

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

MILOŠ Z. MANDIĆ

**Interakcija mitogenom aktiviranih protein
kinaza i autofagije u diferencijaciji HL-60
leukemijskih ćelija u makrofage forbol-12-
miristat-13-acetatom**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

MILOŠ Z. MANDIĆ

**Interaction of mitogen-activated protein
kinases and autophagy in macrophage
differentiation of HL-60 leukemia cells by
phorbol-12-myristate-13-acetate**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022

MENTOR:

Prof. dr Vladimir Trajković, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR:

dr Maja Misirkić Marjanović, naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“-
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Doc. dr Vladimir Perović, docent, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Darko Ćirić, docent, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Biljana Ristić, naučni saradnik, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Ljubica Vučićević, viši naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“-
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Silvana Andrić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom
Sadu

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju, Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić” Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Istraživanje je realizovano u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja III 41025 „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske balans u terapiji tumora i neuro-immuno-endokrinih poremećaja“ čiji je rukovodilac prof. dr Vladimir Trajković i 173053 „Uloga autofagije u regulaciji smrti tumorskih ćelija“ čiji je rukovodilac dr Ljubica Harhaji Trajković.

Zahvaljujem se:

prof. dr Vladimiru Trajkoviću na rukovođenju pri izradi eksperimenata, pomoći prilikom izrade i pisanja publikacije i doktorske disertacije, ukazanom poverenju i dragocnim savetima

dr Maji Misirkić Marjanović na strpljenju, predanosti i posvećenosti u svim fazama doktorske disertacije, nesebičnoj podršci kada god je za to bilo potrebno, znanju koje je uvek delila sa mnom kao i podsticaju da se disertacija privede kraju

doc. dr Vladimiru Peroviću i doc. dr Darku Ćiriću na nesebičnoj pomoći u realizaciji eksperimenata i korisnim savetima prilikom uobličavanja doktorske disertacije

dr Ljubici Vučićević na izuzetnoj pomoći u izvođenju eksperimenata i razrešenju kada su se oni zakomplikovali, uloženom trudu, inspiraciji i upornosti da ova disertacija dobije kvalitet kakav zaslužuje

dr Biljani Ristić na korisnim savetima i sugestijama tokom pisanja doktorske disertacije i pomoći u realizaciji eksperimenata

prof. dr Silvani Andrić na pomoći, korisnim savetima i sugestijama prilikom uobličavanja doktorske disertacije

dr Ljubici Harhaji Trajković, na rukovođenju pri izradi eksperimenata, prenesenom znanju, podršci i na ukazanom poverenju da se ideja sprovede u delo

dr Maji Jovanović Tucović na znanju, strpljenju i izdvojenom vremenu u izvođenju eksperimenata, podršci, kao i korisnim savetima i sugestijama

dr Mihajlu Bošnjaku na prvim koracima u izvođenju Western blota i pomoći da se eksperimenti završe na vreme

dr Kristini Janjetović, dr Verici Paunović, dr Marini Stamenković, dr Katarini Aršikin Csordás, dr Milici Kosić, dr Danijeli Stevanović i dr Ljiljani Božić na pomoći tokom studija i savetima u izradi eksperimenata

prof. dr Ivanki Marković, prof. dr Aleksandri Isaković i tehničkom osoblju sa Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju

katedri za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, zadovoljstvo je bilo raditi u prijateljskom okruženju

svojoj porodici, pre svega mami i sestri na neizmernoj ljubavi i podršci tokom doktorskih studija.

Interakcija mitogenom aktiviranih protein kinaza i autofagije u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija u makrofage forbol-12-miristat-13-acetatom

SAŽETAK

Forbol-12-miristat-13-acetat (PMA), aktivator protein kinaze C (PKC), indukuje diferencijaciju ćelija akutne mijeloidne leukemije (AML) u makrofage. Pokazano je da autofagija učestvuje u diferencijaciji ćelija hematopoeze i leukemijskih ćelija. Mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) mogu da aktiviraju autofagiju i diferencijaciju ćelija. Cilj ove disertacije je da se ispita uloga autofagije i MAPK u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija u makrofage pod dejstvom PMA, kao i uloga MAPK u indukciji autofagije. PMA je indukovala diferencijaciju HL-60 ćelija u makrofage, što je pokazano povećanom ekspresijom makrofagnih markera CD11b, CD13, CD14, CD45, *EGR1*, *CSF1R* i *IL-8*. Prisustvo autofagije u diferencijaciji HL-60 ćelija pokazano je detekcijom zakišeljavanja citoplazme, povećanjem autofagnog fluksa, povećanjem ekspresije *ATG* gena i oslobađanjem beklina-1 iz kompleksa sa Bcl-2. Autofagija je aktivirana izlaskom autofagnog represora ZKSCAN3 iz jedra i ulaskom aktivatora autofagije FOXO1/3 i TFEB u jedro HL-60 ćelija. Aktivacija autofagije je nezavisna od AMPK i Akt/mTORC1. Međutim, PMA je aktivacijom PKC dovela do stimulacije ERK i JNK, što je povećalo konverziju LC3-I u LC3-II. Farmakološka i genska inhibicija ERK ili JNK je smanjila konverziju LC3, ekspresiju *ATG* gena, premeštanje FOXO1/3 i TFEB u jedro, disocijaciju beklina-1 iz kompleksa sa Bcl-2 i ekspresiju makrofagnih markera CD11b, CD45, *CSF1R*, *EGR1* i *IL-8*. Farmakološka i genska inhibicija autofagije je sprečila diferencijaciju HL-60 ćelija u makrofage. Ovi rezultati ukazuju da ERK i JNK učestvuju u diferencijaciji HL-60 ćelija u makrofage pod dejstvom PMA, aktivacijom autofagije, što predstavlja potencijalnu metu za poboljšanje diferencijacione terapije AML.

Ključne reči: akutna mijeloidna leukemija, forbol-12-miristat-13-acetat, diferencijacija, autofagija, beclin-1, ERK, JNK

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK:

Interaction of mitogen-activated protein kinases and autophagy in macrophage differentiation of HL-60 leukemia cells by phorbol-12-myristate-13-acetate

ABSTRACT

Protein kinase C (PKC) activator phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) induces macrophage differentiation of acute myeloid leukemia (AML) cells. Autophagy has been shown to participate in the differentiation of hematopoietic and leukemic cells. It is well known that mitogen-activated protein kinases (MAPK) can activate autophagy and cell differentiation. The aim of this thesis is to examine the role of autophagy and MAPK activation in PMA-induced macrophage differentiation of HL-60 leukemia cells as well as the role of MAPK in the induction of autophagy. PMA induced macrophage differentiation of HL-60 cells, as shown by increased expression of macrophage markers CD11b, CD13, CD14, CD45, *CSF1R*, *EGR1* and *IL-8*. The activation of autophagy during the differentiation of HL-60 cells has been demonstrated by the increase of cytoplasmic acidification, augmented autophagic flux, increased *ATG* gene expression, and the release of beclin-1 from the complex with Bcl-2. Autophagy in HL-60 cells has been activated by the cytoplasmic translocation of the autophagy repressor ZKSCAN3 and nuclear translocation of autophagy activators FOXO1/3 and TFEB. Stimulation of autophagy was independent of AMPK and Akt/mTORC1 activation. However, PMA activation of PKC stimulated ERK and JNK and increased the LC3 conversion. Pharmacological and genetic inhibition of ERK or JNK reduced LC3 conversion, *ATG* gene expression, FOXO1/3 and TFEB nuclear translocation and expression of macrophage markers CD11b, CD45, *CSF1R*, *EGR1* and *IL-8*. Inhibition of autophagy suppressed differentiation of HL-60 leukemia cells induced by PMA. These results indicate that ERK and JNK-dependent autophagy participates in PMA-induced differentiation of HL-60 cells into macrophages, which represents a potential target for improving AML differentiation therapy.

Keywords: acute myeloid leukemia, phorbol 12-myristate 13-acetate, differentiation, autophagy, beclin-1, ERK, JNK

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Molecular medicine

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Akutna mijeloidna leukemija | 1 |
| 1.2. Diferencijaciona terapija | 4 |
| 1.3. Protein kinaza C | 5 |
| 1.4. Forbol 12-miristat 13-acetat | 5 |
| 1.5. Autofagija..... | 7 |
| 1.5.1. Mehanizam indukcije autofagije..... | 8 |
| 1.5.2. Regulacija PI3KC3-C1 kompleksa | 9 |
| 1.5.3. Uloga mTORC1 kompleksa u autofagiji | 10 |
| 1.5.4. Regulacija ekspresije autofagnih gena transkripcionim faktorima | 10 |
| 1.6. Uloga autofagije u diferencijaciji leukemijskih ćelija..... | 12 |
| 1.7. Mitogenom aktivirane protein kinaze..... | 12 |
| 1.7.1. ERK..... | 13 |
| 1.7.2. Uloga ERK u regulaciji autofagije..... | 14 |
| 1.7.3. JNK | 15 |
| 1.7.4. Uloga JNK u regulaciji autofagije | 16 |
| 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 17 |
| 3. MATERIJAL I METODE | 18 |
| 3.1. Rastvori i reagensi | 18 |
| 3.2. Ćelijska kultura..... | 19 |
| 3.3. Ispitivanje markera diferencijacije, parametara ćelijske smrti i autofagije metodom protočne citofluorimetrije..... | 20 |
| 3.3.1. Detekcija ćelija u apoptozi i nekrozi..... | 20 |
| 3.3.2. Ispitivanje faza ćelijskog ciklusa | 20 |
| 3.3.3. Merenje ekspresije površinskih markera makrofaga | 21 |
| 3.3.4. Ispitivanje autofagije u ćelijama | 21 |
| 3.3.5. Određivanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta | 21 |
| 3.4. Određivanje nivoa ekspresije iRNK za autofagne i makrofagne gene..... | 22 |
| 3.4.1. Izolacija RNK | 22 |
| 3.4.2. Reverzna transkripcija..... | 22 |
| 3.4.3. Reakcija lančanog umnožavanja sa detekcijom proizvoda u realnom vremenu..... | 23 |
| 3.5. Konfokalna mikroskopija | 24 |
| 3.6. Imunoblot analiza | 24 |
| 3.6.1. Merenje koncentracije proteina i priprema uzoraka | 24 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.6.2. | Elektroforeza i transfer..... | 25 |
| 3.6.3. | Imunoblot..... | 26 |
| 3.7. | Izolovanje ćelijskih frakcija | 26 |
| 3.8. | Ko-imunoprecipitacija..... | 27 |
| 3.8.1. | Prečišćavanje lizata | 27 |
| 3.8.2. | Imunoprecipitacija | 28 |
| 3.8.3. | Detekcija | 28 |
| 3.9. | Nukleoporacija | 28 |
| 3.10. | Statistička analiza | 29 |
| 4. | REZULTATI | 30 |
| 4.1. | Ispitivanje citotoksičnog dejstva PMA na HL-60 leukemijske ćelije | 30 |
| 4.2. | PMA diferencira HL-60 leukemijske ćelije u makrofage | 31 |
| 4.2.1. | Uticao PMA na morfologiju HL-60 leukemijskih ćelija | 31 |
| 4.2.2. | PMA indukuje zastoj u G ₀ /G ₁ fazi ćelijskog ciklusa HL-60 leukemijskih ćelija | 31 |
| 4.2.3. | PMA indukuje ekspresiju makrofagnih markera u HL-60 leukemijskim ćelijama | 32 |
| 4.3. | PMA indukuje autofagiju u HL-60 leukemijskim ćelijama | 34 |
| 4.3.1. | PMA indukuje konverziju LC3 i povećava nivo ATG7 i p62 bez uticaja na ekspresiju beklina-1 u HL-60 leukemijskim ćelijama | 34 |
| 4.3.2. | PMA stimuliše autofagni fluks u HL-60 leukemijskim ćelijama | 35 |
| 4.3.3. | PMA indukuje agregaciju LC3 u HL-60 leukemijskim ćelijama | 35 |
| 4.3.4. | PMA stimuliše povećanje broja kiselih vezikula u citoplazmi HL-60 leukemijskih ćelija | 36 |
| 4.3.5. | PMA aktivira transkripciju <i>ATG</i> gena u HL-60 leukemijskim ćelijama | 37 |
| 4.3.6. | PMA stimuliše transkripciju <i>ATG</i> gena u HL-60 ćelijama premeštanjem aktivirajućih transkripcionih faktora autofagije u jedro i represora u citoplazmu..... | 38 |
| 4.4. | Indukcija autofagije sa PMA je nezavisna od aktivacije AMPK i Akt/mTORC1 signalnih puteva u HL-60 leukemijskim ćelijama | 39 |
| 4.5. | PMA aktivira PKC i MAP kinaze u HL-60 leukemijskim ćelijama | 40 |
| 4.6. | PMA indukuje autofagiju aktivacijom ERK i JNK u HL-60 leukemijskim ćelijama..... | 41 |
| 4.7. | PMA indukuje ERK/JNK-zavisnu autofagiju aktivacijom PKC u HL-60 leukemijskim ćelijama | 42 |
| 4.8. | Utišavanje ekspresije <i>MKK1</i> i <i>MKK7</i> gena smanjuje autofagni fluks i nivo p62 u HL-60 leukemijskim ćelijama tretiranim sa PMA | 44 |
| 4.9. | ERK i JNK učestvuju u transkripcionoj aktivaciji autofagije u HL-60 leukemijskim ćelijama pod dejstvom PMA | 45 |
| 4.10. | ERK i JNK stimulišu transkripciju <i>ATG</i> gena u HL-60 ćelijama premeštanjem aktivirajućih transkripcionih faktora autofagije u jedro | 46 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.11. | ERK i JNK stimulišu autofagiju disocijacijom beklina-1 od Bcl-2 u HL-60 leukemijskim ćelijama tretiranim sa PMA..... | 47 |
| 4.12. | ERK i JNK učestvuju u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija pod dejstvom PMA . | 49 |
| 4.13. | PKC učestvuje u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija pod dejstvom PMA..... | 50 |
| 4.14. | Autofagija učestvuje u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija pod dejstvom PMA... | 50 |
| 4.15. | Uloga reaktivnih kiseoničnih vrsta u aktivaciji MAP kinaza, autofagije i diferencijacije HL-60 leukemijskih ćelija indukovanoj sa PMA..... | 52 |
| 5. | DISKUSIJA | 54 |
| 6. | ZAKLJUČCI | 67 |
| 7. | LITERATURA | 68 |

1. UVOD

1.1. Akutna mijeloidna leukemija

Akutna mijeloidna leukemija (engl. *acute myeloid leukemia*, AML) predstavlja maligno oboljenje u kojem dolazi do proliferacije nezrelih mijeloidnih ćelija u koštanoj srži, perifernoj cirkulaciji i drugim tkivima (1). Diferencijacija hematopoetskih stem ćelija (engl. *hematopoietic stem cell*, HSC) je oslabljena i dolazi do akumulacije ćelija koje su zaustavljene u različitim stadijumima diferencijacije (2). Ovaj tip leukemije je heterogen u morfološkim, imunofenotipskim i genetičkim karakteristikama. Produkcija ćelija hematopoeze je usporena zbog čega dolazi do anemije, neutropenije i trombocitopenije (2). Incidenca AML raste sa godinama i značajno se povećava kod pacijenata starijih od šezdeset godina. Kada se uporede sve starosne grupe, incidenca je veća kod muškaraca nego kod žena. Incidenca AML u Evropi prema podacima iz 2013. iznosi 5 pacijenata na 100 000 stanovnika (3), dok je incidenca AML u beogradskoj populaciji za period od 1996. do 2013. iznosila 2,73 na 100 000 stanovnika (4). AML je izlečiva kod 35%-40% pacijenata koji su mlađi od 60 godina, dok su prognoze kod starijih pacijenata lošije (3).

Hromozomske aberacije kao što su delecije i translokacije identifikovane su kod oko 50% pacijenata sa AML i prepoznate su kao genetički faktori koji utiču na uzrok i promociju bolesti (5). Nasuprot tome, kod preostalih 50% pacijenata je prisutan normalni kariotip zbog čega je neophodna detekcija markera bolesti na molekularnom nivou (6). Kod ove grupe je pokazano da svaki pacijent ima u proseku trinaest mutacija od kojih su osam nasumične mutacije, dok su preostalih pet mutacije koje dovode do razvoja leukemije (engl. *driver mutation*) (7). Mutacije koje dovode do razvoja leukemije su detektovane u tirozin-kinaznim receptorima kao što su FLT3 (engl. *FMS-like tyrosine kinase 3*) i c-KIT (engl. *c-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*), GTP-azama (engl. *guanosine triphosphatase*) NRAS (engl. *neuroblastoma ras viral oncogene homolog*) i KRAS (engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), transkripcionim faktorima koji učestvuju u diferencijaciji (RUNX1 (engl. *Runt-related transcription factor 1*), C/EBP α (engl. *CCAAT/enhancer-binding protein α*) i GATA2 (engl. *GATA binding protein 2*)), epigenetičkim regulatorima DNMT3A (engl. *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A*) i izocitratdehidrogenazi 1 i 2 (engl. *isocitrate dehydrogenase*), tumor supresorima WT1 (engl. *Wilm's tumor 1*) i p53, i drugim genima (8-11).

Translokacije često obuhvataju gene za transkripcione faktore koji regulišu hematopoezu i mogu da dovedu do formiranja fuzionih onkoproteina koji remete funkciju transkripcionih faktora i sprečavaju hematopoetsku diferencijaciju. Kod akutne promijelocitne leukemije (engl. *acute promyelocytic leukemia*, APL) onkoprotein, nastao fuzijom proteina promijelocitne leukemije (engl. *promyelocytic leukemia protein*, PML) i receptora α za koji se vezuje retinoična kiselina (engl. *retinoic acid receptor alpha*, RAR α), epigenetičkim mehanizmima suprimira ekspresiju ciljnih gena koji učestvuju u diferencijaciji zbog čega dolazi do su zaustavljanja ćelija u promijelocitnoj fazi (12). Ujedno, PML-RAR α onkoprotein remeti funkciju PML proteina koji učestvuje u popravci oštećenja DNK (dezoksiribonukleinska kiselina, DNK) i indukciji apoptoze čime su tumor supresorski mehanizmi oslabljeni (12). Još jedan od primera je RUNX1 transkripcioni faktor koji je ključan u diferencijaciji različitih ćelija hematopoeze (13). Fuzioni onkoprotein RUNX1-ETO (engl. *Eight-Twenty-One*, ETO) sprečava transkripciju ciljnih gena koje aktivira RUNX1 epigenetičkim mehanizmima za utišavanje ekspresije gena (13). Oba fuzionna onkoproteina PML-RAR α i RUNX1-ETO sprečavaju rad i drugih hematopoetskih transkripcionih faktora kao što je PU.1 (engl. *purine rich box-1*) tako što smanjuju njegovu ekspresiju i sprečavaju vezivanje PU.1 za promotorska mesta (14). Kod pacijenata sa normalnim kariotipom, mutacije aktiviraju receptore sa tirozin kinaznom aktivnošću. Poznata je mutacija FLT3-ITD kinaze (engl. *FMS-like tyrosine kinase*

3-internal tandem duplication) koja promoviše proliferaciju i sprečava apoptozu i diferencijaciju hematopoetskih stem ćelija i progenitorskih ćelija (15). Takođe, mutacije mogu da poremete epigenetsku regulaciju gena koji učestvuju u diferencijaciji. Mutirane izoforme izocitrat dehidrogenaze (IDH1 i IDH2) proizvode 2-hidroksiglutarat koji dovodi do metilacije DNK i histona čime je sprečena indukcija diferencijacije (16). Mutacija DNMT3A može da poveća ili smanji metilaciju određenih gena i tako spreči diferencijaciju (17).

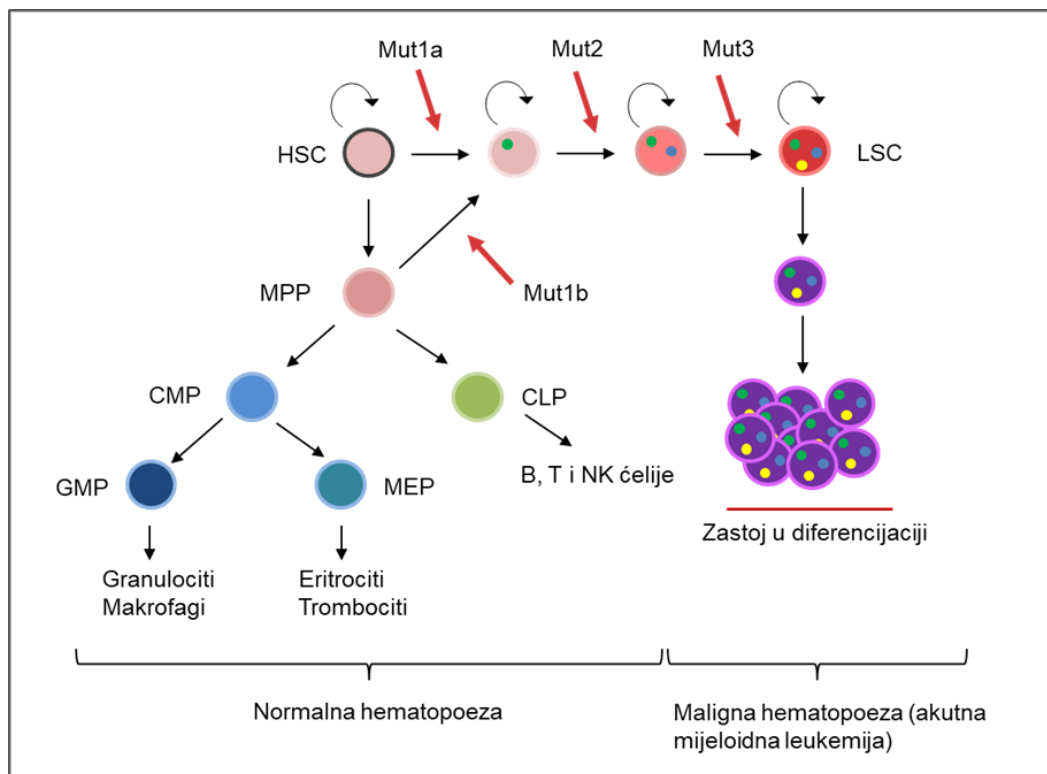
Hromozomske aberacije i mutacije predstavljaju važne prognostičke faktore na osnovu kojih je izvršena klasifikacija ishoda bolesti u tri grupe: povoljne, srednje i teške (18). Kod pacijenata mlađih od 60 godina, petogodišnje preživljavanje je procenjeno 64% kod pacijenata sa povoljnim ishodom, 42% kod srednje-rizičnih i 20% kod pacijenata sa nepovoljnim ishodom (19). Na osnovu etiologije, AML se dele na tri kategorije: sekundarne AML koje su povezane sa prethodnim mijelodisplastičnim sindromom ili drugim mijeloproliferativnim oboljenjima, AML nastala usled primene hemioterapije (engl. *therapy-related AML*) i *de novo* AML (20). Prema novijoj klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije na osnovu morfoloških, citohemijskih, imunofenotipskih, molekularnih i kliničkih parametara, AML se klasifikuje u sedam kategorija: AML sa rekurentnim genskim abnormalnostima, AML sa mijelodisplastičnim promenama, AML nastala usled primene citotoksične terapije, neklasifikovne AML, mijeloidni sarkom, mijeloidna proliferacija povezana sa Daunovim sindromom i neoplazma blastnih plazmocitoidnih dendritskih ćelija (21, 22).

Dijagnoza AML se bazira na prisustvu više od 20% mijeloidnih blasta u koštanoj srži ili perifernoj cirkulaciji. Ako je manje od 20% blasta, dijagnoza može da se uspostavi i na osnovu prisustva hromozomskih aberacija. Određivanje tipa AML zahteva multidisciplinarni pristup koji podrazumeva imunohistohemijske, citohemijske i molekularne analize (1). Morfološki posmatrano, ćelije blasta variraju u veličini, nešto su veće od limfocita i mogu da dostignu veličinu monocita (8). U ovim ćelijama se formiraju agregati citoplazmatskih granula koje su bogate mijeloperoksidazom pod nazivom Auerova tela (23, 24). Mijeloblasti ekspiriraju markere koji su prisutni i kod zdravih mijeloidnih ćelija kao što su CD13, CD33 i CD34. U zavisnosti od toga u kom stadijumu diferencijacije su ćelije zaustavljene one mogu da ekspiriraju monocitne, eritroidne ili megakariocitne markere zbog čega se mogu razlikovati akutna monocitna, eritroidna i megakarioblastna leukemija (8).

Poreklo, održavanje, progresija i heterogenost tumora se objašnjavaju stohastičkim modelom (model klonalne evolucije) i hijerarhijskim modelom (model tumorskih stem ćelija) koji se međusobno ne isključuju (25, 26). Prema modelu klonalne evolucije leukemijske ćelije sa različitim genetičkim i fenotipskim osobinama (leukemijski klonovi) prolaze kroz evolucione mehanizme kao što su genetički drift (slučajno uzorkovanje) i prirodna selekcija. Prednost leukemijskog klona u populaciji zavisi od vrste i broja mutacija koje poseduje, prisutnih faktora rasta i citokina kao i uticaja spoljašne sredine (primena citotoksične terapije) i dr. (27). Prema prvom modelu, bilo koja leukemijska ćelija može da postane leukemijska stem ćelija, dok prema drugom modelu samo određena populacija leukemijskih ćelija ima osobine stem ćelija (25, 26). Ove stem ćelije su prvi put eksperimentalno pokazane kod AML tako što je transplantacija leukemijskih stem ćelija u koštanoj srži kod imunokomprovitovanih miševa indukovala leukemiju (25). Leukemijske stem ćelije imaju sposobnost samoobnavljanja što im omogućava da se podele i budu u nediferenciranom stanju (28, 29). One mogu i da se diferenciraju u blaste koji proliferišu ali ne mogu da se samoobnavljaju tj. da postanu stem ćelije (30). Kao rezultat diferencijacije leukemijskih stem ćelija nastaju različiti leukemijski klonovi što podseća na hijerarhijsku organizaciju ćelija hematopoeze (25).

Kod AML je otkriveno da se mutacije u kinazama koje regulišu proliferaciju često javljaju zajedno sa hromozomskim rearanžmanima u genima za hematopoetske transkripcione faktore (31). Postavljena je (engl. *two-hit model*) hipoteza da AML nastaje kao posledica mutacije gena koji regulišu diferencijaciju zajedno sa mutacijama gena koji kontrolišu proliferaciju (31). Ove mutacije dovode do maligne transformacije hematopoetskih stem ćelija u leukemijske stem ćelije (Slika 1).

Smatra se da mutacije u genima za transkripcione faktore kod hematopoetskih stem ćelija ili prisustvo fuzionih onkogenih proteina dovode do smanjene aktivnosti hematopoetskih transkripcionih faktora (PU.1, C/EBP α i GATA-1) ispod određenog kritičnog nivoa (32). Kao posledica toga dolazi do smanjene diferencijacije stem ćelija i akumulacije mijeloidnih prekursora (32). Naknadno nastale mutacije u genima koji kontrolišu proliferaciju kao što je C-MYC (engl. *cellular avian myelocytomatosis virus oncogene*) dovode do transformacije mijeloidnih prekursora u leukemijske stem ćelije odakle nastaju leukemijski klonovi (32). Leukemijska stem ćelija može da nastane i usled mutacije koja aktivira sposobnost samoobnavljanja multipotentne progenitorske ćelije koja je nastala od hematopoetske stem ćelije (Slika 1) (29). Treba napomenuti da zajedno sa mutacijama u genima koji regulišu proliferaciju i diferencijaciju, mutacije u genima kao što su DNMT3A, IDH1/2, NPM1, WT-1 i drugi, takođe učestvuju u patogenezi AML (33).



Slika 1. Poređenje normalne hematopoeze sa malignom hematopoezom (AML) i nastanak akutne mijeloidne leukemije na dva načina. Prvi način: u hematopoetskoj stem ćeliji (HSC) dolazi do mutacije 1a (Mut1a), potom mutacije 2 (Mut2) i mutacije 3 (Mut3) pri čemu nastaje leukemijska stem ćelija (LSC) koja ima sposobnost samoobnavljanja. Mutacija 1a može biti bilo koja mutacija koja dovodi do zastoja u diferencijaciji i nekontrolisane proliferacije, dok su mutacije 2 i 3 mutacije protoonkogene. Drugi način: u multipotentnoj progenitorskoj ćeliji (MPP) nastaje mutacija 1b koja dovodi do nastanka sposobnosti samoobnavljanja. Dodatne mutacije protoonkogene 2 i 3 potom dovode do nastanka LSC. Na slici je prikazan i normalan proces hematopoeze. CMP, zajednički mijeloidni progenitor; CLP, zajednički limfoidni progenitor; GMP, progenitor granulocita i makrofaga; MEP, eritroidni i megakariocitni progenitor. Preuzeto i modifikovano iz reference (29).

Terapija AML podrazumeva intenzivnu indukcionu hemioterapiju citarabinom i antraciklinom (daunorubicin ili idarubicin) (3). Pored hemioterapeutika u terapiji se može koristiti inhibitor mutirane FLT3 kinaze ukoliko ćelije imaju mutaciju u ovoj kinazi ili antitelo na CD33 ukoliko su ćelije CD33 pozitivne (3, 34, 35). Nakon indukciono terapije, konsolidaciona terapija uključuje hemioterapiju i/ili transplantaciju hematopoetskih stem ćelija kako bi se izbegao relaps i otklonile preostale leukemijske ćelije (3). Kod pacijenata sa akutnom promijelocitnom leukemijom koristi se diferencijaciona terapija retinoičnom kiselinom (engl. *all trans retinoic acid*, ATRA) u kombinaciji sa arsenik-trioksidom koja uspešno dovodi do kompletne remisije (3).

1.2. Diferencijaciona terapija

Pored nekontrolisane proliferacije, u tumorskim ćelijama postoji i zastoj u procesu diferencijacije (36). Ispitivanje molekularnih mehanizama koji su uključeni u proces diferencijacije je značajno zbog pronalaženja potencijalnih meta u terapiji tumora. Diferencijaciona terapija obuhvata regulaciju signalnih puteva i ekspresiju ciljnih gena kako bi se otklonio zastoj u procesu diferencijacije (36). Umesto citotoksičnih i neselektivnih lekova, ova terapija ima za cilj da transformiše tumorske ćelije u funkcionalne ćelije koristeći agense koji stimulišu diferencijaciju, u dozama sa niskom toksičnošću. Indukcija diferencijacije kod tumorskih ćelija je razvijena u terapijske svrhe sedamdesetih godina prošlog veka kako bi se izbegla upotreba citotoksičnih hemioterapeutika (37). Diferencijaciona terapija je do sada imala najveći uticaj na maligne ćelije hematopoeze odnosno leukemije koje ne mogu da nastave proces diferencijacije u zrele i funkcionalne ćelije (38). Početak diferencijacione terapije je vezano za otkriće da određeni hemijski agensi kao što su forbol estri imaju mogućnost da obnove diferencijaciju leukemijskih ćelija (38, 39). Različite supstance diferenciraju leukemijske ćelije u odgovarajuće tipove ćelija: dimetilsulfoksid i ATRA u granulocite, vitamin K2 i D3 u monocite i PMA u monocite i makrofage (40-44). Najveći uspeh u polju diferencijacione terapije je pokazala ATRA koja indukuje diferencijaciju ćelija APL u granulocite (45). Međutim, pokazano je da je izlečenje kratkotrajno zbog nemogućnosti eliminacije leukemijskih stem ćelija. Kombinacija ATRA i arsenik-trioksida se pokazala najefikasnijom jer omogućava njihovu eliminaciju, a kao rezultat toga je više od 95% pacijenata izlečenih ovom terapijom (46, 47). Međutim, ATRA i arsenik-trioksid nisu efikasni kod leukemija koje nisu promijelocitne (engl. *non-acute promyelocytic leukemia cells*, non-APL AML cells) zbog čega se intenzivno traga za novim agensima koji indukuju diferencijaciju (48, 49).

Kod pacijenata koji imaju mutacije u genu za IDH1, IDH2 i FLT3 u terapiji su odobreni odgovarajući inhibitori koji indukuju granulocitnu diferencijaciju. Za njih je pokazano da imaju veću efikasnost od hemioterapeutika (50). Međutim, zbog prisustva mutacija u drugim genima može doći do razvoja rezistencije na ovu terapiju. Generalno, inhibitori epigenetičkih enzima su se dobro pokazali u stimulaciji diferencijacije u prekliničkim studijama, ali nisu odobreni za dalja klinička ispitivanja zbog čega se ispituju u kombinaciji sa drugim agensima diferencijacije ili hemioterapeutcima (50).

Pokazano je da je ekspresija receptora za vitamin D smanjena kod leukemijskih ćelija usled metilacije u promotoru ovog gena (51). Pacijenti koji imaju smanjenu ekspresiju receptora za vitamin D imaju lošiju prognozu bolesti. Kombinacija inhibitora metil transferaze i analoga vitamina D dovodi do monocitne diferencijacije, apoptoze leukemijskih ćelija i eliminacije leukemijskih stem ćelija (51). Ova kombinacija se trenutno nalazi u kliničkoj fazi ispitivanja. Nedostatak terapije vitaminom D i njegovim analogima predstavlja hiperkalcemija jer je ovaj vitamin uključen u metabolizam kalcijuma (52).

Prednost diferencijacione terapije u odnosu na citotoksično dejstvo hemioterapeutika i zračenja je što ne dovodi do masovnog liziranja tumorskih ćelija (engl. *tumor lysis syndrome*) koje usled toga oslobađaju unutarćelijski sadržaj u krvotok (53). Ono što predstavlja nedostatak diferencijacione terapije je proces dediferencijacije, kada zrele ćelije ponovo postanu proliferišuće, kao što je pokazano u slučaju prekida terapije sa retinoičnom kiselinom (54). Drugi nedostatak je diferencijacioni sindrom, sistemska inflamacija koja nastaje usled produkcije proinflamatornih citokina diferenciranih ćelija. Ovaj sindrom se uspešno leči primenom kortikosteroida ili prekidom diferencijacione terapije (55).

1.3. Protein kinaza C

Familija protein kinaza C (engl. *protein kinase C*, PKC) se sastoji od serin/treonin kinaza koje regulišu različite procese u ćeliji kao što su proliferacija, diferencijacija, apoptoza i migracija ćelija. Ova familija se deli na tri podklase: klasične, nove i atipične. Klasične izoforme PKC (PKC α , PKC β I, PKC β II i PKC γ) se aktiviraju kalcijumom i diacilglicerolom/PMA. Nove izoforme PKC (PKC δ , PKC ϵ , PKC η i PKC θ) se aktiviraju samo diacilglicerolom ili sa PMA. Atipične izoforme PKC (PKC ζ i PKC ι) nisu senzitivne na kalcijum, diacilglicerol i PMA (56, 57).

Sve izoforme PKC pre aktivacije prolaze kroz proces sazrevanja koji podrazumeva tri uzastopne fosforilacije na PKC. Šaperon HSP90 (engl. *heat shock protein 90*) se zajedno sa svojim ko-šaperonom CDC37 (engl. *cell division cycle 37*) vezuje za PKC koja se nalazi u blizini ćelijske membrane nakon sinteze u ribozomima (Slika 2A)(58). Interakcija PKC sa šaperonima omogućava fosforilaciju PKC od strane dve kinaze (58). PDK-1 (engl. *phosphoinositide-dependent kinase 1*) fosforiliše aktivacionu petlju PKC, a potom sledi autofosforilacija hidrofobnog regiona i fosforilacija od strane mTORC2 (59). Na ovaj način PKC zauzima stabilnu konformaciju u kojoj je pseudosupstrat na mestu vezivanja supstrata, a C1 i C2 domen ostaju zaključani (Slika 2B)(59, 60). Sekundarni glasnici sada mogu delovati na PKC koja se nalazi u stabilnoj konformaciji u citosolu. Aktivacijom receptora sa tirozin-kinaznom aktivnošću ili receptora sa kuplovanim G proteinom (engl. *G protein-coupled receptor*, GPCR) na ćelijskoj membrani dolazi do aktivacije fosfolipaze C (engl. *phospholipase C*, PLC) koja hidrolizuje fosfatidilinozitol-4,5-difosfat (PIP2) na fosfatidilinozitol-trifosfat i diacilglicerol (DAG) (Slika 2). Dobijeni fosfatidilinozitol-3-fosfat se vezuje za receptore kalcijuma na ER (endoplazmatski retikulum, ER) što dovodi do oslobađanja kalcijuma u citosol (61). Oslobođeni kalcijum se potom vezuje za C2 domen PKC koji dobija sposobnost da se veže za PIP2 na ćelijskoj membrani (Slika 2C) (62). Na ovaj način se PKC iz citosola vezuje za ćelijsku membranu. Potom, sledi vezivanje C1B domena PKC za DAG u membrani što dovodi do konformacione promene koja podrazumeva odvajanje pseudosupstrata iz aktivnog mesta (Slika 2D) (59). Ovako otvorena konformacija PKC je aktivna što omogućava da PKC fosforiliše različite supstrate. Na ovaj način se aktiviraju klasične izoforme PKC, za razliku od novih izoformi čiji C2 domen ne vezuje kalcijum. Nove izoforme PKC se aktiviraju samo vezivanjem DAG za C1 domen koji ima dva puta veći afinitet vezivanja DAG u odnosu na C1 domen klasičnih izoformi (63). PKC vezan za membranu je podložan defosforilaciji fosfatazama PHLPP (engl. *pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase*) i PP2A (engl. *protein phosphatase 2A*) što dovodi do degradacije PKC u proteazomima (Slika 2E) (64, 65). Međutim, za defosforilisanu PKC može da se veže šaperon HSP70 koji omogućava da se PKC ponovo fosforiliše i odgovori na sekundarne glasnike čime se produžava dejstvo ove kinaze u ćeliji (Slika 2) (59).

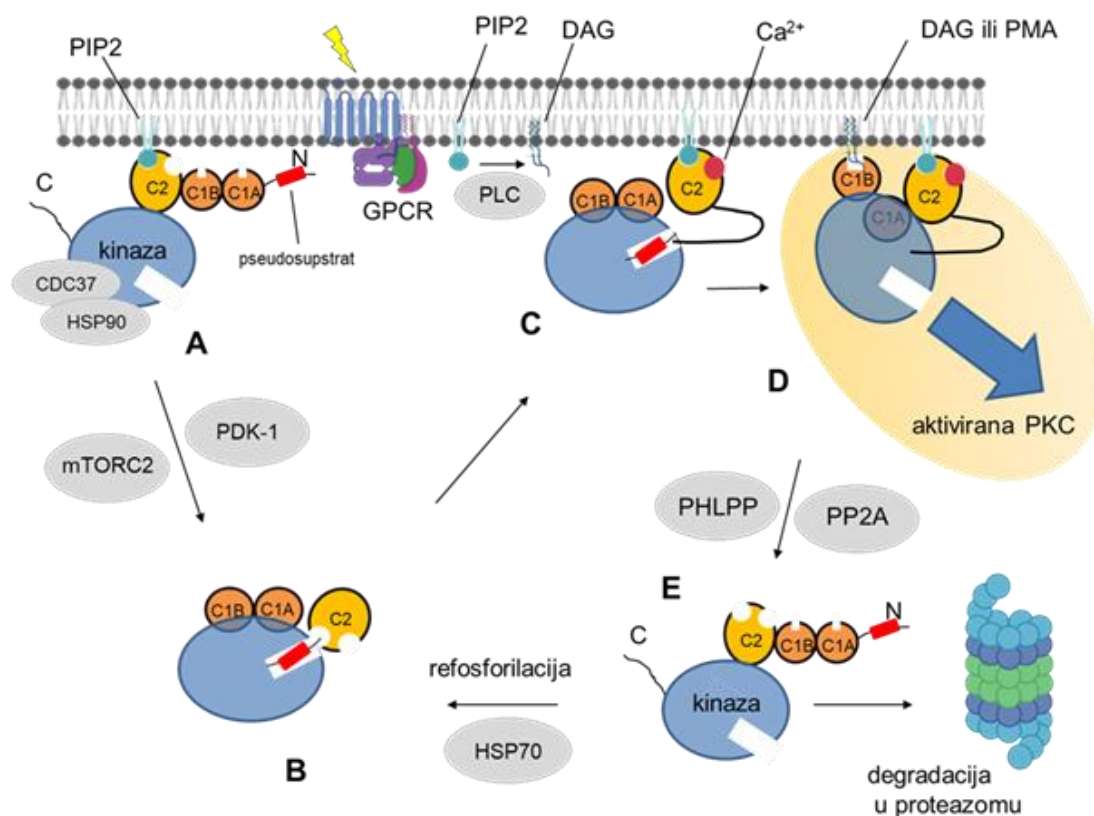
1.4. Forbol 12-miristat 13-acetat

Forbol 12-miristat 13-acetat (engl. *phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA) ili 12-O-tetradekanoilforbol-13-acetat (engl. *12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate*, TPA) je diestar tetracikličnih diterpena izolovan iz ulja semena biljke *Croton tiglium* (66). PMA je strukturno slična diacilglicerolu koji na ćelijskoj membrani aktivira PKC vezujući se za njen C1B domen (Slika 2) kako bi je usidrio na membranu (56). Za razliku od diacilglicerola koji dovodi do prolazne aktivacije PKC i brzo se metaboliše, PMA ima dva puta jači afinitet za C1B domen PKC i sporije se metaboliše (59). Zbog toga PMA zadržava konformaciju PKC u otvorenoj (aktivnoj) formi na membrani čime se održava aktivacija PKC. Međutim, zbog otvorene konformacije PKC podleže

defosforilaciji, ubikvitinaciji i degradaciji u proteozomu čime se aktivnost PKC nakon određenog vremena smanjuje (67).

Pored PKC, postoje i drugi proteini koji imaju C1 domen za koji se vezuje PMA kao što su protein kinaza D, kinaze diacilglicerola, regulatori malih GTP-aza (Ras guanil-nukleotid oslobađajući proteini koji menjaju GDP u GTP (engl. *Ras guanyl nucleotide-releasing proteins*) i himerini koji hidrolizuju GTP (eng. *Chimaerins*) i Munc13 (engl. *mammalian homolog of Caenorhabditis elegans uncoordinated gene 13*) proteini koji regulišu egzocitozu i vezikularni transport (56, 57, 68). Zbog toga PMA može da aktivira procese u ćeliji koji nisu zavisni od PKC.

PMA može da ima protumorsko ili antitumorsko dejstvo u zavisnosti od tipa ćelije na koje deluje (57). PMA promovise nastanak tumora u hemijski indukovanoj tumorogenezi kože. Na primer, primena PMA na koži miševa koji su prethodno tretirani sa mutagenim agensom dovodi do stvaranja tumora (69). Smatra se da nije aktivacija, već inhibicija PKC δ pod dejstvom PMA odgovorna za nastanak tumora kože. Transgeni miševi koji prekomerno ekspimiraju PKC δ imaju smanjenu incidencu karcinoma kože koji su nastali pod dejstvom PMA (70). Takođe, PMA ostvaruje protumorske efekte u ćelijama fibroblasta koji prekomereno ekspimiraju protoonkogen c-Src (engl. *cellular sarcoma*) tako što PMA inhibira izoformu PKC δ (71).



Slika 2. Mehanizam aktivacije PKC.

PIP2, fosfatidilinozitol-4,5-difosfat; DAG, diacilglicerol; GPCR, receptor sa kuplovanim G proteinom; PLC, fosfolipaza C; HSP90 šaperon; CDC37 ko-šaperon; mTORC2, kinaza mTOR kompleksa 2; PDK-1, protein kinaza 1 zavisna od fosfoinozitida; HSP70 šaperon; PHLPP fosfataza; PP2A, protein fosfataza 2A; Izrada slike korišćenjem www.biorender.com. Preuzeto i modifikovano iz reference (59).

PKC je otkriven kao glavni receptor za koji se vezuje PMA. Kako se za PMA znalo samo da promovise nastanak tumora, PKC je klasifikovan kao onkoprotein (59). Međutim, noviji podaci ukazuju da PKC funkcioniše kao tumor supresor što ukazuje da je neophodno da se PKC aktivira u

tumorskim ćelijama (59). Pokazano je da PMA aktivacijom PKC ostvaruje antitumorsko dejstvo na tumorskim ćelijama jetre, dojke, pluća i antiproliferativno dejstvo na ćelije eptiela tankog creva (72-75). Takođe, aktivacijom PKC, PMA indukuje diferencijaciju ćelija AML u makrofage, dok se ćelije hronične mijeloidne leukemije ovim agensom diferenciraju u megakariocite (44, 76). Različite izoforme PKC učestvuju u makrofagnoj diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija pod dejstvom PMA. Pokazano je da ćelije koje imaju mutiranu formu PKC β ne mogu da se diferenciraju sa PMA (77-79). Takođe, poznato je da PKC α učestvuje u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija u makrofage (80, 81). PMA je korišćena u terapiji mijeloidne leukemije i prošla je fazu 1 kliničkih studija (82-84). Trenutno farmaceutska kompanija PhorMed ispituje fazu 1/2 kliničkih studija (85).

1.5. Autofagija

U eukariotskim ćelijama postoje dva načina degradacije proteina (86). Jedan je ubikvitin-proteazomski sistem koji razgrađuje kratkoživeće, denaturisane i oštećene proteine, a drugi je autofagija (86). Autofagija je evolutivno konzerviran i genski regulisan katabolički proces razgradnje oštećenih, dotrajalih i nagomilanih/agregiranih proteina, organela i patogena u lizozomima (87). Ovaj proces je neophodan za održavanje ćelijske homeostaze, preživljavanje, razvoj i diferencijaciju ćelija (87). Postoje tri načina prenosa citoplazmatskog materijala za degradaciju u lumen lizozoma: makroautofagija, autofagija posredovana šaperonima i mikroautofagija (88). Autofagija posredovana šaperonima predstavlja unošenje specifičnih proteina direktno u lizosome pomoću pratećih molekula, šaperona, dok se u mikroautofagiji citoplazmatski materijal unosi invaginacijom lizozomalne membrane (88). Makroautofagija podrazumeva pakovanje citoplazmatskog sadržaja u dvoslojne membrane autofagozoma koji se fuzionišu sa lizozomom u kojem se sakupljeni makromolekuli razlažu na metabolite pomoću lizozomalnih proteaza (89, 90).

Makroautofagija može biti bazalna i indukovana (91). Bazalna autofagija je konstitutivno aktivna u ćeliji kada ima dovoljno hranljivih materija i slabog je intenziteta (91). Bazalna autofagija je specifična za tip ćelije i njena uloga je da ukloni oštećene proteine i organele u ćeliji (91, 92). Indukovana autofagija se javlja u uslovima nedostatka hranljivih materija kako bi ćeliji obezbedila metabolite neophodne za preživljavanje (91). Zbog toga autofagija ima važnu ulogu u ćelijskoj homeostazi kao i u odgovoru na različite tipove stresa (92). Makroautofagija može biti neselektivna autofagija (engl. *bulk autophagy*) koja podrazumeva nespecifično uklanjanje citoplazmatskog sadržaja (93). Neselektivna autofagija započinje inicijaciju na više mesta u citoplazmi, nezavisno od materijala za degradaciju (engl. *cargo independent*) (93). U selektivnoj autofagiji autofagozomalna membrana se formira oko materijala za degradaciju (engl. *cargo induced*) ili se materijal za razgradnju premešta do mesta formiranja autofagozomalne membrane (93). Selektivna autofagija ciljano uklanja određene organele i strukture u citoplazmi kao što su nakupljeni proteini (agrefagija), mitohondrije (mitofagija), ribozomi (ribofagija), peroksizomi (peksofagija), lizozomi (lizofagija), bakterije i virusi (ksenofagija) (89, 94, 95). Ova vrsta autofagije, kao i neselektivna autofagija, ima važnu ulogu u održavanju ćelijske homeostaze (89, 93). Selektivna autofagija prepoznaje signale za degradaciju u citoplazmi uz pomoć autofagnih receptora. Najpoznatiji je p62 (engl. *sequestosome 1*, SQSTM1) koji prepoznaje ubikvitirane proteine UBA (engl. *ubiquitin-associated domain*) domenom istovremeno se vezujući za LC3 (engl. *light chain 3*) na membrani autofagozoma LIR (engl. *LC3-interacting region*) domenom (93). Na taj način, zajedno sa LC3-II, p62 se razgrađuje u autolizozomima zbog čega se koristi kao marker autofagne razgradnje (96). U prepoznavanju mitohondrija i bakterija učestvuju receptori p62, NDP52 (engl. *nuclear dot protein 52 kDa*) i optineurin, dok proteinske agregate prepoznaju NBR1 (engl. *neighbor of BRCA1 gene 1*), p62 i optineurin (97). Između receptora i ATG (engl. *AuTophagy-related*) proteina na membrani

autofagozoma se mogu vezati adapterski proteini kako bi olakšali formiranje autofagozomalne membrane oko materijala za degradaciju (98). Poznat adapterski protein je ALFY (engl. *autophagy-linked FYVE-domain containing protein*) koji se vezuje između p62 i ATG5 (98). Zanimljivo je da se NDP52 i p62 vezuju direktno za FIP200 (engl. *focal adhesion kinase family kinase interacting protein of 200 kDa*) u okviru ULK kompleksa za inicijaciju autofagije i tako regrutuju ULK (engl. *Unc-51 like autophagy activating kinase*), čime se autofagozomalna membrana formira oko materijala za degradaciju (99).

