

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marina M. Stamenković**

**Mehanizmi citotoksičnosti farmakoloških  
inhibitora autofagije *in vitro***

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2021.**



**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE**

**Marina M. Stamenković**

**Cytotoxicity mechanisms of pharmacological  
autophagy inhibitors *in vitro***

**Doctoral dissertation**

**Belgrade, 2021.**



## **PODACI O ČLANOVIMA KOMISIJE:**

### **Mentor**

---

Dr Vladimir Trajković, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

### **Komentor**

---

Dr Kristina Janjetović, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

### **Članovi komisije**

---

Dr Ivanka Marković, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

---

Dr Aleksandra Isaković, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

---

Dr Silvana Andrić, redovni profesor  
Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet

---

Dr Dušan Popadić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

---

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



## Zahvalnica

*Istraživanje iz kojeg je proistekla ova doktorska disertacija je urađeno u laboratorijama Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju i Instituta za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“, Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu. Istraživanje je realizovano u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“, broj III41025 čiji je rukovodilac prof. dr Vladimir Trajković.*

*Zahvaljujem se:*

*Svom mentoru, profesoru dr Vladimiru Trajkoviću na dragocenim savetima tokom svih naučno-istraživačkih koraka, strogom, ali pravičnom rukovođenju prilikom izrade ove doktorske teze i rada koji je iz nje proizašao, podršci i poverenju da svoje ideje realizujem iako smo često ispoljavali međusobno antagonističko dejstvo. Nadam se da će jednog dana učenik biti barem jednako dobar kao i učitelj;*

*Svom komentoru, naučnom saradniku dr Kristini Janjetović, mojoj divnoj učiteljici koja je nesebično delila svoje veliko znanje i iskustvo sa mnom, koja me je usmeravala od prvih dečjih koraka u nauci i imala strpljenja za sve moje nestašluke, koja me je oplemenila kao čoveka i zbog koje se i dan danas trudim da budem bolja osoba. Uz malo tuge i mnogo smeha, stigle smo do cilja!*

*Poštovanim članovima komisije prof. dr Ivanki Marković, prof. dr Aleksandri Isaković, prof. dr Silvani Andrić, na uloženom trudu i pomoći pri oblikovanju konačne verzije disertacije, na njihovom velikom razumevanju, dobroti i podršci koju nikada neću zaboraviti;*

*Poštovanom članu komisije, profesoru dr Dušanu Popadiću, koji je indukovao citoprotektivnu autofagiju svaki put kada bi primetio da se sprema apoptoza mog entuzijazma, na svim savetima prilikom pisanja i oblikovanja ove teze i svemu čemu me je naučio proteklih godina;*

*Poštovanom članu komisije, višem naučnom saradniku dr Ljubici Vučićević, na uloženom trudu i pomoći u eksperimentalnom radu i oblikovanju konačne verzije ove doktorske disertacije, na njenom entuzijazmu, inventivnosti i ljubavi prema nauci koja me svakodnevno inspiriše;*

*Svim dragim kolegama sa Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, na podršci i razumevanju. Zadovoljstvo je i privilegija raditi sa vama!*

*Svojim roditeljima koji su mi tokom svih ovih godina bili oslonac i pružali безусловnu ljubav i podršku, svom starijem bratu koje me naučio da treba zadržati dečji duh i kada odrasteš;*

*Svom suprugu, Draganu Stamenkoviću, svom ličnom AMPK senzoru na... apsolutno svemu!*





***Mojoj mamuški***



# Mehanizmi citotoksičnosti farmakoloških inhibitora autofagije *in vitro*

## Sažetak

Autofagija predstavlja proces razgradnje dotrajalih ćelijskih proteina i organela u autolizozomima koji nastaju spajanjem autofagozoma i lizozoma. Brojni dokazi o citoprotektivnom efektu autofagije kod tumora omogućili su pretklinička i klinička istraživanja zasnovana na kombinovanju farmakoloških inhibitora autofagije i hemioterapeutika. Bafilomicin, hlorokin i amonijum hlorid su lizozomalni inhibitori autofagije (LIA) koji sprečavaju razgradnju sadržaja u autolizozomima blokadom V-ATPazne protonske pumpe, inhibicijom kiselih lizozomalnih hidrolaza ili blokadom fuzije lizozoma i autofagozoma. Nedavno je pokazano da i lekovi koji smanjuju želudačnu kiselost inhibicijom gastrične H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaze, kao što je pantoprazol, mogu da ispoljavaju citotoksično dejstvo na maligne ćelije modulacijom autofagije. Upotreba LIA u istraživanjima i terapiji je ograničena zbog nespecifičnih efekata koji zavise od primenjene doze i dužine tretmana, kao i od sposobnosti da indukuju ćelijsku smrt nezavisno od inhibicije autofagije. Uzevši u obzir da molekularni mehanizmi ove pojave nisu u potpunosti razjašnjeni, u ovom istraživanju je prvi put sprovedena uporedna analiza citotoksičnosti farmakoloških inhibitora autofagije na ćelijama mišjeg melanoma (B16) i humanog glioma (U251). Zbog potrebe za selektivnijim i manje toksičnim inhibitorima autofagije, ispitani su molekularni mehanizmi citotoksičnosti pantoprazola i mogućnost njegove upotrebe kao farmakološkog inhibitora autofagije.

Rezultati sprovedenog istraživanja pokazali su da sva tri LIA i pantoprazol indukuju apoptozu tumorskih ćelija praćenu produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta, depolarizacijom mitohondrija, aktivacijom kaspaza i povećanom razgradnjom njihovog glavnog supstrata, PARP-1, kao i fragmentacijom DNK. Farmakološkom inhibicijom kaspaza potvrđena je uloga ovih enzima u apoptozi indukovanoj LIA, dok je učešće katepsina iz oštećenih lizozoma u ovom procesu bilo jedinstveno svojstvo hlorokina. Sva tri lizozomalna inhibitora indukovala su nakupljanje autofagozoma i autolizozoma u tumorskim ćelijama, uz povećanu konverziju LC3-I u LC3-II (engl. *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) i smanjenje unutarćelijske kiselosti, što je u skladu sa inhibicijom autofagije. Međutim, genetska inhibicija LC3, neophodnog za nastanak autofagozoma, nije uticala na preživljavanje tumorskih ćelija nakon tretmana LIA, ukazujući da je njihovo pro-apoptotsko dejstvo bilo nezavisno od inhibicije autofagije. LIA su pokazali različite obrasce modulacije pro-apoptotskih i anti-apoptotskih molekula, kao i aktivacije MAP kinaza (engl. *Mitogen activated protein kinase*) i AMPK (engl. *Adenosine monophosphate-activated protein kinase*), što je bio uzrok njihovog međusobnog antagonizma u ubijanju malignih ćelija. Za razliku od LIA, pantoprazol je u ćelijama tumora aktivirao citoprotektivnu autofagiju praćenu ekspresijom iRNK za različite Atg gene koji regulišu ovaj proces. Indukcija autofagije pantoprazolom bila je praćena aktivacijom energetskog senzora AMPK i inhibicijom fosforilacije AKT, kao i ULK1 i S6K, supstrata glavnog negativnog regulatora autofagije, mTOR-a (engl. *Mechanistic target of rapamycin*). Genetska i farmakološka inhibicija pokazala je da citoprotektivna autofagija indukovana pantoprazolom zavisi od AMPK i Beklina-1, kao i od p38 MAP kinaze, koja je dodatno učestvovala u indukciji ER stresa i aktivaciji transkripcionog faktora CHOP.

U zaključku, iako sva tri LIA dovode do inhibicije autofagije u tumorskim ćelijama, njihova citotoksičnost je nezavisna od ovog efekta i posredovana je različitim mehanizmima koji uključuju modulaciju ekspresije pro- i anti-apoptotskih molekula, lizozomalnu permeabilizaciju i promenu aktivnosti AMPK i MAPK signalnih puteva. Sa druge strane,

pantoprazol aktivira citoprotektivnu autofagiju uticajem na AMPK/AKT/mTOR signalnu osovину i indukcijom ER stresa zavisnog od p38 MAPK. Ovi rezultati ukazuju na oprez u interpretaciji bioloških efekata farmakoloških inhibitora i modulatora autofagije u bazičnim i kliničkim istraživanjima, ali istovremeno pružaju nove mogućnosti za unapređenje njihovih antitumorskih efekata kombinovanjem sa farmakološkim modulatorima AMPK i MAP kinaza.

**KLJUČNE REČI:** bafilomicin, hlorokin, amonijum hlorid, pantoprazol, autofagija

**NAUČNA OBLAST:** Medicina

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Molekularna medicina

**UDK:** 611/612

# Cytotoxicity mechanisms of pharmacological autophagy inhibitors *in vitro*

## Abstract

Autophagy is the process of breaking down old and damaged cellular proteins and organelles in autolysosomes, which are formed by fusion of autophagosomes and lysosomes. Numerous evidence of cytoprotective autophagy in tumors enabled preclinical and clinical studies based on a combination of pharmacological autophagy inhibitors and chemotherapeutics. Bafilomycin, chloroquine, and ammonium chloride are lysosomal inhibitors of autophagy (LIA) that prevent cytoplasmic content degradation in autolysosomes by blocking the V-ATPase proton pump, inhibiting acidic lysosomal hydrolases, or preventing the fusion of lysosomes with autophagosomes. Recently, it has been shown that drugs such as pantoprazole, which reduce gastric acidity by inhibiting gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, exert a cytotoxic effect on tumor cells by autophagy modulation. The use of LIA in research and therapy is limited due to nonspecific effects that depend on the applied dose and the incubation time, as well as the ability to induce cell death independently of autophagy inhibition. Since the molecular mechanisms of this phenomenon have not been fully elucidated, the present study for the first time performed a comparative analysis of the cytotoxicity of pharmacological autophagy inhibitors on mouse melanoma (B16) and human glioma (U251) cells. Considering the need for more selective and less toxic autophagy inhibitors, the molecular mechanisms of cytotoxicity of pantoprazole and the possibility of its use as a pharmacological autophagy inhibitor were also investigated.

The results of this research showed that all three LIA and pantoprazole induce apoptotic death of cancer cells associated with the production of reactive oxygen species, mitochondrial depolarization, caspase activation and increased degradation of their main substrate, PARP-1, as well as DNA fragmentation. The role of caspases in LIA-induced apoptosis was confirmed by their pharmacological inhibition, while the involvement of cathepsins in this process was a unique property of chloroquine. All three lysosomal inhibitors, consistent with autophagy inhibition in tumor cells, induced the accumulation of autophagosomes and autolysosomes with the increased conversion of LC3-I to LC3-II (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*), and the decrease in intracellular acidity. However, the genetic inhibition of LC3, protein necessary for autophagosome formation, did not affect the survival of cancer cells after treatment with LIA, indicating that their pro-apoptotic action was independent of autophagy inhibition. LIA showed different patterns in modulating expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic molecules, as well as activation of MAP kinases (*Mitogen activated protein kinase*) and AMPK (*Adenosine monophosphate-activated protein kinase*), which caused their mutual antagonism in cancer cell killing. Unlike LIA, pantoprazole induced cytoprotective autophagy in tumor cells, associated with the increase in mRNA expression of different Atg genes involved in regulation of this process. Autophagy induction by pantoprazole was accompanied by the activation of the energy sensor AMPK and decrease in the phosphorylation of AKT, as well as ULK1 and S6K, the substrates of mTOR (*Mechanistic target of rapamycin*), the major negative regulator of autophagy. Genetic and pharmacological inhibition showed that cytoprotective autophagy induced by pantoprazole is mediated by AMPK and Beclin-1, as well as by p38 MAP kinase, which additionally participated in the induction of ER stress and activation of CHOP transcription factor. In conclusion, although all three LIA inhibit autophagy in cancer cells, their cytotoxicity is autophagy-independent and mediated by various mechanisms, including modulation of pro- and anti-apoptotic molecule expression, lysosomal permeabilization, and alteration of AMPK and MAPK signaling pathways. On the other hand, pantoprazole activates

cytoprotective autophagy by influencing the AMPK/AKT/mTOR signaling axis and by inducing p38 MAPK-dependent ER stress. These results warrant caution when interpreting the biological effects of pharmacological inhibitors and autophagy modulators in basic and clinical research, but at the same time provide new opportunities to enhance their antitumor effects by combining them with pharmacological modulators of AMPK and MAP kinases.

