125-1136.
- [28] White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 401-410.
- [29] Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009; 137: 1062-1075.
- [30] Sun Y, Peng ZL. Autophagy, Beclin 1, and Their Relation to Oncogenesis 2008; 39: 287-90.
- [31] Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2006; 10: 51-64.
- [32] Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, et al. Activated ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* 2011; 25: 460-470.
- [33] Lock R, Roy S, Kenific CM, Su JS, Salas E, Ronen SM, Debnath J. Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Mol Biol Cell* 2011; 22: 165-178.
- [34] Zhou S, Zhao L, Kuang M, Zhang B, Liang Z, Yi T, et al. Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Cancer Lett* 2012; 323: 115-127.
- [35] Choi KS. Autophagy and cancer. *Exp Mol Med* 2012; 44: 109-120.
- [36] Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: 709-730.
- [37] Li Y, Zhang J, Ma H, Chen X, Liu T, Jiao Z, et al. Protective role of autophagy in matrine-induced gastric cancer cell death. *Int J Oncol* 2013; 42: 1417-1426.
- [38] Tu SP, Quante M, Bhagat G, Takaishi S, Cui G, Yang XD, et al. Interferon- $\gamma$  inhibits gastric carcinogenesis by inducing epithelial cell autophagy and T cell apoptosis. *Cancer Res* 2011; 71: 4247-4259.
- [39] Kuo SH, Chen LT, Lin CW, Yeh KH, Shun CT, Tzeng YS, et al. Expressions of the CagA protein and CagA-signaling molecules predict <math>\text{em}&\text{gt}</math> *Helicobacter pylori*</math> dependence of early-stage gastric DLBCL. *Blood* 2017; 129: 188.
- [40] Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci* 2005; 96: 835-843.

## Review Article

# Role of autophagy associated with *Helicobacter pylori* CagA and VacA toxins in gastric cancer

Bahman Yousefi (Ph.D)<sup>1</sup>, Majid Eslami (Ph.D)<sup>\*2</sup>, Parviz Kokhaei (Ph.D)<sup>3,4</sup>, Saeid Valizadeh (Ph.D)<sup>2</sup>, Abdolmajid Ghasemian (Ph.D)<sup>5</sup>

1 - Dept. of Immunology, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

2 - Dept. of Bacteriology and Virology, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

3 - Cancer Research Center, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

4 - Immune and Gene Therapy Lab, Cancer Centre Karolinska, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

5 - Dept. of Microbiology, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

\* Corresponding author.

+98 9144078609

M.eslami@semums.ac.ir

Received: 3 Jun 2018; Accepted: 8 Dec 2018

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a gram-negative microaerophilic bacterium that has been introduced as a cause of mucosal inflammation and gastric cancer. The most important pathogenic factors are VacA and CagA, which are associated with increased disease severity in clinical strains. Autophagy is a protected lysosomal degradation pathway degrading cytoplasmic content and is important in host cell defense, survival, differentiation and development. It can have a tumor suppressor activity or cancer progression and plays an important role in host safety and homeostatic. *H. pylori* can affect host pathogenic pathway through VacA and CagA virulence factors and carcinogenesis. Increasing autophagy in tumor cells prevents the accumulation of non-functional mitochondria that can disrupt tumorigenicity.

The ability of *H. pylori* to manipulate host pathogenesis pathway is considered as one of the important aspects of its pathogenesis. Several studies have shown that infection with *H. pylori* causes autophagy in both gastric epithelial cells and phagocytes. In the epithelial cells of the stomach, VacA is a necessary factor in autophagy. While CagA is a negative regulator of the phenomenon, the elimination of this gene from *H. pylori* has increased autophagy and the production of inflammatory cytokines is reduced.

**Keywords:** Autophagy, Gastric Cancer, *Helicobacter Pylori*, Bacterial Antigens, Bacterial Proteins