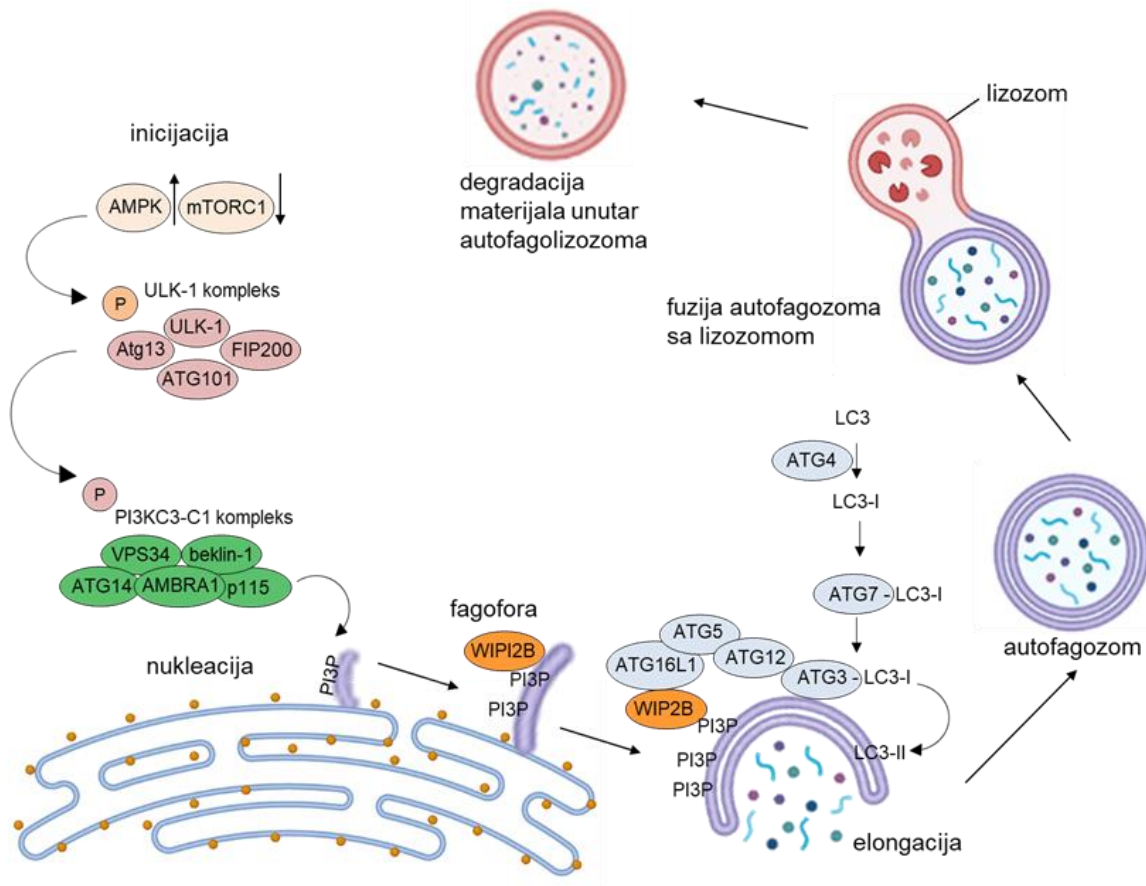
1.5.1. Mehanizam indukcije autofagije

Proces autofagije se sastoji od pet glavnih koraka: inicijacija autofagije, nukleacija različitih ATG proteina na mestu nastanka autofagozomalne membrane, elongacija i zatvaranje autofagozomalne membrane, fuzija autofagozoma i lizozoma i degradacija materijala unutar autofagolizozoma (100). Formiranje autofagozoma i njegova fuzija sa lizozomima je regulisana ATG proteinima. Ovi proteini formiraju šest kompleksa: ULK kompleks, kompleks I klase III fosfatidilinozitol 3 kinaze PI3KC3-C1 (engl. *complex I class III phosphatidylinositol 3-kinase*), ATG2/WIPI4 (engl. *WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein*) kompleks, ATG9 vezikule, ATG12-5-16L1 i ATG8/LC3 konjugacioni sistemi (101).

Inudkcija autofagije je regulisana mnogobrojnim signalnim putevima i molekulima. Inicijacija autofagije započinje kada u nedostatku hranljivih materija dolazi do inaktivacije mTORC1 (engl. *mechanistic target of rapamycin complex 1*) kompleksa. Inhibicija mTORC1 sprečava fosforilaciju na ULK1 i ATG13 u okviru ULK kompleksa zbog čega se ULK kompleks aktivira (102). Humani ULK kompleks se sastoji od ULK1/2, FIP200 nosača, regulatornih proteina ATG13 i ATG101 (102, 103). Faza nukleacije podrazumeva da se ULK kompleks premešta na membranu ER. Nakon toga, ULK1 fosforiliše komponente PI3KC3-C1 kompleksa koji se sastoji od lipidne kinaze VPS34 (engl. *vesicular protein sorting 34*), beklina-1 (engl. *coiled-coil, moesin-like BCL2-interacting protein*), ATG-14L i faktora vezikularnog transporta p115 (102). Aktivirana lipidna kinaza VPS34 potom fosforiliše ostatke fosfatidilinozitola na membrani pri čemu nastaju fosfatidilinozitol trifosfati (engl. *phosphatidylinositol 3-phosphate*, PI(3)P) (Slika 3) (102). U procesu nukleacije domeni ER koji su bogati sa PI(3)P formiraju omegazom odakle nastaje fagofora (prekursor autofagozoma) pod dejstvom VPS34 (104). Ovakve promene na membrani olakšavaju da se PI(3)P nakuplja kako bi omogućio vezivanje WIPI proteina (Slika 3). Na WIPI-2B se vezuje ATG12-5-16L1 konjugacioni sistem koji određuje mesto vezivanja LC3 na membranu fagofore (Slika 3)(104). WIPI4 omogućava vezivanje ATG2 da drži fagoforu i omogućava transfer fosfolipida sa ER na rastuću membranu autofagozoma (101). Dodatne lipide i proteine neophodne za ekspanziju membrane doprinose ATG9A vezikule koje na mestu nastanka fagofore regrutuje ULK kompleks (105). Smatra se da Goldži kompleks, endozomi, mitohondrije i ćelijska membrana doprinose rastu autofagozomalne membrane tako što doniraju membranu ATG9 vezikulama (104).

Najznačajniju ulogu u elongaciji fagofore ima ubikvitinu slična familija proteina ATG8 kojoj pripadaju MAP1LC3 (engl. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*) i GABARAP (engl. *γ-aminobutyric acid receptor-associated proteins*) podfamilije (102). Lipidacija ovih proteina odnosno njihovo vezivanje za membranu autofagozoma je slično procesu ubikvitinacije proteina i sastoji se od aktivacije, konjugacije i ligacije (102, 106). Citosolna forma LC3 se obrađuje cistein proteazom ATG4B i označava se kao LC3-I (Slika 3) (107). Ovako obrađen LC3-I se aktivira sa ATG7 (E1 aktivirajući enzim) i prebacuje na membranski ATG3 (E2 konjugujući enzim) (Slika 3) (106, 108, 109). Finalno prebacivanje LC3-I sa ATG3 na fosfatidiletanolamin membrane autofagozoma omogućava ATG12-5-16L1 kompleks (E3 ligaza) pri čemu nastaje membranska forma LC3-II (Slika 3) (110). Upravo ovaj proces lipidacije promovise rast fagofore i njeno

zatvaranje. LC3-II vezan za spoljnu stranu autofagozoma može da se dekonjuguje sa membrane pomoću ATG4B i da se reciklira, dok se LC3-II vezan sa unutrašnje strane autofagozoma degraduje u autolizozomima (111). U procesu sazrevanja autofagozoma ATG proteini se odvajaju sa spoljne membrane i dolazi do fuzije sa lizozomom pomoću SNARE (engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors*) proteina (112). Kisele hidrolaze razgrađuju sadržaj u lizozomima i dobijeni metaboliti se vraćaju u citoplazmu (102).



Slika 3. Mehanizam indukcije autofagije. Izrada slike korišćenjem www.biorender.com. Preuzeto i modifikovano iz reference (102).

1.5.2. Regulacija PI3KC3-C1 kompleksa

Kompleks PI3KC3-C1 može biti regulisan protein-protein interakcijama. AMBRA1 (engl. *activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy protein 1*) koju aktivira ULK kompleks, se vezuje za beclin-1 i stimuliše kompleks PI3KC3-C1 (102). Pozitivni regulator PI3KC3-C1 kompleksa je i UVRAG (engl. *ultraviolet irradiation resistance-associated gene*) koji u kompeticiji sa ATG-14L interaguje sa beclinom-1 (113). UVRAG dodatno utiče na sazrevanje autofagozoma tako što regrutuje kompleks za fuziju sa lizozomom (102, 114). Sa jedne strane, BIF-1 (engl. *Bax-interacting factor 1*) interaguje sa beclinom-1 vezivanjem za UVRAG što stimuliše PI3KC3-C1 kompleks (115). Sa druge strane, RUBICON (engl. *RUN domain protein as Beclin-1 interacting and cysteine-rich containing protein*) može da se veže za UVRAG i spreči njegovo dejstvo (116). Antiapoptotski proteini Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*), Bcl-XL (engl. *B-cell*

lymphoma-extra large) i BIM (engl. *Bcl2-interacting mediator of cell death*) interguju sa beklinom-1 čime je sprečena interakcija beklina-1 sa VPS34 u okviru PI3KC3-C1 što onemogućava inicijaciju autofagije (117, 118).

1.5.3. Uloga mTORC1 kompleksa u autofagiji

Autofagija može da zavisi od glavnog negativnog regulatora autofagije, mTORC1 kompleksa. mTOR je serin/treonin kinaza koja se nalazi u dva strukturno i funkcionalno različita kompleksa - mTORC1 i mTORC2 (119). mTORC1 se sastoji od tri glavne komponente: mTOR, RAPTOR (engl. *regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin*) koji učestvuje u vezivanju supstrata za mTOR i mLST8 (engl. *mammalian lethal with Sec13 protein 8*) koji stabilizuje katalitički domen mTOR (119). U kompleksu se nalaze još dve inhibitorne subjedinice PRAS40 (engl. *proline-rich Akt substrate of 40 kDa*) i DEPTOR (engl. *DEP domain containing MTOR-interacting protein*) (119). mTORC1 se aktivira pod uticajem faktora rasta i aminokiselina čime se promovira anabolički procesi kao što su sinteza lipida, proteina i nukleotida (119). Istovremeno, mTORC1 suprimira kataboličke procese među kojima je autofagija (119). Sa druge strane, u uslovima nedostatka adenzin trifosfata (ATP), aminokiselina, usled hipoksije ili oštećenja DNK mTORC1 je inhibiran i autofagija je stimulirana (120).

Kompleks mTORC1 inhibira autofagiju delujući na ATG proteine koji učestvuju u inicijaciji autofagije (120). mTORC1 inhibira indukciju autofagije tako što fosforiliše ULK1 na poziciji serin 757 čime sprečava interakciju sa AMPK koji aktivira ULK1 (121). mTORC1 fosforiliše ATG14 u okviru VPS34 kompleksa, što smanjuje aktivnost ovog kompleksa, a samim tim biogenezu autofagozoma (122). Kompleks mTORC1 može istovremeno da inhibira početnu i završnu fazu autofagije tako što fosforiliše UVRAG (123). Ova fosforilacija favorizuje interakciju sa RUBICON koji sprečava UVRAG u promociji sazrevanja autofagozoma i fuzije autofagozoma sa lizozomom (123). Pored toga, mTORC1 inhibira transkripcioni regulator autofagije TFEB (engl. *transcription factor EB*). U uslovima kada ćelija ima dovoljno hranljivih materija, mTORC1 fosforiliše TFEB na poziciji serin 211. Za fosforilisan TFEB se u citoplazmi posledično vezuje 14-3-3 adaptorski protein koji sprečava transport TFEB u jedro (124). Aktivnost mTORC1 je regulisana RHEB (engl. *ras homolog enriched in brain*) GTP-azom (125). Aktivnost mTORC1 je povećana kada RHEB ima vezan GTP (125). Međutim, kada je vezan GDP, aktivnost mTORC1 je smanjena (125). U okviru TSC1/TSC2 (engl. *tuberous sclerosis complex*) kompleksa, TSC2 aktivira GTP-aznu aktivnost RHEB tako što katalizuje konverziju GTP u inaktivnu formu GDP (126). U odgovoru na faktore rasta, uzvodna kinaza Akt inhibira TSC2 zbog čega RHEB-GTP aktivira mTORC1 (127). U isto vreme, Akt može da fosforiliše inhibitor PRAS40 koji se odvaja od kompleksa i povećava aktivnost mTORC1, zbog čega je autofagija inhibirana (127). U uslovima kada je niska koncentracija ATP-a u ćeliji, AMPK (engl. *adenosine monophosphate-dependent kinase*) inhibira mTORC1 tako što aktivira TSC2 ili direktno fosforiliše RAPTOR u okviru mTORC1 kompleksa (127). Uz to, AMPK promovira autofagiju tako što direktno fosforiliše i aktivira ULK1 na pozicijama serin 555, serin 317 i serin 777 (121, 128).

1.5.4. Regulacija ekspresije autofagnih gena transkripcionim faktorima

Aktivacija autofagije na nivou transkripcije je prvi put pokazana kod kvasca kada je u uslovima nedostatka azota transkripciono indukovana Apg8p (engl. *autophagy defective mutant 8p*), homolog LC3 kod sisara. U poslednjih desetak godina različite studije su pokazale da je indukcija autofagije regulisana transkripcionim faktorima. Najpoznatiji je transkripcioni faktor EB (TFEB) koji pripada

mikroftalmija/transkripcioni faktor E MiT/TFE (engl. *microphthalmia/transcription factor E*) familiji transkripcionih faktora (129). TFEB povećava ekspresiju autofagnih gena koji su uključeni u inicijaciju autofagije (*BEKLIN-1, WIPI-1, ATG9B*), elongaciju autofagozoma (*GABARAP, MAP1LC3B, ATG5*), prepoznavanje supstrata za degradaciju (*p62*), transport autofagozoma (*RAB7*) i njihovu fuziju sa lizozomima (*UVRAG*) (130, 131). Pored toga, TFEB aktivira ekspresiju gena koji učestvuju u biogenezi lizozoma (132). Aktivaciju autofagnih i lizozomalnih gena vrše i drugi članovi MiT/TFE familije kao što su TFE3 (engl. *transcription factor binding to IGHM enhancer 3*) i MITF (engl. *melanocyte inducing transcription factor*) (133, 134). Različite kinaze fosforilišu TFEB što menja njegovu lokalizaciju u ćeliji samim tim i funkciju (135). Kada je TFEB fosforilisan, on se nalazi u inaktivnoj formi u citoplazmi (131). Kada TFEB nije fosforilisan, on prelazi u jedro i aktivira transkripciju autofagnih gena (131). U prisustvu aminokiselina mTORC1 fosforiliše TFEB vezujući ga za adapterski protein 14-3-3 u citoplazmi čime sprečava njegov odlazak u jedro (136). U uslovima gladovanja, mTORC1 je inaktiviran pri čemu se TFEB oslobađa fosforilacije od strane mTORC1 i odlazi u jedro aktivirajući ekspresiju autofagnih gena (131). Prelazak TFEB u jedro može biti sprečen od strane ERK2, GSK3 β (engl. *glycogen synthase kinase 3 β*) i Akt kinaza (131, 137, 138). Smatra se da kada GSK3 β fosforiliše TFEB dolazi do premeštanja TFEB na lizozomu kako bi bio inaktiviran pomoću mTORC1 (137). Pored promena u lokalizaciji, pojedine kinaze utiču na stabilnost ovog transkripcionog faktora. Pokazano je da PKC β povećava stabilnost i aktivnost TFEB u osteoklastima (139), za razliku od Akt koji smanjuje aktivnost i stabilnost TFEB (138). Za razliku od funkcije koju ima TFEB, ZKSCAN3 (engl. *zinc-finger protein with Kruppel-associated box and SCAN domains 3*) suprimira ekspresiju autofagnih i lizozomalnih gena (140). U uslovima gladovanja ZKSCAN3 se premešta iz jedra, dok TFEB ulazi u jedro kako bi se omogućila transkripcija autofagnih i lizozomalnih gena (140). Represor ZKSCAN3 je takođe regulisan od strane mTORC1. Aktiviran mTORC1 zadržava ZKSCAN3 u jedru čime su autofagni geni suprimirani (140). Pokazano je da JNK2 i p38 indukuju inaktivaciju ZKSCAN3 tako što ga premeštaju iz jedra u citoplazmu čime su autofagni geni oslobođeni inhibicije od strane ZKSCAN3 (137).

Grupa transkripcionih faktora koji takođe regulišu autofagiju su članovi familije FOXO (engl. *forkhead box O*) transkripcionih faktora među kojima su FOXO1 i FOXO3 (129). FOXO3 aktivira autofagiju tako što se vezuje za promotore *LC3B, BNIP3, BNIP3L* i *GABARAPL1* gena i dovodi do povećanja ekspresije *ATG12L, ATG4B, ULK1, ULK2, VPS34, BECN-1, ATG7, FIP200* i *p62* gena (141, 142). Takođe, geni za *LC3B, ATG4B, ATG12, VPS34* i *BECN-1* mogu biti aktivirani od strane FOXO1 (143). Na sličan način kao i kod TFEB, transkripciona aktivnost ovih faktora zavisi od njihove lokalizacije. Pod uticajem faktora rasta, Akt fosforiliše FOXO faktore za koje se vezuju 14-3-3 adapterski proteini koji ih zadržavaju u citoplazmi, čime je sprečena aktivacija autofagije (144).

Treba istaći da transkripcioni faktori p53, E2F1 (engl. *E2F transcription factor 1*), NF- κ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), HIF1 α (engl. *hypoxia-inducible factor 1 alpha*), PPAR α (engl. *Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha*), FXR (engl. *farnesoid X receptor*), CREB (engl. *cAMP response element-binding protein*) takođe učestvuju u aktivaciji autofagije. Zanimljivo je da neki hematopoetski transkripcioni faktori direktno ili indirektno mogu da aktiviraju transkripciju *ATG* gena (145).

1.6. Uloga autofagije u diferencijaciji leukemijskih ćelija

Pored održavanja homeostaze u krajnje diferenciranim ćelijama, autofagija ima ulogu u unutarćelijskom remodelovanju tokom procesa diferencijacije (146). Kao dinamičan proces u odgovoru na faktore spoljašnje sredine, autofagija dovodi do brzih promena proteina i organela u procesu diferencijacije (87, 146). Ekstremni primer remodelovanja je diferencijacija eritrocita koja zahteva uklanjanje mitohondrija pomoću mitofagije (146, 147). Inaktivacija autofagnih gena kao što su *ULK-1* i *FIP200* dovodi do poremećaja eritroidne diferencijacije i anemije (148). Autofagija je takođe važna i u diferencijaciji drugih hematopoetskih ćelija kao što su limfociti, makrofagi i neutrofili (148). Ona učestvuje u održavanju hematopoetskih stem ćelija što je pokazano kod miševa koji imaju deleciju *ATG7*, gde stem ćelije gube sposobnost diferencijacije i počinju nekontrolisano da proliferišu (149). U skladu sa tim, ekspresija *ATG* gena (*ULK1*, *FIP200*, *BEKLIN-1*, *ATG 14*, *ATG 5*, *ATG 7*, *ATG 3*, *ATG 4B*, *ATG 4D*) u leukemijskim ćelijama je značajno smanjena u poređenju sa granulocitima zdravih kontrola (150). U leukemijskim ćelijama je takođe pokazano smanjenje autofagnog fluksa (mera razgradnje sadržaja autofagijom) (151). Smatra se da supresija autofagije u ovim ćelijama predstavlja adaptivni mehanizam koji omogućava stabilizaciju različitih onkoproteina jer sprečava njihovu degradaciju autofagijom (152). Zbog toga je neophodna upotreba agenasa koji istovremeno indukuju autofagiju i diferencijaciju. Pokazano je da kombinacija retinoične kiseline i arsenik trioksida dovode do autofagne razgradnje fuzionog PML-RAR onkoproteina inhibicijom mTOR signalnog puta (153). Degradacija PML-RAR omogućava diferencijaciju leukemijskih ćelija u granulocite (153). U ovom selektivnom procesu učestvuju autofagni receptor p62 i adapterski protein autofagije ALFY (154, 155). Diferencijacija retinoičnom kiselinom takođe indukuje ekspresiju TFEB, što posledično aktivira transkripciju *ATG* gena (156). Postoji još nekoliko primera gde autofagne razgradnje onkoproteina koji suprimiraju diferencijaciju. Arsenik trioksid i inhibitor proteazoma bortezomib indukuju autofagnu razgradnju mutirane tirozin kinaze FLT3-ITD, koja je pronađena kod 30% pacijenata sa AML (157, 158). Na sličan način, arsenik trioksid i imatinib, inhibitor mutirane tirozin kinaze BCR-ABL, kod hronične mijeloidne leukemije indukuju autofagnu razgradnju onkoproteina koji nastaje fuzijom Abelsonove tirozin kinaze (engl. *Abelson tyrosine kinase*, Abl) i proteina *BCR* gena (engl. *breakpoint cluster region*) (159, 160). Pored uloge u razgradnji onkoproteina, autofagija učestvuje u megakariocitnoj diferencijaciji ćelija hronične mijeloidne leukemije indukovanoj sa PMA i inhibitorom p38 kinaze (161). Pokazano je da vitamin D indukuje autofagiju zavisnu od mTOR-a i beklina-1 koja je neophodna u diferencijaciji leukemijskih ćelija u monocite (162). Takođe, inhibicija autofagije suprimira monocitnu diferencijaciju leukemijskih ćelija u makrofage indukovanu sa PMA (163). Inhibitor SRC i BCR-ABL kinaza, dasatinib, indukuje autofagiju koja omogućava diferencijaciju HL-60 i NB-4 ćelija AML (164).

1.7. Mitogenom aktivirane protein kinaze

Familija mitogenom aktiviranih protein kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) obuhvata grupu evolutivno konzerviranih kinaza koje se aktiviraju nakon kaskadne fosforilacije od strane uzvodnih kinaza (165). Aktivirane MAPK se dimerizuju i fosforilišu različite supstrate u citoplazmi i jedru u kojem regulišu transkripciju velikog broja gena (165, 166). Svaki MAPK signalni put obuhvata najmanje tri komponente: kinazu kinaze MAP kinaze, MAPKKK (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*), koja fosforiliše i aktivira kinazu MAP kinaze (MAPKK, MEK) (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*), koja potom aktivira MAP kinazu (165, 166). MAPKKK primaju signal od aktiviranih receptora na površini ćelije ili kroz interakciju sa GTP vezujućim proteinima ili drugim kinazama (166). Familija MAPK se sastoji od 14 različitih

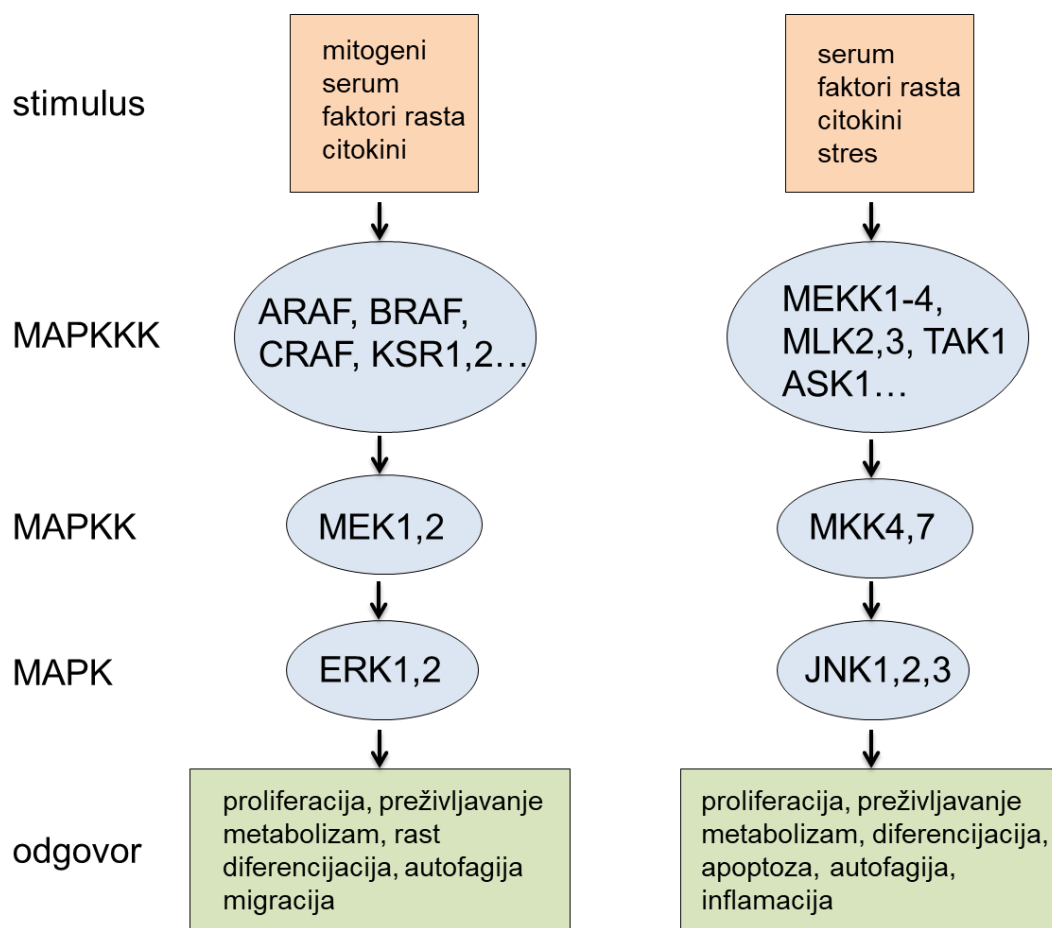
kinaza koje su na osnovu sekvence i načina aktivacije klasifikovane na konvencionalne i atipične (167). Konvencionalne MAPK su: podfamilija kinaza regulisane vanćelijskim signalima (engl. *extracellular signal-regulated-kinase*, ERK) (ERK1 i ERK2), podfamilija kinaza N-terminalnog domena C-JUN (engl. *c-Jun N-terminal kinase*, JNK) (JNK1, JNK2 i JNK3), p38 kinaza (p38 α , p38 β , p38 γ i p38 δ) i ERK5 podfamilija (167). Atipične MAPK su ERK3, ERK4, ERK7 i NLK (engl. *Nemo-like kinase*) (167) i njih ne aktiviraju klasične MAPKK (168). Konvencionalne MAPK imaju TXY motiv (treonin, bilo koja aminokiselina, tirozin) u aktivacionom segmentu koji za katalitičku aktivaciju zahteva dvostruku fosforilaciju od strane uzvodnih kinaza (167). Ove kinaze takođe imaju jedan kinazni domen sa kratkim N i C terminusima, za razliku od ERK5 koja ima dugačak C terminus (167). Atipične kinaze imaju dugačak N ili C terminus koji mogu da imaju regulatornu ulogu i ove kinaze nemaju TXY konsenzusnu sekvencu, sa izuzetkom ERK7 (167). Ovako aktivirane kinaze fosforilišu supstrate na serinskom ili treoninskom ostatku zbog čega se MAPK označavaju kao serin/treonin kinaze (169).

U modulaciji MAPK signalnog puta učestvuju fosfataze i proteinski nosači (engl. *scaffold*) (170). Fosfataze defosforilišu i inaktiviraju ove kinaze i tako smanjuju njihovu aktivnost u ćeliji (170). Ravnoteža između aktivacije uzvodnih kinaza sa jedne strane i fosfataza sa druge strane, određuje trajanje aktivnosti MAP kinaza (171). Proteinski nosači učestvuju u prostorno-vremenskoj regulaciji MAPK signalnog puta tako što kolokalizuju sa njegovim komponentama i integrišu signale od drugih signalnih puteva ili usmeravaju njihov put ka specifičnim supstratima (170). Poznati proteinski nosači za ERK signalni put su supresor kinaze za Ras-1 (engl. *kinase suppressor of Ras-1*, KSR1) i partner MEK 1 kinaze (engl. *MEK partner 1*), dok su JNK interagujući proteini (engl. *JNK-interacting proteins*) proteinski nosači za JNK signalni put (170).

1.7.1. ERK

ERK1/2 ili klasične MAP kinaze aktiviraju mitogeni i faktori rasta i one učestvuju u proliferaciji, preživljavanju, rastu, diferencijaciji, metabolizmu i migraciji ćelija (167). RAF (engl. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*), BRAF, CRAF, KSR1, KSR2 i dr. aktiviraju MEK1/2 koje potom aktiviraju ERK1/2 (Slika 4). RAF se aktivira tako što mala RAS GTP-aza prima signal od membranskih receptora sa tirozin kinaznom aktivnošću posredstvom adapterskog proteina GRB2 (engl. *growth factor receptor-bound protein 2*). GRB2, kada je vezan za receptor na membrani, regrutuje SOS (engl. *son of sevenless*) koji zamenjuje GDP sa GTP na RAS, koja u poslednjem koraku aktivira RAF (172). Aktivacija ERK može biti nezavisna od RAS GTP-aze. PMA aktivacijom PKC δ aktivira RAF/MEK/ERK signalni put nezavisno od RAS (173, 174).

ERK aktivira transkripciju i fosforilaciju produkata ranih gena (engl. *immediate early genes*) kao što su *EGR1* (engl. *early growth response protein 1*), *FOS* (engl. *FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog*), *JUN* i *MYC*. Produkti ovih gena kao transkripcioni faktori potom aktiviraju ekspresiju kasnih gena i koji dovode do prelaska ćelije iz G₁ u S fazu ćelijskog ciklusa (167). Iako ERK utiče na proliferaciju leukemijskih ćelija, ERK utiče i na njihovu diferencijaciju u granulocite, megakariocite i makrofage pod dejstvom različitih agenasa (175-177). Pored toga što se ekspresija *EGR1* indukuje pod uticajem mitogena, ovaj transkripcioni faktor učestvuje u diferencijaciji leukemijskih ćelija u makrofage (167, 178). Takođe, AP-1 (engl. *activating protein-1*) transkripcioni faktor koji nastaje dimerizacijom c-JUN i c-FOS (engl. *cellular FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog*) učestvuje u pomenutoj diferencijaciji (179).



Slika 4. Komponentne ERK i JNK signalnih puteva i njihova uloga u odgovoru na stimulus. Preuzeto i modificirano iz reference (167).

1.7.2. Uloga ERK u regulaciji autofagije

Različiti stimuli kao što su TNF (engl. *tumor necrosis factor*), nedostatak hranljivih materija, kadmijum i kurkumin aktiviraju autofagiju koja zavisi od ERK (180, 181). Aktivacija autofagije pod dejstvom ERK može biti nezavisna od stimulusa jer je pokazano da konstitutivno aktiviran MEK indukuje autofagiju (182, 183). Autofagija aktivirana pod uticajem ERK može da ima protumorsko dejstvo tako što doprinosi rezistenciji leukemijskih ćelija na hemioterapeutike (184). Međutim, ovako stimulisana autofagija kada je prekomerno aktivirana može imati i antitumorske efekte tako što dovodi do autofagne ćelijske smrti (180).

ERK aktivira autofagiju različitim mehanizmima. ERK stimuliše autofagiju indukujući ekspresiju beklina-1, BNIP3 i p62 (180, 185). Pokazano je da ERK fosforiliše i aktivira p53, što dovodi do indukcije autofagije zavisne od beklina-1 u tretmanu ćelija fibroblasta sa TNF (186). Konstitutivno aktivna izoforma BRAF stimuliše autofagiju u ćelijama melanoma tako što inhibira Akt/mTORC1 signalni put (187). ERK fosforilacijom Bcl-2 može da dovede do disocijacije beklina-1 od Bcl-2 kako bi oslobođen beclin-1 mogao da indukuje autofagiju. Iako mehanizam još uvek nije razjašnjen, pokazano je da HMGB1 (engl. *high mobility group box 1*) učestvuje u aktivaciji ERK i fosforilaciji Bcl-2 (188).

MEK/ERK signalni put može biti aktiviran od strane AMPK. Ova netipična aktivacija MEK/ERK (engl. *non-canonical MEK/ERK signaling pathway*) reguliše nivo beklina-1 i na taj način određuje intenzitet procesa autofagije u ćeliji, a samim tim i njen ishod. Prolazna aktivacija MEK/ERK dovodi do inhibicije mTORC1 ili mTORC2 i povišene ekspresije beklina-1, što rezultuje u indukciji citoprotektivne autofagije. Sa druge strane, neprekidna ili snažna aktivacija MEK/ERK dovodi do inhibicije oba mTOR kompleksa, što dovodi do značajnog povećanja nivoa beklina-1 i indukcije citotoksične autofagije. MEK/ERK inhibiraju kompleks mTORC1 fosforilacijom TSC2 (182).

Pored uloge u aktivaciji autofagije, ERK može da inhibira autofagiju tako što sprečava ekspresiju autofagnih i lizosomalnih gena fosforilacijom TFEB na poziciji S142, čime sprečava njegov ulazak u jedro (131).

1.7.3. JNK

JNK ili stresom aktivirana protein kinaza (engl. *stress-activated protein kinase*, SAPK) se indukuje pod uticajem vanćelijskih signala (jonizujuće zračenje, ishemija, proinflamatorni citokini, hormoni i dr.) i unutarćelijskih signala (oštećenja DNK, oksidativni stres, stres ER i dr.) (189-191). Postoje tri gena (*JNK1*, *JNK2* i *JNK3*) koji alternativnim iskrajanjem daju 10 izoformi JNK (190). Produkti *JNK1* i *JNK2* gena su eksprimirani u svim ćelijama i tkivima, dok se *JNK3* prvenstveno nalazi u mozgu, srcu i testisima (190). MAPKK koje aktiviraju JNK su MEK4 i MEK7 (Slika 4). MEK4 prvenstveno fosforiliše tirozin 185, a MEK7 treonin 183 na JNK, pri čemu oba mesta moraju biti fosforilisana za potpunu aktivaciju JNK (192). MEK4 i MEK7 su aktivirane od strane uzvodnih MAPKKK kao što su MEKK1, MEKK4, MLK2 (engl. *mixed-lineage kinase*), MLK3, TAK1 (engl. *transforming growth factor- β -activated kinase 1*) i ASK1 (engl. *apoptosis signal-regulating kinase 1*) (Slika 4) (189, 190). Ove kinaze aktiviraju membranski receptori za faktor nekroze tumora TNF, za transformišući faktor rasta TGF- β (engl. *Transforming growth factor beta*), GPCR i Toll receptorski kompleksi (191). JNK može da aktivira i PKC kinaza. Adapterski protein RACK1 (engl. *receptor for activated C kinase 1*) vezuje PKC i JNK što omogućava da PKC fosforiliše JNK (193). Uloga ove fosforilacije je da dodatno pojača aktivnost JNK od strane MKK4 i MKK7. U diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelja pod dejstvom PMA, PKC β aktivira MEKK1 što za posledicu ima aktivaciju MEK4 i JNK (194).

U zavisnosti od stimulusa i tipa ćelija, JNK fosforiliše preko 100 opisanih supstrata među kojima su najbrojniji transkripcioni faktori u jedru (191). Najpoznatija je fosforilacija C- JUN po kojoj je kinaza dobila ime. JNK takođe fosforiliše transkripcione regulatore kao što su aktivirajući transkripcioni faktor 2 (engl. *activating transcription factor 2*, ATF2), C-MYC, p53, FOXO3 i mnoge druge, što omogućava ćeliji da se prilagodi uslovima stresa (191). U citoplazmi JNK fosforiliše antiapoptotski Bcl-2 i proapoptotske članove Bcl-2 familije kao što su Bad (engl. *BCL2 associated agonist of cell death*) i Bim, regulišući apoptozu i autofagiju (191). JNK fosforiliše u citoplazmi i druge proteine koji regulišu vezikularni transport, receptore, kinaze i fosfataze (191).

Posredstvom C-JUN, JNK učestvuje u mijeloidnoj diferencijaciji leukemijskih ćelija (195). Pored toga što je AP-1 (C-JUN i C-FOS) važan u proliferaciji, apoptozi i inflamaciji, ovaj transkripcioni faktor učestvuje u diferencijaciji leukemijskih ćelija indukovanoj sa PMA i vitaminom D3 (179, 196, 197). C-JUN je ujedno i kofaktor transkripcionog faktora PU.1 koji aktivira ekspresiju gena uključenih u mijeloidnu diferencijaciju (195). Ove studije ukazuju na značaj JNK/C-JUN signalnog puta u diferencijaciji leukemijskih ćelija.

1.7.4. Uloga JNK u regulaciji autofagije

JNK aktivira autofagiju tako što deluje na transkripcione faktore u jedru. JNK aktivira ekspresiju beklina-1 uz pomoć C-JUN transkripcionog faktora koji se vezuje za njegov promotor (198). Tretman ćelija ceramidom, agonistom receptora smrti 5 i konstitutivno eksprimirana histonska deacetilaza 6 indukuju ekspresiju beklina-1 aktivacijom JNK (199). Pored indukcije ekspresije beklina-1, JNK dovodi do povećane ekspresije ATG5 i ATG7 aktivacijom C-JUN. Indukcija ATG5 se odvija aktivacijom RAC-1 (engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*)/MKK7/JNK/C-JUN signalnog puta u odgovoru na prekomerno eksprimiran H-RAS (engl. *Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*) (200). Povećana ekspresija ATG7 nastaje usled aktivacije RIP (engl. *receptor interacting protein*)/MKK7/JNK/C-JUN signalnog puta pod dejstvom inhibitora kaspaze 8 (201). Oksidativni stres aktivira ekspresiju ATG gena aktivacijom JNK (202). Smatra se da u ovom procesu JNK aktivira AP-1 transkripcioni faktor, koji indukuje ekspresiju autofagnih gena (203). Pored toga što JNK aktivira autofagiju zavisnu od C-JUN i AP-1, ona može da aktivira i FOXO transkripcione faktore koji stimulišu ekspresiju ATG gena (199). Aktivacija JNK stimuliše transport FOXO transkripcionih faktora u jedro. To se odvija direktnom fosforilacijom ili indirektno, tako što JNK dovodi do razdvajanja FOXO od 14-3-3 adapterskih proteina koji ih drže inaktiviranim u citoplazmi (204-206). Kada JNK fosforiliše autofagni represor ZKSCAN3, on se transportuje iz jedra u citoplazmu čime se ekspresija autofagnih gena oslobađa inhibicije (137). JNK1 takođe fosforiliše Bcl-2 i oslobađa beclin-1 iz kompleksa sa Bcl-2 kako bi mogao da interaguje sa VPS34 i indukuje autofagiju (207, 208). Ovako indukovana autofagija je neophodna za proces diferencijacije monocita u makrofage, faktorom stimulacije makrofagnih i granulocitnih kolonija GM-CSF (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (209). Treba istaći da uticaj JNK na indukciju autofagije zavisi od tipa ćelije. Inhibicija JNK u neuronima dovodi do citoprotektivne autofagije aktivacijom FOXO1 transkripcionog faktora (210).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U ovoj disertaciji su postavljeni sledeći ciljevi:

1. Ispitati ulogu autofagije i MAP kinaza u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija u makrofage pod dejstvom PMA.
2. Ispitati ulogu AMPK, mTOR i MAP kinaznog signalnog puta u indukciji autofagije tokom diferencijacije HL-60 leukemijskih ćelija u makrofage pod dejstvom PMA.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Rastvori i reagensi

Za izvođenje eksperimenata ove doktorske teze korišćeni su sledeći reagensi: medjum za propagaciju ćelija RPMI-1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute Medium 1640*, RPMI), L-glutamin, fetalni serum teleta (engl. *fetal calf serum*, FCS), rastvor antibiotika i antimikotika 100 × koncentrovan (sve od Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Nemačka), PMA, bafilomicin A1 (oba od Tocris Bioscience, Bristol, Velika Britanija), inhibitor MEK1/2 2-(2-amino-3-metoksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on (PD098059) (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), inhibitor JNK 1,9-pirazoloantron (SP600125) (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), inhibitori PKC: 3-(1-(3-aminopropil)-1H-indol-3-il)-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirol-2,5-dion acetat monohidrat (Ro-317549) i 2-[1-(3-dimetilaminopropil)-1H-indol-3-il]-3-(1H-indol-3-il)-maleimid (bisindolilmaleimid I) (oba od Merck CalBiochem, Darmštat, Nemačka), antioksidant NAC (engl. *N-acetylcysteine*, NAC) (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), fosfatni pufer (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS - 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl pH 7,4), antitela CD11b, CD13, CD14 konjugovana sa fikoeritriinom (engl. *phycoerythrin*, PE) (anti-CD11b/PE, anti-CD13/PE, anti-CD14/PE) (svi od BD Biosciences, San Hoze, Kalifornija), CD45 antitelo konjugovano sa fluorescein izotiocijanatom (engl. *fluorescein isothiocyanate*, FITC) (anti-CD45/FITC) (BD Biosciences, San Hoze, Kalifornija), akridin oranž (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), lysotracker Green DND-26 (Thermo Fisher Scientific, Voltman, Masačusets, SAD), propidijum jodid (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), aneksin V-FITC (Biolegend, San Dijego, Kalifornija, SAD), 2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat H2DCFDA (Thermo Fisher Scientific, Voltman, Masačusets, SAD), apsolutni etanol (Carlo Erba Reagents, Milano, Italija), deterdžent Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), RNA-aza (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), *TRIzol* reagens za izolaciju RNK (ribonuklesinska kiselina, RNK) (Karslbard, Kalifornija, SAD), hloroform (SERVA, Hajdelberg, Nemačka), izopropanol (SERVA, Hajdelberg, Nemačka), nasumični heksamerni prajameri, dezoksiribonukleotidi-trifosfat (dNTP) (oba od Thermo Fisher Scientific, Voltman, Masačusets, SAD), 5 × pufer za reverznu transkriptazu, RNA-aza (oba od Thermo Fisher Scientific, Voltman, Masačusets, SAD), M-MuLV reverzna transkriptaza (engl. *Moloney Murine Leukemia Virus RevertAid Reverse Transcriptase*, M-MuLV) (Thermo Fisher Scientific, Voltman, Masačusets, SAD), polimeraza i pufer za polimerazu (engl. *Maxima Hot Start PCR Master Mix*) (Thermo Fisher Scientific, Voltman, Masačusets, SAD), prajmeri/probe za BIF (Hs00990283_m1), ATG7 (Hs00197348_m1), ATF4 (Hs00909569_g1), ATG4B (Hs00367088_m1), ULK1 (Hs00177504_m1), AMBRA1 (Hs00387943_m1), VPS34 (Hs00176908_m1), FOXO1 (Hs00231106_m1), FOXO3 (Hs00818121_m1), FIP200(Hs01089002_m1), TFEB (Hs01065085_m1), GABARAP (Hs00925899_g1), p62 (Hs00177654_m1) i 18s rRNA (Hs03928992_g1) (Thermo Fisher Scientific, Voltman, Masačusets, SAD), adhezivni film za ploče sa 96 bunara (*MicroAmpOptical 96-Well Reaction Plate*, Life Technologies, Karlsbad, Kalifornija, SAD), EvaGreen (Biotium, Hejvard, Kalifornija, SAD), prajmeri za *CSF1R* uzvodni 5'-GCCTTCCTCGCTTCCAAGA-3' i nizvodni 5'-CATTGGTCAACAGCACGTTACG-3', prajmeri za *EGR1* uzvodni 5'-TGACCGCAGAGTCTTTTCCT -3' i nizvodni 5'-GAGTGGTTTGGCTGGGGTAA-3' prajmeri za *IL-8* uzvodni 5'-TCTGTGTGAAGGTGCAGTTTTG-3' i nizvodni 5'-GGGGTGGAAAGGTTTGGAGT-3', prajmeri za *GAPDH* (engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) uzvodni 5'-AAATCCCATCACCATCTTCC-3' i nizvodni 5'-GACTCCACGACTACTCAGC-3' (svi prajmeri od Invitrogen, Karlsbad, Kalifornija, SAD), SF kit za nukleofekciju ćelijskih linija (SF Cell Line 4D-Nucleofector X kit L, Lonza, Bazel, Švajcarska), inhibitor fosfataza natrijum-fluorid (NaF) i natrijum ortovanadat (Na₃VO₄), inhibitor

proteaza fenil-metil-sulfonil-fluorid (PMSF) i smeša inhibitora proteaza (svi inhibitori od Sigma Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), albumin goveđeg seruma, mleko u prahu sa 0% mlečne masti, Tris, bromfenol plavo, β -merkaptoetanol, glicerol, natrijum dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulphate*, SDS), akrilamid/bisakrilamid, amonijum persulfat, tetrametiletildiamin (sve od SERVA, Hajdelberg, Nemačka), marker sa proteinima poznatih molekulskih masa (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa, Thermo Fisher Scientific, Voltman, Masačusets, SAD), nitrocelulozna membrana (Amersham Protran 0,45 NC nitrocellulose membrane, GE Healthcare, Freiburg, Nemačka), Ponceau S (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), sirćetna kiselina (SERVA, Hajdelberg, Nemačka), deterdžent Tween-20 (Thermo Fisher Scientific, Voltman, Masačusets, SAD), zečija antitela na ATG 5, ATG 7, beclin-1, LC3, β -aktin, fosfo-AKT (Ser473), AKT, fosfo-p70S6K (Thr389), p70S6K, fosfo-4EBP1 (Thr37/46), 4EBP1, fosfo-AMPK α (Thr172), AMPK α , fosfo-ERK, ERK, fosfo-JNK (Thr183/Tyr185), JNK, fosfo-p38 (Thr180/Tyr182), p38, fosfo-GSK3 β (Ser9), β -tubulin, lamin A/C (sve od Cell Signaling Technology, Danvers, Masačusets, SAD), mišija antitela GSK3 β , TFEB, FOXO1, FOXO3, ZKSCAN3, Bcl-2 (sve od Santa Cruz, Santa Kruz, Kalifornija, SAD), anti-zečije antitelo konjugovana sa peroksidazom rena (Cell Signaling Technology, Danvers, Masačusets, SAD), anti-mišije antitelo konjugovano sa peroksidazom rena (H+L, IgG1, Southern Biotech, Bermingem, Alabama), kumarinska kiselina i luminol (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), paraformaldehid (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), metanol (Carlo Erba Reagents, Milano, Italija), koziji serum (Abcam, Kembriđž, Velika Britanija), antitelo obeleženo sa zelenom fluorescencijom Alexa Fluor 488 (Cell Signaling Technology, Danvers, Masačusets, SAD), Fluoromount-G (Southern Biotech, Bermingem, Alabama), kit za izolaciju frakcija (*FractionPREP Cell Fractionation kit*, BioVision, Mautin Vju, Kalifornija, SAD), deterdžent NP-40 (engl. *Nonidet P-40*) (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), antitelo na beclin-1 (Novus Biologicals, Sentenijal, Kolorado, SAD) i (Santa Cruz, Santa Kruz, Kalifornija, SAD), protein A agarozne kuglice (Cell Signaling Technology, Danvers, Masačusets, SAD) siRNK (engl. small interfering RNA, siRNK) za *MKK1* FlexiTube GeneSolution GS5604 (Qiagen, Hilden, Nemačka), siRNK za *MKK7* FlexiTube GeneSolution GS5609 (Qiagen, Hilden, Nemačka), kontrolna siRNK (Qiagen, Hilden, Nemačka), siRNK za *p62*, *ATG5* i kontrolna siRNK (sve od Santa Cruz, Santa Kruz, Kalifornija, SAD).