**KEY WORDS:** bafilomycin, chloroquine, ammonium chloride, pantoprazole, autophagy

**SCIENTIFIC FIELD:** Medicine

**SPECIALISED SCIENTIFIC FIELD:** Molecular medicine

**UDC:** 611/612

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b>	
1.1. Autofagija .....	1
1.1.1. Osnove procesa, klasifikacija i regulacija .....	1
1.1.2. Uloga autofagije u nastanku tumora i njihovom lečenju citotoksičnim agensima .....	5
1.2. Apoptoza i interakcija sa autofagijom .....	8
1.3. Farmakološki inhibitori autofagije .....	12
<b>2. Ciljevi</b> .....	19
<b>3. Materijal i metode</b>	
3.1. Reagensi i rastvori .....	23
3.2. Čelijske kulture .....	24
3.3. Testovi vijabilneta .....	24
3.3.1. MTT test .....	24
3.3.2. Kristal violet test .....	25
3.3.3. Fazno-kontrastna mikroskopija .....	25
3.4. Analiza parametara čelijske smrti, produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta, depolarizacije mitohondrija i autofagije metodom protočne citofluorimetrije .....	25
3.4.1. Određivanje faza čelijskog ciklusa i ispitivanje prisustva fragmentirane DNK .....	25
3.4.2. Određivanje apoptoze i nekroze .....	26
3.4.3. Određivanje aktivacije kaspaza .....	26
3.4.4. Određivanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta .....	27
3.4.5. Određivanje potencijala membrane mitohondrija .....	27
3.4.6. Određivanje autofagije u ćelijama .....	28
3.5. Imunoblot analiza .....	28
3.5.1. Određivanje koncentracije proteina .....	28
3.5.2. Priprema uzoraka i denaturišuća gel elektroforeza ( <i>SDS page</i> ) .....	29
3.5.3. Imunoblot i detekcija proteina .....	29
3.6. Ultrastrukturalna analiza ćelija transmisivnom elektronskom mikroskopijom (TEM) .....	30
3.7. Konfokalna fluorescentna mikroskopija .....	30
3.8. Određivanje nivoa ekspresije iRNK gena značajnih za apoptozu i autofagiju .....	31
3.8.1. Izolacija RNK .....	31
3.8.2. Revertzna transkripcija .....	31
3.8.3. Reakcija lančanog umnožavanja sa detekcijom proizvoda u realnom vremenu .....	32
3.9. Transfekcija malom interferirajućom RNK .....	33
3.10. Chou-Talalay metod .....	33
3.11. Statistička analiza .....	33
<b>4. Rezultati</b>	
4.1. LIA smanjuju vijabilitet ćelija mišjeg melanoma .....	37
4.2. LIA menjaju morfologiju ćelija mišjeg melanoma .....	37
4.3. LIA uzrokuju apoptozu ćelija mišjeg melanoma .....	38
4.4. LIA indukuju smrt ćelija melanoma zavisnu od kaspaza .....	38
4.5. LIA uzrokuju depolarizaciju mitohondrija i oksidativni stres u ćelijama mišjeg melanoma .....	39
4.6. LIA na različit način regulišu ravnotežu između pro-apoptotskih i anti-apoptotskih molekula u ćelijama melanoma .....	41
4.7. LIA indukuju akumulaciju autofagozoma i autolizozoma u ćelijama melanoma .....	42
4.8. LIA smanjuju unutarćelijsku kiselost i dovode do inhibicije autofagnog fluksa u ćelijama melanoma .....	42
4.9. LIA indukuju apoptozu ćelija melanoma nezavisno od inhibicije autofagije .....	43
4.10. Lizozomalni katepsini su uključeni u ćelijsku smrt izazvanu hlorokinom, ali ne i bafilomicinom ili amonijum hloridom .....	44
4.11. Citotoksični efekat LIA je nezavisan od inhibicije mTOR kinaze u ćelijama melanoma .....	44
4.12. p38 MAPK različito deluje na citotoksičnost LIA u ćelijama melanoma .....	45
4.13. ERK štiti ćelije melanoma od citotoksičnosti hlorokina .....	46
4.14. JNK štiti ćelije melanoma od citotoksičnosti amonijum hlorida .....	47
4.15. AMPK štiti ćelije od citotoksičnosti bafilomicina .....	48

4.16.	LIA međusobno ispoljavaju antagonističko dejstvo .....	48
4.17.	LIA smanjuju vijabilitet U251 ćelija glioma .....	48
4.18.	LIA menjaju morfologiju ćelija humanog glioma .....	48
4.19.	Obrazac aktivacije MAPK i AMPK signalnog puta u citotoksičnom dejstvu LIA na U251 ćelija humanog glioma.....	50
4.20.	Pantoprazol smanjuje vijabilitet ćelija mišjeg melanoma .....	52
4.21.	Pantoprazol menja morfologiju ćelija mišjeg melanoma .....	52
4.22.	Pantoprazol izaziva fragmentaciju DNK molekula i apoptozu ćelija mišjeg melanoma .....	52
4.23.	Pantoprazol izaziva oksidativni stres i aktivira kaspaze u ćelijama mišjeg melanoma .....	54
4.24.	Pantoprazol smanjuje unutarćelijsku kiselost kod ćelija mišjeg melanoma .....	54
4.25.	Pantoprazol povećava nivo LC3-II i smanjuje nivo p62 u ćelijama mišjeg melanoma .....	55
4.26.	Pantoprazol aktivira autofagni fluks u B16 ćelijama .....	55
4.27.	Pantoprazol u ćelijama melanoma povećava ekspresiju ključnih gena koji regulišu autofagiju .....	56
4.28.	Pantoprazol aktivira AMPK i inhibira AKT/mTOR u B16 ćelijama .....	57
4.29.	AMPK i Beklin-1 štite ćelije mišjeg melanoma od citotoksičnosti pantoprazola.....	58
4.30.	LIA stimulišu citotoksično dejstvo pantoprazola na ćelije mišjeg melanoma .....	59
4.31.	p38 MAPK ne utiče na citotoksičnost pantoprazola u ćelijama mišjeg melanoma .....	60
4.32.	Pantoprazol ispoljava citotoksično dejstvo i dovodi do morfoloških promena kod ćelija humanog glioma.....	60
4.33.	Pantoprazol u ćelijama humanog glioma indukuje apoptozu, oksidativni stres i aktivaciju kaspaza ...	61
4.34.	Pantoprazol aktivira autofagiju u ćelijama humanog glioma U251 .....	63
4.35.	Pantoprazol povećava ekspresiju ključnih Atg gena u U251 ćelijama .....	63
4.36.	AMPK/AKT/mTOR signalni put učestvuje u regulaciji citoprotektivne autofagije u U251 ćelijama tretiranim pantoprazolom .....	63
4.37.	pAMPK ispoljava protektivni efekat na ćelijama humanog glioma tretiranim pantoprazolom .....	64
4.38.	Aktivacija p38 MAPK pantoprazolom ima protektivni efekat u ćelijama humanog glioma .....	66
4.39.	p38 MAPK učestvuje u indukciji autofagije i ER stresa pantoprazolom u ćelijama humanog glioma ...	66
4.40.	Aktivacija AMPK i p38 MAPK pantoprazolom su međusobno nezavisne.....	68
5.	<b>Diskusija</b> .....	71
6.	<b>Zaključci</b> .....	87
7.	<b>Literatura</b> .....	91



## **1. Uvod**



## 1.1. Autofagija

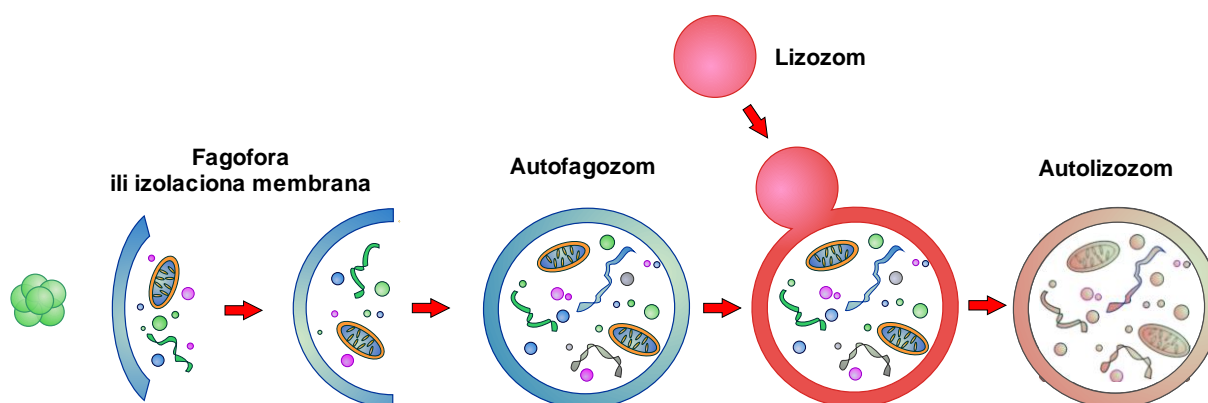
### 1.1.1. Osnove procesa, klasifikacija i regulacija

Autofagija predstavlja evolutivno očuvani proces razgradnje oštećenog i dotrajalog citoplazmatskog sadržaja pomoću lizozoma, sa izuzetno važnom ulogom u preživljavanju, razvoju i održavanju homeostaze eukariotskih ćelija (Yang i Klionsky, 2010). Termin autofagija, sačinjen od grčkih reči „*auto*“, što znači „sebe“ i „*phagein*“, što znači „jesti“, u naučnu zajednicu prvi put 1963. godine uvodi Christian de Duve, koji je ovaj proces detaljnije opisao, a koji se ujedno smatra i osnivačem čitavog istraživačkog polja autofagije (De Duve, 1963, De Duve i Wattiaux, 1966, Klionsky, 2008). Iako je pre više od 50 godina i pojave samog termina, autofagija smatrana samo „mašinerijom“ za reciklažu unutar ćelija, danas se, zahvaljujući ubrzanom razvoju tehnika molekularne biologije, o ovom procesu i njegovoj funkciji zna mnogo više. Od perioda otkrića autofagije pa do danas, interesovanje za ovaj proces sa godinama kontinuirano raste i još uvek je u žiži mnogih istraživanja, uzevši u obzir učešće autofagije kako u fiziološkim, tako i u patološkim dešavanjima u organizmu. O tome svedoči i Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu, koja je 2016. godine dodeljena Jošinoriju Osumiju (*Yoshinori Ohsumi*) za otkriće molekularnih mehanizama autofagije.

U ćelijama sisara definisana su tri tipa autofagije: makroautofagija, koja je do danas najviše izučavana, mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonima – proteinima značajnim u održavanju stabilne konformacije polipeptidnih lanaca (Parzych i Klionsky, 2014). Svaki od ovih procesa, iako poseduje posebne morfološke karakteristike, rezultira konačnom razgradnjom citoplazmatskog sadržaja u lizozomima. Mikroautofagiju odlikuje direktno obuhvatanje dela ćelijske citoplazme, a nekada čak i neoštećenih organela samim lizozomima, nasumičnim pokretima protruzije i uvlačenja njihove membrane (Li i sar., 2012a). Sa druge strane, u autofagiji posredovanoj šaperonima, sadržaj predodređen za razgradnju, a to su najčešće neadekvatno savijeni proteini, identifikuje se šaperonima, a zatim transportuje kroz membranu lizozoma (Kaushik i Cuervo, 2018). Na kraju, makroautofagija (u daljem tekstu zbog jednostavnosti označena kao autofagija) podrazumeva uklanjanje oštećenih, starih organela, kao i nefunkcionalnih proteina koji se izdvajaju iz citoplazme u posebne vezikule sa dvostrukom membranom, tzv. autofagozome. U nastavku procesa, autofagozomi se spajaju sa lizozomima formirajući autolizosome, vezikule sa jednostrukom membranom, u kojima ćelijski sadržaj podleže krajnjoj razgradnji kiselim hidrolazama (**Shema 1**) (Yu i sar., 2018). U većini ćelija i tkiva, bazalni nivo autofagije (tzv. bazalna autofagija) odgovoran je za kontrolu kvaliteta i uklanjanje dotrajalih i oštećenih citoplazmatskih komponenti, ali u određenim uslovima ovaj proces može biti i dodatno aktiviran (Mizushima, 2005). Pokretanje autofagije u cilju proizvodnje energije za preživljavanje neophodno je u uslovima stresa u kojima ćelija može da se nađe zbog nedostatka hranljivih materija, hipoksije i drugih spoljašnjih uticaja koji mogu narušiti homeostazu, kao što su infekcija, zračenje i izlaganje toksičnim materijama (Kroemer i sar., 2010). Zanimljivo je da većina pomenutih patoloških procesa dovodi do nakupljanja neadekvatno savijenih proteina u endoplazmatskom retikulumu, što narušava njegovo normalno funkcionisanje i aktivira odgovor na stres (tzv. ER stres). Novija istraživanja sve više pažnje usmeravaju na proučavanje povezanosti autofagije i ER stresa, posebno u nastanku i progresiji pojedinih bolesti (Ji i sar., 2016, Cai i sar., 2016, Zhang i sar., 2017a).

Da bi što duže preživele u nepovoljnim uslovima kao što su gladovanje, stres i smanjena dostupnost faktora rasta, ćelije se prilagođavaju menjajući svoj metabolizam. Jedna od najranijih metaboličkih promena u ovakvim uslovima podrazumeva inhibiciju anaboličkih procesa sa jedne i pokretanje autofagije sa druge strane. Proces autofagije odvija se kroz nekoliko jasno definisanih stadijuma (**Shema 1**) u kojima učestvuju odgovarajući specijalizovani proteini slični ubikvitinu, nazvani **Atg** (engl. *AuTophagy-related*) proteini (Klionsky i Schulman, 2014). Početak autofagnog procesa obeležava nastanak autofagozoma

učešćem makromolekulskog kompleksa koji čine **ULK1** (engl. *UNC-51-like kinase 1*), **Atg13** i **FIP200** (engl. *Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa*). Za biogenezu ovih organela takođe je neophodna lipidna kinaza **hVps34**, član III klase fosfoinozimid 3-kinaza (engl. *Phosphoinositide 3-kinase, PI3K*), koja predstavlja deo makromolekulskog kompleksa za inicijaciju autofagije sačinjenog od **Beklina-1**, **Atg14L** i **hVps15**. Aktivnost hVps34 se pojačava nakon vezivanja za Beklin-1. U aktivaciji autofagije i stimulaciji maturacije autofagozoma značajni su proteini koji interaguju sa Beklinom-1, pre svega Atg14L, **AMBRA1** (engl. *Activating molecule in Beclin-1-regulated autophagy*), **UVRAG** (engl. *UV irradiation resistance-associated gene*) i **Bif-1** (engl. *Bax-interacting factor 1*) (Liang i sar., 2008, Takahashi i sar., 2007), dok se **Rubicon** (engl. *Run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein*), anti-apoptotski Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) i Bcl-xL (engl. *Bcl-2 related protein, long isoform*) kao i pro-apoptotski **Bim** (engl. *Bcl-2-interacting mediator of cell death*) (Luo i sar., 2012), vezuju za Beklin-1 da bi inhibirali autofagiju. U daljem toku autofagije, aktivira se **Atg12** uz učešće **Atg7** (E1 konjugacioni enzim sličan ubikvitinu) i **Atg10** (E2 aktivirajući enzim sličan ubikvitinu), a zatim se **Atg12** kovalentno spaja sa **Atg5** u jedinstveni kompleks (Ohsumi, 2001, Mizushima i sar., 1998). Nastali **Atg5-Atg12 konjugat** u nastavku procesa formira još veći kompleks vezujući **Atg16L1** (Atg5-Atg12-Atg16L), što je od izuzetnog značaja za elongaciju fagofora i formiranje autofagozoma (Mizushima i sar., 2003). Drugi važan korak u formiranju autofagozoma predstavlja povezivanje proteina **LC3** (engl. *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) sa fosfatidiletanolaminom – **PE**, fosfolipidom koji je sastavna komponenta gotovo svih bioloških membrana.



### Shema 1. Faze autofagije

Proces autofagije podeljen je na nekoliko faza: indukciju, nastanak fagofore (inicijacija) i njeno izduživanje oko određenog citoplazmatičkog sadržaja (elongacija), nastanak autofagozoma (maturacija), fuziju sa lizozomom, razgradnju sadržaja i njegovo ponovno oslobađanje natrag u citoplazmu. Formiranje fagofore na samom početku ovog procesa, oduvek je privlačilo pažnju naučnika i postoji veliki broj pretpostavki o njenom nastanku, a jedna od njih je da fagofore potiču od endoplazmatičkog retikuluma (Sewell i Klionsky, 2018).