3.2. Čelijska kultura

Dejstvo PMA je ispitivano na humanoj mijeloidnoj leukemijskoj čelijskoj liniji HL-60 (engl. *human leukemia-60*) koja je kupljena od Evropske kolekcije čelijskih linija (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Velika Britanija). Ova čelijska linija je izolovana iz pacijenta ženskog pola i prvobitno je klasifikovana kao akutna promijelocitna leukemija. Međutim, ove ćelije nemaju karakteristike akutne promijelocitne leukemije što podrazumeva translokaciju između 15. i 17. hromozoma, hipergranuliranost i prisustvo Auerovih tela tj. agregata citoplazmatskih granula bogatih mijeloperoksidazom. Zbog toga je HL-60 čelijska linija klasifikovana kao akutna mijeloidna leukemija sa maturacijom (211). HL-60 ćelije su gajene u medijumu RPMI 1640 sa 20 mM HEPES puferom, 1 mM L-glutaminom, 10% FCS i 1% rastvora antibiotika i antimikotika (sve od Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Nemačka) u inkubatoru na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Nakon odmrzavanja ćelija iz tečnog azota, HL-60 ćelije su gajene u Petri šoljama za suspenziju, prečnika 100 mm. Za analizu protočnom citofluorimetrijom i konfokalnu mikroskopiju korišćene su ploče sa 24 bunara (3 × 10⁵ ćelija/bunaru). Za imunoblot analizu, fracionaciju ćelija i ko-imunoprecipitaciju ćelije su gajene u Petri šoljama (100 mm) u kojima je sađeno 10 × 10⁶ ćelija. Za transfekciju ćelija i qRT-PCR metodu upotrebene su ploče sa 6 bunara (1 × 10⁶ ćelija/bunaru). HL-60 ćelije su diferencirane 16 h ili 24 h pod dejstvom PMA u prisustvu

ili odsustvu inhibitora autofagije bafilomicina A1, inhibitora MEK1/2 (PD098059), inhibitora JNK (SP600125), inhibitora PKC (Ro-317549 i bisindolilmalemid I) ili antioksidanta NAC kao što je opisano u figurama i legendama.

3.3. Ispitivanje markera diferencijacije, parametara ćelijske smrti i autofagije metodom protočne citofluorimetrije

Korišćenjem protočne citofluorimetrije (engl. *Fluorescence-Activated Cell Sorting*, FACS) analizirane su faze ćelijskog ciklusa, prisustvo markera diferencijacije, produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta i prisustvo autofagije, apoptoze i nekroze. U svakom uzorku je sakupljeno 10 000 događaja (ćelija). Analiza je izvršena pomoću protočnog citometra FACS Aria III (BD Biosciences, San Hoze, Kalifornija) ili FACSCalibur, pri čemu su korišćeni softveri FACSDiva v6.1.3, CellQuest Pro (BD Biosciences) i FlowJo v10.1 (FlowJo LLC, Ešland, Oregon).

3.3.1. Detekcija ćelija u apoptozi i nekrozi

Za ispitivanje prisustva apoptoze i nekroze, ćelije su analizirane protočnim citofluorimetrom nakon bojenja sa aneksin V-fluorescein izotiocijanatom (aneksin V-FITC) i propidijum jodidom (PI). Aneksin V je protein od 36 kDa i vezuje se za fosfatidilserin koji se nalazi na spoljašnoj strani ćelijske membrane kada ćelija umire apoptozom (212). Aneksin V-FITC emituje zelenu fluorescencu nakon pobuđivanja laserom protočnog citofluorimetra. Sposobnost propidijum jodida da prođe kroz ćelijsku membranu zavisi od njenog oštećenja. U kasnoj apoptozi i nekrozi integritet ćelijske i jedarne membrane je narušen, što omogućava da PI uđe u jedro i umetne se između lanaca DNK. PI emituje crvenu fluorescencu nakon pobuđivanja laserom protočnog citofluorimetra. Na osnovu analize dvostrukog bojenja sa aneksin V-FITC i PI, na tačkastom grafikonu se mogu razlikovati populacije zdravih ćelija (aneksin negativne i PI negativne), ćelija u ranoj apoptozi (aneksin pozitivne i PI negativne) i ćelija u kasnoj apoptozi ili nekrozi (aneksin pozitivne i PI pozitivne) (213). Ukratko, po završetku tretmana ćelije su centrifugirane 5 minuta na 500 g, oprane u 2 ml PBS-a, centrifugirane 5 minuta na 500 g i talog ćelija je resuspendovan u 100 µl aneksin vezujućeg pufera kojem je dodat aneksin V-FITC (2 µg/ml). Nakon inkubacije 30 min u mraku na sobnoj temperaturi, dodato je još 300 µl aneksin vezujućeg pufera sa propidijum jodidom (20 µg/ml). Analiza je izvršena pomoću protočnog citometra FACS Aria III i FACSDiva v6.1.3 softvera.

3.3.2. Ispitivanje faza ćelijskog ciklusa

Za analizu faza ćelijskog ciklusa korišćeno je bojenje ćelija propidijum jodidom (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD) na način kao što je ranije opisano (214). Ova boja se umeće u lance DNK i RNK i fluorescira crveno. Intenzitet fluorescence je proporcionalan količini DNK u ćeliji koja ostaje nakon uklanjanja RNK korišćenjem RNAza. Na osnovu obojenih ćelija sa propidijum jodidom mogu se razlikovati faza ćelijskog rasta G₀G₁, S faza replikacije DNK, faza deobe ćelija G₂M i detekcija subG₀ ako je DNK fragmentisana usled apoptoze. Nakon diferencijacije HL-60 leukemijskih ćelija pod dejstvom PMA, ćelije su prebačene u FACS epruvete i oprane u 1ml PBS-a, 2 puta po 5 minuta pri brzini od 500g na sobnoj temperaturi. Na talog ćelija je dodato 300 µl PBS-a i 700 µl hladnog apsolutnog etanola i inkubirano je na +4 °C preko noći. Sledećeg dana, ćelije su

centrifugirane na 800 g 5 minuta na sobnoj temperaturi, oprane sa 3ml PBS-a, ponovo centrifugirane i resuspendovane u 300 μ l PBS-a sa 1% Triton X-100 i 1 mg/ml RNA-aze. Po završetku inkubacije u trajanju od 15 minuta na 37 °C u FACS epruvete je dodato 0,05 mg/ml PI. Inkubacija je potom trajala 30 minuta na 37 °C i analiza je izvršena pomoću protočnog citometra FACSCalibur. Za detekciju crvene fluorescence koju emituje PI boja, korišćen je kanal FL2 protočnog citometra. Rezultat je predstavljen u obliku histograma distribucije intenziteta crvene fluorescence. Za svaku fazu ćelijskog ciklusa je prikazan odgovarajući procenat ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija.

3.3.3. Merenje ekspresije površinskih markera makrofaga

Za analizu ekspresije površinskih markera diferencijacije CD11b, CD13, CD14 i CD45 korišćena je protočna citofluorimetrija. Nakon tretmana sa PMA, HL-60 ćelije (2×10^6) su sakupljene i obojene sa 0,2 μ g/ml antitela za CD11b, CD13, CD14 i CD45 konjugovanih sa fluorescentnom bojom, u 500 μ l pufera za bojenje. Pufer za bojenje se sastojao od PBS-a sa 2% FCS. CD11b, CD13 i CD14 antitela su konjugovana sa fikoeritriinom, dok je CD45 antitelo konjugovano sa fluorescein izotiocijanatom. Nakon 30 minuta inkubacije na +4 °C, ćelije (1×10^6 /ml) su oprane i resuspendovane u puferu za bojenje. Ćelije su potom analizirane pomoću protočnog citometra FACS Aria III i FACSDiva v6.1.3 softvera. Obrada podataka je izvršena u programu FlowJo v10.1. Rezultati su predstavljeni u obliku histograma distribucije intenziteta fluorescence ili kao relativna srednja vrednost intenziteta fluorescence tretiranih ćelija u odnosu na dobijene vrednosti u netretiranim ćelijama.

3.3.4. Ispitivanje autofagije u ćelijama

Akridin oranž je lipofilna zelena fluorescentna boja koja se u kiselim vezikulama protonuje i akumulira emitujući crvenu fluorescencu. Zbog toga autofagolizozomi u kontaktu sa akridin oranžom fluoresciraju crvenom bojom, dok pH neutralna citoplazma i jedro fluoresciraju zeleno. Nakon tretmana, HL-60 ćelije su inkubirane sa bojom akridin oranž finalne koncentracije 1 μ g/ml, 15 minuta na 37 °C u mraku. Ćelije su zatim analizirane invertnim fluorescentnim mikroskopom (Leica Microsystems DMIL, Veclar, Nemačka) koristeći Leica Microsystems DFC320 kameru i softver Leica Application Suite (version 2.8.1). Autofagolizozomi se uočavaju pod mikroskopom kao narandžaste ili crvene vezikule, dok citoplazma i jedro fluoresciraju zeleno. Za detekciju autofagolizozoma je korišćena i fluorescentna boja LysoTracker Green DND-26. Ova boja emituje zelenu fluorescencu u kiselim vezikulama. HL-60 ćelije su inkubirane sa bojom LysoTracker Green DND-26 (100 nM) 15 minuta na 37 °C u mraku. Nakon isteka tretmana, ćelije su prebačene u FACS epruvete, centrifugirane na 500 g na sobnoj temperaturi 5 minuta i talog je finalno rastvoren u 500 μ l PBS-a. Fluorescenca je detektovana na protočnom citofluorimetru FACSCalibur (FL1 kanal) korišćenjem CellQuest Pro softvera. Rezultati su predstavljeni kao relativna srednja vrednost intenziteta fluorescence u odnosu na dobijene vrednosti u netretiranim ćelijama.

3.3.5. Određivanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta

Za određivanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) korišćena je redoks-senzitivna boja 2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat (H2DCFDA) koja predstavlja redukovan fluorescein. Ova

boja može slobodno da prođe kroz ćelijsku membranu i kada uđe u ćeliju hidrolizuje se unutarćelijskim esterazama pri čemu nastaje derivat 2',7'-dihlorodihidrofluorescein (H2DCF) koji ne fluorescira. U prisustvu RKV dolazi do oksidacije H2DCF u 2',7'-dihlorofluorescein (DCF) koji fluorescira zeleno (215). Istovremeno sa tretmanom dodato je 10 μ M H2DCFDA boje u medijum HL-60 ćelija. Nakon završetka tretmana, ćelije su prebačene u FACS epruvete i oborene 5 minuta na 500 g. Potom su ćelije resuspendovane u 1 ml PBS-a, centrifugirane 5 minuta na 500 g i finalno resuspendovane u 500 μ l PBS-a. Analiza je izvršena pomoću protočnog citometra *FACS Aria III* (BD Biosciences, San Hoze, Kalifornija) na *FACSDiva* v6.1.3 softveru. Rezultati su predstavljeni u obliku histograma distribucije intenziteta fluorescence. Povećanje intenziteta fluorescence u odnosu na netretirane ćelije ukazuje na povećanu produkciju RKV.

3.4. Određivanje nivoa ekspresije iRNK za autofagne i makrofagne gene

3.4.1. Izolacija RNK

Izolacija RNK iz ćelija je izvršena korišćenjem *TRIzol* reagensa za izolaciju RNK. Nakon tretmana HL-60 ćelija uz upotrebu PMA, ćelije su sakupljene i centrifugirane 5 minuta na 500 g na sobnoj temperaturi. Talog ćelija je resuspendovan u 500 μ l *TRIzol* reagensa i inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga je u lizate dodato 100 μ l hloroforma i oni su vorteksovani, a potom inkubirani 10 minuta na +4 °C. Uzorci su zatim centrifugirani 15 minuta na 12 000 g na +4 °C i formirane su sledeće faze: gornja vodena faza koja sadrži RNK, intermedijerna faza sa DNK i donja hloroformska faza sa lipidima i proteinima. Vodena faza sa RNK je pažljivo prebačena u nove epruvete i dodata je ista zapremina izopropanola da bi se precipitovala RNK. Sadržaj epruveta je promućkan i nakon 30 minuta na sobnoj temperaturi uzorci su centrifugirani na +4 °C, 15 minuta na 12000 g. Supernatant je odliven, a talog RNK je opran 2 puta po 5 minuta sa 1ml 75% hladnog etanola centrifugiranjem na brzini od 7500 g. Nakon poslednjeg pranja talog je osušen od etanola na sobnoj temperaturi dok nije dobio staklastu formu, a potom je resuspendovan u 20-50 μ l destilovane vode. Nakon izolacije, koncentracija RNK je izmerena pomoću spektrofotometra GeneQuant pro (Biochrom Ltd., Kembridž, Velika Britanija) prema uputstvu proizvođača. Molekuli RNK se detektuju na apsorbanici od 260 nm. Apsorbanca na 230 nm detektuje prisustvo soli, dok se na 280 nm detektuju proteini u rastvoru RNK. Odnos A_{260}/A_{230} veći od 2 ukazuje na odustvo soli, dok odnos A_{260}/A_{280} veći od 1,8 ukazuje na čistoću RNK molekula u rastvoru.

3.4.2. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija je proces u kome se RNK prevodi u cDNK. Za svaku reakciju reverzne transkripcije je pripremljeno 1 μ g RNK koja je rastvorena u 13 μ l destilovane vode. U reakciju je potom dodata smeša 1 sačinjena od 1 μ l nasumičnih heksamera i 0,5 μ l 25 mM dNTP (dezoksiribonukleotid-trifosfat, dNTP). Na uzorke je potom primenjen program aparata *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) na 70 °C 10 minuta. U ovom koraku dolazi do topljenja sekundarne strukture RNK kako bi mogli da se vežu prajmeri. Nakon isteka inkubacije od 10 minuta, uzorci su stavljeni na led i dodata je smeša 2 sačinjena od 4 μ l 5 \times pufera za reverznu transkriptazu i 0,5 μ l inhibitora RNAze (40 U/ μ l). U svaku epruvetu je potom dodato 1 μ l (200 U/ μ l) M-MuLV reverzne transkriptaze. Nakon toga, epruvete su vraćene u aparat i usledio je program 15 minuta na 25 °C u kojem se vezuju prajmeri kako bi započeo proces reverzne transkripcije u trajanju od 60 minuta na 42 °C. Sledeći korak je bio 70 °C 10 minuta u kojem se

prekida reakcija i potom deaktivira enzim na 95 °C 3 minuta. Nakon završenog programa reverzne transkripcije uzorci su ostavljeni na +4 °C.

3.4.3. Reakcija lančanog umnožavanja sa detekcijom proizvoda u realnom vremenu

Reakcija lančanog umnožavanja sa detekcijom proizvoda u realnom vremenu (engl. *real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*, qRT-PCR) je korišćena za analizu ekspresije gena za autofagiju i gena za markere makrofaga. Za analizu ekspresije autofagnih gena korišćeni su prajmeri sa probama obeleženi fluorescentnom bojom 6-karboksifluorescein (6-FAM). Za reakciju je bilo neophodno 2,5 µl smeše polimeraze i pufera za polimerazu *Maxima Hot Start PCR Master Mix*, 0,25 µl prajmera/proba i 2,25 µl cDNK (10 × razblažena cDNK dobijena reverznom transkripcijom). U reakciji su korišćeni TaqMan prajmeri i probe: BIF-1 (Hs00990283_m1), ATG7 (Hs00197348_m1), ATF4 (engl. *activating transcription factor 4*; Hs00909569_g1), ATG4B (Hs00367088_m1), ULK1 (Hs00177504_m1), AMBRA1 (Hs00387943_m1), VPS34 (Hs00176908_m1), FOXO1 (Hs00231106_m1), FOXO3 (Hs00818121_m1), FIP200 (Hs01089002_m1), TFEB (Hs01065085_m1), GABARAP (Hs00925899_g1), p62 (Hs00177654_m1) i 18s rRNA (Hs03928992_g1). Na aparatu Realplex2 Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) je podešen program 95 °C 4 minuta inicijalne denaturacije nakon čega je usledilo 40 ciklusa od kojih se svaki sastojao od 95 °C 15 s i 60 °C 1 minut. Nakon pripremanja reakcione smeše u pločama sa 96 bunara ploče su prelepljene adhezivnim filmom MicroAmpOptical 96-Well Reaction Plate kako ne bi došlo do uparavanja uzoraka. Za umnožavanje gena za makrofagne markere korišćeni su prajmeri za čiji PCR produkt se vezuje fluorescentna boja EvaGreen tako što se umeće između lanaca DNK. U reakciji je dodato 4,5 µl smeše polimeraze i pufera za polimerazu *Maxima Hot Start PCR Master Mix*, 0,5 µl boje EvaGreen, 4 µl smeše prajmera i 1 µl cDNK. Program na Realplex² Mastercycler aparatu je bio podešen na 95 °C 4 minuta i 40 ciklusa od kojih se svaki sastojao od 95 °C 30 s i 60 °C 1 minut. Nakon ovoga je usledio program krive topljenja koji se sastojao od 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, od 60 °C do 95 °C 20 minuta i 95 °C 15 s. Prajmeri za umnožavanje gena *CSF1R* i *GAPDH* su dizajnirani korišćenjem programa Primer Express (Applied Biosystems, Češir, Velika Britanija), dok su *EGR1* i *IL-8* dizajnirani korišćenjem *Primer-Blast Tool* (National Institutes of Health, Betesda, Merilend, SAD). Finalne koncentracije i sekvence prajmera su prikazani u Tabeli 1. Dobijene prosečne Ct (engl. *cycle threshold value*, Ct) vrednosti duplikata *housekeeping* gena (*18s rRNA* za autofagne gene, *GAPDH* za gene makrofagnih markera) su oduzete od prosečnih Ct vrednosti duplikata gena od interesa čime se dobija ΔCt na osnovu kojeg se meri relativna ekspresija gena pomoću formule $2^{-\Delta Ct}$. Rezultati su prikazani kao relativni u odnosu na dobijene vrednosti u kontrolnim ćelijama koje su arbitrarno podešene na 1.

Tabela 1. Sekvence i koncentracije prajmera za detekciju makrofagnih markera i interne kontrole

| Naziv gena | Sekvenca prajmera (5'-3') | Koncentracija (nM) |
|--------------|---------------------------|--------------------|
| <i>CSF1R</i> | | |
| F | GCCTTCCTCGCTTCCAAGA | 900nM |
| R | CATTGGTCAACAGCACGTTACG | 300nM |
| <i>EGR1</i> | | |
| F | TGACCGCAGAGTCTTTTCCT | 100nM |
| R | GAGTGGTTTTGGCTGGGGTAA | 300nM |
| <i>IL-8</i> | | |

| | | |
|--------------|------------------------|-------|
| F | TCTGTGTGAAGGTGCAGTTTTG | 300nM |
| R | GGGGTGGAAAGGTTTGGAGT | 300nM |
| <i>GAPDH</i> | | |
| F | AAATCCCATCACCATCTTCC | 900nM |
| R | GACTCCACGACGTACTCAGC | 300nM |

3.5. Konfokalna mikroskopija

Prisustvo autofagozoma u HL-60 ćelijama je analizirano praćenjem tačkaste distribucije fluorescentno obeleženog LC3 proteina konfokalnom mikroskopijom. HL-60 ćelije su posađene na pokrovna stakalca u ploče sa 24 bunara (3×10^5 ćelija/bunaru) i tretirane sa PMA. Po završetku tretmana, medijum je pažljivo otklonjen i ćelije su fiksirane sa 4% paraformaldehidom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Usledila je zatim permeabilizacija ćelija sa hladnim metanolom 4 minuta na -20 °C. Ćelije su potom inkubirane 60 minuta u rastvoru za blokiranje koji se sastojao od 5% kozijeg seruma rastvorenog u PBS-u kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela. Ćelije su pažljivo oprane PBS-om i inkubirane preko noći na $+4$ °C sa zečijim antitelom na LC3B sa razblaženjem 1:200 u rastvoru za blokiranje. Nakon toga su ćelije oprane u PBS-u i inkubacija je trajala 90 minuta sa kozijim sekundarnim anti-LC3B antitelom koje je obeleženo sa zelenom fluoroforom Alexa Fluor 488. Pokrovna stakalca sa ćelijama su zalepljena na mikroskopske pločice pomoću Fluoromount-G. Slike ćelija su dobijene pomoću softvera Leica Confocal Software sa Leica TCS SP2 konfokalnog mikroskopa (Leica Microsystems, Veclar, Nemačka) koristeći PL APO 63 x 1.3 Glycerol HCX CS objektiv sa 2,54 digitalnim uveličanjem i FITC-TRITC kombinacijom lasera.

3.6. Imunoblot analiza

Imunoblot analiza obuhvata identifikaciju i kvantifikaciju proteina od interesa koristeći specifično antitelo na proteine uzorka, koji su elektroforetski razdvojeni na poliakrilamidnom gelu na osnovu veličine i prenešeni na membranu. Na osnovu ove metode se takođe može ispitati fosforilacija odnosno aktivacija proteina u uzorku.

3.6.1. Merenje koncentracije proteina i priprema uzoraka

Po završetku tretmana, HL-60 ćelije su lizirane u RIPA puferu (engl. radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA) u prisustvu inhibitora fosfataza 50 mM NaF i 2 mM Na_3VO_4 , inhibitora proteaza 1mM PMSF i 20 $\mu\text{l/ml}$ smeše inhibitora proteaza. Posle inkubacije od 30 minuta na ledu, ćelije su centrifugirane (15 minuta, 14 000 g) na $+4$ °C i supernatanti su sakupljeni i čuvani na -80 °C. Koncentracija proteina je izmerena metodom po Bradfordu koja se zasniva na promeni boje Coomassie Brilliant Blue G-250 iz katjonske crvene u anjonsku plavu u prisustvu proteina u uzorku (216). Intenzitet plave boje je odgovarao koncentraciji proteina u uzorku. Bradfordov reagens se pripremao rastvaranjem boje Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,1 mg/ml) u destilovanoj vodi sa 10% fosforne kiseline i 5% etanola. Apsorbanca se merila na čitaču za mikrotitarske ploče (Tecan Sunrise microplate reader, Ciriš, Švajcarska) na 570 nm. Nepoznata koncentracija uzorka je dobijena na osnovu standardne krive koja je konstruisana na osnovu apsorbanci poznatih koncentracija albumina goveđeg seruma (0, 5, 10, 15, 20 mg/ml). U svim lizatima uzoraka je koncentracija proteina izjednačena tako što je u svaki uzorak dodata odgovarajuća zapremina redukujućeg pufera za pripremanje uzoraka (62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 0,002% bromfenol plavo, 2

mM β -merkaptotanol, 10% glicerol i 2% SDS). Uzorci su potom kuvani 5 minuta na 95 °C kako bi došlo do denaturacije proteina uz pomoć SDS-a i β -merkaptotandola koji raskida proteinske disulfidne mostove. Zbog toga su proteini zauzeli štapičastu formu i negativno naelektrisanje koje potiče od vezivanja molekula SDS-a. Proteini su potom razdvojeni poliakrilamidnom gel elektroforezom (engl. *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) na osnovu mase, a ne zbog razlike u naelektrisanju.

3.6.2. Elektroforeza i transfer

Elektroforeza proteina se odvijala na poliakrilamidnom gelu koji se sastojao od gela za koncentrovanje i gela za razdvajanje proteina. Gel za koncentrovanje (0,125 M Tris-HCl pH 6.8, 0,1% SDS i 4% akrilamid/0.14% bisakrilamid) sabija uzorke i drži ih u istoj ravni prilikom ulaska u gel za razdvajanje. Zbog toga u ovom gelu prave bunari za nalivanje uzoraka i u svakom bunaru je nalivena ista količina proteina. U zavisnosti od molekulske mase proteina koji je ispitivan pravljene su 8%, 10% ili 12% gelovi za razdvajanje koji su se razlikovali po količini dodatog poliakrilamida u gelu. Manji procenat akrilamida u gelu je upotrebljen za razdvajanje proteina veće molekulske mase (mTOR), dok je veći procenat akrilamida u gelu korišćen za razdvajanje proteina manje molekulske mase (LC3, 4EBP1). Za 10% gel za razdvajanje je bilo neophodno 0,375 M Tris-HCl-a, pH 8.8, 0,1% SDS-a i 10% akrilamida/0,34% bisakrilamida. Reakcija polimerizacije akrilamida je katalizovana pomoću 0,1% amonijum persulfata i 0,033% tetrametiletildiamina. Gel je potom potopljen u pufer za elektroforezu koji se sastojao od 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,1% SDS i 192 mM glicina. Pored uzoraka, u gel je naliven i marker sa proteinima poznatih molekulskih masa (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa*) na osnovu kojih se pratio protein od interesa. Uzorci su se kretali kroz gel za koncentrovanje pri konstantnoj voltaži od 100V, a kada su prešli u gel za razdvajanje voltaža je povećana na 180V. Posle završene elektroforeze, metodom polusuvog transfera, proteini su sa gela preneti na nitroceluloznu membranu *Amersham Protran 0.45 NC nitrocellulose membrane* uz pomoć aparata *TE 70 Semi-dry transfer unit* (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Velika Britanija). Za transfer proteina su korišćena tri različita pufera za transfer zbog čega se ovaj transfer naziva diskontinuirani. Puferi bliži anodi su označeni kao anodni pufer I (300mM Tris pH 10,4 i 20% metanol) i anodni pufer II (25mM Tris pH 10,4 i 20% metanol) dok je bliže katodi bio katodni pufer (25mM Tris pH 9,4, 3% glicin i 20% metanol). Pre postavljanja transfer sendviča, membrana je bila inkubirana u anodnom puferu II, dok je gel inkubiran u katodnom puferu. Na transfer ploči prvo su postavljena 3 filter papira (2 filter papira natopljena u anodni pufer I i 1 filter papir natopljen u anodnom puferu II). Na njih je potom postavljena membrana, gel iz katodnog pufera i 3 filter papira natopljena u katodnom puferu. U transfer sendviču membrana je bila bliža anodi, dok je gel sa negativno naelektrisanim proteinima bio bliži katodi. Ovakva orijentacija je omogućila da negativno naelektrisani proteini sa gela putuju ka anodi i vežu se za membranu pod uticajem struje konstantne jačine (0,8 mA/cm² membrane). Transfer je trajao 90 minuta i odvijao se na sobnoj temperaturi. Provera uspešnosti transfera je izvršena bojenjem membrane u Ponceau S (0,2% Ponceau S u 1% sirćetnoj kiselini) koja se vezuje za proteine. Nakon 5 minuta bojenja u Ponceau S, membrana je isprana od viška boje u 1% sirćetnoj kiselini tako da ostanu samo crveno obojeni proteini na membrani. Membrane su potom isečene za analizu proteina od interesa i odbojene PBS-om.

3.6.3. Imunoblot

Membrana se inkubira odnosno blokira 30 minuta u 10% rastvoru mleka na sobnoj temperaturi. Ovaj rastvor je dobijen tako što je mleko u prahu sa 0% mlečne masti rastvoreno u TBS-T (engl. *tris buffered saline with tween 20*, TBS-T) puferu za pranje (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6 i 0,05% Tween-20 deterdžent). Dodavanje mleka pre inkubiranja membrane sa primarnim antitelom je sprečilo nespecifično vezivanje primarnog antitela za membranu. U sledećem koraku membrana je inkubirana sa primarnim antitelom u 5% mleku koje je rastvoreno u TBS-T puferu preko noći na +4 °C na rotirajućoj platformi. U eksperimentima su korišćena zečija antitela na ATG 5 (1:1000), ATG 7 (1:1000), beklin-1 (1:1000), LC3B (1:800), β-aktin (1:2000), fosfo-AKT (Ser473) (1:1000), AKT (1:2000), fosfo-p70S6K (Thr389) (1:800), p70S6K (1:1000), fosfo-4EBP1 (Thr37/46) (1:800), 4EBP1 (1:1000), fosfo-AMPKα (Thr172) (1:1000), AMPKα (1:1000), fosfo-ERK1/2 (1:2000), ERK1/2 (1:2000), fosfo-JNK (Thr183/Tyr185) (1:800), JNK (1:800), fosfo-p38 (Thr180/Tyr182) (1:800), p38 (1:1000), fosfo-GSK3β (Ser9) (1:1000) (sve od Cell Signaling Technology, Danvers, Masačusets, SAD), p62 (1:2000) (Novus Biologicals, Sentenijal, Kolorado, SAD) i mišija antitela na GSK3β (1:1000), TFEB (1:500), FOXO1 (1:500), FOXO3 (1:500), ZKSCAN3 (1:500) Bcl-2 (1:1000) (sve od Santa Cruz, Santa Kruz, Kalifornija, SAD). Sutradan je membrana oprana 3 puta u TBS-T puferu za pranje. Membrana je potom inkubirana sa sekundarnim antitelom u 5% mleku rastvorenom u TBS-T puferu, 90 minuta na sobnoj temperaturi na rotirajućoj platformi. Korišćeno je anti-zečije (1:2000, Cell Signaling Technology) ili anti-mišje sekundarno antitelo (1:2000, H+L, IgG1, Southern Biotech, Birmingham, Alabama) koje je konjugovano sa peroksidazom rena. Nakon što su membrane oprane 3 puta u TBS-T puferu, prelivene su sa supstratom za peroksidazu. Ovaj supstrat je dobijen mešanjem 0,24 mM kumarinske kiseline i 1,5 mM luminola koji su rastvoreni u Tris-HCl pH 8,5 sa 0,009% vodonik peroksidom. Peroksidaza razgrađuje vodonik peroksid do vode i kiseonika koji potom reaguje sa luminolom iz supstrata formirajući foton svetlosti i 3-aminoflatat kao produkt reakcije. Dobijeni signal je vizuelizovan pomoću aparata *Chemidoc Imaging System* (Bio-Rad, Herkules, Kalifornija, SAD). Ekspresija dobijenih proteinskih traka je kvantifikovana denzitometrijom pomoću ImageLab softvera (Bio-Rad, Herkules, Kalifornija, SAD). Ekspresija LC3-II, p62, ATG 7, beklin-1, ATG 5, AMPK, AKT, p70S6K, 4EBP1, ERK, JNK, p38, GSK3β i Bcl-2 je izražena u odnosu na β-aktin, dok je fosforilacija AMPK, AKT, p70S6K1, 4EBP1, ERK, JNK, p38, GSK3β, Bcl-2 bila izražena u odnosu na njihovu totalnu formu. Dobijene vrednosti intenziteta signala u tretiranim ćelijama su izražene u odnosu na dobijene vrednosti u kontroli.

3.7. Izolovanje ćelijskih frakcija

Ova metoda je korišćena kako bi se pratio transport transkripcionih faktora (TFEB, ZKSCAN3, FOXO1, FOXO3) iz citoplazme u jedro u tretmanu ćelija sa PMA u prisustvu ili odsustvu inhibitora MEK i JNK. Citosolna i jedarna frakcija HL-60 ćelija su dobijene korišćenjem kita za izolaciju frakcija FractionPREP Cell Fractionation kit prema uputstvu proizvođača. Ovaj kit se sastoji od pufera za izolaciju citosola - CEB pufera (engl. *Cytosol Extraction Buffer*), membrane - MEB-A i MEB-B pufera (engl. *Membrane Extraction Buffer*) i nukleusa - NEB pufera (engl. *Nuclear Extraction Buffer*), ditiotreitola (DTT) i smeše inhibitora proteaza. CEB, MEB-A i NEB puferi su pripremljeni na ledu tako što je u 1ml svakog pufera dodato 2 μl 1M DTT-a i 2 μl smeše inhibitora proteaza. Posađeno je 1×10^7 HL-60 ćelija u Petri šolje i nakon 16 h tretmana ćelija sa PMA, ćelije su pokupljene i centrifugirane 5 minuta 500 g na +4 °C. Ćelije su potom oprane u hladnom PBS-u i ponovo centrifugirane 5 minuta na 500 g na +4 °C. Dobijeni talog ćelija je rastvoren u 1 ml hladnog PBS-a i prebačen u ependorf epruvete nakon čega je oboren 5 minuta na 500 g +4 °C. Nakon toga,

PBS je odliven i talog ćelija je potom rastvoren u 400 μ l CEB pufera. Usledilo je inkubiranje lizata na ledu 20 minuta sa mešanjem na svakih 5 minuta kako bi se pospešilo liziranje ćelija. Uzorci su potom centrifugirani 700 g 10 minuta na +4 °C i prikupljeni su supernatanti koji predstavljaju izdvojenu citosolnu frakciju. U sledećem koraku dobijeni talog je resuspendovan u MEB-A puferu i vorteksovan, nakon čega je usledilo dodavanje 22 μ l MEB-B pufera i smeša je inkubirana 1 minut na ledu. Uzorci su vorteksovani 5 s i centrifugirani 5 minuta 1000 g na +4 °C, nakon čega su ukonjeni supernatanti koji predstavljaju membransku frakciju. Za dobijanje nukleusne frakcije, zaostali talog je resuspendovan u 200 μ l hladnog NEB pufera, vorteksovan 15 s i inkubiran na ledu 40 minuta sa vorteksovanjem od 15 s na svakih 10 minuta. Uzorci su potom centrifugirani na maksimalnoj brzini 14 000 g 10 minuta, a dobijeni supernatanti koji predstavljaju nukleusnu frakciju su prebačeni u nove tubice na ledu. Dobijeni talog na dnu tubice je citoskeletalna frakcija koja nije bila korišćena u daljim eksperimentima. Nakon završene fraktionacije ćelija, dobijene frakcije su čuvane na -80 °C do imunoblot analize. U nukleusnoj i citosolnoj frakciji je izmerena koncentracija proteina i dodat je redukujući pufer za pripremanje uzoraka pre nalivanja na gel. Čistoća citosolne frakcije je potvrđena antitelom za β -tubulin (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, Masačusets, SAD), dok je čistoća jedarne frakcije potvrđena antitelom za lamin A/C (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, Masačusets, SAD) u imunoblot analizi. U frakcijama su imunoblotom detektovani: TFEB (1:500), FOXO1 (1:500), FOXO3 (1:500) i ZKSCAN3 (1:500) (sve od Santa Cruz, Santa Kruz, Kalifornija, SAD). Ekspresija proteina u citosolu je izražena relativno u odnosu na β -tubulin, dok je ekspresija proteina u jedru izražena u odnosu na lamin A/C. Dobijene vrednosti intenziteta signala u tretiranim ćelijama su izraženi u odnosu na dobijene vrednosti u kontroli kome je dodeljena vrednost 1.

3.8. Ko-imunoprecipitacija

Za ispitivanje uticaja PMA na interakciju između beklina-1 i Bcl-2, u prisustvu ili odsustvu inhibitora MEK i JNK, korišćena je metoda ko-imunoprecipitacije. Nakon isteka tretmana HL-60 ćelija sa PMA, ćelije su lizirane na ledu 30 minuta korišćenjem pufera za lizu (50 mM Tris-Cl pH 7.8, 150 mM NaCl, 0,5% NP-40 (engl. *Nonidet P-40*) sa inhibitorima proteaza i fosfataza 1 mM PMSF, 2 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF i 20 μ l/ml smeša proteaznih inhibitora. Kako bi se prilikom liziranja očuvale proteinske interakcije korišćen je blagi nejonski deterdžent NP-40 koji izoluje citoplazmatske i membranske proteine ali ih ne denaturiše, već održava njihovu nativnu konformaciju. Koncentracija proteina u ispitivanim uzorcima je bila veća od 1 μ g/ μ l tako da je za svaki uzorak izdvojeno 200 μ g proteina za imunoprecipitaciju, a ostatak lizata je iskorišćen za imunoblot. Korišćenjem beklin-1 antitela (Novus Biologicals, Sentenijal, Kolorado, SAD) i protein A agaroznih kuglica (Cell Signaling Technology, Danvers, Masačusets, SAD) izvršena je imunoprecipitacija za beklin-1.

3.8.1. Prečišćavanje lizata

Kako bi se sprečilo vezivanje nečistoća iz lizata za agarozne kuglice u imunoprecipitaciji, neophodno je da se lizat prečisti sa kuglicama. Korišćeno je 10 μ l agaroznih kuglica za 200 μ l lizata. Agarozne kuglice su pre svake upotrebe vorteksovane i u svakom uzorku sipana jednaka količina kuglica. Uzorci su inkubirani 60 minuta na radijalnom roleru u hladnoj sobi i nakon toga centrifugirani na +4 °C 10 minuta na 3800 g. Prečišćeni supernatanti su potom prebačeni u nove tubice.

3.8.2. Imunoprecipitacija

Imunoprecipitacija beklina-1 je izvršena tako što je u svaki prečišćeni supernatant zapremine 200 μ l dodato 2,5 μ l beklin-1 antitela prema uputstvu proizvođača (1:80, Novus Biologicals, Sentenijal, Kolorado, SAD). Potom je usledila inkubacija preko noći na radijalnom roleru u hladnoj sobi. Sutradan je u svaki uzorak sipano 20 μ l agaroznih kuglica. Nakon inkubacije od 2,5 h na radijalnom roleru na +4 °C, uzorci su centrifugirani 30 s 3800 g na +4 °C. Supernatant je uklonjen i na dnu su ostale agarozne kuglice koje sadrže vezan beklin-1 i proteine koji su u interakciji sa beklinom-1. Usledilo je pranje agaroznih kuglica 1 minut 3800 g +4 °C pet puta sa 500 μ l pufera za lizu u kome su dodati inhibitori proteaza i fosfataza. Epruvete su svaki put invertovane kako bi agarozne kuglice plivale u puferu. U poslednjem pranju, 500 μ l je pažljivo otklonjeno i agarozne kuglice su resuspendovane u 40 μ l redukujućeg pufera za pripremanje uzoraka koji je tri puta koncentrovan. Redukujući pufer je sa agaroznim kuglicama vorteksovao i centrifugiran 30 s na 14000 g na +4 °C. Nakon toga je usledilo kuvanje uzoraka 95 °C 5 minuta i njihovo ponovno centrifugiranje 1 minut na 14 000 g. Na ovaj način kuglice su se istaložile na dnu tako da se samo supernatant nalivao na gel. Uzorci su čuvani na -20 °C i korišćeno je 20 μ l uzorka za imunoblot analizu.

3.8.3. Detekcija

Za detekciju beklina-1 i Bcl-2 su upotrebljena mišja antitela (1:500, Santa Cruz, Santa Kruz, Kalifornija, SAD) i sekundarno anti-mišje antitelo (1:2000, H+L Southern Biotech, Bermingem, Alabama) koje nije prepoznalo teške lance na 50 kDa i lake lance na 25 kDa zečijeg precipitovanog IgG beklin-1 antitela. Za negativnu kontrolu u lizat su dodate samo kuglice bez antitela kako bi se testirala specifičnost vezivanja kuglica. Zajedno sa precipitovanim lizatima na gel su nalivani i lizati u kojima nije precipitovan beklin-1 (označen kao input) kako bi se proverila pozicija precipitovanog beklina-1 i interagujućeg Bcl-2 na membrani. Input je služio i za proveru da li je tretman uticao na promenu u ekspresiji Bcl-2.

3.9. Nukleoporacija

Nukleoporacija je tip elektroporacije koji dovodi do formiranja pora na ćelijskoj i jedarnoj membrani koristeći specifičnu kombinaciju električnog pulsa i rastvora za određeni tip ćelije kako bi se ubacio genetički materijal (DNK i RNK) u jedro. Za nukleoporaciju HL-60 ćelija je korišćen SF kit namenjen za ovu ćelijsku liniju i program EN-138 na aparatu 4D-Nucleofector X Unit (Lonza, Bazel, Švajcarska). Pre transfekcije ćelije su posađene u Petri šolje tako da gustina ćelija nije prelazila 7×10^6 ćelija/ml, a broj pasaže je bio manji od 25. Nakon toga, ćelije su centrifugirane 5 min 500 g i za svaku kivetu je podešen broj ćelija na 2×10^6 ćelija, koliko je maksimalno dozvoljeno po uputstvu proizvođača za HL-60 ćelijsku liniju. Ćelije su transfektovane kontrolnom siRNK, siRNK za *MKK1*, *MKK7*, *p62* i *ATG5* u koncentraciji od 300 nM. Maksimalna zapremina za transfekciju u kiveti bila je 100 μ l, od toga 79 μ l ćelija resuspendovanih u SF rastvoru, 18 μ l suplementa i 3 μ l siRNK. Nakon nekoliko minuta od pulsiranja, ćelijama u kiveti dodato je 500 μ l ugrejanog medijuma. Transfektovane ćelije su potom posađene u ploči sa 6 bunara u koju je dodato 4 ml ugrejanog medijuma. Nakon 24 h od transfekcije, HL-60 ćelije su tretirane sa PMA. Efikasnost transfekcije je potvrđena imunoblot metodom.

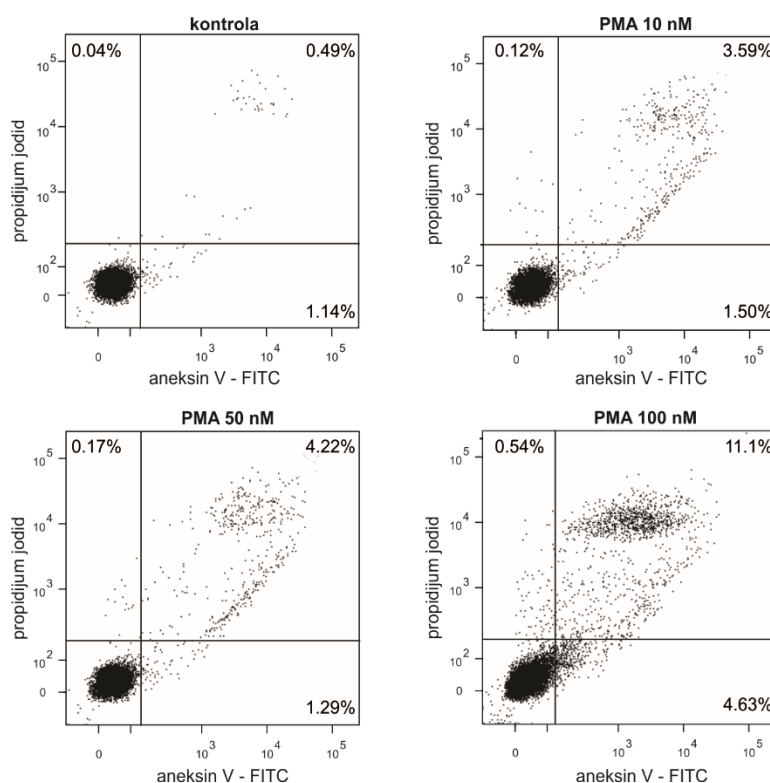
3.10. Statistička analiza

Za ispitivanje statističke značajnosti razlike između tri nezavisna eksperimenta ili triplikata u okviru jednog eksperimenta korišćen je Studentov t-test kao test izbora za ekstremno mali broj uzoraka ($n \leq 5$) (217). Dobijena vrednost $p < 0,05$ se smatrala statistički značajnom razlikom.

4. REZULTATI

4.1. Ispitivanje citotoksičnog dejstva PMA na HL-60 leukemijske ćelije

Za ispitivanje doze PMA koja indukuje diferencijaciju HL-60 ćelija bez citotoksičnog efekta, korišćena je metoda dvostrukog bojenja ćelija sa aneksin V-FITC i propidijum jodidom. Aneksin V-FITC se vezuje za fosfatidilserin na membrani ćelija u apoptozi, dok se propidijum jodid vezuje za DNK nekrotičnih ćelija sa oštećenom membranom (212). HL-60 ćelije su 24 h inkubirane sa rastućim dozama PMA (10 nM, 50 nM i 100 nM). Na tačkastom grafikonu su prikazane aneksin⁺PI⁻ ćelije u ranoj apoptozi u donjem desnom kvadrantu, dok su ćelije u kasnoj apoptozi/nekrozi aneksin⁺PI⁺ prikazane u gornjem desnom kvadrantu (Slika 5). Analiza na protočnom citofluorimetru je pokazala da ćelijske kulture tretirane dozama 10 nM i 50 nM PMA imaju procenat ćelija u ranoj apoptozi sličan kao u kontroli, dok je procenat ćelija u kasnoj apoptozi/nekrozi blago povišen u odnosu na kontrolu (Slika 5). Doza PMA od 100 nM ima najveći procenat ćelija u ranoj apoptozi i kasnoj apoptozi/nekrozi u odnosu na manje doze PMA (Slika 5). Na osnovu dobijenih rezultata izabrana je doza od 50 nM kao najveća doza koja ne indukuje apoptozu i nekrozu.

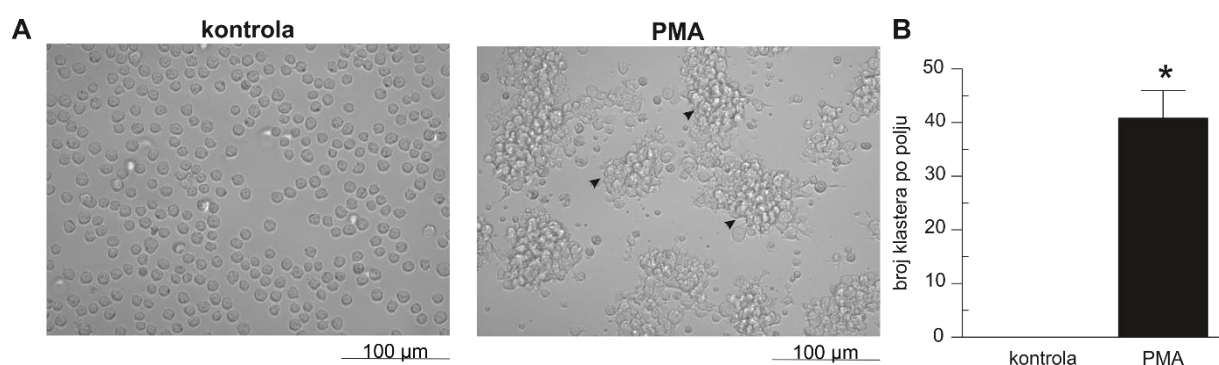


Slika 5. Ispitivanje citotoksičnog dejstva različitih doza PMA na HL-60 leukemijske ćelije. HL-60 ćelije su 24 h inkubirane sa rastućim dozama PMA (10 nM, 50 nM i 100 nM). Citotoksičnost PMA je analizirana bojenjem HL-60 ćelija sa aneksin V-FITC i propidijum jodidom. Reprezentativni tačkasti grafikoni su prikazani sa procentima ćelija u ranoj apoptozi u donjem desnom kvadrantu i kasnoj apoptozi/nekrozi u gornjem desnom kvadrantu.

4.2. PMA diferencira HL-60 leukemijske ćelije u makrofage

4.2.1. Uticaj PMA na morfologiju HL-60 leukemijskih ćelija

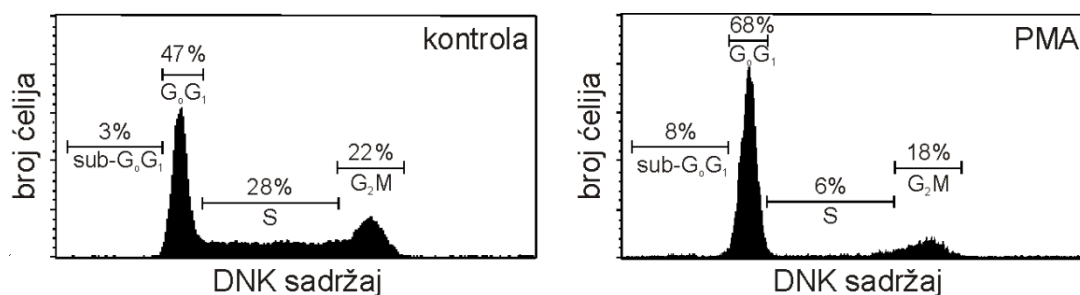
Za ispitivanje dejstva PMA na morfologiju HL-60 ćelija korišćena je svetlosna mikroskopija. Nakon 24 h inkubacije HL-60 ćelija sa 50 nM PMA, analiza svetlosnom mikroskopijom je pokazala da su ćelije formirale citoplazmatične nastavke i zalepile se za podlogu, što su karakteristike makrofaga (Slika 6A). Ove morfološke promene predstavljaju prvi znak procesa diferencijacije leukemijskih ćelija u makrofage (44). Diferencirane ćelije su se međusobno grupisale formirajući klasterne (218), za razliku od ćelija u kontroli koje slobodno plivaju u medijumu (Slika 6A, B).