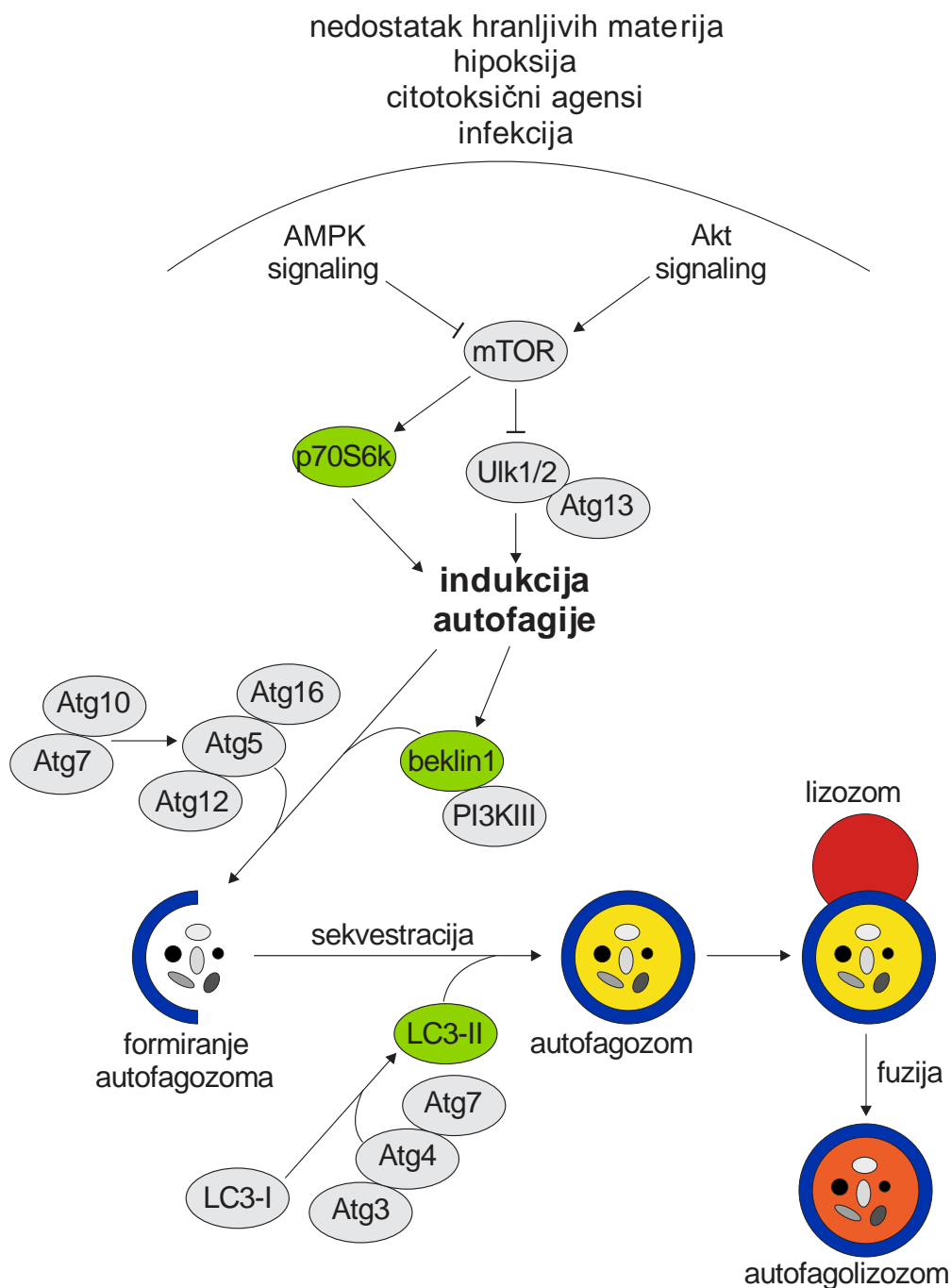
Za razliku od kvasaca, gde postoji samo jedan protein sličan LC3, nazvan Atg 8, kod ljudi postoji čak sedam i podeljeni su na LC3 i GABARAP familiju (engl. *Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*) pri čemu se jedan od njih, **LC3B** (LC3-II), koristi i kao marker izolacionih membrana (Martens, 2016). Ukratko, LC3 protein prolazi kroz post-translacionu obradu nakon koje gubi svoj C-terminalni deo zahvaljujući aktivnosti proteaze **Atg4B**, što rezultira nastankom citoplazmatičke forme **LC3-I**. U nastavku procesa, vezivanjem LC3-I za PE uz učešće **Atg7** i **Atg3** (E2 aktivirajući enzim sličan ubikvitinu) nastaje **LC3-II** forma vezana za autofagozom, glavni marker ove organele (Kabeya i sar., 2000, Tanida i sar., 2004). LC3-II molekuli imaju ulogu u spajanju krajeva fagofora budućih autofagozoma u kojima ostaju tokom svog životnog veka, tako da nivoi ovih molekula koreliraju sa brojem autofagozoma. LC3-II molekuli koji se nalaze

na unutrašnjoj membrani autofagozoma se kasnije razgrađuju u autolizozomima, dok se LC3-II molekulima u unutrašnjosti ovih organela pomoću Atg4 uklanjanju lipidne komponente, a nakon toga se LC3 reciklira. Tokom procesa autofagije, pored LC3, razgradnji podleže i protein **p62**, poznat i kao **sekvestozom 1** (engl. *Sequestosome 1, Sqstm1*) (Pankiv i sar., 2007). Uzevši u obzir da se p62 akumulira kada je autofagija inhibirana, a da se njegovi nivoi smanjuju kada je aktivirana, p62 kao i LC3-II može da se koristi kao marker autofagnog fluksa, pravog merila aktivnosti i sposobnosti razgradnje u procesu autofagije (Bjorkoy i sar., 2009, Loos i sar., 2014). Pored autofagije, protein p62 uključen je i u veliki broj drugih ćelijskih procesa (Sanchez-Martin i Komatsu, 2018). Naredni korak u procesu autofagije koji se sastoji iz dve faze – migracije autofagozoma i fuzije autofagozoma i lizozoma, izuzetno je komplikovan i podrazumeva učešće velikog broja molekula (Nakamura i Yoshimori, 2017). Tako na primer, migraciju autofagozoma omogućava **Rab7** protein koji povezuje ovu organelu sa mikrotubulima (Pankiv i sar., 2010), dok je za proces fuzije zadužena grupa **SNARE** proteina (engl. *Soluble N-ethylmale-imide-sensitive factor-attachment protein receptors*) (Itakura i sar., 2012), kao i pomenuti Rubicon koji pored direktne interakcije sa Rab7 inhibira fuziju dve organele još i fosforilacijom UVRAG proteina (Tabata i sar., 2010, Kim i sar., 2015b).

Među brojnim molekulima koji regulišu indukciju autofagije, centralnu ulogu kako u fiziološkim, tako i u patološkim uslovima ima serin/treonin protein kinaza **mTOR** (engl. *Mechanistic target of rapamycin*). Ovaj enzim pripada familiji kinaza povezanih sa fosfatidilinozitol 3-kinazama (engl. *Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases, PIKKs*) i uobičajeno kontroliše transkripciju, sintezu proteina i metaboličke procese u odgovoru na hranljive materije i faktore rasta. Međutim, mTOR je takođe i glavni negativni regulator procesa autofagije. Njegova aktivnost nalazi se pod kontrolom unutarćelijskog energetskog senzora, protein kinaze indukovane adenzin monofosfatom – **AMPK** (engl. *Adenosine monophosphate-activated protein kinase*) koja inhibira mTOR i protein kinaze B, poznate i kao **AKT**, koja ga aktivira (**Shema 2**). mTOR signalni put obuhvata dva funkcionalno različita proteinska kompleksa: **mTORC1** (engl. *mTOR complex 1*) i **mTORC2** (engl. *mTOR complex 2*). mTORC1 pripada grupi najznačajnijih molekula koji direktno regulišu autofagiju u okviru njihove uloge u koordinisanju anaboličkih i kataboličkih procesa tokom odgovora na različite stimulse. Tako na primer, prilikom gladovanja koje deluje inhibitory na mTORC1, autofagija se aktivira i na taj način se razgradnjom intracelularnog sadržaja obezbeđuje neophodna energija. Inhibicija mTORC1 i posledična indukcija autofagije povezani su sa smanjenom fosforilacijom dva supstrata ovog kompleksa – **p70S6K** (eng. *Ribosomal protein S6 kinase-1, S6K1*) i **4EBP1** (eng. *Translation initiation factor 4E-binding protein-1*). U ćelijama sisara, nishodno od mTORC1 se pored navedenih proteina nalazi i stabilni kompleks sačinjen od **Atg13**, ULK1/ULK2 i FIP200, koji predstavlja integralni deo signala za indukciju biogeneze autofagozoma.

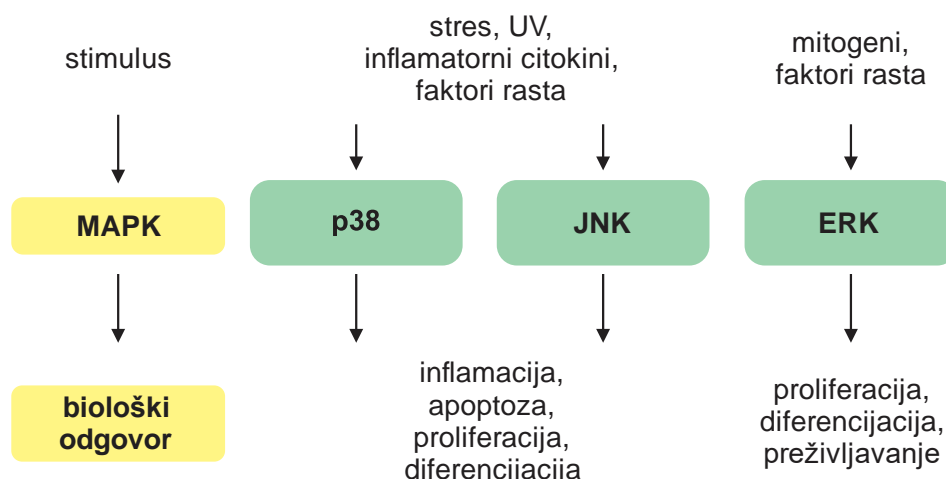
Novije studije pokazale su da aktivacija AMPK kao posledica odsustva glukoze povećava autofagiju, ne samo indirektnom inaktivacijom mTORC1, već i direktno preko fosforilacije **ULK1** (engl. *Unc-51 like autophagy activating kinase*), tačnije njegove aminokiseline serina na pozicijama 317 (Ser 317) i 777 (Ser 777). Sa druge strane u slučaju prisustva odgovarajuće količine hranjivih materija aktivnost mTOR-a se povećava i sprečava aktivaciju ULK1 molekula fosforilišući serin ali sada na poziciji 757 (Ser 757). Na ovaj način mTOR prekida interakciju između AMPK molekula i ULK1 i inhibira proces autofagije (Kim i sar., 2011). U prilog kompleksnosti regulacije autofagije svedoči i učešće transkripcionih faktora Foxo familije (engl. *Forkhead box protein O*), pre svega **Foxo1** i **Foxo3**, koji indukuju ekspresiju nekoliko gena značajnih za autofagiju, među kojima su LC3B, Gabarap, ULK1/2, Atg12, Beklin-1, Atg4b i Bnip3 (engl. *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3*) (Webb i Brunet, 2014). Takođe, značajan transkripcioni faktor koji dovodi do povećanje ekspresije gena ključnih za indukciju autofagije je **Atf4** (engl. *Activating transcription factor 4*), koji ujedno predstavlja sponu ovog procesa sa ER stresom (Rzymiski i sar., 2010). Pored AMPK/AKT/mTOR signalne osovine sve je više podataka o učešću **MAP kinaza** (engl. *Mitogen activated protein kinases*,

MAPK) u regulaciji autofagije, premda je njihova osnovna uloga vezana za proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje ili smrt ćelija (Braicu i sar., 2019) (**Shema 3**). Među njima su najznačajnije kinaza regulisana ekstracelularnim signalima – **ERK** (engl. *Extracellular signal-regulated kinase*), **p38 MAPK** i stresom aktivirana protein kinaza (SAPK) poznata kao c-Jun N-terminalna kinaza, odnosno **JNK** (engl. *Stress activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase*).



### Shema 2. Značaj AMPK/AKT/mTOR signalnog puta u regulaciji autofagije

AMPK je glavni energetska senzor ćelije koji aktivira autofagiju inhibicijom mTOR kinaze. Sa druge strane, aktivacijom AKT-a i posledičnom fosforilacijom i aktivacijom mTOR-a dolazi do inhibicije autofagije. Na slici su prikazani najznačajniji Atg molekuli, kao i faze autofagije u kojima su aktivni.



**Shema 3. Osnovne funkcije MAP kinaza u ćeliji u zavisnosti od vrste stimulusa**

ERK sa jedne strane indukuje autofagiju u odgovoru na različite citotoksične agense, dok sa druge može i da inhibira ovaj proces. (Ellington i sar., 2006, Choi i sar., 2010). Jedna od prvih studija pokazala je da ERK učestvuje u gladovanjem indukovanoj autofagiji u ćelijama tumora (Ogier-Denis i sar., 2000). Takođe je pokazan i značaj autofagije u regulaciji proliferacije i diferencijacije zdravih ćelija MAPK/ERK signalnim putem (Chen i sar., 2018a). JNK takođe učestvuje u modulaciji autofagije delovanjem na procese u citoplazmi i jedru (Mehrpour i sar., 2010). Ova kinaza utiče na povećanje ekspresije Atg i LC3 gena (Wu i sar., 2009a, Sun i sar., 2011), a indukcijom autofagije obezbeđuje preživljavanje tumorskih ćelija izloženih različitim agensima (Mukherjee i sar., 2017, Jin i sar., 2016). Aktivacija **p38** **MAPK** povezuje se sa indukcijom autofagije različitim agensima i promenama bazalne autofagije kod različitih vrsta tumora, kao što su melanom (Liu i sar., 2009), fibrosarkom (Duan i sar., 2011), osteosarkom (Slobodnyuk i sar., 2019), karcinom dojke (Li i sar., 2015) i leukemija (Ge i sar., 2013). Sa druge strane, ova kinaza može i da inhibira autofagiju i tako utiče na balans između preživljavanja i smrti ćelija pod različitim stresnim uslovima (Colosetti i sar., 2009, Webber i Tooze, 2010, Jiang i sar., 2013). U skladu sa vezom između ER stresa i autofagije, pokazano je da senzor ER stresa ATF6 $\alpha$  (engl. *Activating Transcription Factor 6 alpha*) (Hillary i FitzGerald, 2018) može da indukuje autofagiju uticajem na PI3K/AKT/mTOR signalni put (Salazar i sar., 2009, Qin i sar., 2010). Takođe, u uslovima ER stresa transmembranska kinaza PERK (engl. *Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase*) indukuje transkripciju LC3 i Atg5 aktivacijom transkripcionih faktora Atf4 i **CHOP** (engl. *C/EBP homologous protein*), koji ujedno utiču i na povećanje ekspresije p62/Sqstm1 (Kouroku i sar., 2007, Rouschop i sar., 2010, B'Chir i sar., 2013).