Slika 6. Uticaj PMA na morfologiju HL-60 leukemijskih ćelija. Svetlosna mikroskopija je korišćena za analizu morfologije HL-60 ćelija nakon 24 h inkubacije sa PMA (50 nM). Strelicama su označeni klasteri (A). Klasteri su izbrojani u deset slučajno odabranih polja ($100\times$ uveličanje) i rezultat je prikazan kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta (B). * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije bez tretmana (B).

4.2.2. PMA indukuje zastoj u G_0/G_1 fazi ćelijskog ciklusa HL-60 leukemijskih ćelija

Poznato je da ćelije ulaze u proces diferencijacije u G_1 fazi ćelijskog ciklusa (219), zbog toga je bilo neophodno ispitati da li PMA utiče na ćelijski ciklus. Ćelije su obojene propidijum jodidom i analizirane korišćenjem protočnog citofluorimetra. Analiza ćelijskog ciklusa je pokazala da je tretman HL-60 ćelija sa 50 nM PMA nakon 24 h indukovao zastoj ćelijskog ciklusa u G_0/G_1 fazi. (Slika 7). Procenat ćelija u G_0/G_1 fazi je povećan sa 47% na 68% nakon tretmana sa PMA (Slika 7). Nagomilavanje ćelija u G_0/G_1 fazi je ujedno pokazatelj smanjene proliferacije ćelija. Posle tretmana sa PMA nije bilo značajnog povećanja broja ćelija sub- G_0/G_1 faze u kojoj je DNK fragmentisana usled apoptoze (Slika 7). Ovaj rezultat ukazuje na to da PMA ne indukuje apoptozu nakon 24 h, što je u skladu sa prethodnim rezultatima dobijenim bojenjem sa aneksin V-FITC i propidijum jodidom.

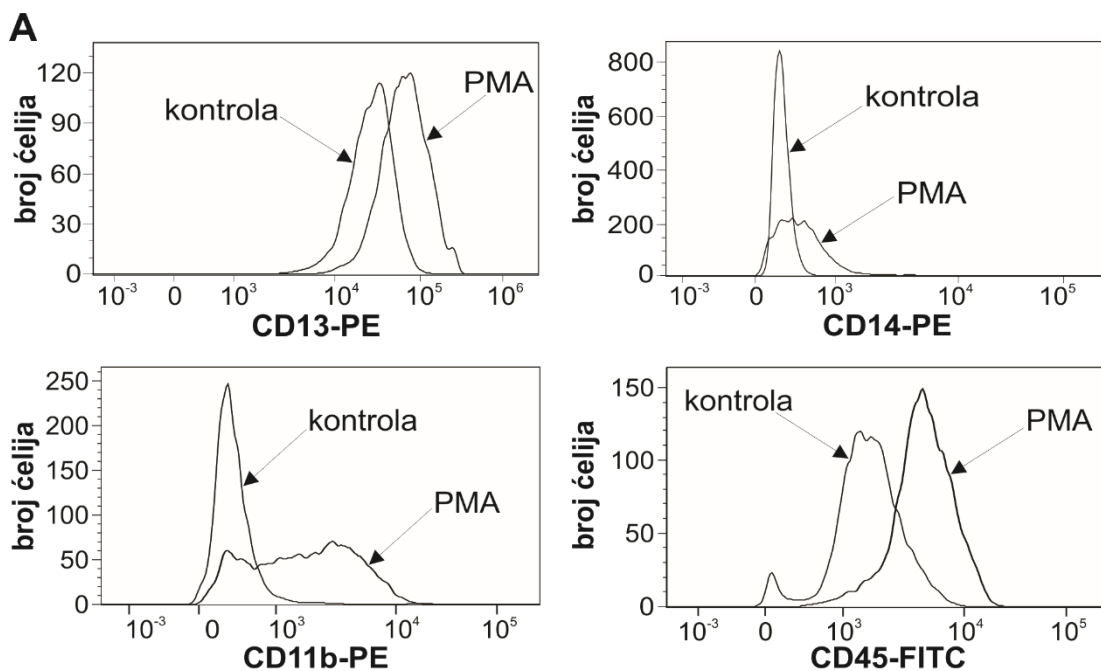


Slika 7. PMA indukuje zastoj u G₀/G₁ fazi ćelijskog ciklusa HL-60 leukemijskih ćelija. Nakon 24 h inkubacije HL-60 ćelija sa PMA (50 nM) ćelije su obojene propidijum jodidom i analizirane na protočnom citofluorimetru. Na slici je predstavljen reprezentativni histogram jednog od tri različita eksperimenta.

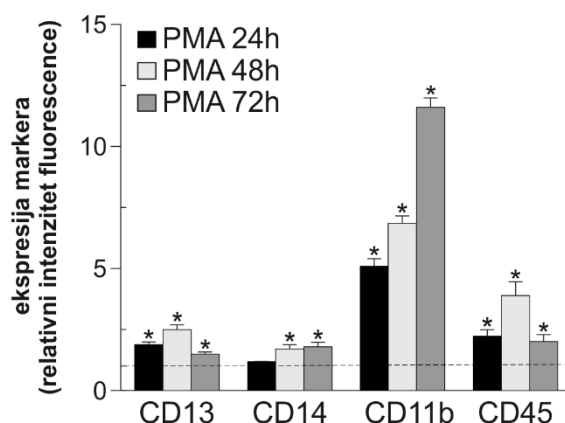
4.2.3. PMA indukuje ekspresiju makrofagnih markera u HL-60 leukemijskim ćelijama

Prethodno je pokazano na slikama 6 i 7 da PMA menja morfologiju HL-60 ćelija u makrofage i indukuje zastoj u G₁ fazi ćelijskog ciklusa. U narednim eksperimentima je ispitivan uticaj PMA na ekspresiju markera makrofaga CD11b, CD13, CD14 i CD45. CD11b (β2 integrin) je površinski marker eksprimiran na mijeloidnim ćelijama u procesu diferencijacije u makrofage (220). CD13 (N-aminopeptidaza) je receptor koji učestvuje u fagocitozi (221). CD14 je površinski receptor za prepoznavanje obrazaca patogena koji je eksprimiran na monocitima i makrofagima (222). CD45 je tirozin fosfataza koja učestvuje u adheziji makrofaga za podlogu (223). Fluorescentno obeleženim antitelima anti-CD11b PE, anti-CD13 PE, anti-CD14 PE i anti-CD45 FITC su detektovani CD11b, CD13, CD14 i CD45 korišćenjem protočne citofluorimetrije. Pokazano je da se nakon 24 h diferencijacije leukemijskih ćelija indukovanoj sa PMA intenzitet fluorescence antitela za navedene markere povećava u odnosu na netretirane ćelije (Slika 8A). Ovaj rezultat ukazuje na to da se povećava ekspresija CD11b, CD13, CD14 i CD45 na površini ćelija (Slika 8A). Tretman sa PMA je nakon 24 h prouzrokovao veći porast fluorescence za CD11b i CD45 nego za CD13 i CD14 (Slika 8A i B). Na vremenskom profilu ekspresije navedenih markera na slici 8B se može uočiti da se intenziteti fluorescence za CD11b i CD14 vremenski-zavisno povećavaju sa tretmanom, dok intenziteti fluorescence za CD13 i CD45 imaju maksimalnu vrednost posle 48 h i nakon 72 h opadaju.

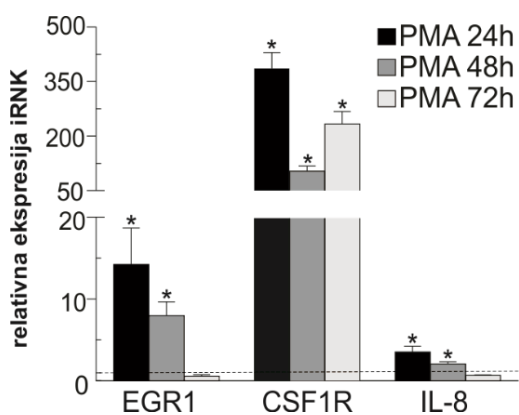
Pored ovih markera, metodom RT-qPCR je ispitana ekspresija gena za *EGR1*, *CSF1R* i *IL-8* nakon 24 h, 48 h i 72 h. *EGR1* je transkripcioni faktor koji aktivira diferencijaciju leukemijskih ćelija u makrofage (178). Receptor faktora stimulacije makrofagnih kolonija (*CSF1R*) reguliše proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje makrofaga (224). Interleukin 8 (*IL-8*) produkuje makrofagi nastali diferencijacijom HL-60 ćelija pod dejstvom PMA (225). Rezultati pokazuju da se transkripcija gena za *EGR1*, *CSF1R* i *IL-8* povećava nakon 24 h diferencijacije sa PMA kada ujedno ovi geni imaju najveći nivo eksprimirane iRNK (Slika 9). Nakon 48 h i 72 h nivo iRNK *EGR1*, *CSF1R* i *IL-8* opada, izuzev iRNK *CSF1R* koja nakon 72 h ponovo raste. (Slika 9). Na osnovu ovih i prethodnih rezultata se može zaključiti da PMA indukuje diferencijaciju HL-60 leukemijskih ćelija u makrofage.



B



Slika 8. PMA indukuje ekspresiju markera makrofaga CD11b, CD13, CD14 i CD45 u HL-60 leukemijskim ćelijama. HL-60 ćelije su inkubirane sa PMA (50 nM) 24 h (A) ili 24 h, 48 h i 72 h (B) i analizom protočne citofluorimetrije je detektovana ekspresija CD11b, CD13, CD14 i CD45 sa anti-CD11b PE, anti-CD13 PE, anti-CD14 PE i anti-CD45 FITC antitelima. Prikazani su reprezentativni histogrami jednog od tri različita eksperimenta (A) i reprezentativni rezultat (B) je prikazan kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta. * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu prikazanu isprekidanom linijom.

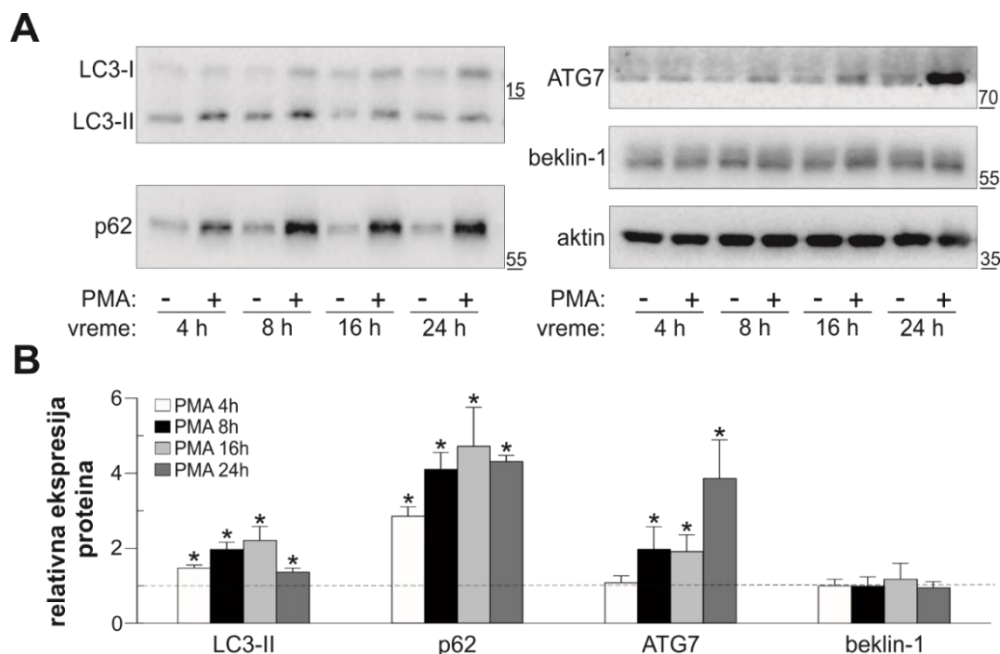


Slika 9. PMA indukuje transkripciju *EGR1*, *CSF1R* i *IL-8* gena u HL-60 leukemijskim ćelijama. HL-60 ćelije su inkubirane sa PMA (50 nM) nakon 24 h, 48 h i 72 h. RT-qPCR metodom je detektovana ekspresija iRNK za *EGR1*, *CSF1R* i *IL-8*. Reprezentativni rezultat je prikazan kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta. * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu prikazanu isprekidanom linijom.

4.3. PMA indukuje autofagiju u HL-60 leukemijskim ćelijama

4.3.1. PMA indukuje konverziju LC3 i povećava nivo ATG7 i p62 bez uticaja na ekspresiju beklina-1 u HL-60 leukemijskim ćelijama

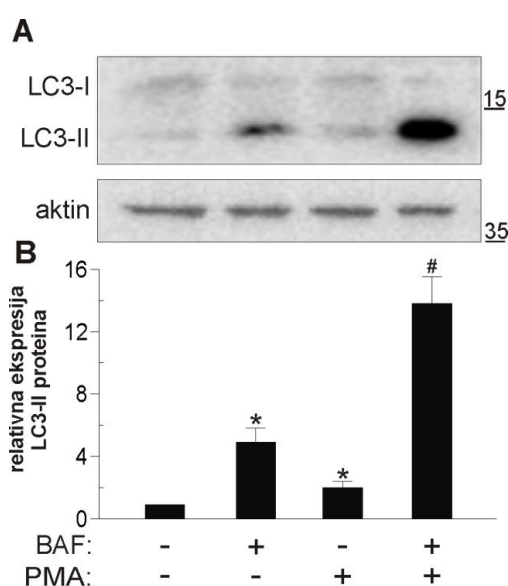
Studije su pokazale da autofagija učestvuje u diferencijaciji ćelija hematopoeze, kao i u diferencijaciji leukemijskih ćelija (148, 154, 161, 226). Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita da li PMA indukuje autofagiju u HL-60 leukemijskim ćelijama. Aktivacija autofagije je ispitana analizom ekspresije proteina autofagije imunoblot metodom. Sazrevanje autofagozoma je praćeno konverzijom LC3-I u LC3-II, u kojoj učestvuje ATG7 tako što aktivira LC3-I za lipidaciju u LC3-II (227). Konverzija LC3 i ekspresija ATG7 je ispitana imunoblotom nakon tretmana HL-60 ćelija sa PMA u vremenskim intervalima prikazanim na slici 10. Imunoblot analiza je pokazala da u diferencijaciji dolazi do povećane vremenski-zavisne konverzije LC3-I u LC3-II koja ima najveću vrednost nakon 16 h (Slika 10A, B). Zajedno sa konverzijom LC3, povećana je ekspresija ATG7 koji učestvuje u elongaciji autofagozoma (Slika 10A, B). Tretman sa PMA nije uticao na promenu u ekspresiji beklina-1 koji u okviru kompleksa PI3KC3-C1 učestvuje u inicijaciji biogeneze autofagozoma (228). Dalje je analiziran nivo proteina p62, adapterskog proteina koji je zadužen za prepozavanje ubikvitiranog supstrata za degradaciju (229). Iako se usled aktivirane autofagije očekuje degradacija p62, imunoblot analiza je pokazala da PMA povećava nivo p62 (Slika 10A, B) što može da označava inhibiciju razgradnje u autofagolizozomu zbog čega je neophodno da se analizira autofagni fluks. Na osnovu dobijenih rezultata, PMA povećava nivo LC3-II, ATG7 i p62 bez uticaja na promenu u nivou beklina-1 u HL-60 leukemijskim ćelijama.



Slika 10. PMA indukuje konverziju LC3 i povećava nivo ATG7 i p62 bez uticaja na ekspresiju beklina-1 u HL-60 leukemijskim ćelijama. Imunoblot metodom je ispitano nivo LC3-I, LC3-II, p62, ATG-7, beklina-1 nakon 4 h, 8 h, 16 h i 24 h tretmana sa PMA (50 nM). Predstavljene su reprezentativni imunoblotovi jednog od tri različita eksperimenta (A), zajedno sa denzitometrijskom analizom koja je prikazana kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta (B). * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu prikazanu isprekidanom linijom.

4.3.2. PMA stimuliše autofagni fluks u HL-60 leukemijskim ćelijama

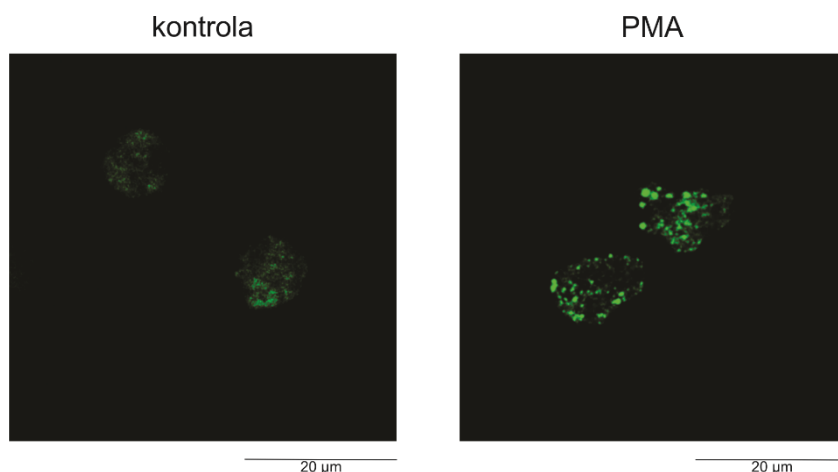
Povećan nivo proteina LC3-II i p62 u tretmanu HL-60 ćelija sa PMA može da se protumači kao njihovo nakupljanje u ćelijama, odnosno sprečenu proteolitičku razgradnju u autolizozomima što ukazuje na inhibiciju autofagije. Zbog toga je bilo neophodno izmeriti autofagni fluks tj. ispitati nivo LC3-II u uslovima kada je inhibirana njegova razgradnja u autolizozomima, korišćenjem inhibitora proteolize bafilomicina A1 (230). Ovaj inhibitor smanjuje aktivnost protonske pumpe na autolizozomima što dovodi do povećanja njihovog pH i prestanka rada proteolitičkih enzima (231). Leukemijske ćelije su tretirane sa PMA 16 h, a nakon 8 h je dodat bafilomicin (10 nM). Rezultati su pokazali da u ćelijama tretiranim bafilomicinom dolazi do nakupljanja LC3-II (Slika 11A, B). U kombinaciji ovog inhibitora sa PMA, nivo LC3-II se dodatno povećava jer dolazi do konverzije LC3-I u LC3-II (Slika 11A, B). Ovaj rezultat ukazuje na sposobnost PMA da stimuliše autofagni fluks u HL-60 ćelijama.



Slika 11. PMA stimuliše autofagni fluks u HL-60 leukemijskim ćelijama. Imunoblot metodom je ispitana konverzija LC3 u HL-60 ćelijama pod dejstvom PMA (50 nM) 16 h u prisustvu ili odsustvu bafilomicina A1 (BAF) (10 nM) koji je dodat nakon 8 h. Prikazan je reprezentativni imunoblot jednog od tri različita eksperimenta, zajedno sa denzitometrijskom analizom koja je prikazana kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta (B). * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije bez tretmana, dok # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane bafilomicinom ili PMA.

4.3.3. PMA indukuje agregaciju LC3 u HL-60 leukemijskim ćelijama

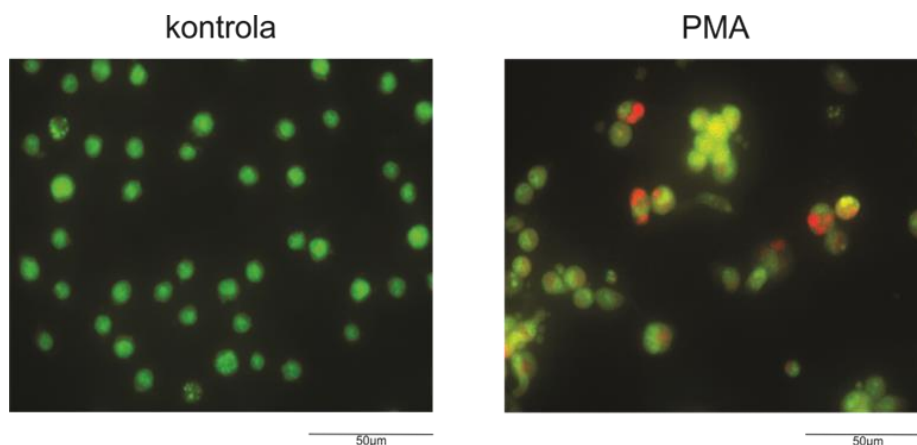
Prisustvo autofagije u HL-60 ćelijama tretiranim sa PMA je dalje ispitano detekcijom autofagozoma konfokalnom mikroskopijom (232). Prilikom konverzije citosolne forme LC3-I u membransku formu LC3-II dolazi do formiranja agregata LC3 za čiju detekciju je korišćeno anti-LC3 antitelo, fluorescentno obeleženo sa Alexa Fluor 488. HL-60 ćelije su diferencirane pod dejstvom PMA u trajanju od 16 h i inkubirane sa antitelom za LC3 koje fluorescira zelenom bojom. Analiza konfokalnom mikroskopijom je pokazala da tretman dovodi do pojave tačkaste distribucije LC3 u odnosu na njegovu pretežno difuznu distribuciju u kontroli (Slika 12). Nakupljanje LC3 u agregate ukazuje na formiranje autofagozoma u ćelijama koje su tretirane sa PMA.



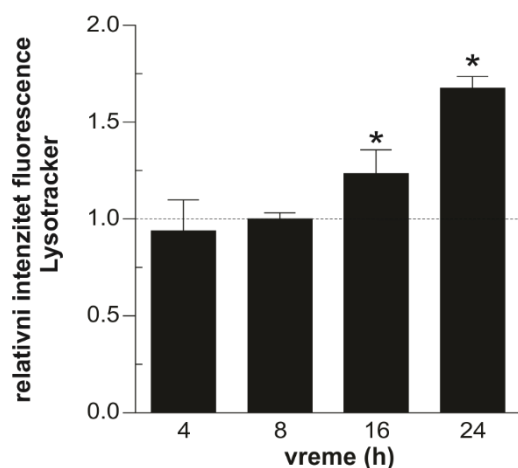
Slika 12. PMA povećava agregaciju LC3 u HL-60 leukemijskim ćelijama. Nakon 16 h tretmana sa PMA (50 nM) ćelije su obeležene sa fluorescentno zeleno obeleženim anti-LC3 antitelom i analizirane konfokalnom mikroskopijom.

4.3.4. PMA stimuliše povećanje broja kiselih vezikula u citoplazmi HL-60 leukemijskih ćelija

U narednim eksperimentima je ispitivano prisustvo autofagolizozoma u citoplazmi HL-60 ćelija nakon tretmana sa PMA. Korišćenjem fluorescentnog mikroskopa na HL-60 ćelijama obojenim sa pH-senzitivnom bojom akridin oranž mogu se videti autofagolizozomi koji zbog niske pH vrednosti fluoresciraju crvenom bojom, dok citoplazma fluorescira zelenom bojom. Nakon 16 h inkubacije ćelija sa PMA na fluorescentnom mikroskopu su uočene mnogobrojne narandžasto-crvene vezikule koje su okružene fluorescentno zelenom citoplazmom (Slika 13). U kontrolnim ćelijama nisu detektovane narandžasto-crvene vezikule (Slika 13). Prisustvo ovih vezikula je dodatno potvrđeno korišćenjem pH senzitivne boje *Lysotracker green* koja emituje zelenu fluorescencu u kiseloj sredini lizozoma i autofagolizozoma. HL-60 ćelije su inkubirane sa PMA u označenim vremenskim intervalima (Slika 14) i obojene sa *Lysotracker green*. Analiza protočnim citofluorimetrom je pokazala da tretman sa PMA povećava intenzitet zelene fluorescence nakon 16 h i 24 h (Slika 14). Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da diferencijacija HL-60 ćelija u makrofage sa PMA povećava broj autofagolizozoma u citoplazmi.



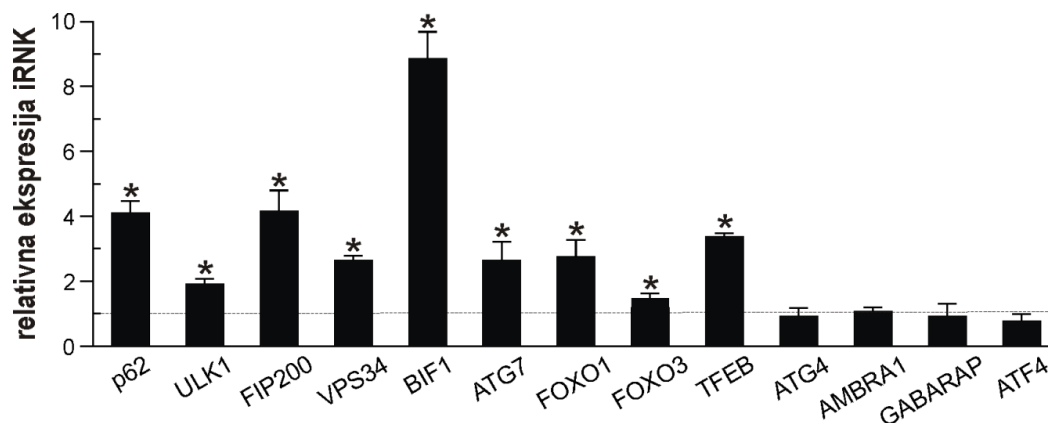
Slika 13. PMA povećava broj kiselih vezikula u citoplazmi HL-60 leukemijskih ćelija. HL-60 ćelije su tretirane sa PMA (50 nM) 16 h i obojene akridin oranžom. Fluorescentna mikroskopija je korišćena za analizu prisustva kiselih vezikula u citoplazmi HL-60 ćelija.



Slika 14. PMA povećava broj kiselih vezikula u citoplazmi HL-60 leukemijskih ćelija. HL-60 ćelije su tretirane sa PMA (50 nM) posle 4 h, 8 h, 16 h i 24 h nakon čega su obojene sa fluorescentnom bojom Lysotracker green. Povećanje zelene fluorescence detektovano je na protočnom citofluorimetru. Reprezentativni rezultat je prikazan kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta. * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu prikazanu isprekidanom linijom.

4.3.5. PMA aktivira transkripciju *ATG* gena u HL-60 leukemijskim ćelijama

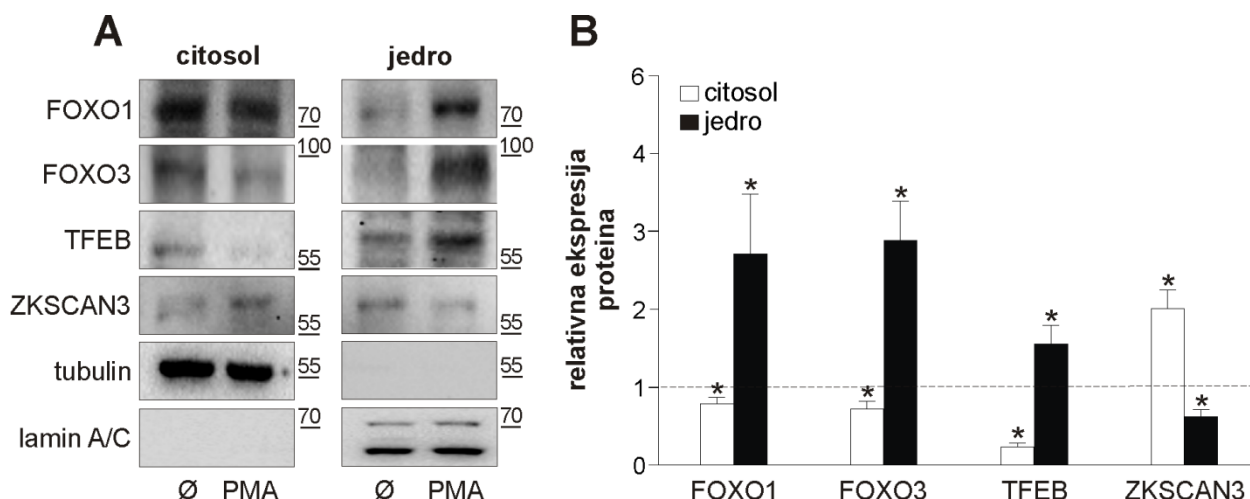
Proces autofagije je regulisan i na nivou transkripcije zbog čega je ispitan uticaj PMA na transkripciju autofagnih gena. Nakon 16 h inkubacije sa PMA, RT-qPCR metodom je analizirana ekspresija *ATG* gena (Slika 15). Tretman HL-60 ćelija sa PMA je značajno povećao nivo iRNK za ULK1 i FIP200, članove ULK kompleksa koji učestvuje u inicijaciji autofagije (103). Povećao se i nivo iRNK aktivirajućih transkripcionih faktora autofagije FOXO1, FOXO3 i TFEB (Slika 15). PMA je aktivirala transkripciju gena za *BIF-1* i *VPS34*, članove PI3KC3-C1 kompleksa koji učestvuje u inicijaciji autofagije (115). Povećana je i transkripcija *ATG7* gena koji učestvuje u lipidaciji LC3, kao i transkripcija gena za *p62*, autofagni receptor koji prepoznaje supstrat za degradaciju (102) (Slika 15). Povećana transkripcija *p62* gena može da objasni povećanje nivoa proteina p62 prikazanog na slici 10, koje je u suprotnosti sa povećanom autofagnom aktivnošću. Međutim, diferencijacija HL-60 ćelija pod dejstvom PMA nije dovela do promene u transkripciji *AMBRA1* gena koji učestvuje u inicijaciji autofagije, kao ni do promene u transkripciji *ATG4B* i *GABARAP* gena koji učestvuju u elongaciji autofagozoma (Slika 15) (102). Tretman HL-60 ćelija sa PMA nije doveo do promene u nivou iRNK za transkripcioni faktor autofagije ATF4 (Slika 15) (233). Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da PMA aktivira transkripciju autofagnih gena.



Slika 15. PMA aktivira transkripciju *ATG* gena u HL-60 leukemijskim ćelijama. HL-60 ćelije su inkubirane sa PMA (50 nM) 16 h i RT-qPCR metodom je detektovana ekspresija iRNK prikazanih *ATG* gena. Reprezentativni rezultat je prikazan kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta. * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu prikazanu isprekidanom linijom.

4.3.6. PMA stimuliše transkripciju *ATG* gena u HL-60 ćelijama premeštanjem aktivirajućih transkripcionih faktora autofagije u jedro i represora u citoplazmu

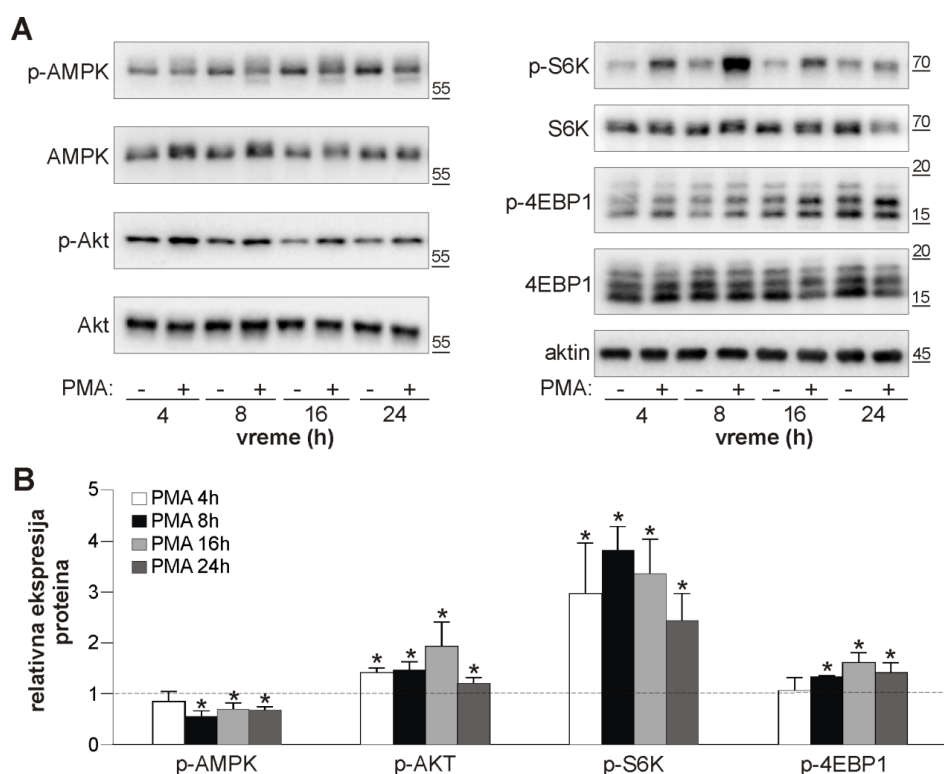
Prethodno je pokazano na slici 15 da PMA povećava transkripciju gena za *FOXO1*, *FOXO3* i *TFEB*, koji imaju važnu ulogu u aktivaciji ekspresije autofagnih gena (129). Metoda frakcionisanja ćelija kojom se razdvajaju citoplazmatska i jedarna frakcija korišćena je za ispitivanje dejstva PMA na translokaciju ovih transkripcionih faktora u jedro. Imunoblotom je detektovano prisustvo ovih transkripcionih faktora u frakcijama. Čistoća jedarne frakcije je potvrđena prisustvom jedarnog proteina lamina A/C i odsustvom citoplazmatskog proteina β -tubulina u jedarnoj frakciji (Slika 16A). Sa druge strane, čistoća citoplazmatske frakcije je potvrđena prisustvom β -tubulina i odsustvom lamina A/C (Slika 16A). Pokazano je da je PMA povećao nivo FOXO1, FOXO3 i TFEB u jedru, dok je istovremeno smanjio njihov nivo u citoplazmi (Slika 16A, B). Dobijeni rezultati pokazuju da FOXO1, FOXO3 i TFEB učestvuju u ekspresiji autofagnih gena u ovom tretmanu. Takođe je ispitan uticaj PMA na ćelijsku lokalizaciju ZKSCAN3, represora autofagnih gena i antagoniste aktivnosti transkripcionog faktora TFEB (140). Pokazano je da se nivo ZKSCAN3 sa tretmanom povećava u citoplazmi, a smanjuje u jedru (Slika 16A, B). Na ovaj način su promotori autofagnih gena oslobođeni inhibicije i mogu da se aktiviraju posredstvom TFEB koji je lokalizovan u jedru. Na osnovu ovog i prethodnih rezultata se može zaključiti da PMA indukuje autofagiju u diferencijaciji HL-60 ćelija.



Slika 16. PMA aktivira transport FOXO1, FOXO3 i TFEB u jedro i ZKSCAN3 u citoplazmu HL-60 ćelija. HL-60 ćelije su tretirane 16 h sa PMA (50 nM) i imunoblot metodom je ispitano prisustvo FOXO1, FOXO3, TFEB i ZKSCAN3 u citoplazmatskoj i jedarnoj frakciji. Lamin A/C je korišćen kao marker jedarne frakcije, dok je β -tubulin korišćen kao marker citoplazmatske frakcije. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi jednog od tri različita eksperimenta (A), zajedno sa denzitometrijskom analizom koja je prikazana kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta (B). * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu prikazanu isprekidanom linijom.

4.4. Indukcija autofagije sa PMA je nezavisna od aktivacije AMPK i Akt/mTORC1 signalnih puteva u HL-60 leukemijskim ćelijama

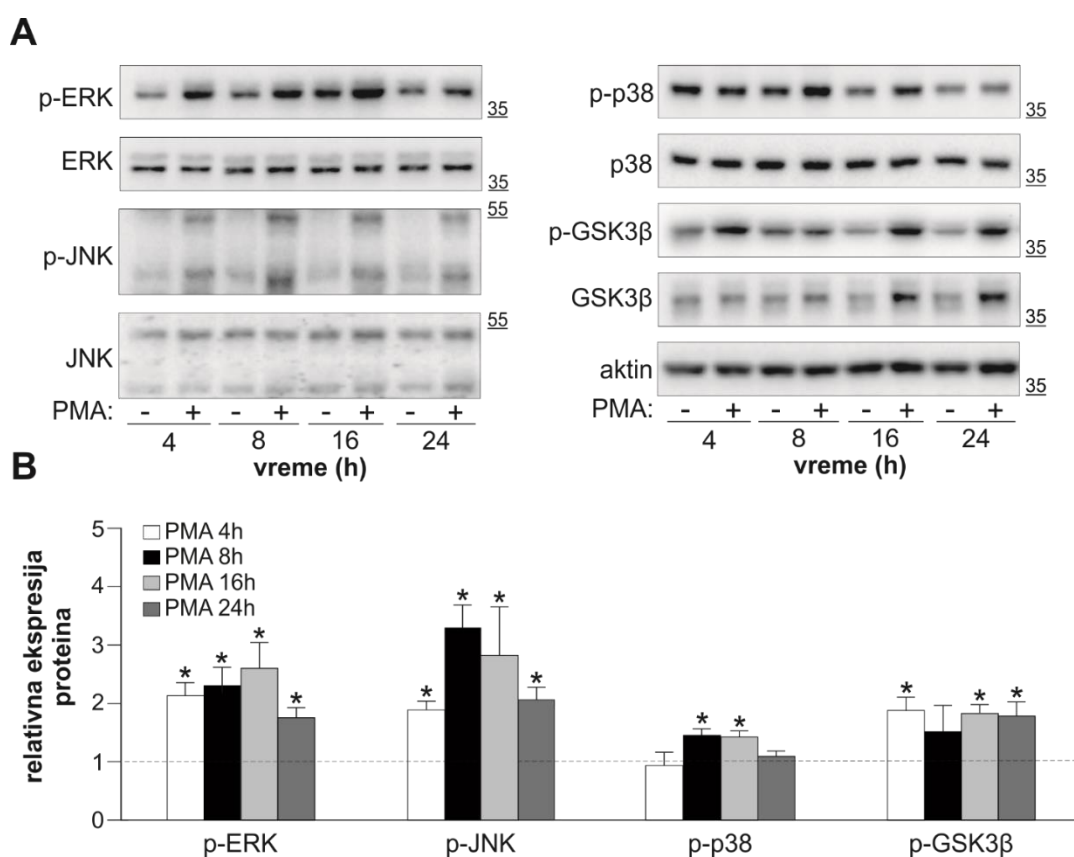
Poznato je da je za indukciju autofagije neophodna aktivacija AMPK i inhibicija represora autofagije mTORC1 od strane AMPK (120). U narednim eksperimentima cilj je bio da se ispita aktivnost ovih kinaza u HL-60 leukemijskim ćelijama imunoblot metodom nakon 4 h, 8 h, 16 h i 24 h od tretmana sa PMA. Tretman sa PMA je u svim terminima doveo do smanjenja fosforilacije AMPK u odnosu na kontrolu (Slika 17A, B). Sa druge strane, uzvodni aktivator mTORC1, Akt, bio je aktiviran već u prvom terminu i njegova aktivnost trajala je i nakon 24 h (Slika 17A, B). Aktivnost mTORC1 je merena fosforilacijom njegovih direktnih supstrata S6K1 (engl. *p70 ribosomal S6 kinase*, S6K1) i 4EBP1 (engl. *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*, 4EBP1). Nakon 4 h inkubacije HL-60 ćelija sa PMA uočena je povećana fosforilacija S6K1, dok je 4EBP1 fosforilisan posle 8 h tretmana (Slika 17A, B). Fosforilacija oba supstrata se zadržala i nakon 24 h tretmana sa PMA. U poslednja dva termina na imunoblotu se može uočiti smanjenje totalne forme 4EBP1 (Slika 17A). Ovaj rezultat je u skladu sa studijom u kojoj je pokazano da se fosforilisane forme 4EBP1 obeležavaju ubikvitinom i degraduju u proteazomu (234). Na osnovu fosforilacije S6K1 kao i fosforilacije i degradacije 4EBP1 se može zaključiti da je aktivnost mTORC1 kompleksa pojačana pod dejstvom PMA. Povećana aktivnost mTORC1 se može pripisati stimulaciji njegovog uzvodnog aktivatora Akt i smanjenju njegovog uzvodnog inhibitora AMPK (120). Povećana aktivnost mTORC1 i smanjena aktivnost AMPK koji se detektuju kada i konverzija LC3-I u LC3-II ukazuju da je autofagija aktivirana nezavisno od ova dva signalna puta.



Slika 17. PMA inhibira AMPK i aktivira Akt/mTORC1 signalni put u HL-60 leukemijskim ćelijama. Imunoblot metodom je ispitana fosforilacija AMPK, Akt, p70S6K1 i 4EBP1 nakon 4 h, 8 h, 16 h i 24 h tretmana HL-60 ćelija sa PMA (50 nM). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi jednog od tri različita eksperimenta (A), zajedno sa denzitometrijskom analizom koja je prikazana kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta (B). * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu prikazanu isprekidanom linijom.

4.5. PMA aktivira PKC i MAP kinaze u HL-60 leukemijskim ćelijama

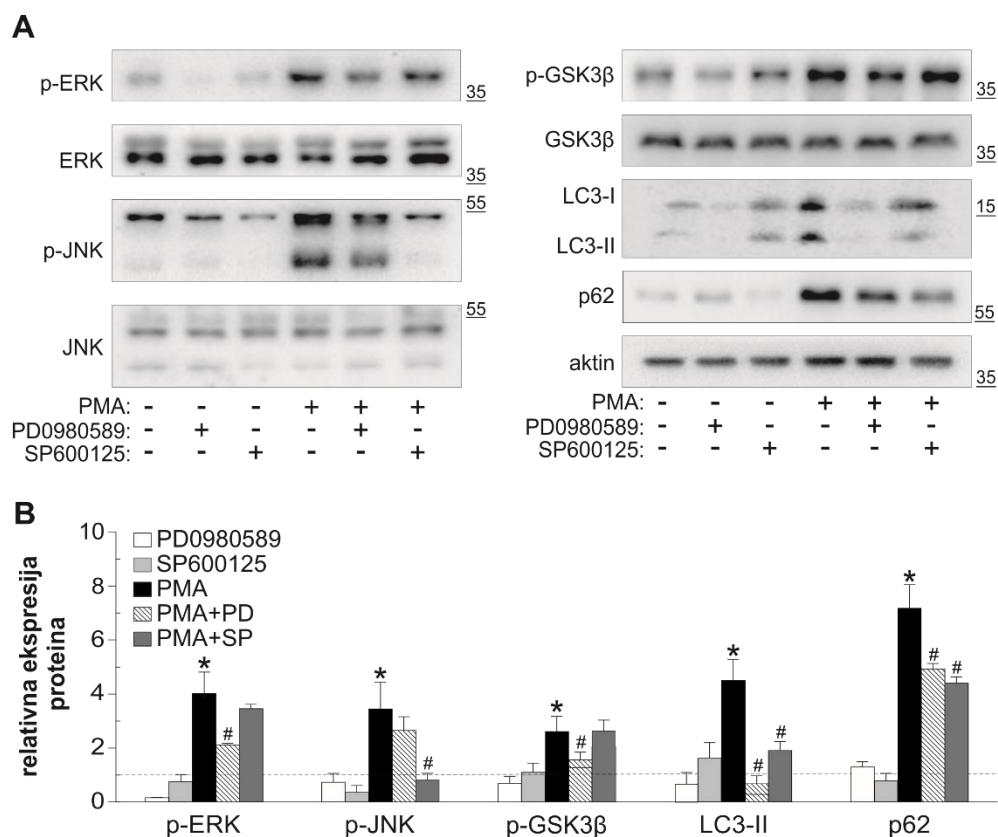
Prethodni rezultati na slici 17 su pokazali da je autofagija stimulirana pod dejstvom PMA nezavisna od Akt/mTORC1 i AMPK signalnih puteva. Poznato je da PMA aktivira PKC (57) i MAP kinaze (173, 193) koji mogu da stimulišu autofagiju (199), zbog čega je bilo neophodno ispitati aktivnost PKC i MAP kinaza u diferencijaciji HL-60 ćelija pod dejstvom PMA. Nakon 4 h, 8 h, 16 h i 24 h od tretmana HL-60 ćelija sa PMA analizirana je fosforilacija ERK, JNK, p38 i GSK3 β imunoblot metodom. Pokazano je da se ERK i JNK aktiviraju već nakon 4 h i njihova aktivnost se zadržava i posle 24 h (Slika 18A, B). Sa druge strane, aktivnost p38 se prvo smanjuje nakon 4 h, a zatim povećava nakon 8 h i 16 h (Slika 18A, B). Aktivacija PKC je potvrđena povećanom fosforilacijom njenog direktnog supstrata GSK3 β (235) posle 4 h tretmana (Slika 18A, B). Aktivnost PKC se zadržava i nakon 24 h tretmana (Slika 18A, B). Navedeni rezultati ukazuju da PMA aktivira PKC, ERK i JNK u ranije u odnosu na p38 koji se aktivira tek posle 8 h.



Slika 18. PMA aktivira ERK, JNK, p38 i PKC u HL-60 leukemijskim ćelijama. HL-60 ćelije su tretirane sa PMA (50 nM) u označenim vremenskim intervalima i imunoblot metodom su detektovane fosforilisane i totalne forme ERK, JNK, p38 i GSK3 β . Prikazani su reprezentativni imunoblotovi jednog od tri različita eksperimenta (A), zajedno sa denzitometrijskom analizom koja je prikazana kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta (B). * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu prikazana isprekidanom linijom.

4.6. PMA indukuje autofagiju aktivacijom ERK i JNK u HL-60 leukemijskim ćelijama

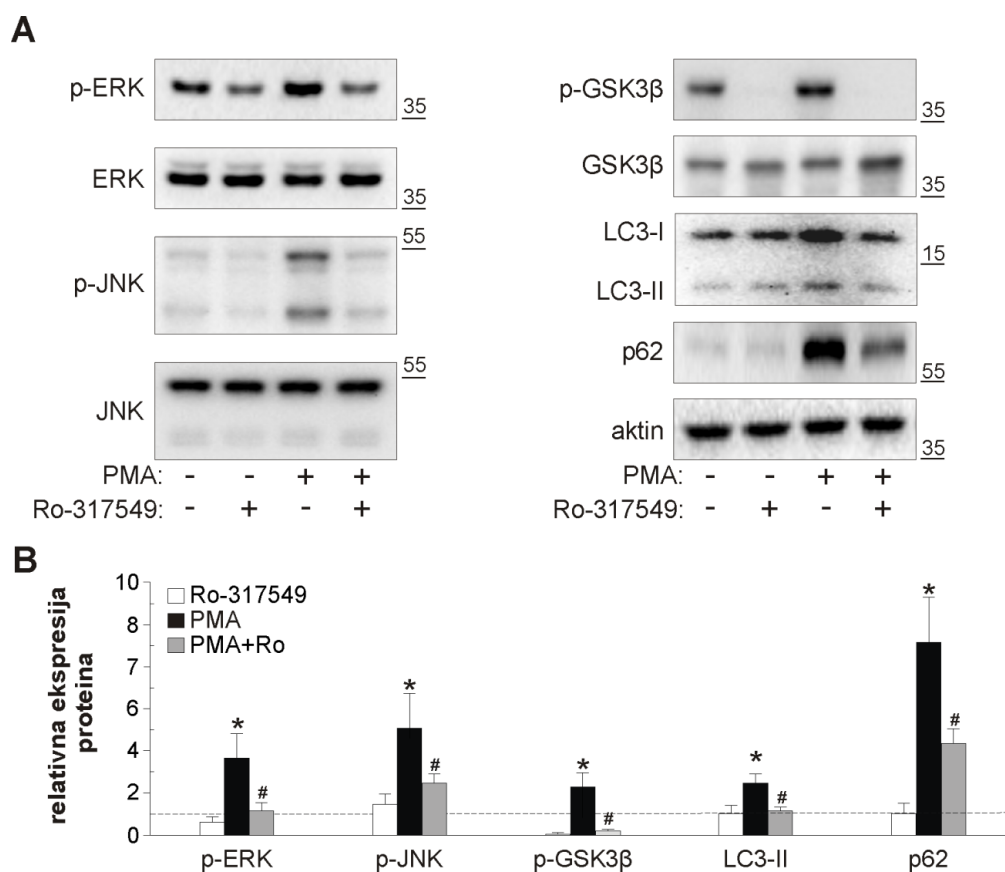
Na osnovu rezultata na slici 18, koji pokazuju da PMA aktivira MAP kinaze i autofagiju, neophodno je bilo ispitati da li MAP kinaze utiču na indukciju autofagije. Kako je aktivnost p38 inhibirana nakon 4 h kada je autofagija već započeta, njena uloga u indukciji autofagije dalje nije ispitivana. U skladu sa tim analizirana je samo uloga ERK i JNK u aktivaciji autofagije. Za inhibiciju ERK korišćen je inhibitor njegove uzvodne kinaze MEK1/2 - PD098059 (236), dok je za inhibiciju JNK korišćen inhibitor - SP600125 koji suprimira ovu kinazu vezujući se za njeno ATP-vezujuće mesto i inhibira njenu uzvodnu kinazu MKK4 (237). Imunoblot metodom je ispitana fosforilacija ERK, JNK i GSK3 β , kao i nivo LC3-I, LC3-II i p62. Fosforilacija GSK3 β na poziciji serin 9 je ispitana jer aktivira autofagiju (238). Inhibicija aktivnosti ERK i JNK je potvrđena smanjenjem fosforilacije ERK i JNK u kontrolnim ćelijama i ćelijama tretiranim sa PMA upotrebom MEK i JNK inhibitora (Slika 19A, B). Imunoblot analiza je pokazala da se sa inhibicijom ERK smanjuje konverzija LC3-I u LC3-II, nivo p62 i fosforilacija GSK3 β (Slika 19A, B). Inhibicija JNK je smanjila konverziju LC3 i nivo p62, dok se fosforilacija GSK3 β nije promenila (Slika 19A, B). Dobijeni rezultati sa farmakološkim inhibitorima ERK i JNK pokazuju da ove kinaze učestvuju u aktivaciji autofagije u diferencijaciji HL-60 ćelija pod dejstvom PMA.



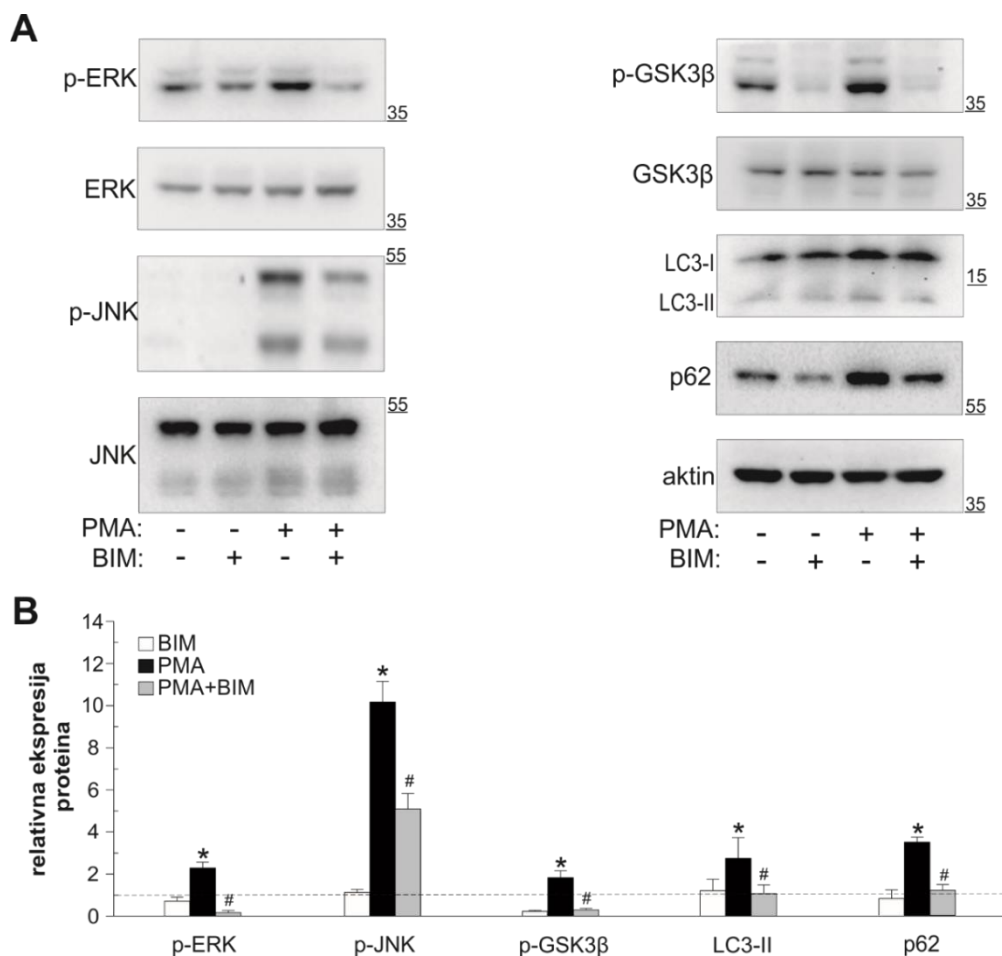
Slika 19. Farmakološka inhibicija ERK i JNK u HL-60 leukemijskim ćelijama tretiranim sa PMA smanjuje konverziju LC3 i nivo p62. HL-60 ćelije su pretretirane 30 minuta sa inhibitorom MEK - PD098059 (10 μ M) ili JNK - SP600125 (15 μ M) nakon čega je indukovana diferencijacija sa PMA (50 nM) u trajanju od 16 h. Imunoblot metodom je detektovana konverzija LC3, nivo p62, fosforilisane i totalne forme ERK, JNK i GSK3 β . Prikazani su reprezentativni imunoblotovi jednog od tri različita eksperimenta (A), zajedno sa denzitometrijskom analizom koja je prikazana kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta (B). * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu prikazanu isprekidanom linijom, dok # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo sa PMA.

4.7. PMA indukuje ERK/JNK-zavisnu autofagiju aktivacijom PKC u HL-60 leukemijskim ćelijama

Prethodne studije su pokazale da PKC može da aktivira ERK i JNK. U diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelja pod dejstvom PMA, pokazano je da PKC β aktivira MEKK1 koji se nalazi uzvodno od MEK4 i JNK (194). Takođe, PKC aktivira Raf koja potom aktivira MEK i ERK kinaze (173). Poznato je i da PKC može da aktivira autofagiju (239). Zbog toga je bilo neophodno ispitati da li PKC indukuje autofagiju aktivacijom ERK i JNK u diferencijaciji HL-60 ćelija pod dejstvom PMA. Korišćeni su inhibitori PKC Ro-317549 i bisindolilmalemid I, koji inhibiraju aktivnost ove kinaze vezujući se za ATP-vezujuće mesto PKC (240, 241). Imunoblot metodom je ispitana fosforilacija ERK, JNK i GSK3 β i nivo autofagnih proteina LC3-I, LC3-II i p62. Inhibicija PKC je potvrđena smanjenjem fosforilacije njenog nizvodnog supstrata GSK3 β u kontrolnim ćelijama i ćelijama tretiranim sa PMA (Slika 20A, B i Slika 21A, B). Inhibicija PKC dovodi do smanjenja fosforilacije ERK i JNK, konverzije LC3 i nivoa p62 (Slike 20 i 21). Na osnovu ovih rezultata može da se zaključi da PKC indukuje autofagiju aktivacijom ERK i JNK u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija pod dejstvom PMA.



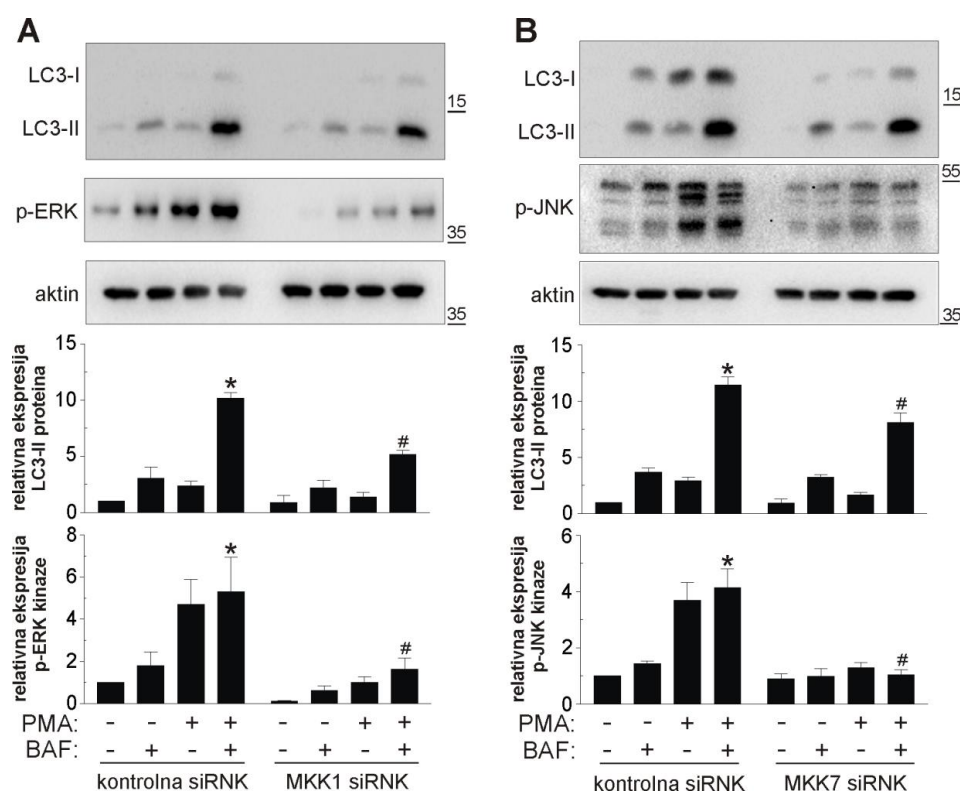
Slika 20. PKC inhibitor Ro-317549 smanjuje aktivaciju ERK, JNK, konverziju LC3 i nivo p62. HL-60 ćelije su inkubirane sa 50 nM PMA 16 h uz pretretman inhibitorom PKC kinaze Ro-317549 (10 μ M). Imunoblot metodom detektovane su fosforilisane i totalne forme ERK, JNK i GSK3 β , konverzija LC3 i nivo p62. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi jednog od tri različita eksperimenta (A), zajedno sa denzitometrijskom analizom koja je prikazana kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta (B). * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu prikazanu isprekidanom linijom, dok # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo sa PMA.



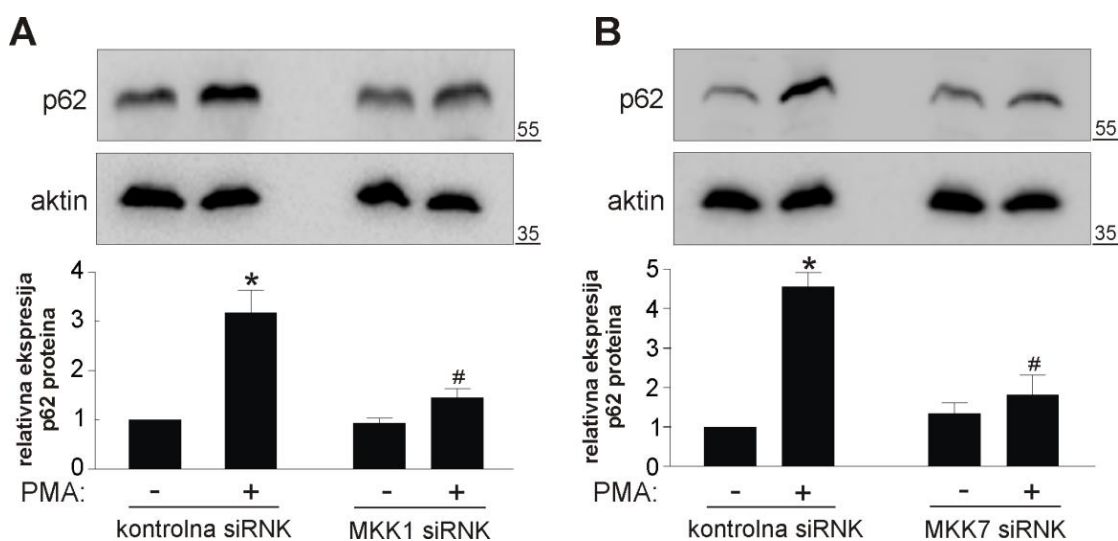
Slika 21. PKC inhibitor bisindolilmalemida I smanjuje aktivaciju ERK, JNK, konverziju LC3 i nivo p62. HL-60 ćelije su inkubirane sa 50 nM PMA 16 h uz pretretman inhibitorom PKC kinaze 1 μ M bisindolilmalemid I (BIM). Imunoblot metodom detektovane su fosforilisane i totalne forme ERK, JNK i GSK3 β , konverzija LC3 i nivo p62. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi jednog od tri različita eksperimenta (A), zajedno sa denzitometrijskom analizom koja je prikazana kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta (B). * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu prikazanu isprekidanom linijom, dok # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo sa PMA.

4.8. Utišavanje ekspresije *MKK1* i *MKK7* gena smanjuje autofagni fluks i nivo p62 u HL-60 leukemijskim ćelijama tretiranim sa PMA

Prethodni rezultati (Slika 19) su pokazali da farmakološka inhibicija ERK i JNK smanjuje konverziju LC3 i nivo p62. U daljim eksperimentima je korišćena inhibicija gena uzvodne kinaze za ERK, *MKK1* i uzvodne kinaze za JNK, *MKK7* pomoću siRNK. Autofagija je analizirana imunoblotom merenjem autofagnog fluksa, tj. konverzije LC3 u prisustvu bafilomicina, inhibitora autofagije. Nakon 24 h od transfekcije, HL-60 ćelije su tretirane sa PMA 16 h, a nakon 8 h tretmana je dodat bafilomicin (10 nM). Uspešnost transfekcije je ispitana imunoblot metodom koja je pokazala da je fosforilacija ERK i JNK smanjena u odnosu na transfektovane ćelije sa kontrolnom siRNK (Slika 22A, B). U transfektovanim ćelijama tretiranim bafilomicinom dolazi do nakupljanja LC3-II koji se dodatno povećava sa PMA tretmanom usled indukovane konverzije LC3-I u LC3-II (Slika 22A, B). Međutim, konverzija LC3-I u LC3-II je manja u transfektovanim ćelijama sa *MKK1* i *MKK7* siRNK u odnosu na ćelije transfektovane sa kontrolnom siRNK (Slika 22A, B). Dakle, može se zaključiti da ERK i JNK povećavaju autofagni fluks u tretmanu leukemijskih ćelija sa PMA. Nivo p62 je smanjen u ćelijama sa utišanim *MKK1* i *MKK7* genima u odnosu na kontrolno transfektovane ćelije (Slika 23A, B) što ukazuje na ulogu ERK i JNK u povećanju nivoa p62. Dobijeni rezultati sa inhibicijom *MKK1* i *MKK7* gena su u skladu sa rezultatima koji su dobijeni farmakološkom inhibicijom ERK i JNK.



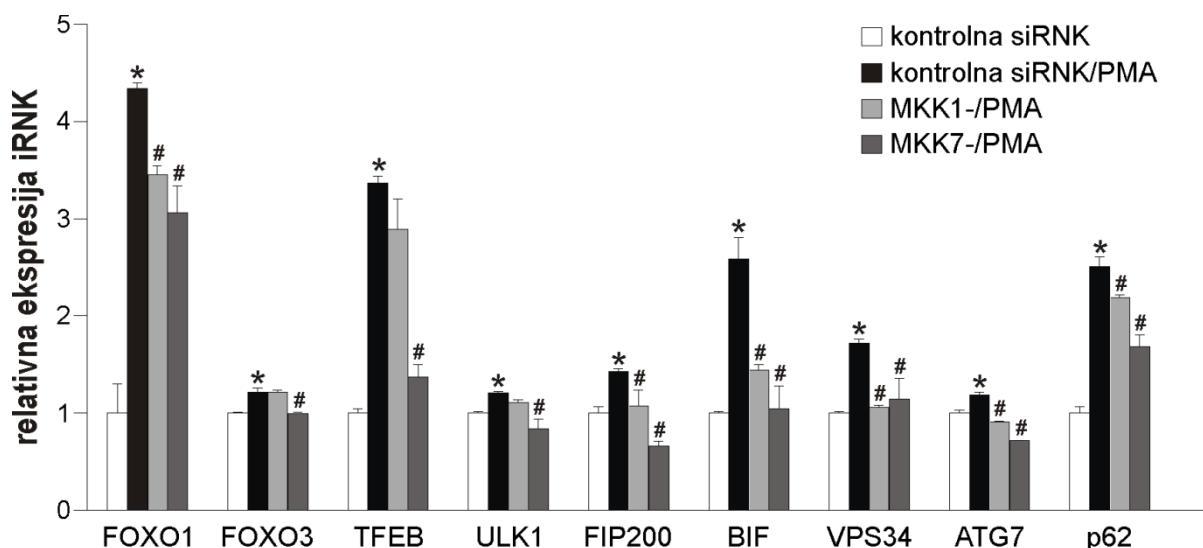
Slika 22. Utišavanje ekspresije *MKK1* i *MKK7* gena smanjuje autofagni fluks u HL-60 leukemijskim ćelijama tretiranim sa PMA. Nakon 24 h od transfekcije sa *MKK1* ili *MKK7* siRNK, HL-60 ćelije su tretirane sa PMA (50 nM) 16 h, a nakon 8 h tretmana je dodat bafilomicin (10 nM). Imunoblot metodom je detektovana konverzija LC3, fosforilacija ERK (A) i JNK (B). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi jednog od tri različita eksperimenta, zajedno sa denzitometrijskom analizom koja je prikazana kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta. * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNK, dok # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNK i tretirane sa PMA.



Slika 23. Utišavanje ekspresije *MKK1* i *MKK7* gena smanjuje nivo p62 u HL-60 leukemijskim ćelijama tretiranim sa PMA. Nakon 24 h od transfekcije sa *MKK1* ili *MKK7* siRNA, HL-60 ćelije su tretirane sa PMA (50 nM) 16 h i nivo p62 je analiziran imunoblotom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi jednog od tri različita eksperimenta zajedno sa denzitometrijskom analizom koja je prikazana kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta. * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNA, dok # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNA i tretirane sa PMA.

4.9. ERK i JNK učestvuju u transkripcionoj aktivaciji autofagije u HL-60 leukemijskim ćelijama pod dejstvom PMA

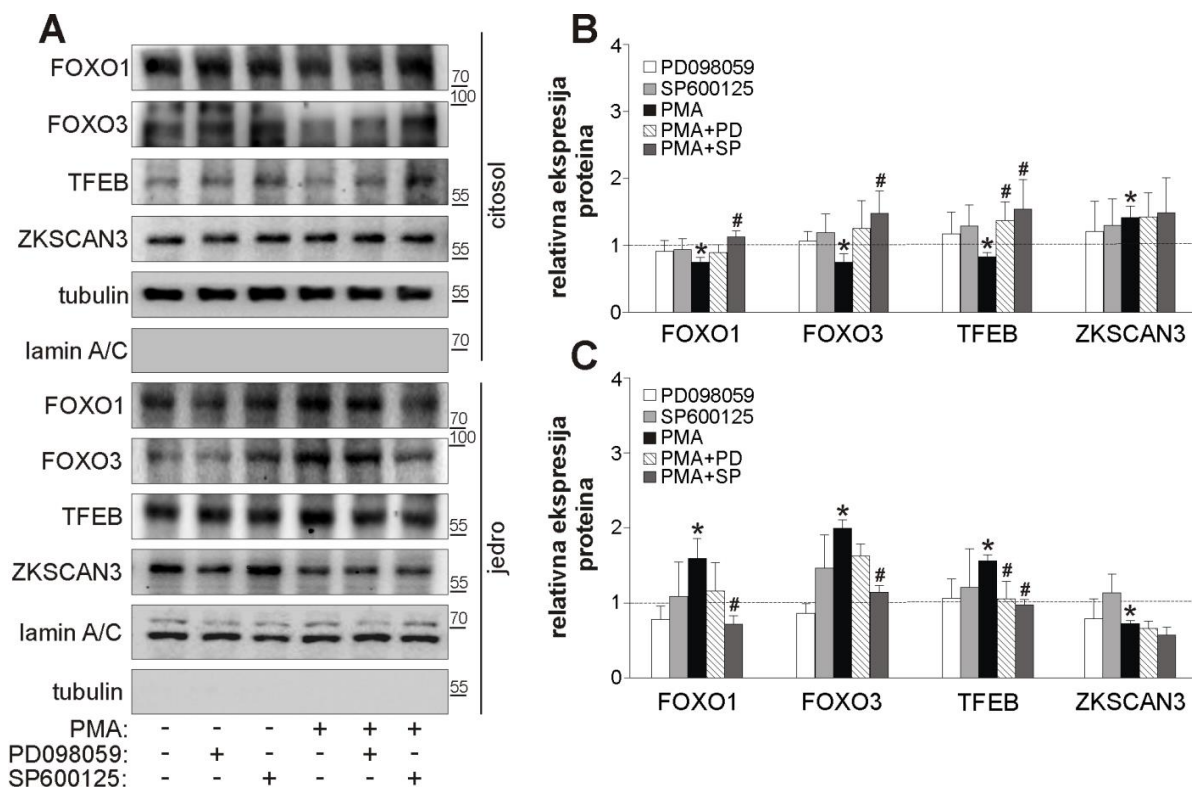
Prethodno je pokazano da PMA aktivira transkripciju *ATG* gena (slika 15) i da ERK i JNK stimulišu konverziju LC3 u tretmanu HL-60 ćelija sa PMA (Slika 19, 22 i 23). Poznato je da ERK i JNK aktiviraju ekspresiju različitih autofagnih gena kao što su *LC3*, *p62*, *BECN-1*, *ATG-5*, *ATG-7* i drugi (185, 199). U daljem nizu eksperimenata je bilo neophodno ispitati da li ERK i JNK aktiviraju autofagiju tako što utiču na transkripciju *ATG* gena. Nakon 24 h od transfekcije sa siRNA za *MKK1* i *MKK7* HL-60 ćelije su tretirane sa PMA (50 nM) 16 h i ekspresija *ATG* gena je analizirana RT-qPCR metodom. Na slici 24 je prikazano da utišavanje ekspresije *MKK7* gena značajno smanjuje transkripciju gena za transkripcione faktore autofagije (*FOXO1*, *FOXO3* i *TFEB*), za inicijaciju autofagije (*ULK1*, *FIP200*), elongaciju autofagozoma (*ATG7*) i za prepoznavanje materijala za degradaciju (*p62*) (102). Takođe je smanjena transkripcija gena za *BIF-1* i *VPS34* koji formiraju kompleks sa beclinom-1 u okviru PI3KC3-C1 inicijacionog kompleksa (Slika 24) (115). Sa druge strane, utišavanje ekspresije *MKK1* gena je značajno smanjilo transkripciju svih analiziranih *ATG* gena izuzev *ULK1*, *FOXO3* i *TFEB* (Slika 24). Može se uočiti da je inhibicija transkripcije *ATG* gena veća sa utišavanjem ekspresije *MKK7* nego *MKK1* gena. Ovi rezultati ukazuju da ERK i JNK aktiviraju transkripciju *ATG* gena u kojoj JNK ima dominantnu ulogu.



Slika 24. Utišavanje ekspresije *MKK1* i *MKK7* gena smanjuje transkripciju *ATG* gena u HL-60 leukemijskim ćelijama tretiranim sa PMA. Nakon 24 h od transfekcije sa kontrolnom, MKK1 (MKK1-) ili MKK7 (MKK7-) siRNK, HL-60 ćelije su tretirane sa PMA (50 nM) 16 h i ekspresija *ATG* gena je analizirana RT-qPCR metodom. Reprezentativni rezultat je prikazan kao srednja vrednost \pm SD triplikata iz jednog od dva različita eksperimenta. * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNK, dok # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije transfektovane sa kontrolnom siRNK i tretirane sa PMA.

4.10. ERK i JNK stimulišu transkripciju *ATG* gena u HL-60 ćelijama premeštanjem aktivirajućih transkripcionih faktora autofagije u jedro

Prethodni rezultati su pokazali da PMA indukuje transport TFEB, FOXO1 i FOXO3 iz citoplazme u jedro i transport ZKSCAN3 iz jedra u citoplazmu (Slika 16). Rezultati drugih studija su pokazali da je JNK uključen u transport TFEB iz citoplazme u jedro (242), dok ERK fosforiliše TFEB i zadržava ga u citoplazmi (131). Poznato je da JNK fosforiliše autofagni represor ZKSCAN3 za izlazak iz jedra u citoplazmu kako bi se omogućila neometana transkripcija autofagnih gena (137). Pored toga, pokazano je da JNK promoviše ulazak FOXO1 i FOXO3 u jedro (204, 206), dok ERK stimuliše njihovu degradaciju u proteazomu (243, 244). U narednim eksperimentima je bio cilj da se ispita da li ERK i JNK aktiviraju autofagiju tako što utiču na transport TFEB, FOXO1 i FOXO3 iz citoplazme u jedro i ZKSCAN3 iz jedra u citoplazmu. Nakon PMA tretmana HL-60 ćelija koje su prethodno inkubirane sa inhibitorom MEK i JNK, metodom ćelijske frakcionacije su razdvojene citoplazmatska i jedarna frakcija. Imunoblotom je detektovano prisustvo TFEB, ZKSCAN3, FOXO1 i FOXO3 u frakcijama. Na slici 25 uočava se smanjenje nivoa FOXO1 i FOXO3 u jedru i povećanje njihovog nivoa u citoplazmi kada je inhibirana JNK u leukemijskim ćelijama tretiranim sa PMA. Značajne promene u nivou FOXO1 i FOXO3 transkripcionih faktora u citoplazmi i jedru nisu uočene kada je inhibiran ERK (Slika 25). U ćelijama tretiranim sa PMA, supresija ERK i JNK je smanjila nivo TFEB u jedru, a povećala u citoplazmi (Slika 25). Inhibicija ERK i JNK nije dovela do promene u nivou ZKSCAN3 u jedru i citoplazmi (Slika 25). Dobijeni rezultati pokazuju da JNK promoviše ulazak FOXO1 i FOXO3 iz citoplazme u jedro HL-60 ćelija diferenciranih pod dejstvom PMA. ERK i JNK su zajedno uključeni u transport TFEB iz citoplazme u jedro. Međutim, transport ZKSCAN3 iz jedra u citoplazmu nije pod kontrolom ERK i JNK.

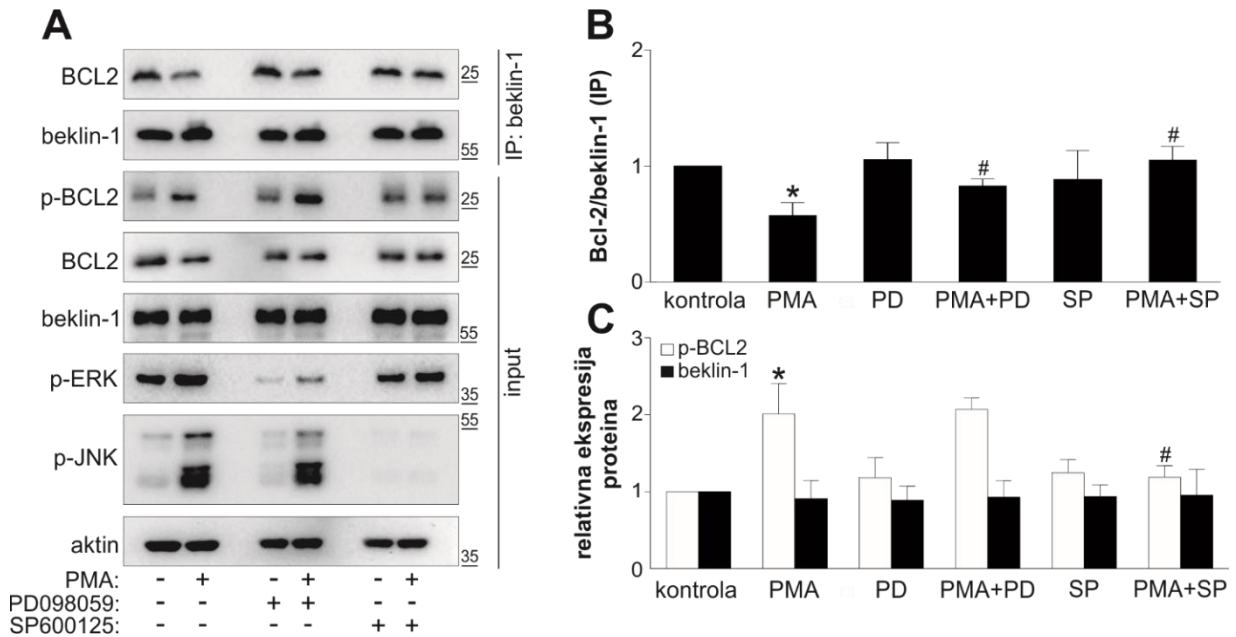


Slika 25. Inhibicija ERK i JNK utiče na transport FOXO1, FOXO3 i TFEB iz citoplazme u jedro HL-60 leukemijskih ćelija tretiranih sa PMA. Nakon 16 h tretmana HL-60 ćelija koje su prethodno tretirane sa inhibitorom MEK - PD098059 (10 μ M) ili JNK - SP600125 (15 μ M) sa PMA (50 nM), imunoblotom je ispitano prisustvo FOXO1, FOXO3, TFEB i ZKSCAN3 u citoplazmatskoj i jedarnoj ćelijskoj frakciji. Lamin A/C je korišćen kao marker jedarne frakcije, dok je β -tubulin korišćen kao marker citoplazmatske frakcije. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi jednog od tri različita eksperimenta (A), zajedno sa denzitometrijskom analizom koja je prikazana kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta (B, C). *p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu prikazanu isprekidanom linijom, dok #p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo sa PMA.

4.11. ERK i JNK stimulišu autofagiju disocijacijom beklina-1 od Bcl-2 u HL-60 leukemijskim ćelijama tretiranim sa PMA

ERK i JNK aktiviraju autofagiju na posttranslacionom nivou tako što utiču na disocijaciju beklina-1 od Bcl-2. Poznato je da se beclin-1 nalazi u interakciji sa antiapoptotskim Bcl-2 što ga sprečava da interaguje sa VPS34 u okviru PI3KC3-C1 kompleksa i tako započne inicijaciju autofagije (245). ERK i JNK fosforilišu Bcl-2 što omogućava da se beclin-1 odvoji od Bcl-2 i indukuje autofagiju (188, 207). U narednim eksperimentima je bio cilj da se istraži da li PMA utiče na razdvajanje beklina-1 od Bcl-2 i da li ERK i JNK učestvuju u tom procesu. HL-60 ćelije su tretirane inhibitorima MEK i JNK, nakon čega su inkubirane 16 h sa PMA. Za analizu interakcije beklina-1 i Bcl-2 korišćena je metoda ko-immunoprecipitacije. Precipitacija beklina-1 je izvršena tako što su ćelijski lizati inkubirani sa anti-beklin-1 antitelom i agaroznim kuglicama. Potom su proteini koji su se vezali za beclin-1 na agaroznim kuglicama analizirani imunoblot metodom. Rezultati su pokazali da PMA dovodi do razdvajanja beklina-1 od Bcl-2 jer je u lizatu ćelija tretiranih sa PMA detektovano smanjenje Bcl-2 (Slika 26A, B). Inhibicija JNK potpuno je poništila uočeno smanjenje

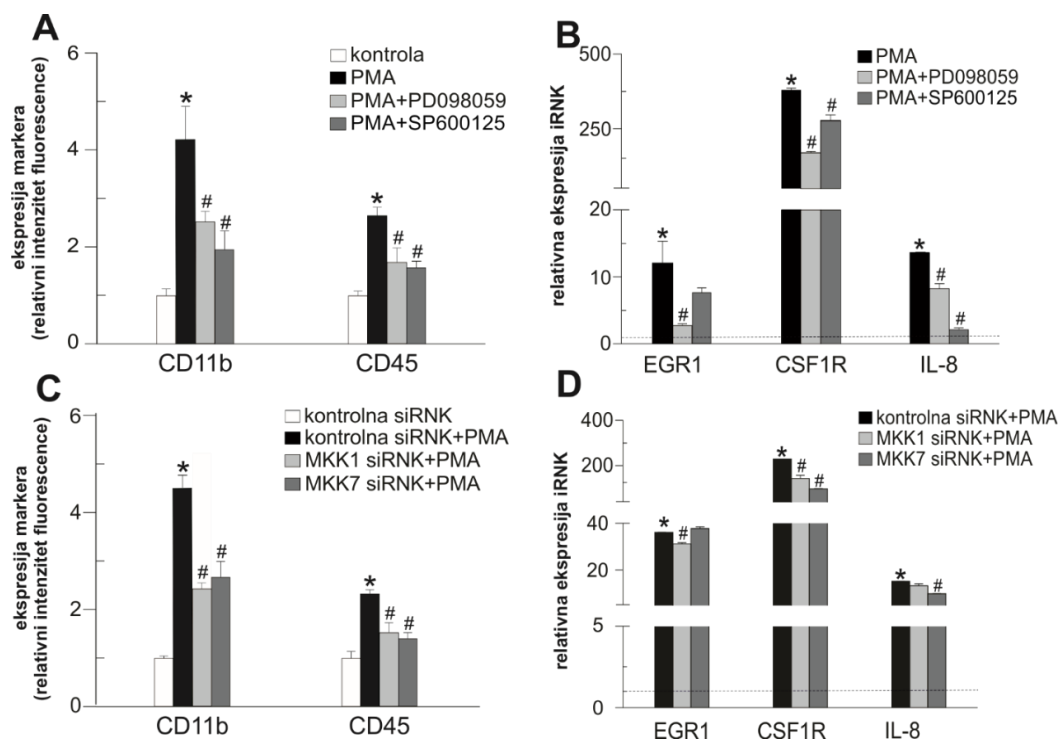
Bcl-2, što ukazuje na njegovu obnovljenu interakciju sa beclinom-1 (Slika 26A, B). Inhibicija ERK je imala sličan efekat, ali u manjoj meri nego inhibicija JNK. Takođe je pokazano da PMA indukuje fosforilaciju Bcl-2 na serinskom ostatku 70 (Slika 26A, C). Inhibicija JNK, ali ne i ERK, smanjila je fosforilaciju Bcl-2 (Slika 26A, C). Na osnovu ovoga se može zaključiti da ERK i JNK dovode do odvajanja beklina-1 od Bcl-2, s tim što JNK utiče na disocijaciju ovog kompleksa fosforilacijom Bcl-2 na serinu 70. Inhibicija ERK i JNK je potvrđena imunoblot metodom koja je pokazala smanjenje njihove fosforilacije u kontrolnim ćelijama i ćelijama tretiranim sa PMA nakon upotrebe MEK i JNK inhibitora (Slika 26A).



Slika 26. Inhibicija ERK i JNK utiče na interakciju beklina-1 i Bcl-2 u HL-60 leukemijskim ćelijama tretiranim sa PMA. HL-60 ćelije su pretretirane inhibitorom MEK - PD098059 (10 μ M) ili inhibitorom JNK - SP600125 (15 μ M), nakon čega su inkubirane 16 h sa PMA. U ko-immunoprecipitaciji (IP) ćelijski lizati su inkubirani sa anti-beklin-1 antitelom i agaroznim kuglicama nakon čega je imunoblot metodom detektovan beclin-1 i Bcl-2. U lizatima u kojima nije precipitovan beclin-1 (input) imunoblotom je detektovana ekspresija beklina-1, Bcl-2, fosforilacija ERK i JNK. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi jednog od tri različita eksperimenta (A), zajedno sa denzitometrijskom analizom koja je prikazana kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta (B, C). Ekspresija Bcl-2 koji interaguje sa beclinom-1 je izražena u odnosu na precipitovan beclin-1 (B), fosforilisana forma Bcl-2 je izražena u odnosu na totalnu formu Bcl-2, dok je ekspresija beklina-1 izražena u odnosu na aktin (C). * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, dok # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo sa PMA.

4.12. ERK i JNK učestvuju u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija pod dejstvom PMA

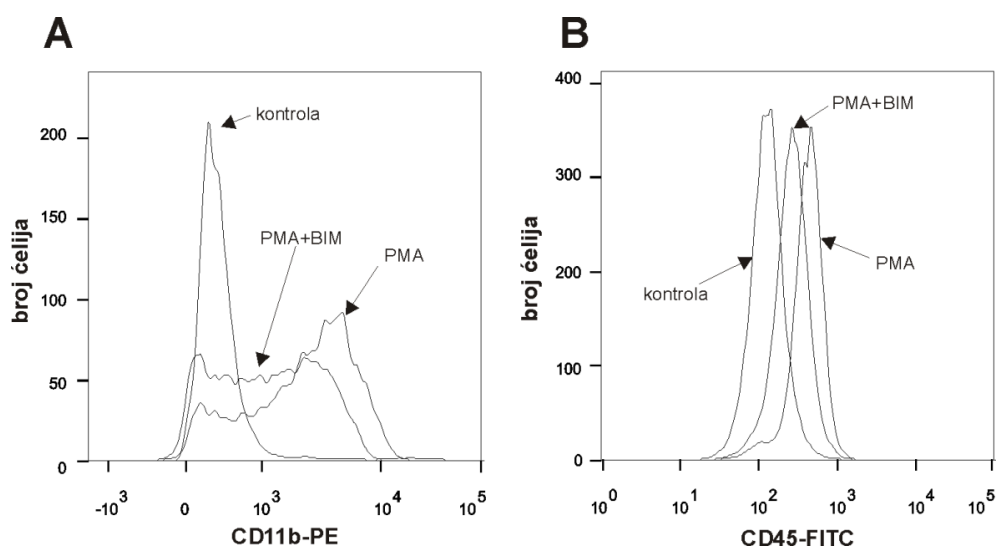
Kako je pokazano da ERK i JNK stimulišu autofagiju, dalje je bilo neophodno ispitati da li ove MAP kinaze učestvuju u diferencijaciji HL-60 ćelija pod dejstvom PMA. HL-60 ćelije su inkubirane sa inhibitorima MEK i JNK, a nakon toga su 24 h tretirane sa PMA. Ekspresija površinskih markera diferencijacije CD11b i CD45 je analizirana protočnom citofluorimetrijom, dok je ekspresija markera makrofaga EGR1, CSF1R i IL-8 ispitana RT-qPCR metodom. Inhibicija ERK i JNK je značajno smanjila ekspresiju površinskih markera CD11b i CD45 (Slika 27A). Inhibicija ERK je dovela do značajnog smanjenja transkripcije *EGR1*, *CSF1R* i *IL-8* gena, dok je inhibicija JNK značajno redukovala transkripciju *CSF1R* i *IL-8* gena (Slika 27B). Kako bi se dodatno potvrdila uloga MAP kinaza u diferencijaciji HL-60 ćelija pod dejstvom PMA, ćelije su transfektovane sa kontrolnom, MKK1 ili MKK7 siRNK. Nakon 24 h od transfekcije, ćelije su tretirane sa PMA (50 nM) u trajanju od 24 h. Uspešnost transfekcije je potvrđena imunoblotom (Slika 20). Inhibicija *MKK1* i *MKK7* gena je značajno smanjila ekspresiju površinskih markera CD11b i CD45 (Slika 27C). Inhibicija *MKK1* gena je značajno redukovala transkripciju *EGR1* i *CSF1R*, dok je inhibicija *MKK7* gena značajno smanjila iRNK za *CSF1R* i *IL-8* (Slika 27D). Na osnovu efekata farmakološke i genske inhibicije ERK i JNK može se zaključiti da ove MAP kinaze učestvuju u diferencijaciji HL-60 ćelija sa PMA.



Slika 27. Inhibicija ERK i JNK smanjuje ekspresiju makrofagnih markera u HL-60 leukemijskim ćelijama tretiranim sa PMA. (A) HL-60 ćelije su inkubirane sa inhibitorom MEK - PD098059 (10 μ M) ili JNK - SP600125 (15 μ M) u trajanju od 30 minuta, nakon čega su tretirane sa PMA (50 nM) 24 h. Ekspresija makrofagnih markera CD11b i CD45 je ispitana protočnom citofluorimetrijom (A), dok je ekspresija makrofagnih markera EGR1, CSF1R i IL-8 ispitana metodom RT-qPCR (B). Nakon 24 h transfekcije sa kontrolnom, MKK1 ili MKK7 siRNK, HL-60 ćelije su tretirane sa PMA (50 nM) 24 h i ispitana je ekspresija makrofagnih markera CD11b, CD45 (C), EGR1, CSF1R i IL-8 (D). Reprezentativni rezultat je prikazan kao srednja vrednost \pm SD triplikata iz jednog od dva različita eksperimenta. * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu prikazanu isprekidanom linijom (B, D), dok # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije koje tretirane sa PMA.

4.13. PKC učestvuje u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija pod dejstvom PMA

Prethodno je pokazano da PKC aktivira ERK i JNK (Slika 20 i 21) i da ove MAP kinaze učestvuju u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija pod dejstvom PMA (Slika 27). Dalje je bilo neophodno ispitati da li PKC učestvuje u ovom procesu diferencijacije. HL-60 ćelije su inkubirane sa inhibitorom PKC bisindolilmalemidom I ($1\mu\text{M}$) pre tretmana sa PMA tokom 24 h. Analiza ekspresija markera diferencijacije CD11b i CD45 protočnom citofluorimetrijom pokazala je smanjenje njihove ekspresije pod dejstvom bisindolilmalemida I u ćelijama tretiranim sa PMA (Slika 28A, B). Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da je aktivacija PKC neophodna za diferencijaciju HL-60 ćelija pod dejstvom PMA.

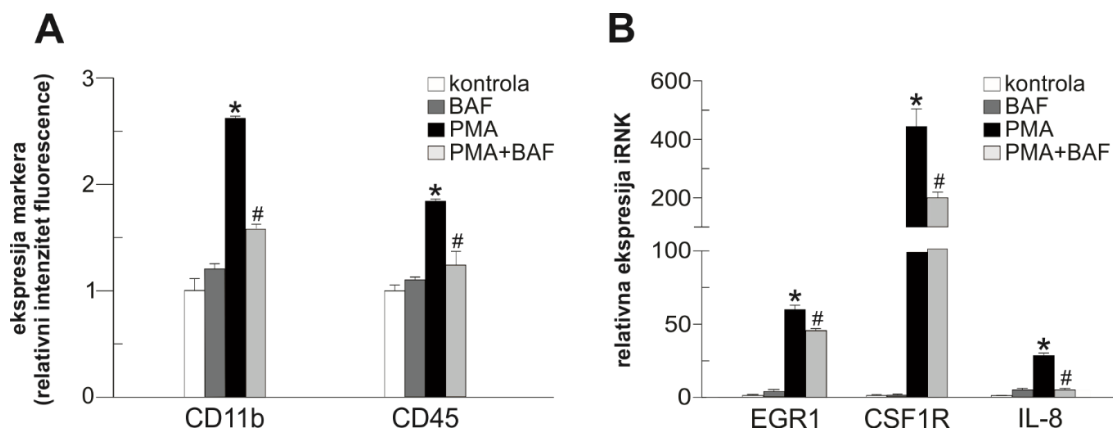


Slika 28. Inhibicija PKC smanjuje ekspresiju CD11b i CD45 u HL-60 leukemijskim ćelijama pod dejstvom PMA. HL-60 ćelije su inkubirane sa bisindolilmalemid I ($1\mu\text{M}$) 30 minuta nakon čega su 24 h tretirane sa PMA (50 nM). Protočnom citofluorimetrijom je detektovana ekspresija CD11b (A) i CD45 (B) sa anti-CD11b PE antitelom i anti-CD45 FITC antitelom. Na slici A i B su predstavljeni reprezentativni histogrami.

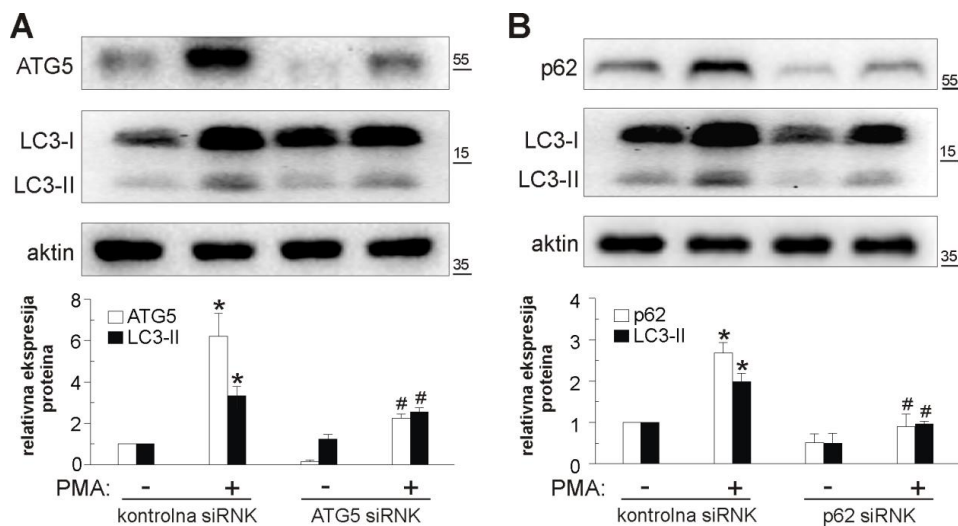
4.14. Autofagija učestvuje u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija pod dejstvom PMA

Kako je pokazano da PMA indukuje autofagiju u HL-60 ćelijama, u narednim eksperimentima je ispitana uloga autofagije u diferencijaciji ovih ćelija pod dejstvom PMA. Ćelije su tretirane 30 minuta inhibitorom autofagije bafilomicinom A1 (10 nM), nakon čega je indukovana diferencijacija sa PMA (50 nM) u trajanju od 24 h. Ekspresija markera diferencijacije CD11b i CD45 je analizirana protočnom citofluorimetrijom, dok je ekspresija markera makrofaga EGR1, CSF1R i IL-8 ispitana RT-qPCR metodom. Analiza navedenih markera je pokazala da je ekspresija CD11b i CD45, kao i ekspresija gena za *EGR1*, *CSF1R* i *IL-8*, značajno smanjena kada je autofagija inhibirana bafilomicinom (Slika 29A, B). Uloga autofagije u ovom modelu diferencijacije je dodatno ispitana utišavanjem ekspresije *ATG5* i *p62* gena. *ATG5* učestvuje u konverziji LC3 i elongaciji autofagozoma, dok je *p62* neophodan u prepoznavanju materijala za degradaciju (102). HL-60 ćelije su transfektovane siRNK za *ATG5* i *p62* i nakon 24 h od transfekcije tretirane sa PMA

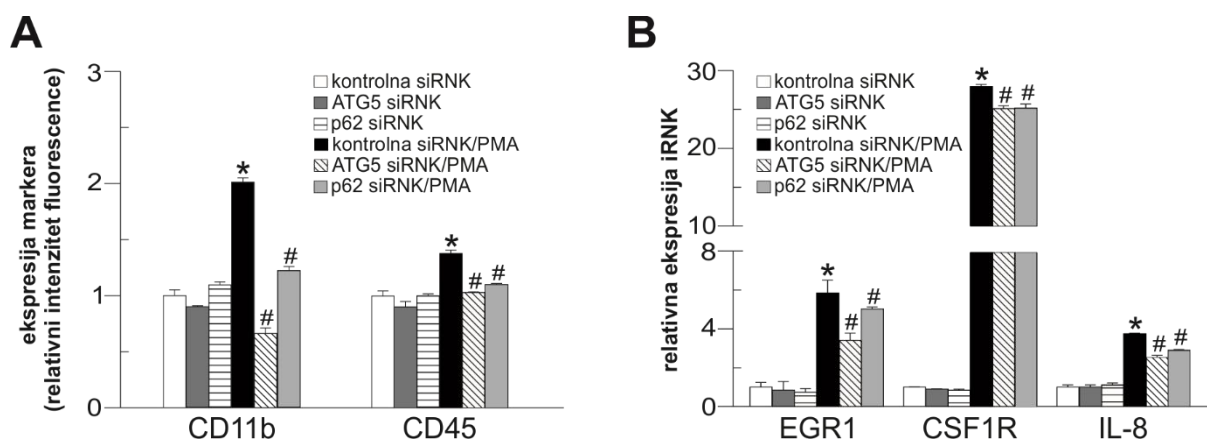
(50 nM) tokom 24 h. Uspešnost transfekcije je ispitana imunoblot metodom koja je pokazala da je nivo ekspresije proteina ATG5 i p62 redukovan korišćenjem odgovarajućih siRNK (Slika 30A, B). U skladu sa tim, konverzija LC3 je smanjena u ćelijama transfektovanim sa ATG5 ili p62 siRNK u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNK, što ukazuje na inhibiranu autofagiju (Slika 30A, B). U ćelijama sa utišanim genom za *ATG5* i *p62* koje su tretirane sa PMA, ekspresija makrofagnih markera (CD11b, CD45, EGR1, CSF1R i IL-8) je bila značajno niža u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNK (Slika 31A, B). Dobijeni rezultati ukazuju na to da autofagija učestvuje u diferencijaciji HL-60 ćelija u makrofage pod dejstvom PMA.