### 1.1.2. Uloga autofagije u nastanku tumora i njihovom lečenju citotoksičnim agensima

Uloga autofagije kod maligno transformisanih ćelija posebno je kompleksna i zavisi od vrste tumora, njegovog stadijuma, genetskih karakteristika (Kimmelman, 2011) metaboličkog statusa, tumorske mikrosredine, kao i primenjene terapije (Santana-Codina i sar., 2017). Uzevši u obzir navedeno, kod određenih tumora autofagija može da inhibira tumorogenezu, dok kod drugih može da pospešuje proliferaciju malignih ćelija različitim mehanizmima (White, 2012). U početku, autofagija je smatrana tumor supresorskim mehanizmom, na osnovu otkrića da kod 40-75% tumora prostate, dojke i ovarijalnih karcinoma, na hromozomu 17 postoji gubitak jednog alela Beklina-1 (Aita i sar., 1999, Liang i sar., 1999). Kasnije je otkriveno da su zapravo velike delecije na pomenutom hromozomu koje uobičajeno obuhvataju BRCA1 (engl. *Breast cancer 1*) gen često odgovorne i za gubitak blisko smeštenog gena za Beklin-1, čime se dovodi u pitanje njegova uloga kao tumor supresora kod navedenih tumora (Laddha i sar., 2014). Naime, za razliku od analiza na mišijim modelima gde gubitak jednog alela Beklina-1 povećava sklonost ka spontanom razvoju maligniteta i to najčešće karcinoma jetre, pluća i limfoma (Qu i

sar., 2003, Yue i sar., 2003), ne postoje dokazi da su mutacije ovog gena ili njegov gubitak odgovorni za nastanak tumora ljudskog porekla (Laddha i sar., 2014). Štaviše, kod humanih ćelijskih linija karcinoma dojke, uklanjanje Beklin-1 gena primenom CRISPR/Cas9 metode dovodi do smanjenja invazivnosti i migratorne sposobnosti tumora, a Beklin-1 je proglašen potencijalno novom terapijskom metom u budućem lečenju karcinoma dojke (Wu i sar., 2018). Antiproliferativni i tumor-supresorski efekat povezuje se i sa nekoliko proteina koji interaguju sa Beklinom-1 prilikom aktivacije autofagije, među kojima su AMBRA-1, Bif-1 i UVRAG (Liang i sar., 2006), međutim njihova uloga ne može da se ograniči samo na modulaciju autofagije, uzevši u obzir da u ćeliji obavljaju i druge funkcije koje mogu da doprinesu supresiji nastanka tumora (White, 2012). Pored navedenih molekula, u tumor supresore uvršten je i Atg4, regulator početnih koraka u formiranju autofagozoma, čija deficijencija čini eksperimentalne životinje podložnijim razvoju fibrosarkoma izazvanog hemijskim karcinogenima (Marino i sar., 2007). Dodatno, delecija gena za Atg5 ili Atg7 rezultira nastankom benignih tumora jetre i pankreasa (Takamura i sar., 2011, Rosenfeldt i sar., 2013), dok sprečava progresiju u maligni fenotip i povećava preživljavanje kod miševa sa invazivnim duktalnim adenokarcinomom pankreasa i rano razvijenim karcinomom pluća usled mutacije B-Raf protoonkogena (Strohecker i sar., 2013). Snižena ekspresija Atg5 i LC3-II, kao i povećan nivo p62, uočeni su kod velike kohorte pacijenata sa ranim primarnim melanomima u poređenju sa pacijentima koji su imali benigne nevuse. Snižen nivo autofagije bio je povezan sa smanjenom dužinom perioda tokom koje se bolest pacijenata nije pogoršavala, odnosno pacijenti sa višim nivoom Atg5 u tumorskim ćelijama imali su bolje preživljavanje bez progresije bolesti od onih sa nižim nivoima ovog proteina (Liu i sar., 2014). Nakupljanje p62 kao posledica neadekvatnog odvijanja autofagije takođe može da doprinese nastanku i progresiji tumora, što se dovodi u vezu sa izbegavanjem programirane ćelijske smrti i rezistencijom na antitumorsku terapiju (Islam i sar., 2018). Rezultati nedavne meta-analize ukazuju da je povećana ekspresija p62 povezana sa lošijom prognozom kod određenih tipova tumora. Takođe, pojedini istraživači smatraju da akumulacija p62 u citoplazmi može da posluži i kao prognostički marker za tumore u ranoj fazi (Zhu i sar., 2018). Ove rezultate treba razmatrati sa rezervom, jer je tek na budućim studijama sa većim brojem uzoraka da potvrde ili opovrgnu značaj ekspresije p62 kao prognostičkog markera tumora. Jedna od važnih veza između autofagije i sprečavanja nastanka malignog fenotipa ostvaruje se regulacijom produkcije reaktivnih oblika kiseonika. Naime, njihova povećana produkcija pospešuje nastanak mutacija, što dovodi do genske nestabilnosti sa pojačanom aktivacijom onkogena odgovornih za razvoj i progresiju tumora (Kumari i sar., 2018, Panieri i Santoro, 2016). Mitohondrije se smatraju najvećim izvorom unutarćelijske proizvodnje reaktivnih oblika kiseonika, čije se stvaranje dodatno povećava sa starenjem ili oštećenjem ovih organela (Galluzzi i sar., 2010). Oksidativni i energetski stres takođe mogu da budu posledica insuficijentne autofagije, koja kao takva ne može recikliranjem da obezbedi makromolekule, odnosno supstrate za mitohondrijalne metaboličke procese (Guo i White, 2016, Iommarini i sar., 2017).

Iz svega navedenog jasno je da autofagija može da ima značaj u sprečavanju nastanka tumora kao i u njihovoj supresiji u ranoj fazi i da se tu prevashodno zapaža učešće regulatora rane faze autofagije. Međutim, važno je naglasiti da autofagija može u isto vreme da bude neophodna za progresiju od benigne ka malignoj bolesti ili da učestvuje u povećanju invazivnosti i terapijske rezistencije postojećeg tumora. Autofagija na različite načine pospešuje preživljavanje tumorskih ćelija. Jasni dokazi ukazuju da je autofagija neophodna za održavanje matičnih ćelija raka – malih ćelijskih subpopulacija unutar tumora koje imaju sposobnost samoobnavljanja i diferencijacije, a koje su značajne za nastanak, progresiju, rezistenciju i metastatski potencijal tumora. Za razliku od ćelija na višem stadijumu diferencijacije, matične ćelije karakteriše povišen nivo autofagije, što je potvrđeno kod različitih tipova tumora uključujući leukemije i karcinome dojke i mokraćne bešike (Folkerts i sar., 2017, Gong i sar., 2013, Ojha i sar., 2014). Do pokretanja autofagije u već formiranim tumorima mogu



da dovedu i određeni onkogeni i na taj način omoguće preživljavanje tumora. Povišeni bazalni nivoi autofagije otkriveni su kod tumora sa RAS (engl. *Rat sarcoma*) mutacijama čak i u slučaju adekvatnog snabdevanja hranljivim materijama (Degenhardt i sar., 2006). Slično, onkogene mutacije tumor supresora p53 mogu da utiču na puteve uključene u regulaciju autofagije, što često rezultira povećanjem aktivnosti ovog procesa u tumorskim ćelijama (Folkerts i sar., 2017, Kim i sar., 2010). Za preživljavanje tumora izuzetno je važna veza autofagije i glavnih metaboličkih puteva tumorskih ćelija. Za maligne ćelije karakteristično je da metabolišu glukozu do laktata čak i kada postoji dovoljna količina kiseonika da bi se obezbedila oksidativna fosforilacija, a ovaj fenomen poznat je pod nazivom Warburgov efekat (Liberti i Locasale, 2016). U glikolitičkom putu, enzim piruvat kinaza omogućava uklanjanje produkata glikolize (Lv i sar., 2011). Kod tumorskih ćelija postoji pojačana razgradnja ovog enzima putem autofagije, što kao posledicu ima nagomilavanje glikolitičkih produkata preusmerenih prema putevima biosinteze koji će omogućiti rast tumora (Zhu i sar., 2017). Takođe, stvaranje laktata usled Warburgovog efekta može da dovede do promene pH vrednosti tumorske mikrosredine i tako aktivira autofagiju (Wojtkowiak i sar., 2012). U adaptaciji tumorskih ćelija na hipoksiju koja nastaje u slabo vaskularizovanim regionima, autofagija predstavlja važan regulatorni mehanizam. Tumorske ćelije iz hipoksičnih regiona posebno su osetljive na inaktivaciju gena koji regulišu autofagiju, kao i na farmakološke inhibitore ovog procesa (Tan i sar., 2016). Pored promene metabolizma i adaptacije na hipoksične uslove, još jedna od karakteristika malignih ćelija jeste sposobnost metastaziranja. Ćelije tumora koje se šire u udaljene organe moraju da izbegnu ćelijsku smrt poznatu kao anoikis koja nastupa usled gubitka kontakta ćelija sa ekstracelularnim matriksom (Simpson i sar., 2008). Tumorske ćelije mogu da izbegnu ovaj vid smrti aktivacijom procesa autofagije, što je pokazano kod hepatocelularnog karcinoma i drugih metastatskih tumora (Peng i sar., 2013, Fu i sar., 2018a, Chen i sar., 2017). Izlaganje tumorskih ćelija lekovima sa citotoksičnim dejstvom uzrokuje ćelijski stres, a pokretanje autofagije u ovakvim uslovima može da predstavlja odgovor koji omogućava preživljavanje tumorskih ćelija i izbegavanje smrti (Chang i Zou, 2020). Nakon primene određenog antitumorskog leka, aktivirana citoprotektivna autofagija uzrokuje smanjenje osetljivosti na citotoksičnu terapiju i čini ćelije rezistentnim, dok inhibicija ovog procesa povećava efikasnost antitumorske terapije sa posledičnim intenziviranjem apoptoze. U skladu sa navedenim, rezistencija na različite vidove terapije odlikuje se povećanom konverzijom LC3-I u LC3-II, povećanjem broja LC3B punkta po ćeliji, povećanim stvaranjem autolizozoma, kao i degradacijom p62. Ovakve promene zapažene su kod različitih tipova tumorskih ćelija tretiranih cisplatinom (Naik i sar., 2018, Qiu i sar., 2017), bortezomibom (Fang i sar., 2012, Min i sar., 2014), radijacijom (Chaachouay i sar., 2011) i mnogim drugim antitumorskim agensima (Liu i sar., 2020). Sa druge strane, kombinovana primena citotoksičnih lekova i farmakoloških inhibitora autofagije povećava osetljivost tumorskih ćelija na tretman na koji se razvija rezistencija (Cook i sar., 2014, Degtyarev i sar., 2008, Ratikan i sar., 2013, Wiedmer i sar., 2017). Međutim, pored citoprotektivnog, autofagija može da ispolji i citotoksično dejstvo, označeno kao autofagna ćelijska smrt. Pokazano je da ovakav vid ćelijske smrti mogu da indukuju različiti agensi kod različitih tipova tumora, pri čemu ona može da se spreči ili farmakološkom inhibicijom autofagije ili inhibicijom ekspresije gena značajnih u regulaciji ovog procesa (Trenti i sar., 2014, Cui i sar., 2016, Kim i sar., 2015a, Wiersma i sar., 2015). Dakle, uvid u indukciju citoprotektivne ili citotoksične autofagije jasno determiniše da li je primena farmakoloških inhibitora autofagije u kombinaciji sa citotoksičnim agensom opravdana ili treba da se izbegava.

Otkrivanje ključnih signalnih puteva u indukciji citoprotektivne autofagije mogao bi da unapredi antitumorski efekat novih ili uobičajeno korišćenih lekova. Jedan od načina kojim antitumorski agensi mogu da pokrenu citoprotektivnu autofagiju je aktivacija intracelularnog energetskog senzora AMPK. U ovom slučaju, poboljšanje citotoksičnog efekta hemioterapeutika mogao bi da se ostvari blokiranjem aktivnosti AMPK odgovarajućim farmakološkim inhibitorom, kao što je pokazano kod ćelija kolorektalnog karcinoma (Li i Chen, 2017). Takođe,

citoprotektivna autofagija može da se indukuje i aktivacijom ULK1, što je zapaženo kod matičnih ćelija akutne limfoblastne leukemije i ćelijskim linijama pankreasnog karcinoma (Jang i sar., 2017, Min i sar., 2014). Pored aktivacije AMPK i ULK1, inhibicija mTOR-a predstavlja mehanizam kojim neki od antitumorskih agenasa indukuju citoprotektivnu autofagiju (Cao i sar., 2016) i to najčešće aktivacijom AMPK ili inhibicijom AKT (Jiang i sar., 2015, Wu i sar., 2015). U ciljanoj terapiji leukemija zapaženo je da mTOR inhibitori kao pojedinačni agensi indukuju autofagiju i nisu efikasni antikancerski lekovi. Međutim, kod kombinovane primene mTOR inhibitora i farmakoloških inhibitora autofagije kao što je hlorokin, javlja se izražen antileukemijski efekat (Altman i sar., 2014). Slično, inhibicija ekspresije ULK1 gena u kombinaciji sa inhibitorima mTOR-a dovodi do smanjenja sposobnosti formiranja kolonija prekursora akutne mijeloidne leukemije (Altman i sar., 2014). Nije iznenađujuće da pored AMPK/AKT/mTOR signalnog puta, u rezistenciji na citotoksične agense učestvuju i članovi MAPK familije. Naime, primena hemioterapeutika dovela je do povećanja MEK i ERK aktivnosti i indukcije citoprotektivne autofagije u ćelijskoj liniji hepatocelularnog karcinoma (Tong i sar., 2015). Autofagija je na sličan način bila aktivirana i kod primarnih melanoma sa BRAF mutacijom koji su tretirani BRAF inhibitorom, što je bila posledica indukcije ER stresa uz učešće CHOP, Atf4 i eIF2 $\alpha$  (engl. *Eukaryotic initiation factor 2 alpha*) (Ma i sar., 2014). Slično, u ćelijskoj liniji melanoma sa mutiranim BRAF genom došlo je do razvoja hroničnog ER stresa sa naknadnom aktivacijom JNK signalne kaskade, što je doprinelo pojačanju bazalne autofagije i rezistenciji na terapiju (Corazzari i sar., 2015). Antitumorski lekovi, pored uticaja na ERK i JNK mogu da indukuju citoprotektivnu autofagiju i aktivacijom p38 MAPK (Kim i sar., 2017). Uzevši u obzir sve navedeno, inhibicija autofagije u najvećem broju slučajeva predstavlja racionalan pristup za prevazilaženje rezistencije i ostvarivanje maksimalne delotvornosti antitumorske terapije. Međutim, delotvornost ovog pristupa u mnogome zavisi od sprovođenja detaljnih analiza mehanizama dejstva citotoksičnih agenasa na velikom broju različitih tipova tumorskih ćelija.