Slika 29. Inhibicija autofagije bafilomicinom A1 smanjuje ekspresiju makrofagnih markera u HL-60 leukemijskim ćelijama tretiranim sa PMA. Protočnom citofluorimetrijom je ispitana ekspresija makrofagnih markera CD11b i CD45 (A), dok je RT-qPCR metodom ispitana ekspresija gena za *EGR1*, *CSF1R* i *IL-8* (B) u prisustvu ili odsustvu bafilomicina A1 (10 nM) pod dejstvom PMA. Reprerativni rezultat je prikazan kao srednja vrednost \pm SD triplikata jednog od dva različita eksperimenta. * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije bez tretmana, dok # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane samo sa PMA.



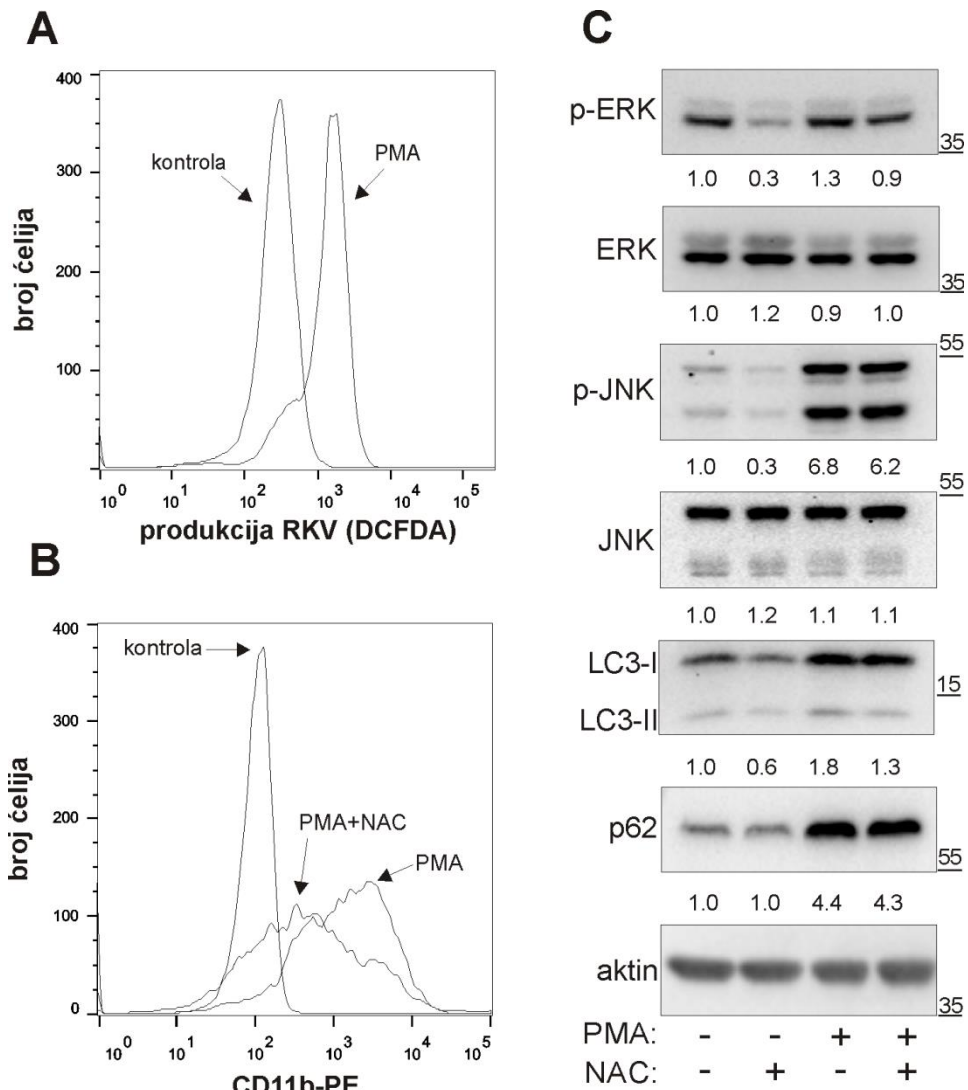
Slika 30. Utišavanje ekspresije *ATG5* i *p62* gena u HL-60 leukemijskim ćelijama tretiranim sa PMA smanjuje konverziju LC3. Ćelije su transfektovane kontrolnom siRNK, siRNK za *ATG5* (A) i siRNK za *p62* (B) nakon čega su tretirane 24 h sa PMA (50 nM). Imunoblot metodom je ispitana ekspresija *ATG5* (A), *p62* (B) i konverzija LC3 (A i B). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi jednog od tri različita eksperimenta, zajedno sa denzitometrijskom analizom koja je prikazana kao srednja vrednost \pm SD tri različita eksperimenta. * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNK, dok # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNK i tretirane sa PMA.



Slika 31. Utišavanje ekspresije *ATG5* ili *p62* gena smanjuje ekspresiju makrofagnih markera u HL-60 leukemijskim ćelijama tretiranim sa PMA. HL-60 ćelije su transfektovane sa ATG5, p62 i kontrolnom siRNK, nakon čega su tretirane 24 h sa PMA (50 nM). Protočnom citofluorimetrijom je detektovana ekspresija CD11b i CD45 (A), dok je RT-qPCR metodom detektovana ekspresija *EGR1*, *CSF1R* i *IL-8* (B). Reprezentativni rezultat je prikazan kao srednja vrednost \pm SD triplikata jednog od dva različita eksperimenta. * $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNK, dok # $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNK i tretirane sa PMA.

4.15. Uloga reaktivnih kiseoničnih vrsta u aktivaciji MAP kinaza, autofagije i diferencijacije HL-60 leukemijskih ćelija indukovanoj sa PMA

Prethodne studije su pokazale da RKV mogu da aktiviraju autofagiju i da aktivacijom ERK i JNK stimulišu diferencijaciju leukemijskih ćelija pod dejstvom PMA (195, 246, 247). Za ispitivanje uloge RKV u aktivaciji MAP kinaza, autofagije i diferencijacije HL-60 ćelija pod dejstvom PMA, bilo je neophodno ispitati da li HL-60 ćelije proizvode RKV nakon tretmana sa PMA. HL-60 ćelije su obojene sa H₂DCFDA, tretirane sa PMA i analizirane korišćenjem protočnog citofluorimetra. U prisustvu RKV dolazi do oksidacije H₂DCF u 2',7'-dihlorofluorescein koji fluorescira zeleno. Nakon 1 h inkubacije HL-60 ćelija sa 50 nM PMA intenzitet fluorescence se povećao u odnosu na ćelije u kontroli (Slika 32A), čime je pokazano da je PMA dovela do povećane produkcije RKV u HL-60 ćelijama. Sledeći korak je bio da se ispita da li RKV učestvuju u diferencijaciji HL-60 ćelija. U tu svrhu ćelije su inkubirane 30 minuta sa antioksidantom NAC (5 mM) i tretirane sa PMA (50 nM) u trajanju od 24 h. Nakon isteka tretmana, ekspresija markera diferencijacije CD11b je analizirana na protočnom citofluorimetru. Pokazano je da antioksidativni treatment značajno smanjuje ekspresiju CD11b u ćelijama tretiranim sa PMA (Slika 32B). Dobijeni rezultat pokazuje da RKV učestvuju u diferencijaciji HL-60 ćelija sa PMA. Kako bi se ispitala uloga RKV u aktivaciji MAP kinaza i autofagije, HL-60 ćelije su tretirane sa 5 mM NAC nakon čega je indukovana diferencijacija sa PMA (50 nM) u trajanju od 16 h. Imunoblot metodom je ispitana fosforilacija ERK, JNK, konverzija LC3 i nivo p62. Rezultati su pokazali da NAC smanjuje fosforilaciju ERK i konverziju LC3, dok je pokazao slabiji uticaj na fosforilaciju JNK i nije uticao na nivo p62 (Slika 32C). Na osnovu ovog se može zaključiti da RKV delimično učestvuju u indukciji autofagije i diferencijacije aktivirane od strane ERK i JNK u HL-60 ćelijama tretiranim sa PMA.



Slika 32. Uloga RKV u aktivaciji MAP kinaza, autofagije i diferencijacije HL-60 leukemijskih ćelija tretiranih sa PMA. HL-60 ćelije su inkubirane 1 h sa PMA (50 nM) i H₂DCFDA, nakon čega je produkcija RKV analizirana na protočnom citofluorimetru. Na slici je predstavljen reprezentativni histogram (A). HL-60 ćelije su pretretirane 30 minuta sa antioksidantom NAC (5 mM), nakon čega je indukovana diferencijacija sa PMA (50 nM) u trajanju od 24 h (B) ili 16 h (C). Protočnom citofluorimetrijom je detektovana ekspresija CD11b sa anti-CD11b PE antitelom. Na slici je predstavljen reprezentativni histogram (B). Imunoblot metodom su detektovane fosforilisane i totalne forme ERK i JNK, konverzija LC3 i nivo p62. Prikazan je reprezentativni imunoblot jednog od tri različita eksperimenta, zajedno sa denzitometrijskom analizom (C).

5. DISKUSIJA

U ovoj studiji je pokazano da autofagija koju aktiviraju ERK i JNK učestvuje u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija u makrofage pod dejstvom PMA, aktivatora PKC. Iako je uloga autofagije i MAP kinaza ranije već opisana na ovom modelu diferencijacije, rezultati ove teze su po prvi put pokazali molekulske mehanizme interakcije ova dva procesa (154, 195, 248). Aktivacija autofagije je nezavisna od AMPK i Akt/mTORC1, ali je zavisna od ERK i JNK. Ove MAP kinaze aktivirane od strane PKC indukuju autofagiju stimulacijom transkripcije autofagnih gena uz pomoć TFEB, FOXO1 i FOXO3 transkripcionih faktora. Autofagija je pod uticajem ERK i JNK aktivirana i na posttranslacionom nivou disocijacijom beklina-1 iz kompleksa sa Bcl-2.

U skladu sa prethodnim studijama, PMA je indukovala diferencijaciju HL-60 ćelija u makrofage (44). HL-60 ćelije su na svojoj površini ekspimirale makrofagne markere CD11b, CD13, CD14 i CD45. Takođe, PMA je indukovala transkripciju makrofagnih gena kao što su transkripcioni faktor *EGR1*, receptor *CSF1R* i citokin *IL-8*. Diferencirani makrofagi su formirali nastavke različitih oblika, zalepili su se za podlogu i grupisali u klustere. Morfologija diferenciranih ćelija je izmenjena u odnosu na morfologiju leukemijskih ćelija koja podrazumeva okruglasto jedro u centru ćelije, okruženo tankim slojem citoplazme (44, 249). Prethodna istraživanja su pokazala da je kod ovako diferenciranih makrofaga jedro nepravilnog oblika periferno postavljeno sa kondenzovanim hromatinom (44, 250). U citoplazmi makrofaga se nalaze brojna lipidna tela, lizozomi, mitohondrije, razvijen granulirani ER i Goldžijev aparat sa velikim brojem vezikula (44, 251). Takođe, poznato je da ovako diferencirani makrofagi imaju sposobnost fagocitoze (44).

PMA je indukovala autofagiju i to je utvrđeno primenom različitih metoda za detekciju autofagije, kao što su detekcija povećanja unutarćeliljskog zakišeljavanja, tačkaste distribucije i lipidacije LC3, transkripcije gena koji regulišu inicijaciju autofagije (*ULK1*, *FIP200*), nukleaciju i elongaciju autofagozoma (*VPS34*, *BIF-1*, *ATG7*), kao i prepoznavanje supstrata za autofagnu degradaciju (*p62*). Povećanje transkripcije ovih autofagnih gena je pokazano u studiji u kojoj je sekvencirana RNK HL-60 ćelija nakon četiri dana diferencijacije pod dejstvom PMA (252). Takođe, indukcija autofagije je potvrđena premeštanjem aktivatora autofagije TFEB, FOXO1 i FOXO3 u jedro, autofagnog represora ZKSCAN3 u citoplazmu i disocijacije beklina-1 iz kompleksa sa Bcl-2. Povećana transkripcija *ATG7* i *p62* je potvrđena na nivou proteina. Ovakvo povećanje *p62* može da reflektuje inhibiciju autofagije jer se *p62* tokom autofagije razgrađuje u autolizozomima. Međutim, pokazano je da se nivo *p62* proteina povećava u PMA tretmanu jer se aktivira transkripcija gena za *p62*. Ovaj rezultat je u skladu sa drugim studijama u kojima je povećan nivo *p62* važan u selektivnoj autofagiji (97). Pokazano je da se u granulocitnoj diferencijaciji leukemijskih ćelija sa ATRA aktivira autofagija zajedno sa povećanim nivoom *p62* (253). U ovom modelu diferencijacije, *p62* se vezuje za PML-RAR onkoprotein koji se potom razgrađuje autofagijom (154). Kako HL-60 ćelije imaju deleciju gena za ovaj onkoprotein, ostaje da se istraži da li i koje onkoproteine vezuje *p62* tokom diferencijacije ovih ćelija sa PMA (211). Da je autofagni fluks zaista aktiviran pokazano je povećanjem nivoa LC3-II u kombinaciji PMA sa inhibitorom lizozomalne razgradnje bafilomicinom A1.

Prethodna studija je pokazala da utišavanje ekspresije *ATG5* gena sprečava diferencijaciju HL-60 ćelija sa PMA što ukazuje na ulogu autofagije u ovom procesu (154). Međutim, u toj studiji indukcija autofagije sa PMA nije direktno ispitivana, a poznato je da *ATG5* može da ima i biološka dejstva nezavisna od autofagije (254). Rezultati ovog istraživanja su pokazala da utišavanje ekspresije *ATG5* gena smanjuje konverziju LC3, ekspresiju površinskih markera makrofaga i transkripciju makrofagnih gena, što ukazuje na to da autofagija zavisna od *ATG5* učestvuje u diferencijaciji HL-60 ćelija sa PMA. Inhibicija ekspresije gena za *p62* je takođe smanjila konverziju LC3, ali i ekspresiju makrofagnih markera, što ukazuje na to da ovaj molekul učestvuje u diferencijaciji leukemijskih ćelija sa PMA. Međutim, u diferencijaciji NB4 ćelija promijelocitne

leukemije sa ATRA, pokazano je da p62 nije neophodan u ovom procesu, ali da je važan za preživljavanje diferenciranih ćelija (253). Uloga autofagije u diferencijaciji HL-60 ćelija pod dejstvom PMA je dodatno potvrđena korišćenjem bafilomicina, farmakološkog inhibitora autofagije.

Autofagija se u većini eksperimentalnih modela aktivira kada je suprimiran mTORC1 i aktivirana AMPK (120). U ovoj disertaciji PMA je uporedo sa aktivacijom autofagije paradoksalno stimulisala mTORC1, što je pokazano fosforilacijom njegovih direktnih supstrata 4EBP1 i S6K. Fosforilacijom 4EBP1 dolazi do njegove disocijacije od eIF4E koji omogućava inicijaciju translacije (255). Istovremeno, fosforilacijom S6K1 se aktivira sinteza ribozomalnih proteina koji učestvuju u procesu translacije (255). Tretman sa PMA je stimulisao i Akt koji aktivira mTORC1 (255). Postoje i drugi mehanizmi kojima PMA može da aktivira mTORC1. Za ovaj kompleks je poznato da svoju aktivnost ostvaruje na lizosomalnoj membrani. Kada je PKC stimulisana od strane PMA, ona učestvuje u pozicioniranju mTORC1 na lizozomima, što bi i ovde mogao da bude slučaj (256). Pošto je u ovoj studiji pokazano da PMA aktivira ERK, ova kinaza bi mogla da stimuliše mTORC1 tako što sprečava aktivnost GTP-aze, zbog čega RHEB-GTP pojačava aktivnost mTORC1 (257). Pokazano je da PMA aktivira mTORC1 na različitim ćelijskim linijama kao što su SH-SY5Y ćelije neuroblastoma i SKBR3 ćelije karcinoma dojke (258, 259). Rezultati ovog istraživanja su pokazala da PMA smanjuje aktivnost AMPK, inhibitora mTORC1, što dodatno pojačava aktivnost ovog kompleksa (255). Na sličan način je aktivnost AMPK smanjena u diferencijaciji ćelija monocitne leukemije THP-1 sa PMA. Iako u ovoj studiji uloga mTORC1 nije ispitivana, pokazano je da je uloga mTORC1 kompleksa značajna u adheziji THP-1 monocita tretiranih sa PMA ili LPS-om (260, 261). Narita i saradnici su pokazali da je istovremena aktivacija mTORC1 i autofagije značajna u produkciji IL-8 kod diferenciranih makrofaga (262). Takođe, smatra se da je mTORC1 neophodan u diferencijaciji mijeloidnih progenitora u monocite i makrofage (263, 264).

Indukcija autofagije pod dejstvom PMA u HL-60 ćelijama nije zavisna od glavnog represora autofagije mTORC1 i aktivatora autofagije AMPK, zbog čega je bilo neophodno ispitati druge mehanizme koji mogu da aktiviraju autofagiju. U ranijim studijama izvedenim na ovom modelu diferencijacije pokazano je da je za ekspresiju makrofagnih markera neophodna aktivacija ERK i JNK. (195, 248). Za ove MAP kinaze je poznato da imaju ulogu u regulaciji svih faza u procesu autofagije, kako na nivou transkripcije, tako i na posttranslacionom nivou (199). Zbog toga je bilo neophodno ispitati njihovu ulogu u aktivaciji autofagije i diferencijacije leukemijskih ćelija pod dejstvom PMA. Rezultati su pokazali da farmakološka i genska inhibicija ERK i JNK smanjuju konverziju LC3-I u LC3-II, kao i nivo autofagnog receptora p62. Inhibicija ovih kinaza je takođe smanjila autofagni fluks. Pokazano je da aktivacija ERK i JNK zavisi od PKC, što je u skladu sa rezultatima prethodnih studija u kojima je pokazano da PKC aktivira MAPK u diferencijaciji leukemijskih ćelija sa PMA (194, 265). Mehanizam kojim PKC aktivira ERK i JNK je poznat iz ranijih studija. PKC aktivira JNK stimulacijom MKK4/7 kinaza, dok aktivacijom RAF kinaze PKC aktivira ERK (173, 193). Rezultati ovog istraživanja su pokazala da inhibicija PKC suprimira autofagiju inhibicijom ERK i JNK. Ovo je u skladu sa podacima da MAPK aktivirane od strane PKC učestvuju u indukciji autofagije. Raf-1 i JNK, aktivirane od strane PKC, stimulišu autofagiju u HeLa ćelijama tretiranim oridoninom (266). Takođe je pokazano da u uslovima hipoksije PKCδ aktivira JNK1, koja zatim fosforiliše BCL-2 i tako dovodi do disocijacije beklina-1 od BCL-2 i indukcije autofagije (267). Postoje podaci i da JNK aktivirana od strane PKC indukuje razgradnju bakterija autofagijom (268). PMA akitvacijom PKC povećava ekspresiju beklina-1, što aktivira autofagiju u megakariocitnoj diferencijaciji K562 leukemijskih ćelija (161). Kako je u toj studiji pokazano da su ERK i JNK aktivirani, moguće je da je autofagija u modelu megakariocitne diferencijacije zavisna od ovih MAP kinaza.

Modulacija autofagije od strane PKC zavisi od vrste i trajanja stimulusa, izoforme PKC koja je aktivirana, lokalizacije PKC u ćeliji, tipa ćelije kao i od nizvodnih supstrata koje PKC aktivira

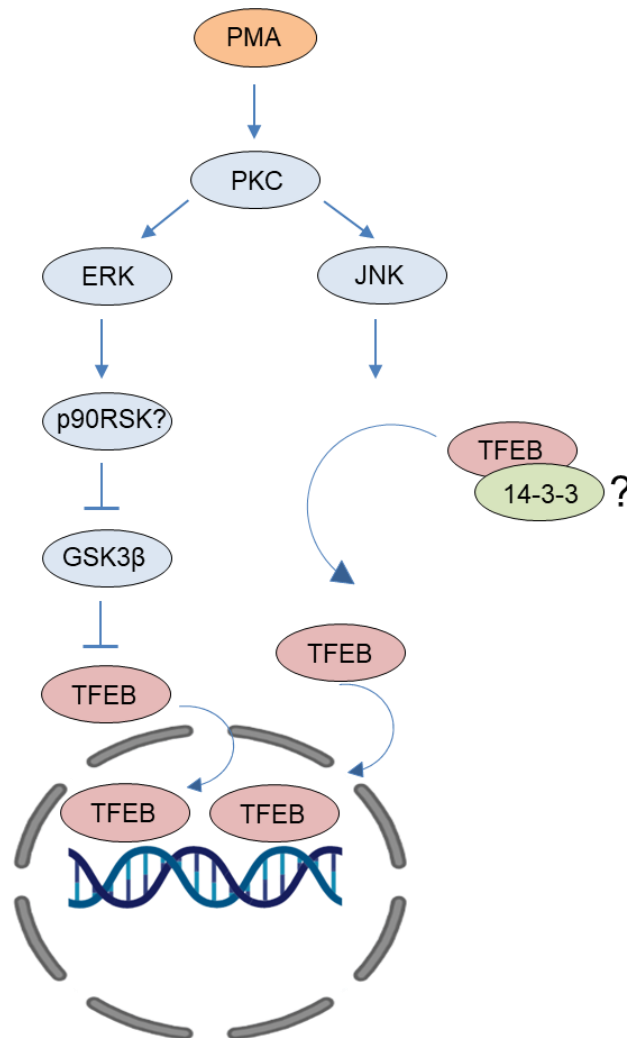
(239). Pokazano je da PKC δ može da aktivira ili inhibira autofagiju modulacijom Akt/mTORC1 signalnog puta (239). Međutim, PKC može da suprimira autofagiju koja je indukovana gladovanjem na HEK293 (engl. *human embryonic kidney 293*) ćelijama (269). Bez obzira na to, rezultati ovog istraživanja ukazuju da aktivacija ERK i JNK od strane PKC indukuje autofagiju koja je neophodna za proces diferencijacije.

ERK i JNK aktiviraju autofagiju na nivou transkripcije u HL-60 ćelijama tretiranim sa PMA. Poznato je da ERK povećava transkripciju *LC3*, *p62*, *BECN-1* i *BNIP-3* gena, dok JNK stimuliše ekspresiju *ATG* gena aktivacijom c-JUN i FOXO transkripcionih faktora (180, 185, 199). U ovoj studiji, ERK i JNK su stimulisali transkripciju p62, koji prepoznaje supstrate za autofagiju razgradnju, ATG7 koji je neophodan za lipidaciju LC3, kao i BIF-1 i VPS34 koji ulaze u sastav PI3KC3-C1 kompleksa (93, 102, 115). U ovom kompleksu, BIF-1 interaguje sa beclinom-1 i tako stimuliše PI3KC3-C1 koji učestvuje u nukleaciji autofagozoma (115). ERK i JNK su takođe povećali transkripciju gena za *FIP200*, člana ULK kompleksa neophodnog za inicijaciju autofagije (103). Međutim, samo JNK je stimulisala transkripciju ULK-1. ULK-1 je regulisan od strane AMPK i mTORC1. AMPK fosforiliše i aktivira ULK1 na serinskim ostacima 555, 317 i 777, dok inhibicija mTORC1 poništava fosforilaciju na serinu 757 na ULK1 zbog čega dolazi do njegove aktivacije (121, 128). Kako dobijeni rezultati ukazuju na autofagiju nezavisnu od AMPK i mTORC1, značaj ULK kompleksa u ovom modelu diferencijacije ostaje da se istraži. Treba istaći da su Martens i saradnici pokazali da se u selektivnoj autofagiji p62 vezuje za FIP200 i tako usmerava ULK1 kompleks na citoplazmatski sadržaj koji treba da se razgradi (99). Kako je nivo p62 povećan u tretmanu HL-60 ćelija sa PMA, ostaje da se ispita uloga ULK1 u ovom procesu.

ERK i JNK aktiviraju transkripciju gena koji kodiraju transkripcione faktore autofagije kao što su *TFEB*, *FOXO1* i *FOXO3*. Pored toga, oni utiču i na njihovu lokalizaciju u ćeliji, što za posledicu ima promenu aktivnosti ovih transkripcionih faktora. JNK aktivirana sa PMA povećava transkripciju gena za *TFEB* i indukuje njegovo premeštanje u jedro (Slika 33 i 35). O uticaju JNK na transport TFEB u jedro se malo zna. Liu i saradnici su pokazali da JNK dovodi do odvajanja TFEB od 14-3-3 δ , sa kojim je u inhibitornoj interakciji u citosolu, što bi mogao da bude mehanizam za njegov ulazak u jedro u ovom modelu diferencijacije (Slika 33) (242). Poznato je da Akt fosforiliše TFEB na poziciji serin 467, kao i da mTORC1 fosforiliše TFEB na pozicijama serin 142 i 211, što zadržava TFEB u citosolu i suprimira autofagiju (270, 271). Kako tretman sa PMA aktivira Akt/mTORC1 signalni put, TFEB očigledno uspeva da prevaziđe inhibitorne uticaje ovog signalnog puta i transportuje se u jedro. Zanimljivo je da JNK može da inhibira Akt/mTORC1 signalni put, iako to u ovom modelu diferencijacije nije slučaj. Pokazano je da u hondrocitima fibroblastni faktor rasta aktivacijom JNK dovodi do degradacije IRS-1, čime se suprimira Akt/mTORC1 i promovise odlazak TFEB u jedro (272).

U ovoj studiji, ERK nije povećao transkripciju gena za *TFEB*, ali je uticao na njegovu translokaciju u jedro (Slika 33 i 35). Ovaj rezultat je u suprotnosti sa studijama u kojima je pokazano da ERK2 fosforiliše TFEB na poziciji serin 142 i tako sprečava njegov transport u jedro (131). Objašnjenje je bilo potrebno pronaći u signalnim putevima koji su zavisni od PKC. Aktivacija PKC od strane PMA je praćena fosforilacijom njegovog nizvodnog supstrata GSK3 β na poziciji serin 9, što dovodi do inaktivacije GSK3 β . GSK3 β fosforiliše TFEB na pozicijama serin 134 i 138 i na taj način ga zadržava u citoplazmi (137). Ovaj efekat je potvrđen korišćenjem inhibitora GSK3 β koji indukuju transport TFEB u jedro (137). Kako je PKC stimulacijom sa PMA inaktivirala GSK3 β , poništila se inhibitorna fosforilacija od strane GSK3 β na TFEB što je za posledicu imalo transport TFEB u jedro (Slika 33). Studije su pokazale da ERK indirektno učestvuje u inaktivaciji GSK3 β tako što aktivira p90RSK (Slika 33) (273). Kada je ERK stimulisan, on se vezuje za GSK3 β i fosforiliše ga na poziciji treonina 43 što olakšava vezivanje p90RSK za GSK3 β . Nakon toga, p90RSK inaktivira GSK3 β na poziciji serin 9, što je takođe mesto inaktivacije od strane PKC (273). Na ovaj način je TFEB oslobođen inhibicije od strane GSK3 β (Slika 33). Rezultati ove disertacije su pokazali da se inhibicijom ERK smanjuje fosforilacija GSK3 β , čime bi

mogla da se objasni uloga ERK u nuklearnoj lokalizaciji TFEB tokom diferencijacije sa PMA. Treba istaći da je ovaj rezultat u skladu sa prethodnom studijom u kojoj je pokazano da ERK može da aktivira PKC pozitivnom povratnom spregom. ERK fosforiliše citosolnu formu fosfolipaze A2 koja potom oslobađa arahidonsku kiselinu koja pojačava aktivaciju PKC od strane PMA (274). Interesantno bi bilo ispitati da li u diferencijaciji HL-60 ćelija pod dejstvom PMA ERK pojačava aktivnost PKC tako što aktivira fosfolipazu A2.



Slika 33. Predloženi mehanizam premeštanja TFEB u jedro HL-60 ćelija pod dejstvom PMA. Izrada slike korišćenjem www.biorender.com.

Opisana aktivacija TFEB od strane ERK se takođe slaže sa studijom u kojoj je pokazano da onkogeni H-RAS indukuje povećanje nivoa TFEB u jedru i tako stimuliše ekspresiju lizozomskih gena. Iako fosforilacija ERK nije direktno izmerena, korišćenjem različitih mutiranih formi H-RAS koji su defektni u nizvodnoj aktivaciji ERK signalnog puta dobijeno je da je nivo TFEB u jedru smanjen (275). Sa druge strane, ovi rezultati nisu u skladu sa podacima u kojima ERK smanjuje ekspresiju TFEB pod dejstvom TGFβ na mišije makrofage zbog čega oni postaju tip M2 makrofaga koji promovira rast tumora (276). Podaci iz literature govore da aktivacija PKC ne utiče direktno na lokalizaciju TFEB u ćeliji, već povećava njegovu stabilnost u citoplazmi i nukleusu. Specifična izoforma PKCβ u osteoklastima fosforiliše TFEB na serinu 461, 462, 466 i 468 čime povećava njegovu stabilnost i aktivnost (139). Pošto je u ranijim istraživanjima ustanovljeno da PMA u

diferencijaciji HL-60 ćelija aktivira ovu izoformu PKC može se pretpostaviti da i ona utiče na stabilnost TFEB (194). Kako do sada nije poznato da PKC može direktno da utiče na transport TFEB u jedru, pretpostavka je da ona u kooperaciji sa nishodnim kinazama, kroz inaktivaciju GSK3 β i aktivaciju ERK i JNK, pomenutim mehanizmima omogućava transport TFEB u jedro. Još jedna kinaza koja može da utiče na lokalizaciju TFEB u jedru je AMPK. Aktivacija AMPK nezavisno od mTORC1 dovodi do defosforilacije TFEB koji se premešta u jedro i aktivira (277). Sa druge strane, AMPK može direktnom fosforilacijom da aktivira transkripcionu aktivnost TFEB (278). Koliko je značajna uloga AMPK govori podatak da ćelije u kojima je AMPK inaktiviran imaju smanjenu ekspresiju gena za TFEB (279). Međutim, rezultati ove studije su pokazali da PMA inaktivira AMPK, tako da inhibicija AMPK nije imala uticaja na translokaciju TFEB u jedro, te se može pretpostaviti da je lokalizacija TFEB u jedru tokom diferencijacije indukovane sa PMA nezavisna od ove kinaze.

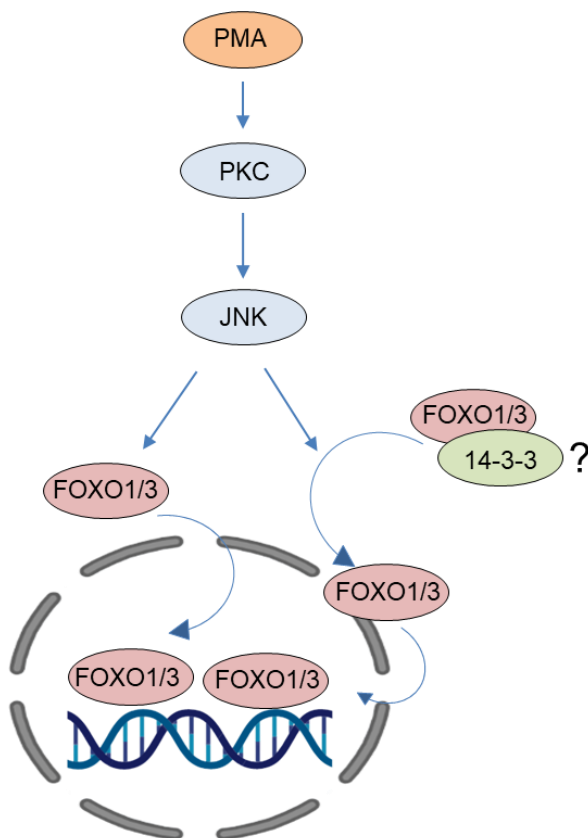
Premeštanje TFEB u jedro se dešava istovremeno sa transportom autofagnog represora ZKSCAN3 iz jedra u citoplazmu, čime se autofagni geni oslobodaju inhibicije (137). Smatra se da više od 60 gena koji kodiraju za autofagne i lizosomalne proteine bivaju suprimirani od strane ZKSCAN3 (140). Poznato je da PKC istovremeno reguliše lokalizaciju aktivatora i represora autofagije, nezavisno od mTORC1, što omogućava da se obavi neometana transkripcija autofagnih gena (137). Sa jedne strane, PKC inaktivacijom GSK3 β indukuje lokalizaciju TFEB u jedro. Sa druge strane, JNK i p38 aktivirani od strane PKC δ , inaktiviraju ZKSCAN3 tako što ga premeštaju iz jedra u citoplazmu (137). Rezultati ove studije su pokazali da PMA stimuliše PKC, koja zatim indukuje translokaciju ZKSCAN3 u citoplazmu (Slika 35). Kako je aktivnost p38 suprimirana kada je autofagija već započeta, uticaj p38 na lokalizaciju ZKSCAN3 nije ispitan. Međutim, iako PMA aktivira JNK, njenom inhibicijom nije dobijena promena u lokalizaciji ZKSCAN3. Na osnovu ovoga se može zaključiti da su neki drugi mehanizmi zavisni od PKC odgovorni za premeštanje represora autofagije iz jedra u citoplazmu. Inhibicija ERK takođe nije uticala na lokalizaciju ZKSCAN3, što je u skladu sa podacima da konstitutivno aktivna forma ERK nije uticala na citoplazmatsku lokalizaciju ZKSCAN3 u tretmanu BRAF mutiranih ćelija melanoma inhibitorom BRAF mutacije (280).

Pored uloge TFEB u diferencijaciji pod dejstvom PMA, pokazano je da je TFEB neophodan u indukciji autofagije i diferencijaciji ćelija promijelocitne leukemije sa ATRA (156). U ovom modelu diferencijacije, inhibicija TFEB je smanjila autofagni fluks i transkripciju gena uključenih u granulocitnoj diferencijaciji. Kod AML sa mutacijom MYC gena je pokazano da rast i proliferaciju ćelija aktivira onkoprotein MYC tako što smanjuje ekspresiju i funkciju TFEB i tako suprimira autofagiju (281). U toj studiji grupa istraživača je dizajnirala TFEB sa mutacijom koja sprečava inhibiciju od strane mTORC1, što za posledicu ima njegovu prekomernu aktivaciju u jedru. Aktivirani TFEB je indukovao monocitnu i granulocitnu diferencijaciju ćelija AML, što je pokazano izmenjenom morfologijom ćelija, njihovom adhezijom za ploču, povećanom ekspresijom makrofagnog markera CD11b i granulocitnog markera CD15 (281).

Pored aktivacije TFEB, JNK utiče i na aktivaciju FOXO1 i FOXO3 transkripcionih faktora. Poznato je da JNK fosforiliše FOXO3 na poziciji serin 573 i tako omogućava njegov transport u jedro i povećanu transkripcionu aktivnost (204). JNK aktivira FOXO1 i FOXO3 indirektno tako što utiče na disocijaciju FOXO od 14-3-3 adapterskih proteina (144). Ovi proteini predstavljaju familiju adapterskih proteina koji se vezuju za fosforilisane serinske ili treoninske ostatke kinaza, fosfataza, transkripcionih faktora i drugih proteina (282). Oni inhibiraju aktivnost FOXO i TFEB transkripcionih faktora tako što maskiraju NLS (engl. *nuclear localization sequence*) sekvencu za lokalizaciju u jedro i tako ih zadržavaju inaktivirane u citoplazmi (283, 284). Kada je aktivirana apoptoza, JNK fosforiliše 14-3-3 što omogućava da se FOXO3 odvoji od 14-3-3 i lokalizuje u jedru (205). Dodatno, pokazano je da oksidativni stres aktivira JNK, koja zatim dovodi do disocijacije FOXO1 od 14-3-3 i povećava transkripciju FOXO1 (206). JNK može da promoviše acetilaciju FOXO1 i tako ga aktivira (285). Rezultati ove disertacije su pokazali da JNK povećava

transkripciju gena za *FOXO1* i *FOXO3* i stimuliše njihovu lokalizaciju u jedru, što je u skladu sa navedenim studijama. Najverovatnije je da ovim prethodno opisanim mehanizmima JNK aktivira transport FOXO1 i FOXO3 u jedro i u diferencijaciji HL-60 ćelija pod dejstvom PMA (Slika 34 i 35).

Sa druge strane, Akt inaktivira FOXO transkripcione faktore. Pod uticajem faktora rasta dolazi do aktivacije Akt, koji fosforiliše FOXO i sprečava njihovo vezivanje za DNK (144). Ovako fosforilisan FOXO prepoznaju i vezuju jedarni 14-3-3 adapterski proteini, nakon čega se kompleks transportuje iz jedra u citoplazmu, gde FOXO ostaje inaktiviran (144). Takođe, postoje podaci i da JNK može inhibicijom PI3K/Akt signalnog puta da aktivira FOXO (286). Rezultati ove studije su pokazali da JNK premešta FOXO1 i FOXO3 u jedro nezavisno od stimulacije Akt koji ima negativni uticaj na FOXO. Kako su Akt i JNK aktivirani istovremeno sa PMA, verovatno je da aktivacija od strane JNK nadvladava efekte Akt. Ovo je u skladu sa studijama u kojima JNK pod uticajem oksidativnog stresa fosforiliše FOXO4, što uzrokuje njegovu translokaciju u jedro čak i u prisustvu aktivacije PI3K/Akt signalnog puta (287).

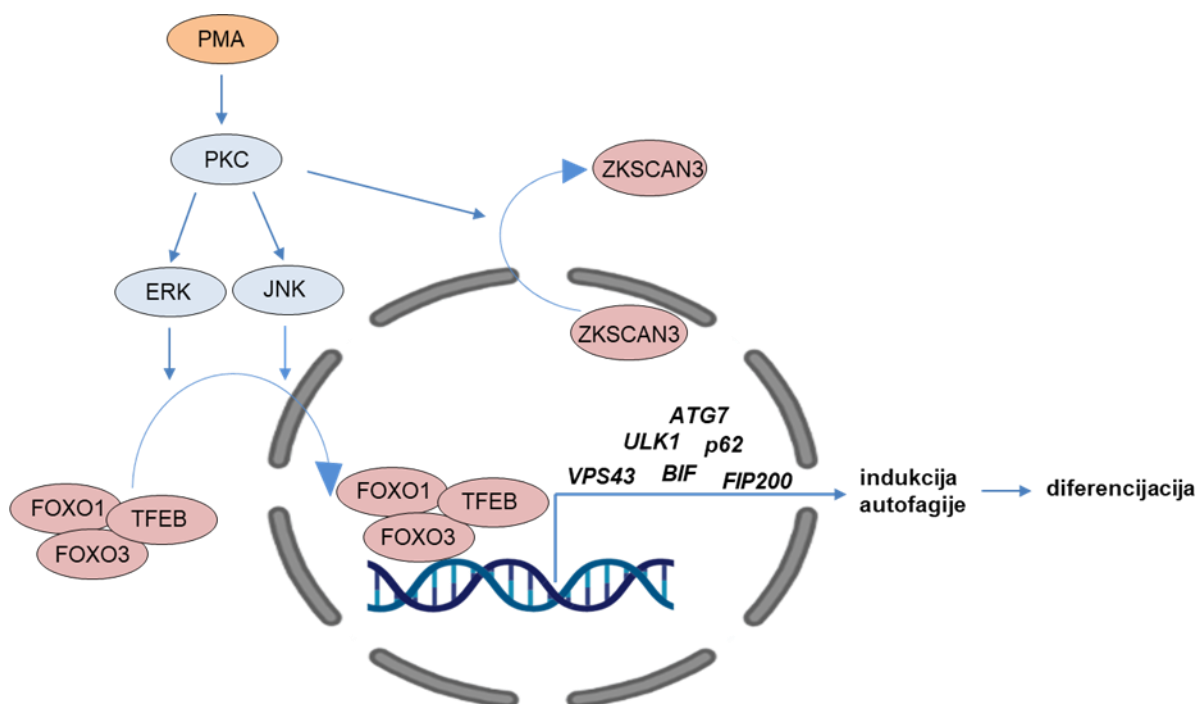


Slika 34. Predloženi mehanizam premeštanja FOXO1/3 u jedro HL-60 ćelija pod dejstvom PMA. Izrada slike korišćenjem www.biorender.com.

Još jedna kinaza koja učestvuje u aktivaciji FOXO1 i FOXO3 je AMPK. AMPK fosforiliše FOXO1 i promoviše njegovu jedarnu lokalizaciju, stabilnost i transkripcionu aktivnost (288). Takođe, AMPK fosforiliše FOXO3 na nekoliko mesta koja se razlikuju od mesta fosforilacije Akt, što povećava transkripcionu aktivnost FOXO3, ali bez uticaja na transport iz citoplazme u jedro (289). Ustanovljeno je i da AMPK može da poveća ekspresiju FOXO1 i FOXO3 (290, 291). S

obzirom na to da rezultati ove disertacije pokazuju da PMA inhibira AMPK signalni put nakon 16 h kada su FOXO1 i FOXO3 već zauzeli poziciju u jedru, najverovatnije je da inhibicija ove kinaze nema uticaja na njihovu jedarnu lokalizaciju u diferencijaciji indukovanoj sa PMA.

Poznato je da ERK suprimira aktivnost FOXO3. FOXO3 se nakon fosforilacije od strane ERK premešta iz jedra u citoplazmu, gde ga prepoznaje ubikvitin ligaza MDM2 (engl. *murine double minute-2*), nakon čega se razgrađuje u proteozomu (243). S obzirom da FOXO3 indukuje ekspresiju gena za apoptozu, njegova degradacija promoviše tumorogenezu (243). Takođe je pokazano i da ERK stimuliše degradaciju FOXO1 (244). Sa druge strane, fosforilacija FOXO1 od strane ERK omogućava aktivaciju FOXO1 i interakciju sa drugim transkripcionim faktorima (292). Rezultati ove studije su pokazali da inhibicija ERK u diferencijaciji HL-60 ćelija sa PMA nije uticala na promenu u lokalizaciji FOXO1 i FOXO3. Takođe, ERK nije povećao transkripciju gena za *FOXO3*, ali je uticao na povećanje transkripcije gena za *FOXO1*.



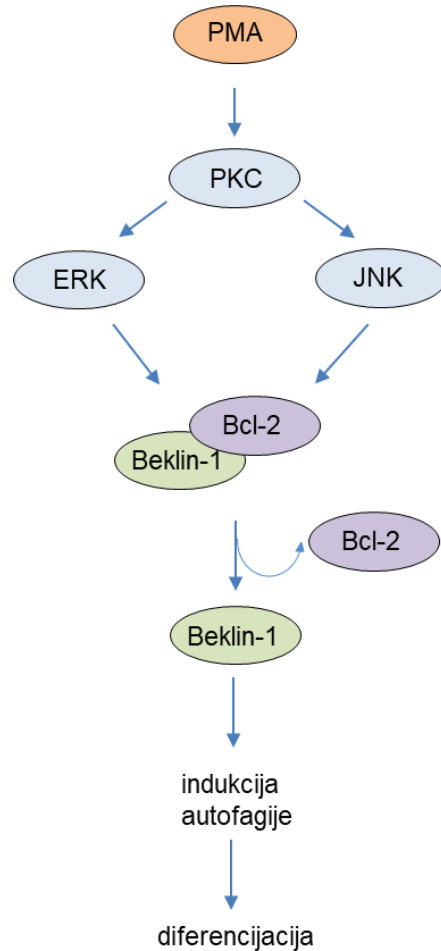
Slika 35. Indukcija autofagije i posledične diferencijacije u HL-60 leukemijskim ćelijama tretiranim sa PMA zavisi od dejstva ERK i JNK na transkripciju autofagnih gena pod uticajem TFEB, FOXO1 i FOXO3. Izrada slike korišćenjem www.biorender.com.

Pored uloge FOXO3 u ovom modelu diferencijacije, ustanovljeno je da je FOXO3 neophodan u granulocitnoj diferencijaciji ćelija promijelocitne leukemije sa ATRA (293). Kod ove vrste leukemije, onkoprotein PML-RAR dovodi do narušavanja funkcije PML proteina koji aktivira Akt i posledično inaktivira FOXO3 (293). Nakon tretmana sa ATRA dolazi do inhibicije Akt i posledične aktivacije FOXO3. Takođe, pokazano je da FOXO3 učestvuje u eritroidnoj diferencijaciji K562 ćelija hronične mijeloidne leukemije (294). Sa druge strane, neke studije ukazuju da aktivacija FOXO3 u različitim ćelijskim linijama i primarnim ćelijama AML dovodi do zastoja u diferencijaciji (295). Takođe, pokazano je da ekspresija FOXO1 kod leukemijskih ćelija sa RUNX1-ETO fuzionim onkoproteinom dovodi do inhibicije diferencijacije hematopoetskih stem ćelija (296). Ortolozi FOXO i TFEB transkripcionih faktora Daf16 i HLH30 kod *C. elegans*

međusobno interaguju i tako zajedno aktiviraju ekspresiju gena koji učestvuju u odbrani od oksidativnog stresa i promoviraju dugovečnost *C. elegans* (297). Na humanim HEK293 ćelijama je takođe pokazana interakcija između FOXO1 i TFEB, dok TFEB i FOXO3 ne interaguju (297). U ovoj studiji, PMA je indukovao translokaciju oba transkripciona faktora u jedro pod dejstvom ERK i JNK, čime se aktivirala ekspresija *ATG* gena. Zanimljivo bi bilo ispitati da li PMA indukuje formiranje kompleksa TFEB sa FOXO, na koji način ERK i JNK učestvuju u tome, kao i značaj njihove interakcije u indukciji autofagije i diferencijacije.

Transkripcioni faktor EGR1, pored toga što je neophodan u makrofagnoj diferencijaciji HL-60 ćelija pod dejstvom PMA, reguliše i ekspresiju autofagnih gena (178, 298). Ovaj transkripcioni faktor pripada grupi gena ranog odgovora jer se eksprimira nekoliko minuta nakon stimulacije ćelija (299). EGR1 može biti aktiviran mitogenima, faktorima rasta, hipoksijom i gladovanjem (298). Pokazano je da u uslovima gladovanja EGR1 povećava transkripciju različitih autofagnih gena među kojima su *ULK-1*, *FIP200*, *VPS34*, *ATG7* i *p62*, za koje je ovde pokazano se aktiviraju pod uticajem PMA (298). Takođe je poznato da ekspresija EGR1 može biti aktivirana od strane ERK i JNK (300). U ovoj disertaciji je pokazana transkripciona aktivacija EGR1 zavisna od ERK. Takođe, inhibicija ERK smanjuje ekspresiju autofagnih gena za koje je poznato da mogu biti aktivirani od strane EGR1. Može se pretpostaviti da u diferencijaciji HL-60 ćelija pod dejstvom PMA ovaj transkripcioni faktor stimulacijom ERK signalnog puta učestvuje u transkripcionoj aktivaciji autofagnih gena. Međutim, postoje podaci da EGR1 može i da suprimira autofagiju tako što sprečava formiranje kompleksa ATG12–ATG5 sa ATG16L1 ili aktivira mikroRNK koja inhibira ekspresiju ATG14 (301, 302).