## 1.2. Apoptoza i interakcija sa autofagijom

Apoptoza ili programirana ćelijska smrt tip 1 predstavlja genetski strogo regulisan proces značajan za embrionalni razvoj i održavanje homeostaze tkiva kod višćelijskih organizama (Renahan i sar., 2001). Ovaj proces odlikuju karakteristične morfološke promene kao što su smanjenje ćelijskog volumena, kondenzacija hromatina koja dovodi do degeneracije jedra (tzv. piknoze) i fragmentacija jedra, poznata kao karioreksa (Kerr i sar., 1972). Nastale promene su praćene bubrenjem ćelijske membrane i izdvajanjem ćelijskih fragmenata tokom procesa pupljenja, pri čemu se formiraju tzv. apoptotska tela koja će kasnije biti uklonjena uz pomoć fagocita (Hacker, 2000). Biohemijski mehanizmi apoptoze su veoma složeni i podrazumevaju kaskadu molekularnih događaja za koje je neophodna energija (Tsujimoto, 1997).

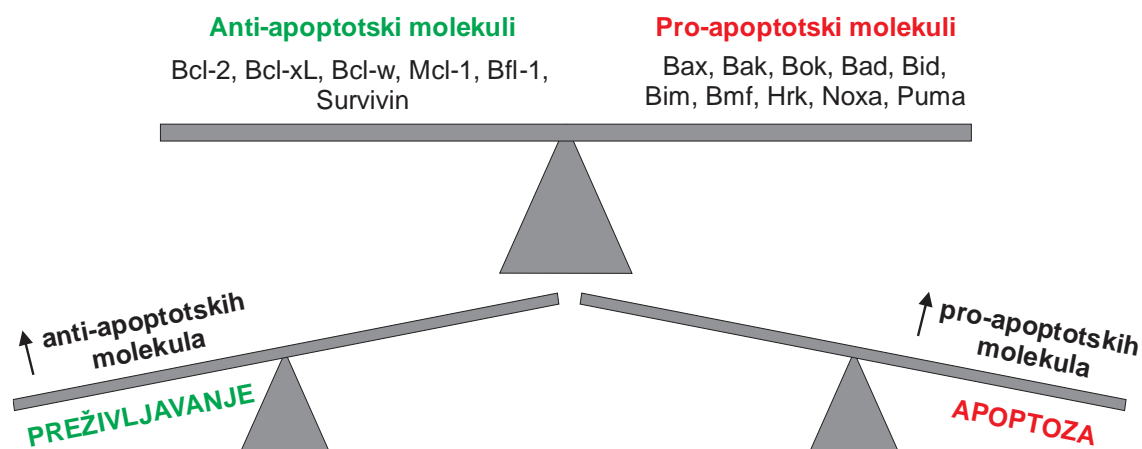
Do danas su opisana dva glavna biohemijska puta apoptoze – spoljašnji, odnosno put posredovan receptorima smrti, i unutrašnji ili mitohondrijalni put. Ova dva puta su međusobno povezana i molekuli jednog puta mogu da utiču na drugi, a kao krajnji rezultat nastaju fragmentacija DNK i degradacija ćelijskog citoskeleta i jedarnih proteina (Fulda i Debatin, 2006). Ovakav ishod u procesu apoptoze je posledica niza biohemijskih promena, od kojih je među najbitnijim aktivacija široko rasprostranjenih proteolitičkih enzima – kaspaza, koje su u zdravim ćelijama prisutne u neaktivnoj formi, odnosno u formi proenzima. Međutim, jednom aktivirane, kaspaze mogu da aktiviraju druge prokaspaze čime se pokreće proteolitička kaskada koja ubrzo dovodi do ćelijske smrti. Do danas je definisano dvanaest kaspaza, a najvažnije među njima su podeljene u tri grupe: **inicijatorske (kaspaze -8, -9 i -10), efektorske (kaspaze -3, -6, i -7) i inflamatorne kaspaze (-1,-4,-5)** (Cohen, 1997). Pored aktivacije kaspaza, u procesu apoptoze izražena je ekspresija i aktivacija tkivnih **transglutaminaza**, enzima koji su odgovorni za međusobno povezivanje proteina (engl. *cross-*

*linking*) (Nemes i sar., 1996), kao i  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  **zavisnih endonukleaza** pod čijim dejstvom se DNK razgrađuje u fragmente veličine od 180 do 200 baznih parova (Bortner i sar., 1995). Čelije koje umiru apoptozom takođe karakteriše i pojava specifičnih površinskih markera koji omogućavaju da one budu blagovremeno uklonjene fagocitozom, čime se sprečava oštećenje tkiva. Jedan od ovakvih markera je **fosfatidil-serin**, koji je uobičajeno lokalizovan sa unutrašnje strane lipidnog dvosloja ćelijske membrane, a tokom procesa apoptoze se premešta na spoljašnju stranu i funkcioniše kao ligand za fagocite (Hoffmann i sar., 2001).

**Spoljašnji put apoptoze** podrazumeva signalne puteve koji se aktiviraju transmembranskim receptorima. Među njima su poznati pripadnici TNF superfamilije (engl. *Tumor necrosis factor*; faktor nekroze tumora), tzv. receptori smrti (Locksley i sar., 2001). Oni poseduju karakteristične citoplazmatske domene od oko 80 aminokiselina, nazvane domeni smrti, jer igraju ključnu ulogu u prenošenju tzv. signala smrti sa ćelijske površine do odgovarajućih unutarćelijskih enzima (Ashkenazi i Dixit, 1998). Neki od najbolje opisanih liganada i njihovih receptora smrti su **FasL/FasR** (engl. *Fatty acid synthetase ligand/Fatty acid synthetase receptor*), **TNF- $\alpha$ /TNFR1** (engl. *Tumor necrosis factor alpha/Tumor necrosis factor receptor 1*), **Apo3L/DR3** (engl. *Apo3 ligand/Death receptor 3*), **Apo2L/DR4** (engl. *Apo2 ligand/Death receptor 4*) i **Apo2L/DR5** (engl. *Apo2 ligand/Death receptor 5*) (Chicheportiche i sar., 1997, Ashkenazi i Dixit, 1998, Suliman i sar., 2001, Rubio-Moscardo i sar., 2005). Vezivanjem liganada za njihove receptore angažuju se odgovarajući adapterski proteini koji kasnije aktiviraju neku od pomenutih inicijatorskih kaspaza.

**Unutrašnji put aktivacije apoptoze** odvija se bez učešća receptora smrti i karakteriše se inicijalnim promenama na mitohondrijama. Unutrašnji put apoptoze može da bude pokrenut ukoliko postoji nedostatak određenih faktora čija je uobičajena uloga da inhibiraju ovaj proces, kao što su pojedini hormoni, citokini ili faktori rasta (Green i Kroemer, 2004). Sa druge strane, radijacija, toksini, hipoksija, hipertermija, virusne infekcije i slobodni radikali takođe mogu direktno da aktiviraju unutrašnji put apoptoze (Dewey i sar., 1995, Zhang i sar., 2017b, Guo i sar., 2001, Ahmed i sar., 2015, Thomson, 2001, Wood i Youle, 1994). Svi pomenuti stimulusi dovode do promena u unutrašnjoj membrani mitohondrija, što rezultira otvaranjem pora ove organele, gubitkom transmembranskog potencijala i oslobađanjem dve glavne grupe pro-apoptotskih proteina iz intramembranskog prostora u citosol. Prvoj grupi pripadaju **citohrom C**, **SMAC/DIABLO** (engl. *Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*) i serin proteaza **HtrA2/Omi** (engl. *High temperature requirement protein A2*) (Du i sar., 2000, Yang i sar., 2003b). Ovi proteini pokreću mitohondrijalni apoptotski put zavisan od kaspaza. Citohrom C se vezuje za Apaf-1 (engl. *Apoptotic protease activating factor 1*) i prokaspazu-9 formirajući apoptozom, kompleks značajan za aktivaciju efektorskih kaspaza-3 i -7 (Jiang i Wang, 2000, Bao i Shi, 2007). Druga grupa pro-apoptotskih proteina uključuje faktor koji indukuje apoptozu – **AIF** (engl. *Apoptosis inducing factor*), **endonukleazu G** i kaspazom aktiviranu dezoksiribonukleazu – **CAD** (engl. *Caspase-activated DNase*). Sva tri enzima se nakon oslobađanja iz mitohondrija premeštaju u nukleus, gde imaju ulogu u fragmentaciji DNK i kondenzaciji perinuklearnog hromatina, sa tom razlikom što AIF i endonukleaza G funkcionišu nezavisno od kaspaza, dok je za aktivnost CAD neophodno isecanje od strane kaspaze-3 (Susin i sar., 1999, Li i sar., 2001, Sakahira i sar., 1998). Apoptotske događaje u mitohondrijama regulišu članovi **Bcl-2 familije** proteina, dok je za njihovu kontrolu značajan tumor supresorski protein **p53** (Slee i sar., 1999, Sax i El-Deiry, 2003). Na osnovu primarne funkcije, članovi Bcl-2 podeljeni su na tri grupe: **anti-apoptotske proteine** Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w (engl. *Bcl-2 like 2 protein*), Mcl-1 (engl. *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein*), Bfl-1/A1 (engl. *Bcl-2-related protein A1*) i Survivin; **pro-apoptotske proteine značajne za formiranje pora** Bax (engl. *Bcl-2 associated X protein*), Bak (engl. *Bcl-2 antagonist killer 1*) i Bok (engl. *Bcl-2 related ovarian killer*); i **pro-apoptotske proteine sa BH3 domenom** Bad (engl. *Bcl-2 antagonist of cell death*), Bid (engl. *BH3 interacting domain death agonist*), Bim (engl. *Bcl-2 interacting protein BIM*), Bmf (engl. *Bcl-2-modifying factor*), Hrk

(*Harakiri*), Noxa/PMAIP1 (engl. *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*) i Puma (engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*) (Kale i sar., 2018) (**Shema 4**). Od odnosa ovih proteina zavisi da li će apoptoza da bude pokrenuta, a njima je regulisano i samo oslobađanje citohroma C iz transmembranskog prostora promenom propustljivosti mitohondrijalne membrane (Campbell i Tait, 2018).



#### Shema 4. Najvažniji pro- i anti-apoptotski molekuli

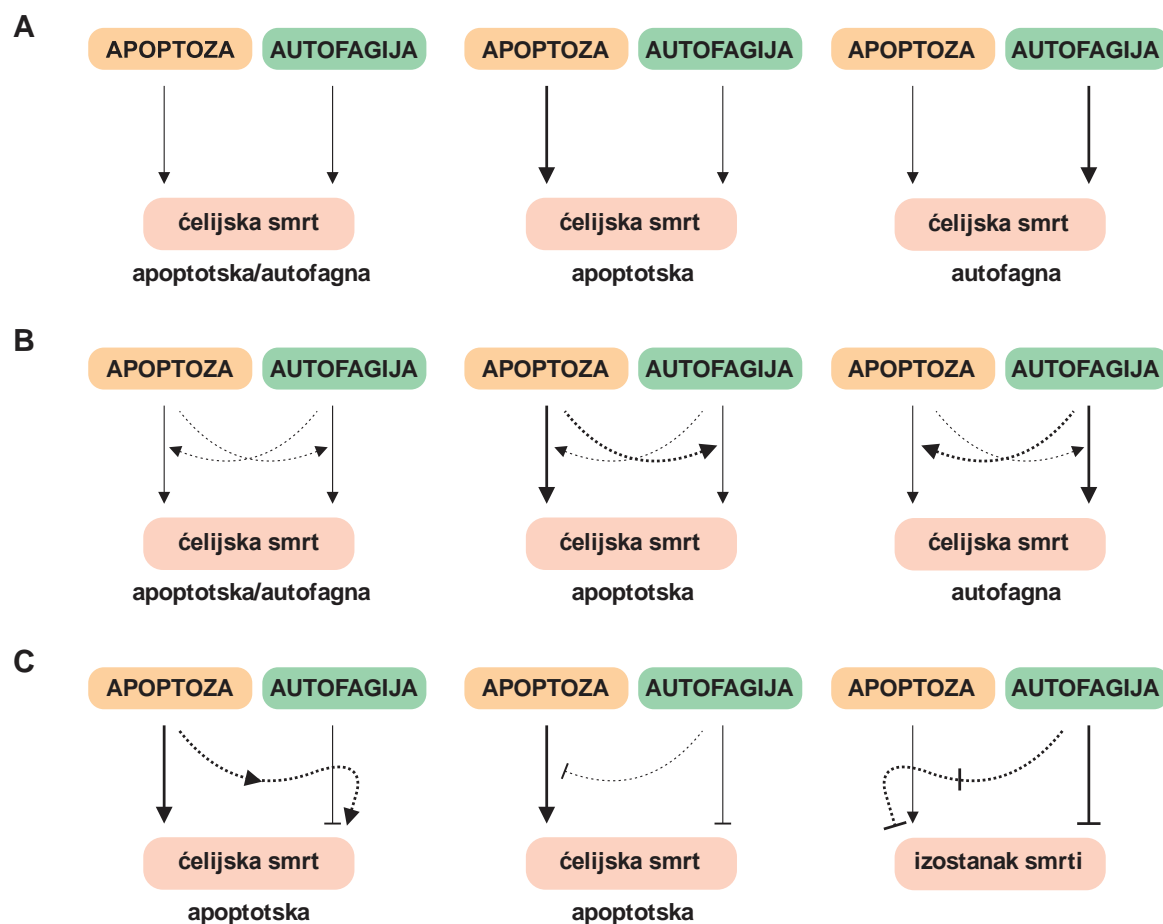
Od balansa pro-apoptotskih i anti-apoptotskih molekula zavisi da li će ćelija preživeti određeni stres ili će doći do aktivacije programirane ćelijske smrti – apoptoze

**Bcl-2** i **Bcl-xL** su najpoznatiji inhibitori apoptoze koji svoje dejstvo ostvaruju na nivou mitohondrija supresijom funkcije pro-apoptotskih proteina kao što su **Bax** i **Bak**. Karakteristično je da Bcl-2 i Bcl-xL međusobno stoje u recipročnom odnosu tj. kada se ekspresija jednog molekula povećava, ekspresija drugog se smanjuje (Arriola i sar., 1999). Sa druge strane, **Puma** i **Bim** predstavljaju značajne članove Bcl-2 familije sa pro-apoptotskim potencijalom. Puma je važan protein u apoptozi indukovanoj p53 tumor supresorom, ali svoju pro-apoptotsku funkciju može da ostvaruje i nezavisno od ovog molekula (Nakano i Vousden, 2001). Povećana ekspresija Puma u *in vitro* uslovima zajedno sa Bim-om dovodi do aktivacije **Bax**-a, njegovog premeštanja u mitohondrije i oslobađanja citohroma C, kao i smanjenja membranskog potencijala mitohondrija (Garrison i sar., 2012). Pro-apoptotska aktivnost Bim-a delimično zavisi i od njegove sposobnosti da formira komplekse sa anti-apoptotskim članovima, pre svega Bcl-2 i Bcl-xL i inhibira njihovu funkciju (O'Connor i sar., 1998). **Pten** je takođe značajan modulator apoptoze zavisne od mitohondrija, koji uglavnom deluje tako što antagonizuje anti-apoptotsku funkciju PI3K (Zhao i sar., 2004, Weng i sar., 2001). Takođe, pokazano je postojanje pozitivne povratne sprege između p53 i Pten. Naime, DNK oštećenje dovodi do naglog porasta p53 i njegovog vezivanja za promotor Pten-a, pri čemu se povećava transkripcija ovog molekula i posledično sprečava razgradnja p53 (Stambolic i sar., 2001).

Ovo su samo neki od primera mogućih interakcija između pojedinih predstavnika pro-i anti-apoptotskih molekula. Bilo da je aktiviran spoljašnji ili unutrašnji put apoptoze i jedan i drugi završavaju se takozvanom egzekucionom fazom koja podrazumeva aktivaciju odgovarajućih efektorskih kaspaza. Kao što je prethodno pomenuto, ova grupa kaspaza aktivira citoplazmatske endonukleaze koje razgrađuju nuklearni materijal, kao i proteaze koje razgrađuju jedarne i proteine citoskeleta. Jednim od osnovnih obeležja apoptotskog procesa smatra se isecanje **PARP-1** (engl. *Poly (ADP-ribose) polymerase*), čija je osnovna uloga da otkriva greške i vrši popravku DNK oštećenja (Soldani i Scovassi, 2002, Kaufmann i sar., 1993). Međutim, izraženo oštećenje DNK materijala praćeno aktivacijom ovog enzima dovodi do velike potrošnje zaliha ATP molekula, što može da dovede do pasivne ćelijske smrti nekrozom (Eguchi i sar., 1997). Nekroza se sprečava brzom inaktivacijom, odnosno isecanjem PARP-1 molekula pomoću kaspaza (Herceg i Wang, 1999). Kao rezultat nastaju dva specifična fragmenta: jedan

katalitički fragment od 89-kD i jedan DNK vezujući fragment od 24-kD (Boulares i sar., 1999). Fragment od 89-kD ima značajno smanjenu sposobnost vezivanja za DNK i oslobađa se iz jedra u citosol, dok se fragment od 24-kD zadržava u jedru, ireverzibilno vezuje za prekinutu DNK i funkcioniše kao inhibitor aktivne forme PARP-1 i drugih enzima za reparaciju DNK (Chaitanya i sar., 2010). Kaspaza-3 se smatra najvažnijom od svih efektorskih kaspaza i može da bude aktivirana bilo kojom od inicijatorskih kaspaza (-8, -9 ili -10) (Stennicke i sar., 1998). Kao što je pomenuto, kaspaza-3 specifično aktivira endonukleazu CAD zaslužnu za kondenzaciju hromatina, ali deluje i na reorganizaciju citoskeleta odgovornu za nastanak apoptotskih tela. Apoptotska tela se preuzimaju procesom fagocitoze koja se smatra i poslednjom komponentom apoptoze. Glavno obeležje ove faze je eksternalizacija fosfatidil-serina na površinu apoptotskih tela, koja u zavisnosti od tipa ćelija može biti zavisna ili nezavisna od kaspaza (Mandal i sar., 2002, Ferraro-Peyret i sar., 2002).

Neadekvatno odvijanje apoptoze nalazi se u osnovi mnogih patoloških stanja kod ljudi, među kojima su neurodegenerativne i autoimunske bolesti, kao i nastanak različitih tipova tumora. Mogućnost kontrole preživljavanja i smrti ćelija ima značajan terapijski potencijal i veliki broj istraživanja usmeren je na analizu signalnih puteva koji kontrolišu ćelijski ciklus i apoptozu. U otkrivanju novih antitumorskih terapeutika prednost se daje agensima koji indukuju apoptozu, jer za razliku od nekroze, ona nije praćena inflamacijom i burnom reakcijom imunskog sistema usled odsustva izlivanja ćelijskog sadržaja u okolna tkiva. U lečenju tumora, uspeh terapije umnogome zavisi od sposobnosti hemioterapeutika da indukuju apoptozu malignih ćelija. Međutim, kao što je prethodno pomenuto, citoprotektivna autofagija koju pokreću određeni citotoksični agensi može da spreči, odnosno odloži apoptozu i doprinese rezistenciji tumorskih ćelija na terapiju. Ovo je samo jedna, ali najčešća relacija između apoptoze i autofagije. Pored navedenog, u određenim toksikološkim modelima, ali i u pojedinim tumorskim ćelijama pokazano je da autofagija može da funkcioniše kao promoter apoptoze, odnosno da se ovi procesi odvijaju istovremeno u ćelijama, pri čemu inhibicija autofagije uzrokuje smanjenje apoptotske smrti (Chen i sar., 2008, Chen i sar., 2010, Wang i sar., 2014). Odnos ova dva procesa je izuzetno kompleksan zbog preplitanja signalnih puteva i molekula koji mogu biti deo signalne kaskade kako u apoptozi tako i u autofagiji. Jedan od primera je Beklin-1, značajan za indukciju autofagije, koji je ujedno član familije proteina koji sadrže BH3 domene (He i Levine, 2010). Karakteristično je da se Bcl-2 ili Bcl-xL vezuju za BH3 domene Beklina-1 i tako blokiraju autofagiju, ali zadržavaju svoju anti-apoptotsku funkciju (Maiuri i sar., 2007b, Robert i sar., 2012). Sa druge strane, Noxa i drugi pro-apoptotski molekuli Bcl-2 familije nakon uklanjanja Bcl-2 i Bcl-xL iz kompleksa sa Beklinom-1 utiču na indukciju autofagne ćelijske smrti (Elgandy i sar., 2011, Maiuri i sar., 2007a). Takođe, kaspaza-8 i -3 mogu da iseku Beklin-1, pri čemu se sudbina ćelije usmerava od autofagije prema apoptozi (Luo i Rubinsztein, 2010, Zhang i sar., 2015), tako što C-terminalni fragmenti isečenog Beklina-1 nakon transporta u mitohondrije utiču na promenu njihovog membranskog potencijala (Wirawan i sar., 2010). Slične interakcije zabeležene su i u slučaju p62, glavnog supstrata autofagije čija akumulacija usled direktne interakcije sa kaspazom-8 pojačava ćelijsku smrt indukovanu inhibicijom Bcl-2 i Bcl-xL (Huang i sar., 2013). Pro-apoptotski efekat p62 zapažen je i kod ćelija humanog glioma tretiranih inhibitorom proteazoma (Zeng i sar., 2014). Na Shemi 5 nalazi se pojednostavljeni prikaz mogućih interakcija između procesa apoptoze i autofagije i krajnjih efekata na tip ćelijske smrti (**Shema 5**).



### Shema 5. Interakcije između apoptoze i autofagije i pretpostavljeni ishodi

Pod pretpostavkom da i apoptoza i autofagija indukuju smrt ćelija moguće je da se ovi procesi dešavaju nezavisno jedan od drugog (A). U ovakvim okolnostima, u zavisnosti od jačine signala koji indukuje smrt, ona može biti apoptotska ili autofagna (srednji i desni panel). Međutim ukoliko se apoptoza i autofagija dešavaju istovremeno i sličnog su intenziteta, manifestacija jednog odnosno drugog mehanizma neće biti očigledna, pri čemu oba procesa zajedno indukuju ćelijsku smrt (panel levo). Druga mogućnost je da autofagija i apoptoza sarađuju u indukciji ćelijske smrti (B). U ovom slučaju, ako je jačina autofagnih signala koji indukuju smrt slabija od apoptotskih signala, ćelije će umirati procesom apoptoze (srednji panel). Ukoliko je intenzitet autofagnih signala jači ili jednak apoptotskim, ćelija umire autofagnom ili kombinovanom smrću (desni i levi panel). Treća mogućnost podrazumeva da čak i kada autofagija ima citoprotektivnu ulogu, ishod zavisi od jačine apoptotskih signala koji pokreću smrt i autofagnih koji omogućavaju preživljavanje ćelija (C). (\*debljim strelicama označen je jači intenzitet signala)

Preuzeto i modifikovano iz: Masayuki Noguchi i sar. *Intersection of Apoptosis and Autophagy Cell Death Pathways*. *Austin J Mol & Cell Biol*. 2015; 2(1): 1004

### 1.3. Farmakološki inhibitori autofagije

Uzevši u obzir dvostruku ulogu autofagije, koja sa jedne strane može da omogućava preživljavanje, a sa druge da indukuje smrt tumorskih ćelija, razvijeni su preklinički eksperimentalni modeli usmereni na aktivaciju ili inhibiciju ovog procesa kako bi se poboljšao terapijski efekat pojedinih lekova (Galluzzi i sar., 2017). Modulacija glavnih signalnih molekula koji regulišu autofagiju pokazala se kao obećavajuća strategija u lečenju različitih tipova tumora i u kliničkim istraživanjima (Marinkovic i sar., 2018). Tokom protekle decenije zapažen je veliki napredak u otkrivanju novih i specifičnih inhibitora autofagije koji se mogu podeliti na inhibitore rane i kasne faze. Inhibitori rane faze autofagije blokiraju početne korake ovog procesa i njima pripadaju neselektivni inhibitori PI3K, selektivni inhibitori klase III PI3K, kao i

specifični inhibitori ULK1 i Beclin-1 (Wang i sar., 2016). Inhibitori kasne faze autofagije deluju tako što inhibiraju funkciju lizozoma, te se zbog toga još nazivaju i lizozomalni inhibitori autofagije (LIA), među kojima su najpoznatiji bafilomicin A1, hlorokin i amonijum hlorid (Shacka i sar., 2006a, Yang i sar., 2011). Veliki broj kliničkih studija baziran je na kombinovanoj primeni hemioterapeutika koji aktiviraju proces autofagije i lizozomalnog inhibitora hlorokina koji inhibicijom autofagije pojačava njihovo citotoksično dejstvo na tumorske ćelije (Xu i sar., 2018). Pored toga, farmakološki inhibitori autofagije, uključujući LIA, koriste se u bazičnim istraživanjima uloge autofagije u mnogim fiziološkim i patološkim procesima. Takođe, LIA se intenzivno koriste za ispitivanje autofagnog fluksa koji je definisan kao mera razgradnje ćelijskog sadržaja u procesu autofagije, i čija analiza omogućava zaključak da li je autofagija inhibirana ili aktivirana (Klionsky i sar., 2021). Značaj blokade kasne faze autofagije mogao bi da bude u tome što se na ovaj način izbegava inhibicija signalnih molekula koji pored uloge u kontroli ranih koraka autofagije učestvuju i u velikom broju drugih procesa u ćeliji, uključujući proliferaciju i ćelijsku smrt. Međutim, LIA nemaju u potpunosti specifično dejstvo i ono često zavisi kako od doze agensa, tako i od dužine tretmana (Baek i sar., 2016). Takođe, jedno od ograničenja upotrebe farmakoloških inhibitora autofagije u istraživanjima i terapiji jeste njihova sposobnost da indukuju programiranu ćelijsku smrt nezavisno od inhibicije autofagije (Maycotte i sar., 2012, Klejman i sar., 2005, Kinoshita i sar., 1996). Molekularni mehanizmi ove pojave nisu u potpunosti razjašnjeni, a uporedna analiza citotoksičnosti farmakoloških inhibitora autofagije, kao značajan korak ka tom cilju, do sada nije sprovedena.