Pored transkripcione aktivacije autofagije, PMA indukuje autofagiju na posttranslacionom nivou tako što dovodi do oslobađanja beklina-1 iz inhibitorne interakcije sa Bcl-2 (245). Oslobođeni beklina-1 interaguje sa VPS34 u okviru PI3KC3-C1 kompleksa i tako dovodi do inicijacije autofagije (303). Poznato je da JNK dovodi do razdvajanja beklina-1 od Bcl-2 (207, 304). Prilikom gladovanja kao i u tretmanu ćelija sfingolipidom ceramidom, JNK1 fosforiliše Bcl-2 na pozicijama treonin 69, serin 70 i serin 87, oslobađajući beklina-1 od ove inhibitorne interakcije (207, 304). Rezultati ovog rada su pokazali da je disocijacija beklina-1 od Bcl-2 zavisna od ERK i JNK (Slika 36). Inhibicijom JNK se smanjuje fosforilacija Bcl-2 na serinu 70 i beklina-1 ostaje vezan za Bcl-2. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim studijama. Indukcija autofagije aktivacijom JNK/Bcl-2/beklina-1 učestvuje u diferencijaciji monocita u makrofage pod dejstvom GM-CSF (209). Iako uloga JNK i autofagije u preživljavanju makrofaga nije ispitivana na modelu diferencijacije leukemijskih ćelija pod uticajem PMA, JNK i autofagija u diferencijaciji sa GM-CSF smanjuju aktivnost kaspaze 3, čime podstiču preživljavanje makrofaga (209). U drugoj studiji je pokazano da je kompleks beklina-1 sa VPS34 neophodan u indukciji autofagije koja učestvuje u diferencijaciji HL-60 ćelija vitaminom D3 (162). Zanimljivo je da je u ovoj studiji pokazano istovremeno formiranje kompleksa Bcl-XL i beklina-1 koji ne inhibira autofagiju vezivanjem beklina-1 već apoptozu, jer sprečava formiranje apoptotskog kompleksa Bcl-XL i Bad (162). Na taj način preživljavaju makrofagi dobijeni diferencijacijom leukemijskih ćelija vitaminom D3. Pored uloge u različitim modelima diferencijacije, JNK aktivirana od strane PKC δ u uslovima akutne hipoksije, stimuliše citoprotektivnu autofagiju fosforilacijom Bcl-2, što dovodi do disocijacije beklina-1 od Bcl-2 (267).



Slika 36. Indukcija autofagije učestvuje u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija pod dejstvom PMA disocijacijom beklina-1 iz kompleksa sa Bcl-2 pod uticajem ERK i JNK.

Antiapoptotski članovi Bcl-2 familije (Bcl-2, Bcl-XL) se pomoću BH3 domena vezuju za apoptotske članove (Bax, Bim), čime inhibiraju apoptozu, ili za proautofagni član beklin-1, što dovodi do inhibicije autofagne indukcije (245, 305, 306). Zbog toga su razvijeni BH3 mimetici, molekuli koji su po strukturi slični BH3 domenu antiapoptotskih proteina i vezuju se za njihov hidrofobni džep (307). Posledica toga je oslobađanje proapoptotskih ili proautofagnih molekula koji učestvuju u aktivaciji apoptoze i/ili autofagije (308). Venetoklaks je prvi klinički odobren inhibitor Bcl-2 za lečenje hronične limfocitne leukemije koji deluje tako što raskida interakcije Bcl-2 sa proteinima (309). On pripada drugoj generaciji inhibitora Bcl-2 familije koja je selektivnija za Bcl-2 nego za Bcl-XL i manje toksična od prvobitno otkrivenih (309). Ovaj molekul je u kombinaciji sa drugim lekovima odobren za lečenje AML kod starijih pacijenata koji ne ispunjavaju uslove za intenzivnu hemioterapiju (310). Pored indukcije apoptoze, za ovaj inhibitor je pokazano da može da aktivira ERK, JNK i indukuje autofagiju disocijacijom beklina-1 od Bcl-2 u ćelijama limfoma (311, 312). Zanimljivo bi bilo ispitati na koji način bi ovaj inhibitor delovao na diferencijaciju leukemijskih ćelija sa PMA.

Smatra se da JNK/Bcl-2/beklin-1 i mTORC1 signalni putevi nezavisno regulišu autofagiju (313). Pokazano je da rapamicin, inhibitor mTORC1, nije imao uticaja na fosforilaciju JNK i Bcl-2. Takođe, njihova fosforilacija se nije promenila ni u ćelijama u kojima je TSC2 isključen, odnosno mTORC1 aktiviran (314). Sa druge strane, konstitutivno aktiviran JNK nije uticao na aktivnosti mTORC1 (314). U skladu sa ovim podacima, rezultati ove teze su pokazali da je indukcija

autofagije aktivacijom JNK/Bcl-2/beklin-1 signalnog puta nezavisna od aktivacije mTORC1. Poznato je da ERK fosforilacijom Bcl-2 može da dovede do disocijacije beklina-1 od Bcl-2. Iako mehanizam još uvek nije razjašnjen, pokazano je da HMGB1 učestvuje u aktivaciji ERK, koji potom fosforiliše Bcl-2 (188). Međutim u diferencijaciji HL-60 ćelija pod dejstvom PMA, inhibicija ERK nije uticala na promenu u fosforilaciji Bcl-2 i ERK je slabije uticao na interakciju beklina-1 i Bcl-2 od JNK.

Kada se uporedi efekat ERK i JNK na indukciju autofagije u ovom modelu diferencijacije, može se zaključiti da JNK ima vodeću ulogu u aktivaciji autofagije. Ovaj efekat se može uočiti i na nivou aktivacije transkripcionih faktora. JNK je indukovao translokaciju TFEB i FOXO1/3 faktora u jedro, dok je ERK aktivirao samo TFEB. U skladu sa tim, rezultati su pokazali i da je transkripcija *ATG* gena indukovana sa PMA pod većim uticajem JNK nego ERK. S obzirom da rezultati pokazuju da inhibicija ERK smanjuje konverziju LC3 sličnim intenzitetom kao i inhibicija JNK, najverovatnije je da ERK učestvuje u indukciji autofagije sa PMA nekim drugim mehanizmima koji ne zavise od transkripcije *ATG* gena i interakcija beklina-1 sa Bcl-2. Pokazano je da se ERK2 pomoću domena za prepoznavaње supstrata vezuje za ATG5–ATG12, LC3-II i WIPI1 (315). Na ovaj način ERK2 se lokalizuje na citoplazmatskoj strani (pre)autofagozomalne membrane čime se omogućava efikasna prostorna koordinacija i aktivacija Raf/MEK/ERK signalnog puta u odgovoru na faktore rasta. Zanimljivo bi bilo ispitati na koji način interakcija ERK sa ovim autofagnim molekulima utiče na indukciju autofagije u diferencijaciji HL-60 ćelija pod dejstvom PMA.

U ovoj studiji je pokazano da inhibicija ERK i JNK smanjuje makrofagnu diferencijaciju HL-60 ćelija indukovanu sa PMA. Ovaj rezultat je u skladu sa podacima da je ERK neophodan u diferencijaciji različitih leukemijskih ćelija (HL-60, K562, U937, TF-1a) pod dejstvom PMA (177, 248). Takođe, ERK učestvuje u diferencijaciji leukemijskih ćelija pod uticajem različitih agenasa u granulocite i megakariocite (175, 176). Dasatinib, inhibitor BCR/ABL fuzionog proteina i Src kinaza, indukuje diferencijaciju HL-60 ćelija koja zavisi od ERK (316). Alkaloid sekurinin indukuje monocitnu diferencijaciju HL-60 ćelija zavisnu od ERK i JNK (317). U monocitnoj diferencijaciji leukemijskih ćelija vitaminom D3 takođe je neophodna aktivacija ERK (318). U kombinaciji vitamina D3 i antioksidanasa, JNK dovodi do povećanja ekspresije aktivatora makrofagne diferencijacije EGR1 (319). Poznato je da JNK učestvuje u mijeloidnoj diferencijaciji leukemijskih ćelija sa PMA posredstvom transkripcionog faktora C-JUN (195). Takođe, C-JUN predstavlja kofaktor transkripcionog faktora PU.1 koji aktivira ekspresiju gena koji kontrolišu mijeloidnu diferencijaciju (195). Rezultati ovih istraživanja ukazuju da su ERK i JNK značajni u indukciji diferencijacije leukemijskih ćelija pod dejstvom PMA, a ova studija je pokazala da njihova uloga u diferencijaciji zavisi od aktivacije autofagije.

Pored važne uloge ERK i JNK u aktivaciji autofagije i diferencijacije HL-60 ćelija sa PMA, treba istaći da bi reaktivne kiseonične vrste takođe mogle da doprinesu aktivaciji ovih procesa. Pokazano je da askorbinska kiselina inhibira diferencijaciju HL-60 ćelija sa PMA tako što suprimira aktivnost ERK (247). Takođe, u diferencijaciji leukemijskih ćelija sa PMA, RKV aktivacijom JNK/c-JUN signalnog puta indukuju transkripciju gena koji aktiviraju mijeloidnu diferencijaciju (195). Navedene studije su u skladu sa rezultatima ovog istraživanja, koje je pokazalo da su RKV uključene u aktivaciju ERK, a delimično u aktivaciju JNK i diferencijaciju HL-60 ćelija sa PMA. Poznato je i da RKV mogu da aktiviraju autofagiju (246). U ovom modelu diferencijacije je pokazano da RKV stimulišu konverziju LC3, ali ne utiču na promenu u nivou p62. Ovaj rezultat je u skladu sa studijama koje su pokazale da RKV indukuju autofagiju aktivacijom ERK i JNK (320, 321). S obzirom na relativno ograničenu ulogu ERK i JNK u indukciju autofagije i diferencijacije, treba napomenuti da bi RKV mogle i nezavisno od MAPK da učestvuju u indukciji ovih procesa. Vezu između RKV i ERK/JNK u ovom modelu diferencijacije je neophodno dalje ispitati.

Pored uloge ERK i JNK u diferencijaciji leukemijskih ćelija, poznato je da ERK i JNK učestvuju u makrofagnoj diferencijaciji mijeloidnih prekursora koštane srži. Hematopoetski faktor rasta CSF-1 je neophodan za rast, preživljavanje i diferencijaciju makrofaga (224). Kada se veže za

receptor CSF1R aktivira ERK i JNK signalne puteve koji učestvuju u razvoju makrofaga (322, 323). Diferencijacija mišjih mijeloidnih prekursora koji imaju isključen *ERK* gen uzrokuje smanjenu produkciju makrofaga pod dejstvom CSF1 (322). Takođe, isključivanje gena za *ERK1* i *ERK2* kod miševa dovodi do njihove prerane smrti usled anemije i leukopenije zbog gubitka hematopoetskih stem ćelija i progenitora (324). Pokazano je da ERK učestvuje u diferencijaciji hematopoetskih stem ćelija pod uticajem GM-CSF (325). U jednoj studiji, inhibicija ERK je smanjila vezivanje mijeloidnih transkripcionih faktora za DNK i tako suprimirala monocitnu diferencijaciju indukovanu sa IL-6 (326). Zajedno sa ERK, JNK učestvuje u rastu, proliferaciji, diferencijaciji i preživljavanju makrofaga u odgovoru na CSF-1 (323). JNK aktivira PU.1 i ETS-2 transkripcione faktore koji su važni za razvoj i funkciju monocita i makrofaga. PU.1 je transkripcioni faktor koji učestvuje u ekspresiji makrofagnih gena, među kojima je *CSF1R* (327). Inhibicija JNK kod makofaga stimuliranih sa CSF-1 sprečava ekspresiju i vezivanje PU.1 za promotor *CSF1R* gena. Najverovatnije je da ovim mehanizmom JNK utiče na diferencijaciju ćelija koštane srži miša u makrofage (323). JNK1 takođe interaguje sa transkripcionim faktorom C/EBP α koji reguliše makrofagnu diferencijaciju (328, 329). Na taj način JNK1 sprečava degradaciju ovog transkripcionog faktora i povećava njegovu transkripcionu aktivnost (328).

Studije takođe pokazuju da ERK i JNK imaju ulogu u proliferaciji i preživljavanju ćelija AML. ERK signalni put je prekomereno aktiviran usled mutacija u tirozin-kinaznim receptorima c-KIT i FLT3, kao i GTP-azama NRAS i KRAS koji se nalaze uzvodno od ERK (330-332). Ovaj signalni put učestvuje u proliferaciji različitih ćelijskih linija AML uključujući i HL-60 ćelijsku liniju (333). Kod više od 70% pacijenata je aktiviran ERK signalni put (334). Pokazano je da inhibicija ovog signalnog puta u kombinaciji sa različitim antileukemijskim agensima (paklitaksel, inhibitor BCL-2, radijacija i dr.) povećava indukciju apoptoze (177). Poznato je da ERK fosforiliše hematopoetski transkripcioni faktor AML1 koji dobija novu funkciju tako što učestvuje u malignoj transformaciji ćelija (335). Uloga JNK u proliferaciji je pokazana njenom farmakološkom inhibicijom koja dovodi do zastoja ćelijskog ciklusa i indukcije apoptoze u različitim leukemijskim ćelijskim linijama (336). Ova kinaza takođe aktivira ekspresiju gena koji učestvuju u rezistenciji ćelija na dejstvo hemioterapeutika (337). U toj studiji je pokazana povezanost između konstitutivne ekspresije JNK leukemijskih ćelija pacijenata i slabog odgovora na terapiju (337). Poznato je da inhibicija JNK pospešuje dejstvo hemioterapeutika *in vitro* kod leukemije sa mutiranom FLT3 kinazom (338). Takođe, onkoprotein AML1-ETO stimulacijom JNK aktivira C-JUN koji učestvuje u malignoj transformaciji ćelija (339). Pored poznate uloge u aktivaciji apoptoze, JNK može kod nekih tipova AML da inhibira apoptozu (340).

Moguće je da ERK i JNK promovišu hematopoetsku diferencijaciju mijeloidnih ćelija, ali da tu ulogu ne mogu da ostvare u ćelijama AML, u kojima je diferencijacija u zastoju. Umesto toga, ERK i JNK pokreću njihov rast i preživljavanje. Ovo je u skladu sa studijom u kojoj tretman primarnih ćelija AML sa PMA dovodi do prolazne aktivacije ERK koja smanjuje ili dugotrajne aktivacije ERK koja povećava preživljavanje ćelija (341). U toj studiji, PMA je indukovala diferencijaciju AML ćelija, ali autori nisu povezali sposobnost indukcije diferencijacije sa aktivacijom ERK (341). Takođe, pokazano je da RUNX1-ETO fuzioni onkoprotein sprečava diferencijaciju ćelija AML koju aktivira ERK (342). Uloga ERK u indukciji diferencijacije je onemogućena od strane fuzionog onkoproteina. Ova pojava se može objasniti time što RUNX1-ETO suprimira ekspresiju gena koji promovišu diferencijaciju i tako maskira efekte ERK (342). S obzirom da ERK ne može da aktivira diferencijaciju, u ovoj studiji je istovremeno pokazano da ERK promoviše proliferaciju ćelija aktivacijom ćelijskog ciklusa i inhibicijom apoptoze (342). Pokazano je i da mutirana FLT3-ITD kinaza aktivira ERK koji sa jedne strane promoviše proliferaciju, a sa druge strane inaktivira transkripcioni faktor C/EBP α čime je sprečena diferencijacija (343, 344).

Slično kao ERK i JNK, autofagija može da promoviše proliferaciju ili diferencijaciju ćelija AML. Studije ukazuju da smanjena autofagna aktivnost doprinosi razvoju akutne mijeloidne

leukemije (150, 151). Pokazano je da se ključni autofagni geni (*LC3*, *GABARAP*, *ATG10* i *ATG12*) često nalaze u okviru hromozomskih regiona koji podležu heterozigotnim delecijama kod AML (151). Heterozigotna delecija *ATG5* kod ćelija sa ekspresijom onkoproteina MLL-ENL (engl. *mixed lineage leukemia-eleven nineteen leukemia*) povećava njihovu proliferaciju (151). Sa druge strane, mutirana kinaza FLT3-ITD stimuliše autofagiju koja povećava preživljavanje ćelija (345). Pojačana autofagna aktivnost je pokazana i kod leukemijskih ćelija sa mutacijom u NPM1 šaperonu (346). Dakle, i povećan i smanjen intenzitet autofagije mogu da doprinesu progresiji leukemije. Indukcija autofagije je važna u degradaciji različitih onkoproteina koji sprečavaju diferencijaciju kao što su PML-RAR, FLT3-ITD, mutirani p53 i KMT2A (engl. *lysine methyltransferase 2A*) (153, 157, 345). Stimulacija autofagije kod ovih tipova AML bi omogućila nov pristup u lečenju ove bolesti. Autofagija je ključna i u diferencijaciji leukemijskih ćelija sa agensima kao što su ATRA i vitamin D3 (153, 162).

Na osnovu svega navedenog i imajući u vidu da je AML heterogena bolest, ERK, JNK i autofagija mogu da imaju protumorsko ili tumor-supresorsko dejstvo, u zavisnosti od tipa AML. Rezultati ove teze pokazuju da ERK, JNK i autofagija zajedno promovišu makrofagnu diferencijaciju HL-60 ćelija pod dejstvom PMA (Slika 35 i 36). Zadatak narednih studija je da se ispita uloga interakcije MAP kinaza i autofagije u PMA tretmanu primarnih ćelija AML kao i *in vivo*. PMA je prošla fazu 1 kliničkih studija ispitivanjem na pacijentima sa mijeloidnom leukemijom rezistentnom na hemioterapeutike (83). Pokazano je da PMA indukuje *ex vivo* diferencijaciju leukemijskih ćelija izolovanih iz pacijenata sa AML (83). Takođe, nakon primene PMA u trajanju od 24 h leukemijske ćelije pacijenata su pokazale povećanu ekspresiju gena koji učestvuju u adheziji i diferencijaciji među kojima je c-JUN, čiju transkripciju aktivira JNK (83). PMA je korišćena u terapiji pacijenata sa akutnom i hroničnom mijeloidnom leukemijom koje su rezistentne na različite hemioterapeutike (82). U toj studiji je pokazano da je PMA, sama ili u kombinaciji sa citarabinom i vitaminom D3, dovela do kratkotrajne remisije bolesti kod sedam od dvanaest pacijenata (82). Međutim, u drugoj kliničkoj studiji PMA nije dovela do remisije kod pacijenata sa AML (84). Trenutno, farmaceutska kompanija PhorMed ispituje PMA u fazi 1/2 kliničkih studija (85).

Klinička ispitivanja sa PMA su pokazala prisustvo neželjenih efekata, zbog čega bi se mogli ispitati neki drugi aktivatori PKC, koji su manje toksični i imaju sposobnost diferencijacije ćelija AML (82, 83). Jedan od njih je briostatin-1, makrociklični lakton izolovan iz morske životinje *Bugula neritina*, koji pripada grupi aktivatora PKC koji se vezuju za C1 domen ove kinaze (347). Za razliku od PMA, briostatin-1 je izučavan u mnogim kliničkim studijama koje se bave malignim i drugim bolestima (348). Briostatin-1 u kombinaciji sa paklitakselom je odobren od strane agencije za hranu i lekove u lečenju karcinoma ezofagusa (348). Slično kao PMA, briostatin-1 dovodi do aktivacije klasičnih i novih izoformi PKC, kao i njihove inhibicije degradacijom u proteazomu usled njegovog dugotrajnog dejstva (347) (349). Za razliku od PMA, briostatin-1 ne poseduje osobinu da promovise nastanak tumora. Objašnjenje se može naći u specifičnoj hemijskoj strukturi ovog molekula. Briostatin-1 ne poseduje keto grupu na trećem ugljenikovom atomu koja je prisutna kod PMA, a za koju se smatra da je odgovorna za promociju nastanka tumora (350). Pokazano je i da briostatin-1 sprečava aktivnosti PMA koje stimulišu rast tumora tako što smanjuje inflamaciju i produkciju slobodnih radikala (351). Zanimljivo je da briostatin-1 ne sinergizuje sa PMA u diferencijaciji HL-60 ćelija u makrofage već je sprečava (352). Smatra se da dolazi do kompeticije oba molekula za vezivanje PKC jer su njihovi bočni lanci slične strukture što dovodi do smetnji prilikom vezivanja za PKC (352). Briostatin-1 indukuje diferencijaciju različitih ćelijskih linija AML kao što su HL-60, THP-1 i NB4 (353-355). Briostatin-1 u diferencijaciji mijeloidnih leukemijskih ćelija aktivira JNK, dok u diferencijaciji akutne limfoblastne leukemije aktivira ERK (194, 356). Aktivacija ovih MAP kinaza bi mogla imati sličnu ulogu u indukciji autofagije i diferencijacije kao u ovom modelu diferencijacije sa PMA. Međutim, studije su pokazale da ovaj agens nije indukovao diferencijaciju U937 ćelija humane monocitne leukemije (357, 358). Takođe, briostatin-1 nije inhibirao proliferaciju MV4-11, K562 i U937 leukemijskih ćelija (357).

Istraživanja su pokazala da se dizajniranjem analoga briostatina-1 prevazilaze mane ovog molekula. Pokazano je da se analozi briostatina-1 ponašaju kao PMA. Oni inhibiraju proliferaciju i indukuju adheziju U937 ćelija za ploču (357, 358). Neophodna su dodatna ispitivanja briostatina-1 i njegovih analoga kako u indukciji diferencijacije, tako i autofagije u leukemijskim ćelijama.

Pokazano je da PKC α i PKC β učestvuju u makrofagnoj diferencijaciji leukemijskih ćelija sa PMA (80, 194). Zanimljivo bi bilo ispitati koja izoforma PKC ima ključnu ulogu u indukciji MAP kinaza i autofagije. Stimulacija odgovarajuće izoforme bi možda otklonila neželjena dejstva PMA koja su pokazana kod pacijenata koji su primili terapiju sa PMA (82, 83). Ono što se zna je da je struktura C1 domena klasičnih i novih izoformi PKC visoko konzervirana, upravo na domenu za vezivanje DAG, tj. PMA. To predstavlja problem da se sintetišu jedinjenja koja ciljaju ovaj domen, a koja bi aktivirala specifičnu izoformu PKC (347). Takođe, dizajnirani ligandi koji vezuju C1 domen mogu da aktiviraju druge kinaze sa ovim domenom što može imati efekte nezavisno od PKC (359). Novija istraživanja su pokazala da bi analozi briostatina-1 mogli imati potencijal u aktivaciji određene izoforme PKC (360). Za sada je pokazano da laktoni, sintetisani metodom ciklizacije DAG i modifikacijom bočnih lanaca, aktiviraju određenu izoformu PKC. Jedna vrsta DAG-laktona prvenstveno aktivira nove izoforme PKC kojoj pripadaju PKC δ i PKC ϵ , dok druga vrsta DAG-laktona aktivira klasičnu izoformu PKC α (359, 361). Ova jedinjenja je potrebno dodatno ispitati kako bi se potvrdila njihova selektivnost prema odgovarajućoj izoformi PKC. Takođe je neophodno ispitati kako bi ovi ligandi PKC izoformi indukovali diferencijaciju i autofagiju zavisnu od MAPK u leukemijskim ćelijama.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa definisanim ciljevima, a na osnovu dobijenih rezultata mogu da se izvedu sledeći zaključci:

1. U makrofagnoj diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija sa PMA učestvuje AMPK/mTOR-nezavisna autofagija izazvana aktivacijom PKC i posledičnom aktivacijom MAP kinaza JNK i ERK.
2. JNK, i u manjoj meri ERK, indukuju autofagiju u HL-60 leukemijskim ćelijama na transkripcionom nivou aktivacijom transkripcionih faktora TFEB, FOXO1 i FOXO3, kao i na post-translacionom nivou oslobađanjem beklina-1 iz inhibitorne interakcije sa Bcl-2.

7. LITERATURA

1. Tallman MS, Wang ES, Altman JK, Appelbaum FR, Bhatt VR, Bixby D, et al. Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2019;17(6):721-49.
2. Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet (London, England)*. 2013;381(9865):484-95.
3. Heuser M, Ofran Y, Boissel N, Brunet Mauri S, Craddock C, Janssen J, et al. Acute myeloid leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2020;31(6):697-712.
4. Maksimovic N, Zarić M, Gazibara T, Trajković G, Marić G, Miljusić D, et al. Incidence and Mortality Patterns of Acute Myeloid Leukemia in Belgrade, Serbia (1999-2013). *Medicina (Kaunas, Lithuania)*. 2018;54(1).
5. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002;100(13):4325-36.
6. Gaidzik V, Döhner K. Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Seminars in oncology*. 2008;35(4):346-55.
7. Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2013;368(22):2059-74.
8. Saultz JN, Garzon R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *Journal of clinical medicine*. 2016;5(3).
9. Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood*. 2006;107(10):3847-53.
10. Greif PA, Dufour A, Konstantin NP, Ksienzyk B, Zellmeier E, Tizazu B, et al. GATA2 zinc finger 1 mutations associated with biallelic CEBPA mutations define a unique genetic entity of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012;120(2):395-403.
11. Rampal R, Figueroa ME. Wilms tumor 1 mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2016;101(6):672-9.
12. Rice KL, de Thé H. The acute promyelocytic leukaemia success story: curing leukaemia through targeted therapies. *Journal of internal medicine*. 2014;276(1):61-70.
13. van der Kouwe E, Staber PB. RUNX1-ETO: Attacking the Epigenome for Genomic Instable Leukemia. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(2).
14. Sive JI, Basilico S, Hannah R, Kinston SJ, Calero-Nieto FJ, Göttgens B. Genome-scale definition of the transcriptional programme associated with compromised PU.1 activity in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2016;30(1):14-23.
15. Lagunas-Rangel FA, Chávez-Valencia V. FLT3-ITD and its current role in acute myeloid leukaemia. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 2017;34(6):114.
16. Kats LM, Reschke M, Taulli R, Pozdnyakova O, Burgess K, Bhargava P, et al. Proto-oncogenic role of mutant IDH2 in leukemia initiation and maintenance. *Cell stem cell*. 2014;14(3):329-41.
17. Park DJ, Kwon A, Cho BS, Kim HJ, Hwang KA, Kim M, et al. Characteristics of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *Blood research*. 2020;55(1):17-26.
18. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453-74.

19. Herold T, Rothenberg-Thurley M, Grunwald VV, Janke H, Goerlich D, Sauerland MC, et al. Validation and refinement of the revised 2017 European LeukemiaNet genetic risk stratification of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34(12):3161-72.
20. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman PV, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 2015;125(9):1367-76.
21. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
22. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
23. Yoshida Y, Oguma S, Ohno H. John Auer and Auer rods; controversies revisited. *Leukemia research*. 2009;33(5):614-6.
24. Rafiq S, McKenna SL, Muller S, Tschan MP, Humbert M. Lysosomes in acute myeloid leukemia: potential therapeutic targets? *Leukemia*. 2021;35(10):2759-70.
25. Rich JN. Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity. *Medicine*. 2016;95(1 Suppl 1):S2-s7.
26. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008;112(13):4793-807.
27. Duchmann M, Laplane L, Itzykson R. Clonal Architecture and Evolutionary Dynamics in Acute Myeloid Leukemias. *Cancers*. 2021;13(19).
28. Fuchs E, Chen T. A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO reports*. 2013;14(1):39-48.
29. Chopra M, Bohlander SK. The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia. *Genes, chromosomes & cancer*. 2019;58(12):850-8.
30. Thomas D, Majeti R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*. 2017;129(12):1577-85.
31. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002;100(5):1532-42.
32. Rosenbauer F, Koschmieder S, Steidl U, Tenen DG. Effect of transcription-factor concentrations on leukemic stem cells. *Blood*. 2005;106(5):1519-24.
33. Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *Journal of hematology & oncology*. 2011;4:36.
34. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *The New England journal of medicine*. 2017;377(5):454-64.
35. Lambert J, Pautas C, Terré C, Raffoux E, Turlure P, Caillot D, et al. Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: final efficacy and safety updates from the open-label, phase III ALFA-0701 trial. *Haematologica*. 2019;104(1):113-9.
36. Morceau F, Chateauvieux S, Orsini M, Trecul A, Dicato M, Diederich M. Natural compounds and pharmaceuticals reprogram leukemia cell differentiation pathways. *Biotechnology advances*. 2015;33(6 Pt 1):785-97.
37. Sachs L. Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukaemia. *Nature*. 1978;274(5671):535-9.
38. Leszczyniecka M, Roberts T, Dent P, Grant S, Fisher PB. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacology & therapeutics*. 2001;90(2-3):105-56.
39. Koeffler HP, Bar-Eli M, Territo M. Phorbol diester-induced macrophage differentiation of leukemic blasts from patients with human myelogenous leukemia. *The Journal of clinical investigation*. 1980;66(5):1101-8.
40. Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC. Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *The Journal of experimental medicine*. 1979;149(4):969-74.

41. Collins SJ, Robertson KA, Mueller L. Retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells is mediated directly through the retinoic acid receptor (RAR- α). *Molecular and cellular biology*. 1990;10(5):2154-63.
42. Miyazawa K, Yaguchi M, Funato K, Gotoh A, Kawanishi Y, Nishizawa Y, et al. Apoptosis/differentiation-inducing effects of vitamin K2 on HL-60 cells: dichotomous nature of vitamin K2 in leukemia cells. *Leukemia*. 2001;15(7):1111-7.
43. Miyaura C, Abe E, Kuribayashi T, Tanaka H, Konno K, Nishii Y, et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 induces differentiation of human myeloid leukemia cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1981;102(3):937-43.
44. Rovera G, Santoli D, Damsky C. Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(6):2779-83.
45. Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhou L, et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1988;72(2):567-72.
46. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2013;369(2):111-21.
47. Dos Santos GA, Kats L, Pandolfi PP. Synergy against PML-RAR α : targeting transcription, proteolysis, differentiation, and self-renewal in acute promyelocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(13):2793-802.
48. Nguyen CH, Grandits AM, Purton LE, Sill H, Wieser R. All-trans retinoic acid in non-promyelocytic acute myeloid leukemia: driver lesion dependent effects on leukemic stem cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2020;19(20):2573-88.
49. Falchi L, Verstovsek S, Ravandi-Kashani F, Kantarjian HM. The evolution of arsenic in the treatment of acute promyelocytic leukemia and other myeloid neoplasms: Moving toward an effective oral, outpatient therapy. *Cancer*. 2016;122(8):1160-8.
50. Madan V, Koefler HP. Differentiation therapy of myeloid leukemia: four decades of development. *Haematologica*. 2021;106(1):26-38.
51. Paubelle E, Zylbersztejn F, Maciel TT, Carvalho C, Mupo A, Cheok M, et al. Vitamin D Receptor Controls Cell Stemness in Acute Myeloid Leukemia and in Normal Bone Marrow. *Cell reports*. 2020;30(3):739-54.e4.
52. Cao H, Xu Y, de Necochea-Campion R, Baylink DJ, Payne KJ, Tang X, et al. Application of vitamin D and vitamin D analogs in acute myelogenous leukemia. *Experimental hematology*. 2017;50:1-12.
53. Mughal TI, Ejaz AA, Foringer JR, Coiffier B. An integrated clinical approach for the identification, prevention, and treatment of tumor lysis syndrome. *Cancer treatment reviews*. 2010;36(2):164-76.
54. McKenzie MD, Ghisi M, Oxley EP, Ngo S, Cimmino L, Esnault C, et al. Interconversion between Tumorigenic and Differentiated States in Acute Myeloid Leukemia. *Cell stem cell*. 2019;25(2):258-72.e9.
55. Rego EM, De Santis GC. Differentiation syndrome in promyelocytic leukemia: clinical presentation, pathogenesis and treatment. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2011;3(1):e2011048.
56. Colón-González F, Kazanietz MG. C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochimica et biophysica acta*. 2006;1761(8):827-37.
57. Griner EM, Kazanietz MG. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(4):281-94.
58. Gould CM, Kannan N, Taylor SS, Newton AC. The chaperones Hsp90 and Cdc37 mediate the maturation and stabilization of protein kinase C through a conserved PXXP motif in the C-terminal tail. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(8):4921-35.
59. Newton AC. Protein kinase C: perfectly balanced. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2018;53(2):208-30.

- 60.Sommese RF, Ritt M, Swanson CJ, Sivaramakrishnan S. The Role of Regulatory Domains in Maintaining Autoinhibition in the Multidomain Kinase PKC α . *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(7):2873-80.
- 61.Nakamura Y, Fukami K. Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C. *Journal of biochemistry*. 2017;161(4):315-21.
- 62.Corbalán-García S, García-García J, Rodríguez-Alfaro JA, Gómez-Fernández JC. A new phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding site located in the C2 domain of protein kinase Calpha. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(7):4972-80.
- 63.Dries DR, Gallegos LL, Newton AC. A single residue in the C1 domain sensitizes novel protein kinase C isoforms to cellular diacylglycerol production. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(2):826-30.
- 64.Gao T, Brognard J, Newton AC. The phosphatase PHLPP controls the cellular levels of protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(10):6300-11.
- 65.Hansra G, Bornancin F, Whelan R, Hemmings BA, Parker PJ. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced dephosphorylation of protein kinase Calpha correlates with the presence of a membrane-associated protein phosphatase 2A heterotrimer. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(51):32785-8.
- 66.Goel G, Makkar HP, Francis G, Becker K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *International journal of toxicology*. 2007;26(4):279-88.
- 67.Lu Z, Liu D, Hornia A, Devonish W, Pagano M, Foster DA. Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Molecular and cellular biology*. 1998;18(2):839-45.
- 68.Cooke M, Magimaidas A, Casado-Medrano V, Kazanietz MG. Protein kinase C in cancer: The top five unanswered questions. *Molecular carcinogenesis*. 2017;56(6):1531-42.
- 69.Barrett JC. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environmental health perspectives*. 1993;100:9-20.
- 70.Reddig PJ, Dreckschmidt NE, Ahrens H, Simsiman R, Tseng CP, Zou J, et al. Transgenic mice overexpressing protein kinase Cdelta in the epidermis are resistant to skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer research*. 1999;59(22):5710-8.
- 71.Lu Z, Hornia A, Jiang YW, Zang Q, Ohno S, Foster DA. Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(6):3418-28.
- 72.Zhu G, Chen Y, Zhang X, Wu Q, Zhao Y, Chen Y, et al. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) is anti-tumorigenic in liver cancer cells via inhibiting YAP through AMOT. *Scientific reports*. 2017;7:44940.
- 73.Wong CY, Jiang H, Abel PW, Scofield MA, Xie Y, Wei T, et al. Phorbol myristate acetate suppresses breast cancer cell growth via down-regulation of P-Rex1 expression. *Protein & cell*. 2016;7(6):445-9.
- 74.Frey MR, Saxon ML, Zhao X, Rollins A, Evans SS, Black JD. Protein kinase C isozyme-mediated cell cycle arrest involves induction of p21(waf1/cip1) and p27(kip1) and hypophosphorylation of the retinoblastoma protein in intestinal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(14):9424-35.
- 75.Nakagawa M, Oliva JL, Kothapalli D, Fournier A, Assoian RK, Kazanietz MG. Phorbol ester-induced G1 phase arrest selectively mediated by protein kinase Cdelta-dependent induction of p21. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(40):33926-34.
- 76.Jacquel A, Herrant M, Defamie V, Belhacene N, Colosetti P, Marchetti S, et al. A survey of the signaling pathways involved in megakaryocytic differentiation of the human K562 leukemia cell line by molecular and c-DNA array analysis. *Oncogene*. 2006;25(5):781-94.
- 77.Tonetti DA, Henning-Chubb C, Yamanishi DT, Huberman E. Protein kinase C-beta is required for macrophage differentiation of human HL-60 leukemia cells. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(37):23230-5.
- 78.Tonetti DA, Horio M, Collart FR, Huberman E. Protein kinase C beta gene expression is associated with susceptibility of human promyelocytic leukemia cells to phorbol ester-induced

- differentiation. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1992;3(10):739-45.
79. Macfarlane DE, Manzel L. Activation of beta-isozyme of protein kinase C (PKC beta) is necessary and sufficient for phorbol ester-induced differentiation of HL-60 promyelocytes. Studies with PKC beta-defective PET mutant. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(6):4327-31.
80. Edashige K, Sato EF, Akimaru K, Kasai M, Utsumi K. Differentiation of HL-60 cells by phorbol ester is correlated with up-regulation of protein kinase C-alpha. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1992;299(2):200-5.
81. Aihara H, Asaoka Y, Yoshida K, Nishizuka Y. Sustained activation of protein kinase C is essential to HL-60 cell differentiation to macrophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(24):11062-6.
82. Han ZT, Zhu XX, Yang RY, Sun JZ, Tian GF, Liu XJ, et al. Effect of intravenous infusions of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in patients with myelocytic leukemia: preliminary studies on therapeutic efficacy and toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(9):5357-61.
83. Strair RK, Schaar D, Goodell L, Aisner J, Chin KV, Eid J, et al. Administration of a phorbol ester to patients with hematological malignancies: preliminary results from a phase I clinical trial of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002;8(8):2512-8.
84. Schaar D, Goodell L, Aisner J, Cui XX, Han ZT, Chang R, et al. A phase I clinical trial of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate for patients with relapsed/refractory malignancies. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2006;57(6):789-95.
85. Phormed Inc. *Science and Technology*: [August 21, 2022]. Available from: <https://www.phormed.com/science/pipeline>.
86. Lilienbaum A. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *International journal of biochemistry and molecular biology*. 2013;4(1):1-26.
87. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell*. 2004;6(4):463-77.
88. Reggiori F, Komatsu M, Finley K, Simonsen A. Selective types of autophagy. *International journal of cell biology*. 2012;2012:156272.
89. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013;14(12):759-74.
90. Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. *Science (New York, NY)*. 2010;330(6009):1344-8.
91. Mizushima N. The role of mammalian autophagy in protein metabolism. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences*. 2007;83(2):39-46.
92. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147(4):728-41.
93. Zaffagnini G, Martens S. Mechanisms of Selective Autophagy. *Journal of molecular biology*. 2016;428(9 Pt A):1714-24.
94. Otomo T, Yoshimori T. Lysophagy: A Method for Monitoring Lysosomal Rupture Followed by Autophagy-Dependent Recovery. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2017;1594:141-9.
95. Wyant GA, Abu-Remaileh M, Frenkel EM, Laqtom NN, Dharamdasani V, Lewis CA, et al. NUFIP1 is a ribosome receptor for starvation-induced ribophagy. *Science (New York, NY)*. 2018;360(6390):751-8.
96. Bjørkøy G, Lamark T, Pankiv S, Øvervatn A, Brech A, Johansen T. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods in enzymology*. 2009;452:181-97.
97. Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays in biochemistry*. 2017;61(6):609-24.
98. Isakson P, Holland P, Simonsen A. The role of ALFY in selective autophagy. *Cell death and differentiation*. 2013;20(1):12-20.

99. Johansen T, Lamark T. Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. *Journal of molecular biology*. 2020;432(1):80-103.
100. Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ. Autophagy: machinery and regulation. *Microbial cell (Graz, Austria)*. 2016;3(12):588-96.
101. Nishimura T, Tooze SA. Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation. *Cell discovery*. 2020;6:32.
102. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2018;19(6):349-64.
103. Lin MG, Hurley JH. Structure and function of the ULK1 complex in autophagy. *Current opinion in cell biology*. 2016;39:61-8.
104. Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*. 2018;14(2):207-15.
105. Papinski D, Schuschnig M, Reiter W, Wilhelm L, Barnes CA, Maiolica A, et al. Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase. *Molecular cell*. 2014;53(3):471-83.
106. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*. 2000;408(6811):488-92.
107. Hemelaar J, Lelyveld VS, Kessler BM, Ploegh HL. A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(51):51841-50.
108. Tanida I, Tanida-Miyake E, Ueno T, Kominami E. The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(3):1701-6.
109. Tanida I, Tanida-Miyake E, Komatsu M, Ueno T, Kominami E. Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(16):13739-44.
110. Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, et al. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(52):37298-302.
111. Kauffman KJ, Yu S, Jin J, Mugo B, Nguyen N, O'Brien A, et al. Delipidation of mammalian Atg8-family proteins by each of the four ATG4 proteases. *Autophagy*. 2018;14(6):992-1010.
112. Wang Y, Li L, Hou C, Lai Y, Long J, Liu J, et al. SNARE-mediated membrane fusion in autophagy. *Seminars in cell & developmental biology*. 2016;60:97-104.
113. Dall'Armi C, Devereaux KA, Di Paolo G. The role of lipids in the control of autophagy. *Current biology : CB*. 2013;23(1):R33-45.
114. Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, et al. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nature cell biology*. 2006;8(7):688-99.
115. Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cualing HD, Sun M, Sato Y, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature cell biology*. 2007;9(10):1142-51.
116. Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, et al. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature cell biology*. 2009;11(4):468-76.
117. Luo S, Rubinsztein DC. BCL2L1/BIM: a novel molecular link between autophagy and apoptosis. *Autophagy*. 2013;9(1):104-5.
118. Zhou F, Yang Y, Xing D. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *The FEBS journal*. 2011;278(3):403-13.
119. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;168(6):960-76.
120. Rabanal-Ruiz Y, Otten EG, Korolchuk VI. mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays in biochemistry*. 2017;61(6):565-84.

121. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology*. 2011;13(2):132-41.
122. Yuan HX, Russell RC, Guan KL. Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy*. 2013;9(12):1983-95.
123. Kim YM, Jung CH, Seo M, Kim EK, Park JM, Bae SS, et al. mTORC1 phosphorylates UVRAG to negatively regulate autophagosome and endosome maturation. *Molecular cell*. 2015;57(2):207-18.
124. Martina JA, Chen Y, Gucek M, Puertollano R. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy*. 2012;8(6):903-14.
125. Avruch J, Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Rapley J, Papageorgiou A, et al. Activation of mTORC1 in two steps: Rheb-GTP activation of catalytic function and increased binding of substrates to raptor. *Biochemical Society transactions*. 2009;37(Pt 1):223-6.
126. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & development*. 2003;17(15):1829-34.
127. Liu GY, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2020;21(4):183-203.
128. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science (New York, NY)*. 2011;331(6016):456-61.
129. Di Malta C, Cinque L, Settembre C. Transcriptional Regulation of Autophagy: Mechanisms and Diseases. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2019;7:114.
130. Palmieri M, Impey S, Kang H, di Ronza A, Pelz C, Sardiello M, et al. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Human molecular genetics*. 2011;20(19):3852-66.
131. Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, et al. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science (New York, NY)*. 2011;332(6036):1429-33.
132. Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science (New York, NY)*. 2009;325(5939):473-7.
133. Martina JA, Diab HI, Lishu L, Jeong AL, Patange S, Raben N, et al. The nutrient-responsive transcription factor TFE3 promotes autophagy, lysosomal biogenesis, and clearance of cellular debris. *Science signaling*. 2014;7(309):ra9.
134. Möller K, Sigurbjornsdottir S, Arnthorsson AO, Pogenberg V, Dilshat R, Fock V, et al. MITF has a central role in regulating starvation-induced autophagy in melanoma. *Scientific reports*. 2019;9(1):1055.
135. Puertollano R, Ferguson SM, Brugarolas J, Ballabio A. The complex relationship between TFEB transcription factor phosphorylation and subcellular localization. *The EMBO journal*. 2018;37(11).
136. Napolitano G, Ballabio A. TFEB at a glance. *Journal of cell science*. 2016;129(13):2475-81.
137. Li Y, Xu M, Ding X, Yan C, Song Z, Chen L, et al. Protein kinase C controls lysosome biogenesis independently of mTORC1. *Nature cell biology*. 2016;18(10):1065-77.
138. Palmieri M, Pal R, Nelvagal HR, Lotfi P, Stinnett GR, Seymour ML, et al. mTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases. *Nature communications*. 2017;8:14338.
139. Ferron M, Settembre C, Shimazu J, Lacombe J, Kato S, Rawlings DJ, et al. A RANKL-PKC β -TFEB signaling cascade is necessary for lysosomal biogenesis in osteoclasts. *Genes & development*. 2013;27(8):955-69.
140. Chauhan S, Goodwin JG, Chauhan S, Manyam G, Wang J, Kamat AM, et al. ZKSCAN3 is a master transcriptional repressor of autophagy. *Molecular cell*. 2013;50(1):16-28.
141. Zhao J, Braut JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell metabolism*. 2007;6(6):472-83.

- 142.Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism*. 2007;6(6):458-71.
- 143.Zhang J, Ng S, Wang J, Zhou J, Tan SH, Yang N, et al. Histone deacetylase inhibitors induce autophagy through FOXO1-dependent pathways. *Autophagy*. 2015;11(4):629-42.
- 144.Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813(11):1938-45.
- 145.Kang YA, Sanalkumar R, O'Geen H, Linnemann AK, Chang CJ, Bouhassira EE, et al. Autophagy driven by a master regulator of hematopoiesis. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(1):226-39.
- 146.Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature cell biology*. 2010;12(9):823-30.
- 147.Kundu M, Lindsten T, Yang CY, Wu J, Zhao F, Zhang J, et al. Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood*. 2008;112(4):1493-502.
- 148.Riffelmacher T, Simon AK. Mechanistic roles of autophagy in hematopoietic differentiation. *The FEBS journal*. 2017;284(7):1008-20.
- 149.Mortensen M, Soilleux EJ, Djordjevic G, Tripp R, Lutteropp M, Sadighi-Akha E, et al. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(3):455-67.
- 150.Jin J, Britschgi A, Schläfli AM, Humbert M, Shan-Krauer D, Batliner J, et al. Low Autophagy (ATG) Gene Expression Is Associated with an Immature AML Blast Cell Phenotype and Can Be Restored during AML Differentiation Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018:1482795.
- 151.Watson AS, Riffelmacher T, Stranks A, Williams O, De Boer J, Cain K, et al. Autophagy limits proliferation and glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia. *Cell death discovery*. 2015;1:15008-.
- 152.Auberger P, Puissant A. Autophagy, a key mechanism of oncogenesis and resistance in leukemia. *Blood*. 2017;129(5):547-52.
- 153.Isakson P, Bjørås M, Bøe SO, Simonsen A. Autophagy contributes to therapy-induced degradation of the PML/RARA oncoprotein. *Blood*. 2010;116(13):2324-31.
- 154.Wang Z, Cao L, Kang R, Yang M, Liu L, Zhao Y, et al. Autophagy regulates myeloid cell differentiation by p62/SQSTM1-mediated degradation of PML-RARalpha oncoprotein. *Autophagy*. 2011;7(4):401-11.
- 155.Schläfli AM, Isakson P, Garattini E, Simonsen A, Tschan MP. The autophagy scaffold protein ALFY is critical for the granulocytic differentiation of AML cells. *Scientific reports*. 2017;7(1):12980.
- 156.Orfali N, O'Donovan TR, Cahill MR, Benjamin D, Nanus DM, McKenna SL, et al. All-trans retinoic acid (ATRA)-induced TFEB expression is required for myeloid differentiation in acute promyelocytic leukemia (APL). *European journal of haematology*. 2020;104(3):236-50.
- 157.Larrue C, Saland E, Boutzen H, Vergez F, David M, Joffre C, et al. Proteasome inhibitors induce FLT3-ITD degradation through autophagy in AML cells. *Blood*. 2016;127(7):882-92.
- 158.Liu XJ, Wang LN, Zhang ZH, Liang C, Li Y, Luo JS, et al. Arsenic trioxide induces autophagic degradation of the FLT3-ITD mutated protein in FLT3-ITD acute myeloid leukemia cells. *Journal of Cancer*. 2020;11(12):3476-82.
- 159.Elzinga BM, Nyhan MJ, Crowley LC, O'Donovan TR, Cahill MR, McKenna SL. Induction of autophagy by Imatinib sequesters Bcr-Abl in autophagosomes and down-regulates Bcr-Abl protein. *American journal of hematology*. 2013;88(6):455-62.
- 160.Goussetis DJ, Gounaris E, Wu EJ, Vakana E, Sharma B, Bogyo M, et al. Autophagic degradation of the BCR-ABL oncoprotein and generation of antileukemic responses by arsenic trioxide. *Blood*. 2012;120(17):3555-62.