Jedan od najčešće upotrebljivanih farmakoloških inhibitora autofagije je bafilomicin A1 (u nastavku teksta bafilomicin, BAF), makrolidni antibiotik izolovan procesom fermentacije iz bakterijske vrste *Streptomyces griseus* (Werner i sar., 1984). Otkriće bafilomicina osamdesetih godina prošlog veka rezultat je potrage za sekundarnim metabolitima mikroorganizama sa efektima sličnim srčanim glikozidima (Hensens i sar., 1983) ali su očekivani kardiotonički efekti izostali u *in vivo* istraživanjima (Huang i sar., 1984). Sa druge strane, otkriven je antimikrobni potencijal bafilomicina protiv nekoliko tipova gljiva, kvasaca i Gram pozitivnih bakterija, kao i njegova sposobnost da, slično konkanamicinu, inhibira proliferaciju konkavalinom stimuliranih T-limfocita. Međutim, zbog ispoljene toksičnosti bafilomicin i ostali pripadnici ove grupe nikada nisu ušli u kliničku upotrebu (Heinle i sar., 1988). Nekoliko godina kasnije, istraživanja su pokazala da bafilomicin inhibira aktivnost vakuolarne H<sup>+</sup> V-adenozintrifosfataze (V-ATPaze), protonske pumpe sačinjene od većeg broja subjedinica koja održava kiselost ćelijskih odeljaka sa membranom kod eukariota (Bowman i sar., 1988), pre svega endozoma, lizozoma, fagozoma i delova Goldžijevog aparata (Pamarthy i sar., 2018). Pored inhibicije zakišeljavanja lizozoma, uočeno je da bafilomicin sprečava i proces fuzije autofagozoma i lizozoma, pri čemu se i ova osobina pripisivala funkciji V-ATPaze. Međutim, inhibicija ekspresije gena za subjedinice ovog enzima je pokazala da on, iako ima ulogu u zakišeljavanju lizozoma i razgradnji nakupljenog sadržaja, ne utiče na proces fuzije. Tada je kao ciljno mesto delovanja bafilomicina identifikovana ATPaza endoplazmatskog/sarkoplazmatskog retikuluma koja transportuje kalcijum (engl. *ER-calcium ATPase Ca-P60A/dSERCA*), čijom inhibicijom fuzija autofagozoma i lizozoma zaista biva onemogućena (Mauvezin i Neufeld, 2015). Iz navedenih razloga bafilomicin danas predstavlja nezaobilaznu komponentu u ispitivanju procesa autofagije, odnosno njene aktivnosti izraženu kroz autofagni fluks. Međutim zbog moguće citotoksičnosti, njegova upotreba je ograničena samo na *in vitro* uslove. Zavisno od upotrebljene doze, smatra se da bafilomicin može da bude selektivni inhibitor autofagije (Yamamoto i sar., 1998), dok sa druge strane može da dovede i do programirane ćelijske smrti – apoptoze (Yuan i sar., 2015). Pored dozne zavisnosti, ova dva ishoda zavise i od tipa ćelija, tako da se kod nekih vrsta tumora kao što su karcinom prostate i pluća, osteosarkom, hepatocelularni karcinom, leukemije i karcinom debelog creva, zapaža direktna veza između indukcije apoptoze i inhibicije autofagije (Lim i sar., 2006, Xie i sar., 2014, Yuan i sar., 2015, Yan i sar., 2016, Fitzwalter i sar., 2018). Zavisnost efekta bafilomicina od ćelijskog tipa i primenjene doze pokazana je i u slučaju ćelija

humanog neuroblastoma, gde je inhibicija autofagije ovim agensom imala citoprotektivni efekat (Pivtoraiko i sar., 2010). Međutim, ne treba odbaciti ni mogućnost da ćelijska smrt indukovana bafilomicinom može da bude i nezavisna od inhibicije autofagije (Kinoshita i sar., 1996).

Hlorokin (CQ) i hidrosihlorokin su veoma značajni lekovi otkriveni u poslednjih pet decenija, koji su pored upotrebe u lečenju malarije sve više priznati zbog svoje efikasnosti u velikom broju bolesti. Naime, hlorokin i njegov manje toksični metabolit hidrosihlorokin pokazuju imunomodulatorne i imunosupresivne efekte sa potvrđenom kliničkom efikasnošću u reumatskoj bolesti (Dos Reis Neto i sar., 2020), različitim formama eritemskog lupusa (Fanourakis i sar., 2020), bolesti kože (Sardana i sar., 2020) a od skoro i u lečenju različitih tipova maligniteta (Xu i sar., 2018). Hlorokin i hidrosihlorokin su do sada jedini lekovi odobreni od strane administracije za hranu i lekove (engl. *FDA, Food and Drug Administration*) za upotrebu u kliničkim studijama koje se bave lečenjem tumora inhibicijom autofagije (Manic i sar., 2014). Pored navedenog, za analoge hlorokina je pokazano da imaju metaboličke, kardiovaskularne i antitrombotične efekte (Al-Bari, 2015). Upotreba hlorokina kao inhibitora autofagije nezaobilazna je u istraživanjima ovog procesa kako *in vitro* tako i *in vivo* (Klionsky i sar., 2021). Naime, kao slaba baza, hlorokin pokazuje afinitet ka akumulaciji u lizozomima, pri čemu u kiseloj sredini prelazi u protonovanu formu pa tako ostaje zarobljen u ovoj organeli. Protonovana forma hlorokina povećava pH vrednost unutrašnjosti lizozoma i na taj način sprečava degradaciju sadržaja u ovim organelama (Homewood i sar., 1972). Precizan mehanizam inhibicije autofagije hlorokinom još uvek je predmet istraživanja, a noviji podaci ukazuju da ometanje fuzije autofagozoma i lizozoma (Mauthe i sar., 2018) ima važniju ulogu u ovom procesu nego smanjenje kiselosti i sposobnosti razgradnje sadržaja lizozoma. Takođe, hlorokin može nezavisno od inhibicije autofagije da dovede do dezorganizacije Goldžijevog kompleksa i endolizozomalnog sistema, što dodatno remeti proces fuzije. Zbog ovih dodatnih dejstava i mnogobrojnih promena koje mogu da izazovu u ćelijama, hlorokin i hidrosihlorokin ne treba smatrati jednostavnom zamenom za druge inhibitore autofagije, posebno u *in vivo* eksperimentalnim sistemima. Iako se hlorokin koristi kao inhibitor autofagije da bi potencirao smrt tumorskih ćelija, nameće se pitanje da li antitumorsko dejstvo hlorokina zavisi samo od blokade autofagije. Odgovor na ovo pitanje pružaju podaci nove studije koja pokazuje da hlorokin dejstvom na endotelne ćelije *in vivo* smanjuje hipoksiju u tumorskoj mikrosredini i metastatski potencijal malignih ćelija, poboljšavajući odgovor hemioterapeutika, i to uglavnom mehanizmima koji su nezavisni od autofagije (Maes i sar., 2014, Maes i sar., 2016). Takođe, slično bafilomicinu, i hlorokin može da dovede do programirane ćelijske smrti. Kod primarnog efuzijskog limfoma *in vitro* i *in vivo*, kao i u ćelijskoj liniji holangiokarcioma, hlorokin uzrokuje ER stres sa apoptozom kao krajnjim ishodom (Masud Alam i sar., 2016, Jia i sar., 2018). Slično dejstvo hlorokina pokazano je i na ćelijama renalnog karcinoma, karcinoma dojke i humanog glioma, dok u normalnim ćelijama bubrega miša i primarnoj kulturi humanih mezangijalnih ćelija nije bilo efekta (Park i sar., 2016). Zbog svih zapaženih efekata hlorokina, rezultate dobijene njegovom upotrebom u cilju inhibicije autofagije treba obazrivo tumačiti.

Pored bafilomicina i hlorokina, za farmakološku inhibiciju autofagije često se koristi i amonijum hlorid (AH), neorganska bela kristalna so koja se dobro rastvara u vodi dajući slabo kiseli rastvor (Stefan-Kharicha i sar., 2018). Ova supstanca našla je svoju upotrebu u različitim granama industrije pa se tako koristi kao izvor amonijaka u đubrivu, preradi metala i kao aditiv E500 u proizvodnji hrane (Jim Smith, 2011). U medicini, amonijum hlorid može da se koristi razblažen u izotoničnom rastvoru natrijum hlorida za lečenje pacijenata sa hipohloremijskim stanjima i metaboličkom alkalozom (Mathew i Bio, 2012). U ispitivanju procesa autofagije u *in vitro* uslovima amonijum hlorid se koristi zbog sposobnosti da inhibira zakišeljavanje lizozoma, tako da se i on smatra kasnim inhibitorom autofagije (Kawai i sar., 2007). Međutim, tačan mehanizam njegovog dejstva u inhibiciji autofagije još uvek nije u potpunosti razjašnjen, a izvesni podaci govore u prilog mogućem učešću članova TGF- $\beta$  familije (engl. *Transforming growth factor- $\beta$* ) i SMAD2 signalnih molekula (engl. *Mothers against decapentaplegic homolog*



2) (Sun i sar., 2015). Nema mnogo podataka koji se tiču samostalnih efekata amonijum hlorida na tumorske ćelije. Citotoksično dejstvo amonijum hlorida do sada je pokazano samo na primarnim kortikalnim neuronima i hipokampalnim ćelijama, u kojima ova supstanca indukuje nekrozu i apoptozu uz smanjenje aktivnosti AKT kinaze (Klejman i sar., 2005, Yang i sar., 2003a)

Uzevši u obzir značaj farmakološke inhibicije autofagije u bazičnim istraživanjima, kao i u terapiji tumora, nameće se potreba za otkrivanjem novih, netoksičnih supstanci sa što selektivnijim dejstvom na autofagiju. Lekovi koji bi mogli da zadovolje navedene kriterijume pripadaju grupi inhibitora protonske pumpe, među kojima je jedan od najpoznatijih pantoprazol. Inhibitori protonske pumpe su uvedeni u upotrebu 1989. godine i predstavljaju jedan od najvećih medicinskih pomaka u terapiji gastrointestinalnih bolesti sa povećanom produkcijom hlorovodonične kiseline (Shin i Kim, 2013). Tokom poslednjih deset godina inhibitori protonske pumpe su postali jedni od najčešće propisivanih lekova širom sveta. Trenutno je njihova dugotrajna upotreba odobrena za prevenciju i kontrolu simptoma gastroezofagealne refluksne bolesti i Baretovog jednjaka, patoloških hipersekretornih stanja, uključujući i Žolinger-Elisonov sindrom i funkcionalnu dispepsiju, a upotrebljavaju se i kao profilaksa kod krvarenja i ulkusa izazvanih upotrebom nesteroidnih antiinflamatornih lekova. U kombinaciji sa antibioticima predstavljaju sastavni deo terapije za eradikaciju infekcije bakterijom *Helicobacter pylori*. Takođe, procenjeno je da čak 20% osoba obolelih od maligniteta dobija inhibitore protonskih pumpi kao terapiju za gastrointestinalne simptome, pre svega refluksnu bolest (Smelick i sar., 2013). Ovi lekovi su slabe baze, osetljivi na kiselu sredinu, koji se ireverzibilno vezuju za enzim vodoničnu/kalijumsku adenozintrifosfatazu ( $H^+/K^+$  ATPaza), lokalizovanu na parjetalnim ćelijama želuca i na taj način inhibiraju sekreciju hlorovodonične kiseline (Nehra i sar., 2018, Strand i sar., 2017). Međutim, pokazano je da, slično bafilomicinu, oni uspešno blokiraju i V-ATPazu, što ih svrstava u grupu lekova za čiju bi upotrebu mogle da se pronađu nove indikacije (engl. *drug repurposing/repositioning*) (Ashburn i Thor, 2004, Spugnini i sar., 2010). Nova primena mogla bi da bude usmerena na regulaciju procesa autofagije, ali i na terapiju tumora (Luciani i sar., 2004, De Milito i sar., 2010). Iako su se inhibitori protonske pumpe pokazali kao efikasni supresori autofagije u različitim *in vitro* i *in vivo* eksperimentalnim modelima (Tan i sar., 2017, Tan i sar., 2015, Feng i sar., 2021), postoje podaci koji ukazuju da njihovi pojedini predstavnici, kao što jeesomeprazol, mogu da aktiviraju autofagiju u tumorskim ćelijama (Marino i sar., 2010, Chueca i sar., 2016). Slično bafilomicinu, glavni mehanizam kojim inhibitori protonske pumpe blokiraju autofagiju je inhibicija V-ATPaze i posledično smanjenje zakišeljavanja lizozoma (De Milito i sar., 2007, Cao i sar., 2018). U ovom kontekstu, inhibitori protonske pumpe mogu da se smatraju inhibitorima kasne faze autofagije, odnosno lizosomalnim inhibitorima. Pored sposobnosti da modulišu autofagiju, njihova primena kao antitumorskih agenasa opravdana je i zbog povećane ekspresije protonskih pumpi u tumorskim ćelijama i posledičnog nastanka kisele tumorske mikrosredine odgovorne za veći metastatski potencijal i rezistenciju tumora na terapiju (De Milito i Fais, 2005, Walsh i sar., 2015, Asgharzadeh i sar., 2017). Ovakva sredina takođe utiče negativno na distribuciju, preuzimanje i bioraspoloživost neoplastičnih agenasa koji su slabe baze (Wojtkowiak i sar., 2012). Sa druge strane, kombinovana primena hemioterapeutika sa pantoprazolom doprinosi njihovom efikasnijem preuzimanju i boljem terapijskom odgovoru (Patel i sar., 2013, Lu i sar., 2019, Wang i sar., 2017a, Wang i sar., 2015). Pozitivni aspekt potencijalne terapijske primene inhibitora protonskih pumpi kao što je pantoprazol predstavlja i selektivno citotoksično dejstvo na ćelije tumora u odnosu na zdrave ćelije (Yeo i sar., 2004). Interesantno je da pored efekata ostvarenih delovanjem na V-ATPazu, pantoprazol može da indukuje smrt tumorskih ćelija i drugim mehanizmima (Zeng i sar., 2016, Feng i sar., 2016), zbog čega detaljnija analiza mehanizama citotoksičnosti ovog leka zavređuje pažnju.

Pored velikog potencijala farmakoloških inhibitora autofagije u lečenju maligniteta, nespecifično dejstvo koje zavisi od doze i dužine tretmana, kao i sposobnost da indukuju programiranu ćelijsku smrt nezavisno od inhibicije autofagije, ograničava mogućnost njihove

upotrebe u istraživanjima i terapiji. Molekularni mehanizmi ove pojave nisu u potpunosti razjašnjeni, a uporedna analiza citotoksičnosti farmakoloških inhibitora autofagije nikada do sada nije sprovedena. Iz tog razloga cilj ovog istraživanja je bio da prvi put sprovede uporednu analizu mehanizama citotoksičnosti farmakoloških inhibitora autofagije na ćelijama mišjeg melanoma (B16) i humanog glioma (U251). Dodatno, zbog potrebe za selektivnijim i manje toksičnim inhibitorima autofagije, deo istraživanja je usmeren na ispitivanje molekularnih mehanizama citotoksičnosti pantoprazola i mogućnosti njegove upotrebe kao farmakološkog inhibitora autofagije.

## **2. Ciljevi**



U skladu sa tim da uporedna analiza molekularnih mehanizama citotoksičnosti farmakoloških inhibitora autofagije do sada nije sprovedena, u okviru ove doktorske disertacije postavljeni su sledeći ciljevi:

- Ispitati uticaj farmakoloških inhibitora autofagije bafilomicina, hlorokina, amonijum hlorida, i pantoprazola na vijabilitet ćelija mišjeg melanoma i humanog glioma *in vitro*.
- Ispitati tip ćelijske smrti koju izazivaju farmakološki inhibitori autofagije.
- Ispitati mehanizam citotoksičnosti farmakoloških inhibitora autofagije.