- 161.Colosetti P, Puissant A, Robert G, Luciano F, Jacquel A, Gounon P, et al. Autophagy is an important event for megakaryocytic differentiation of the chronic myelogenous leukemia K562 cell line. *Autophagy*. 2009;5(8):1092-8.
- 162.Wang J, Lian H, Zhao Y, Kauss MA, Spindel S. Vitamin D3 induces autophagy of human myeloid leukemia cells. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(37):25596-605.
- 163.Xu Y, Wang L, Bai R, Zhang T, Chen C. Silver nanoparticles impede phorbol myristate acetate-induced monocyte-macrophage differentiation and autophagy. *Nanoscale*. 2015;7(38):16100-9.
- 164.Xie N, Zhong L, Liu L, Fang Y, Qi X, Cao J, et al. Autophagy contributes to dasatinib-induced myeloid differentiation of human acute myeloid leukemia cells. *Biochemical pharmacology*. 2014;89(1):74-85.
- 165.Krens SF, Spaik HP, Snaar-Jagalska BE. Functions of the MAPK family in vertebrate-development. *FEBS letters*. 2006;580(21):4984-90.
- 166.Morrison DK. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(11).
- 167.Lavoie H, Gagnon J, Therrien M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2020;21(10):607-32.
- 168.Coulombe P, Meloche S. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1773(8):1376-87.
- 169.Turjanski AG, Vaqué JP, Gutkind JS. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*. 2007;26(22):3240-53.
- 170.Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene*. 2013;513(1):1-13.
- 171.Keyse SM. Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity. *Seminars in cell & developmental biology*. 1998;9(2):143-52.
- 172.Margolis B, Skolnik EY. Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1994;5(6):1288-99.
- 173.Ueda Y, Hirai S, Osada S, Suzuki A, Mizuno K, Ohno S. Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(38):23512-9.
- 174.Marquardt B, Frith D, Stabel S. Signalling from TPA to MAP kinase requires protein kinase C, raf and MEK: reconstitution of the signalling pathway in vitro. *Oncogene*. 1994;9(11):3213-8.
- 175.Yen JH, Lin CY, Chuang CH, Chin HK, Wu MJ, Chen PY. Nobiletin Promotes Megakaryocytic Differentiation through the MAPK/ERK-Dependent EGR1 Expression and Exerts Anti-Leukemic Effects in Human Chronic Myeloid Leukemia (CML) K562 Cells. *Cells*. 2020;9(4).
- 176.Shao X, Liu Y, Li Y, Xian M, Zhou Q, Yang B, et al. The HER2 inhibitor TAK165 Sensitizes Human Acute Myeloid Leukemia Cells to Retinoic Acid-Induced Myeloid Differentiation by activating MEK/ERK mediated RAR α /STAT1 axis. *Scientific reports*. 2016;6:24589.
- 177.Johnson DE. Src family kinases and the MEK/ERK pathway in the regulation of myeloid differentiation and myeloid leukemogenesis. *Advances in enzyme regulation*. 2008;48:98-112.
- 178.Nguyen HQ, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell*. 1993;72(2):197-209.
- 179.Phanstiel DH, Van Bortle K, Spacek D, Hess GT, Shamim MS, Machol I, et al. Static and Dynamic DNA Loops form AP-1-Bound Activation Hubs during Macrophage Development. *Molecular cell*. 2017;67(6):1037-48.e6.
- 180.Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *The FEBS journal*. 2010;277(1):2-21.
- 181.Aoki H, Takada Y, Kondo S, Sawaya R, Aggarwal BB, Kondo Y. Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Molecular pharmacology*. 2007;72(1):29-39.

182. Wang J, Whiteman MW, Lian H, Wang G, Singh A, Huang D, et al. A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(32):21412-24.
183. Corcelle E, Nebout M, Bekri S, Gauthier N, Hofman P, Poujeol P, et al. Disruption of autophagy at the maturation step by the carcinogen lindane is associated with the sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. *Cancer research*. 2006;66(13):6861-70.
184. Liu L, Yang M, Kang R, Wang Z, Zhao Y, Yu Y, et al. HMGB1-induced autophagy promotes chemotherapy resistance in leukemia cells. *Leukemia*. 2011;25(1):23-31.
185. Kim JH, Hong SK, Wu PK, Richards AL, Jackson WT, Park JI. Raf/MEK/ERK can regulate cellular levels of LC3B and SQSTM1/p62 at expression levels. *Experimental cell research*. 2014;327(2):340-52.
186. Cheng Y, Qiu F, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. ERK and JNK mediate TNF α -induced p53 activation in apoptotic and autophagic L929 cell death. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;376(3):483-8.
187. Maddodi N, Huang W, Havighurst T, Kim K, Longley BJ, Setaluri V. Induction of autophagy and inhibition of melanoma growth in vitro and in vivo by hyperactivation of oncogenic BRAF. *The Journal of investigative dermatology*. 2010;130(6):1657-67.
188. Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh CW, Farkas A, Loughran P, et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *The Journal of cell biology*. 2010;190(5):881-92.
189. Cowan KJ, Storey KB. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *The Journal of experimental biology*. 2003;206(Pt 7):1107-15.
190. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007;26(22):3279-90.
191. Zeke A, Misheva M, Reményi A, Bogoyevitch MA. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 2016;80(3):793-835.
192. Bode AM, Dong Z. The functional contrariety of JNK. *Molecular carcinogenesis*. 2007;46(8):591-8.
193. López-Bergami P, Habelhah H, Bhoumik A, Zhang W, Wang LH, Ronai Z. RACK1 mediates activation of JNK by protein kinase C [corrected]. *Molecular cell*. 2005;19(3):309-20.
194. Kaneki M, Kharbanda S, Pandey P, Yoshida K, Takekawa M, Liou JR, et al. Functional role for protein kinase C β as a regulator of stress-activated protein kinase activation and monocytic differentiation of myeloid leukemia cells. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(1):461-70.
195. Lam CF, Yeung HT, Lam YM, Ng RK. Reactive oxygen species activate differentiation gene transcription of acute myeloid leukemia cells via the JNK/c-JUN signaling pathway. *Leukemia research*. 2018;68:112-9.
196. Bobilev I, Novik V, Levi I, Shpilberg O, Levy J, Sharoni Y, et al. The Nrf2 transcription factor is a positive regulator of myeloid differentiation of acute myeloid leukemia cells. *Cancer biology & therapy*. 2011;11(3):317-29.
197. Gazon H, Barbeau B, Mesnard JM, Peloponese JM, Jr. Hijacking of the AP-1 Signaling Pathway during Development of ATL. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:2686.
198. Li DD, Wang LL, Deng R, Tang J, Shen Y, Guo JF, et al. The pivotal role of c-Jun NH2-terminal kinase-mediated Beclin 1 expression during anticancer agents-induced autophagy in cancer cells. *Oncogene*. 2009;28(6):886-98.
199. Zhou YY, Li Y, Jiang WQ, Zhou LF. MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. *Bioscience reports*. 2015;35(3).
200. Byun JY, Yoon CH, An S, Park IC, Kang CM, Kim MJ, et al. The Rac1/MKK7/JNK pathway signals upregulation of Atg5 and subsequent autophagic cell death in response to oncogenic Ras. *Carcinogenesis*. 2009;30(11):1880-8.

201. Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, et al. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science (New York, NY)*. 2004;304(5676):1500-2.
202. Wu H, Wang MC, Bohmann D. JNK protects *Drosophila* from oxidative stress by transcriptionally activating autophagy. *Mechanisms of development*. 2009;126(8-9):624-37.
203. Milton VJ, Jarrett HE, Gowers K, Chalak S, Briggs L, Robinson IM, et al. Oxidative stress induces overgrowth of the *Drosophila* neuromuscular junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(42):17521-6.
204. Tikhanovich I, Kuravi S, Campbell RV, Kharbanda KK, Artigues A, Villar MT, et al. Regulation of FOXO3 by phosphorylation and methylation in hepatitis C virus infection and alcohol exposure. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2014;59(1):58-70.
205. Sunayama J, Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y. JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *The Journal of cell biology*. 2005;170(2):295-304.
206. Weng Q, Liu Z, Li B, Liu K, Wu W, Liu H. Oxidative Stress Induces Mouse Follicular Granulosa Cells Apoptosis via JNK/FoxO1 Pathway. *PloS one*. 2016;11(12):e0167869.
207. Pattingre S, Bauvy C, Carpentier S, Levade T, Levine B, Codogno P. Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(5):2719-28.
208. Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular cell*. 2008;30(6):678-88.
209. Zhang Y, Morgan MJ, Chen K, Choksi S, Liu ZG. Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation. *Blood*. 2012;119(12):2895-905.
210. Xu P, Das M, Reilly J, Davis RJ. JNK regulates FoxO-dependent autophagy in neurons. *Genes & development*. 2011;25(4):310-22.
211. Dalton WT, Jr., Ahearn MJ, McCredie KB, Freireich EJ, Stass SA, Trujillo JM. HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood*. 1988;71(1):242-7.
212. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994;84(5):1415-20.
213. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of immunological methods*. 2000;243(1-2):167-90.
214. Kaludjerović GN, Miljković D, Momčilović M, Djinović VM, Mostarica Stojković M, Sabo TJ, et al. Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *International journal of cancer*. 2005;116(3):479-86.
215. Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free radical biology & medicine*. 2012;52(1):1-6.
216. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-54.
217. Winter JCFd. Using the Student's "t"-Test with Extremely Small Sample Sizes. *Practical Assessment, Research and Evaluation*. 2013;18:10.
218. Kumbrink J, Kirsch KH. p130Cas acts as survival factor during PMA-induced apoptosis in HL-60 promyelocytic leukemia cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45(3):531-5.
219. Schnerch D, Yalcintepe J, Schmidts A, Becker H, Follo M, Engelhardt M, et al. Cell cycle control in acute myeloid leukemia. *American journal of cancer research*. 2012;2(5):508-28.
220. Rosmarin AG, Weil SC, Rosner GL, Griffin JD, Arnaout MA, Tenen DG. Differential expression of CD11b/CD18 (Mo1) and myeloperoxidase genes during myeloid differentiation. *Blood*. 1989;73(1):131-6.
221. Licona-Limón I, Garay-Canales CA, Muñoz-Paleta O, Ortega E. CD13 mediates phagocytosis in human monocytic cells. *Journal of leukocyte biology*. 2015;98(1):85-98.
222. Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M, et al. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity*. 1994;1(6):509-16.

- 223.St-Pierre J, Ostergaard HL. A role for the protein tyrosine phosphatase CD45 in macrophage adhesion through the regulation of paxillin degradation. *PloS one*. 2013;8(7):e71531.
- 224.Stanley ER, Berg KL, Einstein DB, Lee PS, Pixley FJ, Wang Y, et al. Biology and action of colony--stimulating factor-1. *Molecular reproduction and development*. 1997;46(1):4-10.
- 225.Meier RW, Niklaus G, Fey MF, Tobler A. The induction kinetics of Il-8 messenger RNA in HL60 cells demonstrate the participation of negative-acting gene(s). *Leukemia research*. 1995;19(7):449-55.
- 226.Moosavi MA, Sharifi M, Ghafary SM, Mohammadalipour Z, Khataee A, Rahmati M, et al. Photodynamic N-TiO(2) Nanoparticle Treatment Induces Controlled ROS-mediated Autophagy and Terminal Differentiation of Leukemia Cells. *Scientific reports*. 2016;6:34413.
- 227.Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *The Journal of cell biology*. 2005;169(3):425-34.
- 228.Furuya N, Yu J, Byfield M, Pattingre S, Levine B. The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy*. 2005;1(1):46-52.
- 229.Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of cell biology*. 2005;171(4):603-14.
- 230.Rubinsztein DC, Cuervo AM, Ravikumar B, Sarkar S, Korolchuk V, Kaushik S, et al. In search of an "autophagometer". *Autophagy*. 2009;5(5):585-9.
- 231.Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(26):17707-12.
- 232.Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1). *Autophagy*. 2021;17(1):1-382.
- 233.Rzyski T, Milani M, Pike L, Buffa F, Mellor HR, Winchester L, et al. Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia. *Oncogene*. 2010;29(31):4424-35.
- 234.Elia A, Constantinou C, Clemens MJ. Effects of protein phosphorylation on ubiquitination and stability of the translational inhibitor protein 4E-BP1. *Oncogene*. 2008;27(6):811-22.
- 235.Fang X, Yu S, Tanyi JL, Lu Y, Woodgett JR, Mills GB. Convergence of multiple signaling cascades at glycogen synthase kinase 3: Edg receptor-mediated phosphorylation and inactivation by lysophosphatidic acid through a protein kinase C-dependent intracellular pathway. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(7):2099-110.
- 236.Wu PK, Park JI. MEK1/2 Inhibitors: Molecular Activity and Resistance Mechanisms. *Seminars in oncology*. 2015;42(6):849-62.
- 237.Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(24):13681-6.
- 238.Mancinelli R, Carpino G, Petrunaro S, Mammola CL, Tomaipitca L, Filippini A, et al. Multifaceted Roles of GSK-3 in Cancer and Autophagy-Related Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;2017:4629495.
- 239.Wang T, Liu C, Jia L. The roles of PKCs in regulating autophagy. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2018;144(12):2303-11.
- 240.Wilkinson SE, Parker PJ, Nixon JS. Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem J*. 1993;294 (Pt 2)(Pt 2):335-7.
- 241.Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, et al. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(24):15771-81.
- 242.Liu X, Zhang N, Liu Y, Liu L, Zeng Q, Yin M, et al. MPB, a novel berberine derivative, enhances lysosomal and bactericidal properties via TGF- β -activated kinase 1-dependent activation

of the transcription factor EB. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2019;33(1):1468-81.

243. Yang JY, Zong CS, Xia W, Yamaguchi H, Ding Q, Xie X, et al. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nature cell biology*. 2008;10(2):138-48.

244. Zhao Y, Li X, Cai MY, Ma K, Yang J, Zhou J, et al. XBP-1 α suppresses autophagy by promoting the degradation of FoxO1 in cancer cells. *Cell research*. 2013;23(4):491-507.

245. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 2005;122(6):927-39.

246. Yun HR, Jo YH, Kim J, Shin Y, Kim SS, Choi TG. Roles of Autophagy in Oxidative Stress. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(9).

247. Yiang GT, Chen JN, Wu TK, Wang HF, Hung YT, Chang WJ, et al. Ascorbic acid inhibits TPA-induced HL-60 cell differentiation by decreasing cellular H₂O₂ and ERK phosphorylation. *Molecular medicine reports*. 2015;12(4):5501-7.

248. Miranda MB, McGuire TF, Johnson DE. Importance of MEK-1/-2 signaling in monocytic and granulocytic differentiation of myeloid cell lines. *Leukemia*. 2002;16(4):683-92.

249. Herst PM, Levine DM, Berridge MV. Mitochondrial gene knockout HL60rho0 cells show preferential differentiation into monocytes/macrophages. *Leukemia research*. 2005;29(10):1163-70.

250. Liu YH, Gao XM, Ge FM, Wang Z, Wang WQ, Li XY. PBK/TOPK expression during TPA-induced HL-60 leukemic cell differentiation. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2012;13(5):2145-8.

251. Burón MI, Rodríguez-Aguilera JC, González-Reyes JA, Villalba JM, Alcaín FJ, Navarro F, et al. A quantitative ultrastructural and cytochemical study of TPA-induced differentiation in HL-60 cells. *Leukemia research*. 1993;17(10):863-72.

252. Mark Welch DB, Jauch A, Langowski J, Olins AL, Olins DE. Transcriptomes reflect the phenotypes of undifferentiated, granulocyte and macrophage forms of HL-60/S4 cells. *Nucleus (Austin, Tex)*. 2017;8(2):222-37.

253. Trocoli A, Bensadoun P, Richard E, Labrunie G, Merhi F, Schläfli AM, et al. p62/SQSTM1 upregulation constitutes a survival mechanism that occurs during granulocytic differentiation of acute myeloid leukemia cells. *Cell death and differentiation*. 2014;21(12):1852-61.

254. Galluzzi L, Green DR. Autophagy-Independent Functions of the Autophagy Machinery. *Cell*. 2019;177(7):1682-99.

255. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(5):307-18.

256. Liu M, Clarke CJ, Salama MF, Choi YJ, Obeid LM, Hannun YA. Co-ordinated activation of classical and novel PKC isoforms is required for PMA-induced mTORC1 activation. *PloS one*. 2017;12(9):e0184818.

257. Huang J, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J*. 2008;412(2):179-90.

258. Zogovic N, Tovilovic-Kovacevic G, Misirkic-Marjanovic M, Vucicevic L, Janjetovic K, Harhaji-Trajkovic L, et al. Coordinated activation of AMP-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase, and autophagy regulates phorbol myristate acetate-induced differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of neurochemistry*. 2015;133(2):223-32.

259. Leontieva OV, Blagosklonny MV. Tumor promoter-induced cellular senescence: cell cycle arrest followed by geroconversion. *Oncotarget*. 2014;5(24):12715-27.

260. Vasamsetti SB, Karnewar S, Kanugula AK, Thatipalli AR, Kumar JM, Kotamraju S. Metformin inhibits monocyte-to-macrophage differentiation via AMPK-mediated inhibition of STAT3 activation: potential role in atherosclerosis. *Diabetes*. 2015;64(6):2028-41.

261. Ribeiro MC, Peruchetti DB, Silva LS, Silva-Filho JL, Souza MC, Henriques MDG, et al. LPS Induces mTORC1 and mTORC2 Activation During Monocyte Adhesion. *Frontiers in molecular biosciences*. 2018;5:67.

- 262.Narita M, Young AR, Arakawa S, Samarajiwa SA, Nakashima T, Yoshida S, et al. Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science (New York, NY)*. 2011;332(6032):966-70.
- 263.Lee PY, Sykes DB, Ameri S, Kalaitzidis D, Charles JF, Nelson-Maney N, et al. The metabolic regulator mTORC1 controls terminal myeloid differentiation. *Science immunology*. 2017;2(11).
- 264.Zhang M, Liu F, Zhou P, Wang Q, Xu C, Li Y, et al. The MTOR signaling pathway regulates macrophage differentiation from mouse myeloid progenitors by inhibiting autophagy. *Autophagy*. 2019;15(7):1150-62.
- 265.Schultz H, Engel K, Gaestel M. PMA-induced activation of the p42/44ERK- and p38RK-MAP kinase cascades in HL-60 cells is PKC dependent but not essential for differentiation to the macrophage-like phenotype. *Journal of cellular physiology*. 1997;173(3):310-8.
- 266.Zhang Y, Wu Y, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Involvement of PKC signal pathways in oridonin-induced autophagy in HeLa cells: a protective mechanism against apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;378(2):273-8.
- 267.Chen JL, Lin HH, Kim KJ, Lin A, Forman HJ, Ann DK. Novel roles for protein kinase Cdelta-dependent signaling pathways in acute hypoxic stress-induced autophagy. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(49):34432-44.
- 268.Shahnazari S, Yen WL, Birmingham CL, Shiu J, Namolovan A, Zheng YT, et al. A diacylglycerol-dependent signaling pathway contributes to regulation of antibacterial autophagy. *Cell host & microbe*. 2010;8(2):137-46.
- 269.Jiang H, Cheng D, Liu W, Peng J, Feng J. Protein kinase C inhibits autophagy and phosphorylates LC3. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;395(4):471-6.
- 270.Settembre C, Zoncu R, Medina DL, Vetrini F, Erdin S, Erdin S, et al. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO journal*. 2012;31(5):1095-108.
- 271.Palmieri M, Pal R, Sardiello M. AKT modulates the autophagy-lysosome pathway via TFEB. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2017;16(13):1237-8.
- 272.Cinque L, De Leonibus C, Iavazzo M, Krahmer N, Intartaglia D, Salierno FG, et al. MiT/TFE factors control ER-phagy via transcriptional regulation of FAM134B. *The EMBO journal*. 2020;39(17):e105696.
- 273.Ding Q, Xia W, Liu JC, Yang JY, Lee DF, Xia J, et al. Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. *Molecular cell*. 2005;19(2):159-70.
- 274.Hornberg JJ, Tijssen MR, Lankelma J. Synergistic activation of signalling to extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 by epidermal growth factor and 4 beta-phorbol 12-myristate 13-acetate. *European journal of biochemistry*. 2004;271(19):3905-13.
- 275.Urbanelli L, Magini A, Ercolani L, Sagini K, Polchi A, Tancini B, et al. Oncogenic H-Ras up-regulates acid β -hexosaminidase by a mechanism dependent on the autophagy regulator TFEB. *PloS one*. 2014;9(2):e89485.
- 276.Fang L, Hodge J, Saaoud F, Wang J, Iwanowycz S, Wang Y, et al. Transcriptional factor EB regulates macrophage polarization in the tumor microenvironment. *Oncoimmunology*. 2017;6(5):e1312042.
- 277.Collodet C, Foretz M, Deak M, Bultot L, Mitaon S, Viollet B, et al. AMPK promotes induction of the tumor suppressor FLCN through activation of TFEB independently of mTOR. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2019;33(11):12374-91.
- 278.Paquette M, El-Houjeiri L, L CZ, Puustinen P, Blanchette P, Jeong H, et al. AMPK-dependent phosphorylation is required for transcriptional activation of TFEB and TFE3. *Autophagy*. 2021:1-19.
- 279.Young NP, Kamireddy A, Van Nostrand JL, Eichner LJ, Shokhirev MN, Dayn Y, et al. AMPK governs lineage specification through Tfeb-dependent regulation of lysosomes. *Genes & development*. 2016;30(5):535-52.

- 280.Li S, Song Y, Quach C, Guo H, Jang GB, Maazi H, et al. Transcriptional regulation of autophagy-lysosomal function in BRAF-driven melanoma progression and chemoresistance. *Nature communications*. 2019;10(1):1693.
- 281.Yun S, Vincelette ND, Yu X, Watson GW, Fernandez MR, Yang C, et al. TFEB links MYC signaling to epigenetic control of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia. *Blood cancer discovery*. 2021;2(2):162-85.
- 282.Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2000;40:617-47.
- 283.Xu Y, Ren J, He X, Chen H, Wei T, Feng W. YWHA/14-3-3 proteins recognize phosphorylated TFEB by a noncanonical mode for controlling TFEB cytoplasmic localization. *Autophagy*. 2019;15(6):1017-30.
- 284.Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, et al. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *The Journal of cell biology*. 2002;156(5):817-28.
- 285.Pramanik KC, Fofaria NM, Gupta P, Srivastava SK. CBP-mediated FOXO-1 acetylation inhibits pancreatic tumor growth by targeting SirT. *Molecular cancer therapeutics*. 2014;13(3):687-98.
- 286.Sunters A, Madureira PA, Pomeranz KM, Aubert M, Brosens JJ, Cook SJ, et al. Paclitaxel-induced nuclear translocation of FOXO3a in breast cancer cells is mediated by c-Jun NH2-terminal kinase and Akt. *Cancer research*. 2006;66(1):212-20.
- 287.Essers MA, Weijzen S, de Vries-Smits AM, Saarloos I, de Rooter ND, Bos JL, et al. FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *The EMBO journal*. 2004;23(24):4802-12.
- 288.Yun H, Park S, Kim MJ, Yang WK, Im DU, Yang KR, et al. AMP-activated protein kinase mediates the antioxidant effects of resveratrol through regulation of the transcription factor FoxO1. *The FEBS journal*. 2014;281(19):4421-38.
- 289.Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP, et al. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(41):30107-19.
- 290.Nakashima K, Yakabe Y. AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2007;71(7):1650-6.
- 291.Romanello V, Guadagnin E, Gomes L, Roder I, Sandri C, Petersen Y, et al. Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *The EMBO journal*. 2010;29(10):1774-85.
- 292.Asada S, Daitoku H, Matsuzaki H, Saito T, Sudo T, Mukai H, et al. Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1. *Cellular signalling*. 2007;19(3):519-27.
- 293.Sakoe Y, Sakoe K, Kirito K, Ozawa K, Komatsu N. FOXO3A as a key molecule for all-trans retinoic acid-induced granulocytic differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(18):3787-95.
- 294.Birkenkamp KU, Essafi A, van der Vos KE, da Costa M, Hui RC, Holstege F, et al. FOXO3a induces differentiation of Bcr-Abl-transformed cells through transcriptional down-regulation of Id1. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(4):2211-20.
- 295.Sykes SM, Lane SW, Bullinger L, Kalaitzidis D, Yusuf R, Saez B, et al. AKT/FOXO signaling enforces reversible differentiation blockade in myeloid leukemias. *Cell*. 2011;146(5):697-708.
- 296.Lin S, Ptasincka A, Chen X, Shrestha M, Assi SA, Chin PS, et al. A FOXO1-induced oncogenic network defines the AML1-ETO preleukemic program. *Blood*. 2017;130(10):1213-22.
- 297.Lin XX, Sen I, Janssens GE, Zhou X, Fonslow BR, Edgar D, et al. DAF-16/FOXO and HLH-30/TFEB function as combinatorial transcription factors to promote stress resistance and longevity. *Nature communications*. 2018;9(1):4400.
- 298.Peeters JGC, Picavet LW, Coenen S, Mauthe M, Vervoort SJ, Mocholi E, et al. Transcriptional and epigenetic profiling of nutrient-deprived cells to identify novel regulators of autophagy. *Autophagy*. 2019;15(1):98-112.

299. Milbrandt J. A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science (New York, NY)*. 1987;238(4828):797-9.
300. Aggeli IK, Beis I, Gaitanaki C. ERKs and JNKs mediate hydrogen peroxide-induced Egr-1 expression and nuclear accumulation in H9c2 cells. *Physiological research*. 2010;59(3):443-54.
301. Zhao K, Yu M, Zhu Y, Liu D, Wu Q, Hu Y. EGR-1/ASPP1 inter-regulatory loop promotes apoptosis by inhibiting cyto-protective autophagy. *Cell death & disease*. 2017;8(6):e2869.
302. He J, Yu JJ, Xu Q, Wang L, Zheng JZ, Liu LZ, et al. Downregulation of ATG14 by EGR1-MIR152 sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis by inhibiting cyto-protective autophagy. *Autophagy*. 2015;11(2):373-84.
303. Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO reports*. 2001;2(4):330-5.
304. Wei Y, An Z, Zou Z, Sumpter R, Su M, Zang X, et al. The stress-responsive kinases MAPKAPK2/MAPKAPK3 activate starvation-induced autophagy through Beclin 1 phosphorylation. *eLife*. 2015;4.
305. Chipuk JE, Fisher JC, Dillon CP, Kriwacki RW, Kuwana T, Green DR. Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(51):20327-32.
306. Akl H, Vervloessem T, Kiviluoto S, Bittremieux M, Parys JB, De Smedt H, et al. A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: Mitochondria versus endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2014;1843(10):2240-52.
307. Oltsersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*. 2005;435(7042):677-81.
308. Maiuri MC, Criollo A, Tasdemir E, Vicencio JM, Tajeddine N, Hickman JA, et al. BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy*. 2007;3(4):374-6.
309. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature medicine*. 2013;19(2):202-8.
310. Richard-Carpentier G, DiNardo CD. Venetoclax for the treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia in patients who are ineligible for intensive chemotherapy. *Therapeutic advances in hematology*. 2019;10:2040620719882822.
311. Bodo J, Zhao X, Durkin L, Souers AJ, Phillips DC, Smith MR, et al. Acquired resistance to venetoclax (ABT-199) in t(14;18) positive lymphoma cells. *Oncotarget*. 2016;7(43):70000-10.
312. Avsec D, Jakoš Djordjevič AT, Kandušer M, Podgornik H, Škerget M, Mlinarič-Raščan I. Targeting Autophagy Triggers Apoptosis and Complements the Action of Venetoclax in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Cancers*. 2021;13(18).
313. Sarkar S. Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochemical Society transactions*. 2013;41(5):1103-30.
314. Sarkar S, Korolchuk VI, Renna M, Imarisio S, Fleming A, Williams A, et al. Complex inhibitory effects of nitric oxide on autophagy. *Molecular cell*. 2011;43(1):19-32.
315. Martinez-Lopez N, Athonvarangkul D, Mishall P, Sahu S, Singh R. Autophagy proteins regulate ERK phosphorylation. *Nature communications*. 2013;4:2799.
316. Fang Y, Zhong L, Lin M, Zhou X, Jing H, Ying M, et al. MEK/ERK Dependent Activation of STAT1 Mediates Dasatinib-Induced Differentiation of Acute Myeloid Leukemia. *PloS one*. 2013;8(6):e66915.
317. Sharma J, Pandey A, Sharma S, Dixit A. Securinine Induces Differentiation of Human Promyelocytic Leukemic HL-60 Cells through JNK-Mediated Signaling Pathway. *Nutrition and Cancer*. 2021:1-16.

- 318.Wang X, Studzinski GP. Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) defines the first phase of 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced differentiation of HL60 cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2001;80(4):471-82.
- 319.Wang Q, Salman H, Danilenko M, Studzinski GP. Cooperation between antioxidants and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in induction of leukemia HL60 cell differentiation through the JNK/AP-1/Egr-1 pathway. *Journal of cellular physiology*. 2005;204(3):964-74.
- 320.Kim SH, Kim KY, Park SG, Yu SN, Kim YW, Nam HW, et al. Mitochondrial ROS activates ERK/autophagy pathway as a protected mechanism against deoxypodophyllotoxin-induced apoptosis. *Oncotarget*. 2017;8(67):111581-96.
- 321.Zhou H, Shen T, Shang C, Luo Y, Liu L, Yan J, et al. Ciclopirox induces autophagy through reactive oxygen species-mediated activation of JNK signaling pathway. *Oncotarget*. 2014;5(20):10140-50.
- 322.Richardson ET, Shukla S, Nagy N, Boom WH, Beck RC, Zhou L, et al. ERK Signaling Is Essential for Macrophage Development. *PloS one*. 2015;10(10):e0140064.
- 323.Himes SR, Sester DP, Ravasi T, Cronau SL, Sasmono T, Hume DA. The JNK are important for development and survival of macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;176(4):2219-28.
- 324.Chan G, Gu S, Neel BG. Erk1 and Erk2 are required for maintenance of hematopoietic stem cells and adult hematopoiesis. *Blood*. 2013;121(18):3594-8.
- 325.Hsu CL, Kikuchi K, Kondo M. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/extracellular signal regulated kinase (ERK) signaling pathway is involved in myeloid lineage commitment. *Blood*. 2007;110(5):1420-8.
- 326.Miranda MB, Xu H, Torchia JA, Johnson DE. Cytokine-induced myeloid differentiation is dependent on activation of the MEK/ERK pathway. *Leukemia research*. 2005;29(11):1293-306.
- 327.Zhang DE, Hetherington CJ, Chen HM, Tenen DG. The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(1):373-81.
- 328.Trivedi AK, Bararia D, Christopheit M, Peerzada AA, Singh SM, Kieser A, et al. Proteomic identification of C/EBP-DBD multiprotein complex: JNK1 activates stem cell regulator C/EBPalpha by inhibiting its ubiquitination. *Oncogene*. 2007;26(12):1789-801.
- 329.Heath V, Suh HC, Holman M, Renn K, Gooya JM, Parkin S, et al. C/EBPalpha deficiency results in hyperproliferation of hematopoietic progenitor cells and disrupts macrophage development in vitro and in vivo. *Blood*. 2004;104(6):1639-47.
- 330.Bruner JK, Ma HS, Li L, Qin ACR, Rudek MA, Jones RJ, et al. Adaptation to TKI Treatment Reactivates ERK Signaling in Tyrosine Kinase-Driven Leukemias and Other Malignancies. *Cancer research*. 2017;77(20):5554-63.
- 331.Choudhary C, Schwäble J, Brandts C, Tickenbrock L, Sargin B, Kindler T, et al. AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood*. 2005;106(1):265-73.
- 332.Plataniias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*. 2003;101(12):4667-79.
- 333.Morgan MA, Dolp O, Reuter CW. Cell-cycle-dependent activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK-1/2) in myeloid leukemia cell lines and induction of growth inhibition and apoptosis by inhibitors of RAS signaling. *Blood*. 2001;97(6):1823-34.
- 334.Milella M, Kornblau SM, Estrov Z, Carter BZ, Lapillonne H, Harris D, et al. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(6):851-9.
- 335.Tanaka T, Kurokawa M, Ueki K, Tanaka K, Imai Y, Mitani K, et al. The extracellular signal-regulated kinase pathway phosphorylates AML1, an acute myeloid leukemia gene product, and potentially regulates its transactivation ability. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(7):3967-79.

336. Moon DO, Kim MO, Kang CH, Lee JD, Choi YH, Kim GY. JNK inhibitor SP600125 promotes the formation of polymerized tubulin, leading to G2/M phase arrest, endoreduplication, and delayed apoptosis. *Experimental & molecular medicine*. 2009;41(9):665-77.
337. Cripe LD, Gelfanov VM, Smith EA, Spigel DR, Phillips CA, Gabig TG, et al. Role for c-jun N-terminal kinase in treatment-refractory acute myeloid leukemia (AML): signaling to multidrug-efflux and hyperproliferation. *Leukemia*. 2002;16(5):799-812.
338. Hartman AD, Wilson-Weekes A, Suvannasankha A, Burgess GS, Phillips CA, Hinchey KJ, et al. Constitutive c-jun N-terminal kinase activity in acute myeloid leukemia derives from Flt3 and affects survival and proliferation. *Experimental hematology*. 2006;34(10):1360-76.
339. Elsässer A, Franzen M, Kohlmann A, Weisser M, Schnittger S, Schoch C, et al. The fusion protein AML1-ETO in acute myeloid leukemia with translocation t(8;21) induces c-jun protein expression via the proximal AP-1 site of the c-jun promoter in an indirect, JNK-dependent manner. *Oncogene*. 2003;22(36):5646-57.
340. Lin X, Fang Q, Chen S, Zhe N, Chai Q, Yu M, et al. Heme oxygenase-1 suppresses the apoptosis of acute myeloid leukemia cells via the JNK/c-JUN signaling pathway. *Leukemia research*. 2015;39(5):544-52.
341. Schaar DG, Liu H, Sharma S, Ting Y, Martin J, Krier C, et al. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced dual-specificity phosphatase expression and AML cell survival. *Leukemia research*. 2005;29(10):1171-9.
342. Bashanfer SAA, Saleem M, Heidenreich O, Moses EJ, Yusoff NM. Disruption of MAPK1 expression in the ERK signalling pathway and the RUNX1-RUNX1T1 fusion gene attenuate the differentiation and proliferation and induces the growth arrest in t(8;21) leukaemia cells. *Oncology reports*. 2019;41(3):2027-40.
343. Watanabe D, Nogami A, Okada K, Akiyama H, Umezawa Y, Miura O. FLT3-ITD Activates RSK1 to Enhance Proliferation and Survival of AML Cells by Activating mTORC1 and eIF4B Cooperatively with PIM or PI3K and by Inhibiting Bad and BIM. *Cancers*. 2019;11(12).
344. Radomska HS, Bassères DS, Zheng R, Zhang P, Dayaram T, Yamamoto Y, et al. Block of C/EBP alpha function by phosphorylation in acute myeloid leukemia with FLT3 activating mutations. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(2):371-81.
345. Du W, Xu A, Huang Y, Cao J, Zhu H, Yang B, et al. The role of autophagy in targeted therapy for acute myeloid leukemia. *Autophagy*. 2020:1-15.
346. Zou Q, Tan S, Yang Z, Zhan Q, Jin H, Xian J, et al. NPM1 Mutant Mediated PML Delocalization and Stabilization Enhances Autophagy and Cell Survival in Leukemic Cells. *Theranostics*. 2017;7(8):2289-304.
347. Isakov N. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Seminars in cancer biology*. 2018;48:36-52.
348. Raghuvanshi R, Bharate SB. Preclinical and Clinical Studies on Bryostatins, A Class of Marine-Derived Protein Kinase C Modulators: A Mini-Review. *Current topics in medicinal chemistry*. 2020;20(12):1124-35.
349. Kortmansky J, Schwartz GK. Bryostatin-1: a novel PKC inhibitor in clinical development. *Cancer investigation*. 2003;21(6):924-36.
350. Nelson TJ, Alkon DL. Neuroprotective versus tumorigenic protein kinase C activators. *Trends in biochemical sciences*. 2009;34(3):136-45.
351. Zeng N, Xu Y, Wu Y, Hongbo T, Wu M. Bryostatin 1 causes attenuation of TPA-mediated tumor promotion in mouse skin. *Molecular medicine reports*. 2018;17(1):1077-82.
352. Kraft AS, Smith JB, Berkow RL. Bryostatin, an activator of the calcium phospholipid-dependent protein kinase, blocks phorbol ester-induced differentiation of human promyelocytic leukemia cells HL-60. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(5):1334-8.
353. Stone RM, Sariban E, Pettit GR, Kufe DW. Bryostatin 1 activates protein kinase C and induces monocytic differentiation of HL-60 cells. *Blood*. 1988;72(1):208-13.

- 354.Li Y, Mohammad RM, al-Katib A, Varterasian ML, Chen B. Bryostatin 1 (bryo1)-induced monocytic differentiation in THP-1 human leukemia cells is associated with enhanced c-fyn tyrosine kinase and M-CSF receptors. *Leukemia research*. 1997;21(5):391-7.
- 355.Song XD, Norman AW. Bryostatin-1 and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 synergistically stimulate the differentiation of NB4 acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia*. 1999;13(2):275-81.
- 356.Wall NR, Mohammad RM, Al-Katib AM. Mitogen-activated protein kinase is required for bryostatin 1-induced differentiation of the human acute lymphoblastic leukemia cell line Reh. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;12(12):641-7.
- 357.Keck GE, Poudel YB, Rudra A, Stephens JC, Kedei N, Lewin NE, et al. Role of the C8 gem-dimethyl group of bryostatin 1 on its unique pattern of biological activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2012;22(12):4084-8.
- 358.Baumann DO, McGowan KM, Kedei N, Peach ML, Blumberg PM, Keck GE. Synthesis and Biological Evaluation of Several Bryostatin Analogues Bearing a Diacylglycerol Lactone C-Ring. *The Journal of organic chemistry*. 2016;81(17):7862-83.
- 359.Cooke M, Casado-Medrano V, Ann J, Lee J, Blumberg PM, Abba MC, et al. Differential Regulation of Gene Expression in Lung Cancer Cells by Diacylglycerol-Lactones and a Phorbol Ester Via Selective Activation of Protein Kinase C Isozymes. *Scientific reports*. 2019;9(1):6041.
- 360.Hardman C, Ho S, Shimizu A, Luu-Nguyen Q, Sloane JL, Soliman MSA, et al. Synthesis and evaluation of designed PKC modulators for enhanced cancer immunotherapy. *Nature communications*. 2020;11(1):1879.
- 361.Garcia-Bermejo ML, Leskow FC, Fujii T, Wang Q, Blumberg PM, Ohba M, et al. Diacylglycerol (DAG)-lactones, a new class of protein kinase C (PKC) agonists, induce apoptosis in LNCaP prostate cancer cells by selective activation of PKCalpha. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(1):645-55.

LISTA SKRAĆENICA:

- 4EBP1 - engl. *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*
- 6-FAM - 6-karboksifluorescein
- Abl - Abelsonova tirozin kinaza (engl. *Abelson tyrosine kinase*)
- ALFY - engl. *autophagy-linked FYVE-domain containing protein*
- AMBRA1 - engl. *activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy protein 1*
- AML - akutna mijeloidna leukemija
- AMPK - engl. *adenosine monophosphate-dependent kinase*
- AP-1 - engl. *activating protein-1*
- Apg8p - engl. *autophagy defective mutant 8p*
- APL - akutna promijelocitna leukemija
- ASK1 - engl. *apoptosis signal-regulating kinase 1*
- ATF2 - aktivirajući transkripcioni faktor 2 (engl. *activating transcription factor 2*)
- ATG - engl. *AuTophagy-related*
- ATP - engl. *adenosine triphosphate*
- ATRA - retinoična kiselina (engl. *all trans retinoic acid*)
- BAF - bafilomicin A1
- Bcl-2 - engl. *B-cell lymphoma 2*
- Bcl-XL - engl. *B-cell lymphoma-extra large*
- BCR - engl. *breakpoint cluster region*
- beklin-1- engl. *coiled-coil, moesin-like BCL2-interacting protein*
- BIF-1 - engl. *Bax-interacting factor 1*
- BIM - engl. *Bcl2-interacting mediator of cell death*
- C/EBP α - engl. *CCAAT/enhancer-binding protein α*
- CDC37 - engl. *cell division cycle 37*
- CEB - engl. *cytosol extraction buffer*
- C-FOS - engl. *cellular FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog*
- c-KIT - engl. *c-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*
- C-MYC- engl. *cellular avian myelocytomatosis virus oncogene*
- CREB - engl. *cAMP response element-binding protein*
- c-Src - engl. *cellular sarcoma*

DAG – diacilglicerol

DEPTOR - engl. *DEP domain containing MTOR-interacting protein*

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina,

DNMT3A- DNK metiltransferaza 3A (engl. *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A*)

dNTP - dezoksiribonukleotid-trifosfat

DTT - ditiotreitrol

E2F1- engl. *E2F transcription factor 1*

EGR1 - engl. *early growth response protein 1*

ER – endoplazmatični retikulum

ERK - kinaza regulisana vanćelijskim signalima (engl. *extracellular signal-regulated-kinase*)

ETO - engl. *Eight-Twenty-One*

FACS - engl. *fluorescence-activated cell sorting*

FCS - fetalni serum teleta (engl. *fetal calf serum*)

FIP200 - engl. *focal adhesion kinase family kinase interacting protein of 200 kDa*

FITC - fluorescein izotiocijanat (engl. *fluorescein isothiocyanate*)

FLT3 - engl. *FMS-like tyrosine kinase 3*

FLT3-ITD - engl. *FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication*

FOS - engl. *FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog*

FOXO - engl. *forkhead box O*

FXR- engl. *farnesoid X receptor*

GABARAP - engl. *γ-aminobutyric acid receptor-associated proteins*

GAPDH - engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GATA - engl. *GATA binding protein*

GM-CSF - GM-CSF, engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GPCR - receptor sa kuplovanim G proteinom

GRB2 - engl. *growth factor receptor-bound protein 2*

GSK3β - engl. *glycogen synthase kinase 3 β*

GTP-aza - engl. *guanosine triphosphatase*

HIF1α - engl. *hypoxia-inducible factor 1 alpha*

HL-60 ćelijska linija - (engl. *human leukemia cell line*)

HMGB1 - engl. *high mobility group box 1*

H-RAS - engl. *Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*

HSC - hematopoetske stem ćelije (engl. *hematopoietic stem cell*)

HSP90 - engl. *heat shock protein 90*

IDH - izocitratdehidrogenaza (engl. *isocitrate dehydrogenase*)

JNK - kinaza N-terminalnog domena C-JUN (engl. *c-Jun N-terminal kinase*)

KRAS - engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

LC3 - engl. *light chain 3*

LIR- engl. *LC3-interacting region*

MAP1LC3 - engl. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*

MAPK- mitogenom aktivirane protein kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase*)

MAPKK - kinaza MAP kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*)

MAPKKK - kinaza kinaze MAP kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*)

MEB - engl. *membrane extraction buffer*

MiT/TFE - engl. *microphthalmia/transcription factor E*

MITF - engl. *melanocyte inducing transcription factor*

MLK2 - engl. *mixed-lineage kinase*

mLST8 - engl. *mammalian lethal with Sec13 protein 8*

M-MuLV (engl. *Moloney Murine Leukemia Virus RevertAid Reverse Transcriptase*)

mTORC1 - engl. *mechanistic target of rapamycin complex 1*

Munk13 - engl. *mammalian homolog of Caenorhabditis elegans uncoordinated gene 13*

Na₃VO₄ - natrijum-ortovanadat

NAC - N-acetilcistein

NaF - natrijum-fluorid

NBR1- engl. *neighbor of BRCA1 gene 1*

NDP52 - engl. *nuclear dot protein 52 kDa*

NEB - engl. *nuclear extraction buffer*

NF-κB - engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NLK kinaza - engl. *Nemo-like kinase*

NRAS - engl. *neuroblastoma ras viral oncogene homolog*

PBS - fosfatni puffer (engl. *phosphate-buffered saline*)

PDK-1 - engl. *phosphoinositide-dependent kinase 1*

PE - fikoeritrin (engl. *phycoerythrin*)

PHLPP - engl. *pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase*

PI - propidijum jodid

PI3KC3-C1 - engl. *complex I class III phosphatidylinositol 3-kinase*

PIP2 - fosfatidilinozitol-4,5-difosfat

PKC - protein kinaza C (engl. *protein kinase C*)

PMA - forbol 12-miristat 13-acetat (engl. *phorbol 12-myristate 13-acetate*)

PML - protein promijelocitne leukemije (engl. *promyelocytic leukemia protein*)

PMSF - fenil-metil-sulfonil-fluorid

PP2A - engl. *protein phosphatase 2*

PPAR α - engl. *Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha*

PRAS40 - engl. *proline Akt substrate of 40 kDa*

PU.1 - engl. *purine rich box-1*

qRT-PCR - engl. *real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*

RAC-1 - engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*

RACK1 - engl. *receptor for activated C kinase 1*

RAF - engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*

RAPTOR - engl. *regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin*

RAR α - receptor retinoične kiseline α (engl. *retinoic acid receptor alpha*)

RHEB - engl. *ras homolog enriched in brain*

RIP - engl. *receptor interacting protein*

RKV - reaktivne kisonične vrste

RNK - ribonuklesinska kiselina

RPMI - engl. *Roswell Park Memorial Institute Medium 1640*

RUBICON - engl. *RUN domain protein as Beclin-1 interacting and cysteine-rich containing protein*

RUNX1 - engl. *Runt-related transcription factor 1*

S6K1 - engl. *p70 ribosomal S6 kinase, S6K1*

SAPK - stresom aktivirana protein kinaza (engl. *stress-activated protein kinase*)

SDS - natrijum dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulphate*)

siRNK - engl. *small interfering RNA*

SNARE- engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors*

SOS - engl. *son of sevenless*

TAK1 - engl. *transforming growth factor- β -activated kinase 1*

TFE3 - engl. *transcription factor binding to IGHM enhancer 3*

TFEB - engl. *transcription factor EB*

TGF- β - engl. *Transforming growth factor beta*

TNF α - engl. *Tumour Necrosis Factor alpha*

TPA - 12-O-tetradekanoilforbol-13-acetat (engl. *12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate*)

TSC - engl. *tuberous sclerosis complex*

UBA - engl. *ubiquitin-associated domain*

ULK - engl. *Unc-51 like autophagy activating kinase-1*

UVRAG - engl. *ultraviolet irradiation resistance-associated gene*

VPS34 - engl. *vesicular protein sorting 34*

WIPI4 - engl. *WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein*

ZKSCAN3 - engl. *zinc-finger protein with Kruppel-associated box and SCAN domains 3*

BIOGRAFIJA

Miloš Z. Mandić je rođen 12.3.1990. u Pančevu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisao školske 2009/2010. godine. Osnovne akademske studije smera Molekularna biologija i fiziologija je završio sa prosečnom ocenom 9,58, a master studije smera Humana molekularna biologija sa prosečnom ocenom 10,00. Doktorske akademske studije studijskog programa Molekularna medicina je upisao školske 2014/15. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od maja 2015. godine do 2019. godine je bio angažovan na projektu MPNTR III41025 „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske balans u terapiji tumora i neuroimuno-endokrinih poremećaja“, kojim je rukovodio prof. dr Vladimir Trajković na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od maja 2015. do marta 2017. godine je bio angažovan na projektu kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od 2020. godine je angažovan na projektu MPNTR Medicinskog fakulteta (evidencioni broj 200110). Od januara 2021. godine do decembra 2022. godine je bio učesnik na COVID-19 projektu Fonda za nauku „Uloga autofagije u imunskoj disregulaciji prouzrokovanoj SARS-CoV-2 infekcijom“ (TACTICIAN, evidencioni broj 7552006) kojim je rukovodio prof. dr Vladimir Trajković.

Zvanje istraživač pripravnik u oblasti Molekularne medicine je stekao marta 2017. godine, dok je zvanje istraživač saradnik u oblasti Molekularne medicine stekao septembra 2020. godine odlukom Naučnog veća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Miloš je posetio Univerzitet u Njukaslju u Velikoj Britaniji u okviru „TRANSAUTOPHAGY COST“ akcije. Koautor je 5 rada objavljena u celini u međunarodnim časopisima. Miloš je član Srpskog društva za molekularnu biologiju, Nordijskog društva za autofagiju i Društva Imunologa Srbije.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Miloš Mandić

broj indeksa: MM-06/14

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Interakcija mitogenom aktiviranih protein kinaza i autofagije u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija u makrofage forbol-12-miristat-13-acetatom“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 14.9.2022.

Potpis doktoranda

Milovan Mandić

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Miloš Mandić

Broj indeksa: MM-06/14

Studijski program: Molekularna medicina

Naslov rada: „Interakcija mitogenom aktiviranih protein kinaza i autofagije u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija u makrofage forbol-12-miristat-13-acetatom“

Mentor: prof. dr Vladimir Trajković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Komentor: dr Maja Misirkić Marjanović, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

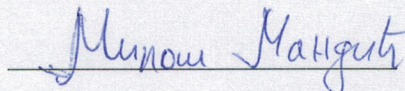
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 14.9.2022.

Potpis doktoranda



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Interakcija mitogenom aktiviranih protein kinaza i autofagije u diferencijaciji HL-60 leukemijskih ćelija u makrofage forbol-12-miristat-13-acetatom“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, 14.9.2022.

Potpis doktoranda

Muraw Margita

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo - nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.