### **3. Materijal i metode**





### 3.1. Reagensi i rastvori

Za potrebe *in vitro* istraživanja mehanizama citotoksičnosti farmakoloških inhibitora autofagije su korišćeni sledeći reagensi: bafilomicin A1, hlorokin (oba od *Bio-Techne*, Minneapolis, Minnesota, US), amonijum hlorid (*Merk Milipore*, Burlingtone, Massachusetts, US), pantoprazol (*Takeda GmbH*, Oranienburg, Germany), inhibitor AMPK kinaze – dorzomorfina, inhibitor p38 – 4-(4-Fluorophenil)-2-(4-metilsulfinilfenil)-5-(4-piridil)1H-imidazol (SB 203580) (oba od *Merk Milipore*, Burlingtone, Massachusetts, US), inhibitor JNK – 1,9 pirazoloantron (SP600125), Inhibitor ERK – 2-(2-Amino-3-metoksifenil)-4H-1-benzopiran-4-jedan (PD98059) (oba *Santa Cruz Biotechnology*, Dallas, Texas, US), 5-(2,6-Difluorofenoksi)-3-[[3-metil-1-okso-2-[(2-kvinolinilkarbonil)amino]butil]amino]-4-okso-hidrat pentanoične kiseline (Q-VD-OPh-hidrat) (*Merk Milipore*, Burlingtone, Massachusetts, US), pepstatin – (1S, 2S)-2-(((S)-1((4-gvanidinobutil)amino)-4-metil-oksopentan-2il)karbamoil) ciklopropankarboksilna kiselina (E64) (oba od *Bio-Techne*, Minneapolis, Minnesota, US), rapamicin (*Merk Milipore*, Burlingtone, Massachusetts, US), propidijum jodid (PI; *BD Pharmingen*, San Diego, California, US), aneksin V-FITC (*BD Biosciences*, Heidelberg, Germany), ApoStat (*R&D Systems, Bio-Techne*, Minneapolis, Minnesota, US), dihidroetidijum (DHE) dihidrorodamin (DHR), akridin oranž, lizotreker zeleno (svi od *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, US), 5',6,6-tetrahaloro1,1',3,tetraetilbenzimidazilkarbocijanin jodid (JC-1) (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, US), serum fetusa teleta (engl. *fetal calf serum, FCS*) (*Capricorn Scientific*, Ebsdorfergrund, Nemačka), medijumi za kultivaciju ćelija – Opti-MEM (engl. *Dulbecco's Minimal Essential Medium*), RPMI-1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute Medium*) (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, US), *Fluoromount-G* medijuma za fiksiranje (*SouthernBiotech*, Birmingham, Alabama, US), kozji serum, HEPES pufer, glutamin, natrijum piruvat, rastvor antibiotika i antimikotika (*Capricorn Scientific*, Ebsdorfergrund, Germany), tripsin (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, US), etilendiamino tetrasirćetna kiselina (EDTA), Tris, Tween 20, akrilamid/bisakrilamid (30% w/v), N,N,N',N'-tetrametiletlen-1,2-diamin (TEMED) (*SERVA*, Heidelberg, Germany), 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolium bromid, albumin iz seruma govečeta (engl. *bovine serum albumine, BSA*), RNaza, dimetilsulfoksid (DMSO), 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid, (MTT), kristal violet (sve od *Merk Milipore*, Burlington, Massachusetts, US) metanol, etanol, glicerol, paraformaldehid, hlorovodonična kiselina, fosforna kiselina (*Hemofarm*, Šabac, Srbija), tetrabutil amonijum hidrogen fosfat, fenil-metil-sulfonil-fluorid (PMSF), natrijum ortovanadat, natrijum fluorid, koktel inhibitora proteaza (engl. *protease inhibitor cocktail, PIC*), NP-40, natrijum dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate, SDS*), bromofenol plavo, amonijumpersulfat (APS), glicin, Coomassie Brilliant Blue G-250, Triton X-100 (sve od *Merk Milipore*, Burlington, Massachusetts, US), odmašćeno mleko u prahu (*Carl Roth*, Karlsruhe, Germany), smeša referentnih proteina (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, US), zečja antitela na fosforilisane i totalne forme proteina p38, JNK, ERK, mTOR, S6K AMPK, ULK1, antitela na LC3, PARP-1, Beklin-1, β-aktin (sve od *Cell Signalling Technology*, Danvers, Massachusetts, US), p62 (*Novus Biologicals*, Littleton, Colorado, US), CHOP (*Santa Cruz Biotechnology*, Dallas, Texas, US), sekundarno, kozje anti-zečje IgG antitelo konjugovano sa peroksidazom rena (*Jackson ImmunoResearch Laboratories*, West Grove, Pennsylvania, US), peroksidaza rena (ECL) (*GE Healthcare Life Sciences*, Piscataway, New Jersey), sekundarno Alexa Fluor 488 obeleženo magareće anti-zečje IgG antitelo (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham Massachusetts, US), *TRI Reagent®* (*Merk Millipore*, Burlington, Massachusetts, US), prajmeri, dezoksinukleotidi, pufer za reverznu transkripciju, reverzna transkriptaza (*Life Technologies, Thermo Fisher Scientific*, Waltham Massachusetts, US), mala interferirajuća RNK (engl. *small interfering RNA, siRNA*) za mišju ćelijsku liniju na LC3, Beklin-1 i AMPK, a za humanu ćelijsku liniju na AMPK i p38, i odgovarajuće kontrolne siRNA (sve od *Qiagen*, Valencia, California, US), Lipofektamin 2000 (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, US).

### 3.2. Čelijske kulture

Mehanizmi citotoksičnosti farmakoloških inhibitora autofagije ispitivani su na komercijalno dostupnim, adherentnim čelijskim linijama muškog pola mišjeg melanoma B16F0 i humanog glioma U251. Čelije mišjeg melanoma B16F0 su dobijene od Evropske kolekcije čelijskih kultura (*European Collection of Cell Cultures*, Salisbury, UK), a čelije humanog glioma U251 ljubaznošću dr Pedra Tranque (*Univesitatd de Castilla-La Mancha*, Albacete, Spain).

Obe čelijske linije su gajene u vlažnoj atmosferi inkubatora na temperaturi od 37 °C i pri koncentraciji CO<sub>2</sub> od 5% u RPMI 1640 medijumu (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, US) puferizovanom HEPES-om (20 mM) uz dodatak 5% fetalnog telećeg seruma, 2 mM L-glutamina, 1mM natrijum piruvata i 1% penicilin/streptomycin rastvora (sve komponente od *Capricorn Scientific*, Ebsdorfergrund, Germany). Nakon odmrzavanja iz tečnog azota, čelijske linije su propagirane u polistirenskim Petrijevim posudama prečnika 100x20 mm. Za potrebe eksperimenata čelije su po dostizanju 80% konfluentnosti odlepljivane od podloge upotrebom tripsina, centrifugirane (500 g/5 minuta/22 °C) i potom zasejavane u odgovarajućoj gustini. Vijabilitet je ispitivan zasejavanjem ćelija u polistirenske ploče sa 96 bunara i ravnim dnom u gustini 1x10<sup>4</sup>/bunaru. Za analize na protočnom citofluorimetru čelije su zasejavane u polistirenske ploče sa 24 bunara i ravnim dnom u gustini 1x10<sup>5</sup>/bunaru. RT-qPCR analiza izvršena je na ćelijama koje su sađene u polistirenske ploče sa 6 bunarića u gustini 5x10<sup>5</sup>/bunaru dok je imunoblot analiza sprovedena na ćelijama koje su sađene u Petrijeve posude prečnika 100x20 mm u gustini 2x10<sup>6</sup>, a nakon dostizanja konfluentnosti tretirane odgovarajućim agensima. Obe čelijske linije su mirovale 24 h nakon zasejavanja, a detalji naknadnih tretmana objašnjeni su u okviru slika prikazanih rezultata. Sve plastične posude korišćene za propagaciju ćelija i naknadne tretmane, nabavljene su od kompanije *Sarstedt* (Nümbrecht, Germany).

### 3.3. Testovi vijabiliteta

Uticaj bafilomicina, hlorokina, amonijum hlorida i pantoprazola na preživljavanje ćelija mišjeg melanoma i humanog glioma ispitivan je kolorimetrijskim testovima vijabiliteta, zasnovanim na određivanju aktivnosti mitohondrijalnih dehidrogenaza u supernatantu i količine proteina i DNK živih ćelija pričvršćenih za podlogu kultivacionih ploča.

#### 3.3.1. MTT test

MTT test je zasnovan na sposobnosti živih da redukuju žutu tetrazolijumsku so 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2, 5-difeniltetrazolium bromid (MTT), pri čemu nastaje nerastvorljivi, ljubičasto obojeni unutarćelijski proizvod formazan. Reakcija redukcije se odvija učešćem dehidrogenaznih enzima mitohondrija koje su aktivne kod živih ćelija. Iz tog razloga, ovaj test je pogodan za utvrđivanje ćelijskog vijabiliteta, sposobnosti proliferacije ćelija i njihove aktivnosti.

Test je izvođen u mikrotitracionim pločama sa 96 bunara u koje su ćelije zasejane, a zatim blagovremeno tretirane odgovarajućim agensima. Nakon perioda inkubacije i uklanjanja kultivacionog medijuma iz ploča, dodat je rastvor MTT koncentracije 0,5 mg/ml (50 µl/bunaru). B16 čelijska linija je sa ovim rastvorom inkubirana 20 minuta, a U251 čelijska linija 30 minuta, što je odgovaralo vremenu neophodnom za nastanak formazana. Nakon isteka naznačenih termina, supernatanti su uklonjeni i dodat je DMSO (50 µl/bunaru), polarni rastvarač koji je omogućio rastvaranje formazana. Intenzitet crveno-ljubičaste boje koja se razvila nakon rastvaranja ovog jedinjenja i odgovarajuće apsorbancije proporcionalne broju živih ćelija, merene su na automatizovanom čitaču ploča za mikrotitraciju (*Sunrise; Tecan*, Dorset, UK) pri talasnoj dužini od 570 nm.

### 3.3.2. Kristal violet test

Ovaj test zasnovan je na osobini adherentnih ćelija da se tokom smrti odlepljuju od podloge za koju su bile pričvršćene (Kaludjerovic i sar., 2005). Naime, kristal violet supravitalna boja se karakteristično vezuje za proteine i DNK ćelija koje su pričvršćene za podlogu, ali ne i onih koje su se od nje odvojile. Iz tog razloga ovaj test može da se koristi za određivanje relativnog broja živih/adherentnih ćelija ali i za indirektnu kvantifikaciju ćelijske smrti. Veći intenzitet boje korelira sa većim brojem živih ćelija.

Test je izvođen u mikrotitracionim pločama sa 96 bunara nakon odgovarajućih tretmana, tako što su ćelije u kulturi bar tri puta ispirane sa PBS (200  $\mu$ L/bunaru) kako bi se uklonile neadherentne ćelije. Nakon toga izvršena je fiksacija zalepljenih ćelija na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta dodavanjem metanola (50  $\mu$ L/bunaru). Po odstranjivanju metanola, fiksirane ćelije su bojene 1% rastvorom kristal violeta u vodi (50  $\mu$ L/bunaru) u trajanju od 15 minuta, a zatim su ploče intenzivno ispirane vodom da bi se odstranio višak boje koja se nije vezala za fiksirane ćelije. Inkorporirana boja u ćelijama koja je nakon ispiranja zaostajala, rastvarana je 33% rastvorom sirćetne kiseline (50  $\mu$ L/bunaru), a intenzitet razvijene plavo-ljubičaste boje određivan je merenjem apsorbancije svetlosti pri talasnoj dužini od 570 nm na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju (*Sunrise; Tecan, Dorset, UK*). Intenzitet boje bio je proporcionalan broju adherentnih ćelija, odnosno izmerenim apsorbancijama. Rezultati MTT i kristal violet testa su prikazani kao procenat vijabilитета u odnosu na kontrolne ćelije bez tretmana (vijabilitet arbitrarno postavljen na 100%).

### 3.3.3. Fazno-kontrastna mikroskopija

Analiza morfoloških promena ćelija mišjeg melanoma B16 i humanog glioma U251 izvršena je na Leica DCF320 fazno-kontrastnom mikroskopu pri uveličanju od 20x uz pomoću *Leica Application Suite* (version 2.8.1) softvera (*Leica Microsystems, Wetzlar, Germany*).

## 3.4. Analiza parametara ćelijske smrti, produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta, depolarizacije mitohondrija i autofagije metodom protočne citofluorimetrije

Parametri ćelijske smrti, produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta, depolarizacija mitohondrija i autofagija kod B16 i U251 ćelija analizirani su metodom protočne citofluorimetrije, na aparatu *FACSCalibur* (*BD Biosciences, Heidelberg, Germany*). Analizom je obuhvaćeno 10000 ćelija po pojedinačnom uzorku, pripremljenih u duplikatu ili triplicatu za odgovarajuće tretmane. Dobijeni podaci su analizirani upotrebom *BD Cell Quest Pro* softvera (*BD Biosciences, Heidelberg, Germany*).

### 3.4.1. Određivanje faza ćelijskog ciklusa i ispitivanje prisustva fragmentirane DNK

Količina DNK u ćelijama je određena metodom protočne citofluorimetrije nakon fiksiranja ćelija u etanolu i bojenja propidijum jodidom (PI), prema prethodno opisanom protokolu (Kaludjerovic i sar., 2005).

Propidijum jodid (PI) je fluorofora koja se vezuje između baza dvolančanog molekula nukleinskih kiselina. Nakon pobuđivanja svetlošću talasne dužine 488 nm, ovaj fluorohrom oslobađa crvenu fluorescencu proporcionalnu ćelijskom sadržaju DNK. Uzevši u obzir da se sadržaj DNK menja tokom ćelijskog ciklusa, bojenje propidijum jodidom omogućava razlikovanje faze ćelijskog rasta ( $G_0/G_1$ ), faze udvostručavanja DNK sadržaja, odnosno replikacije (S), faze ćelijske deobe ( $G_2/M$ ), kao i detekciju ćelija sa fragmentisanom (hipodiploidnom) DNK (sub $G_0/G_1$ ). Poznato je da u kasnoj fazi apoptoze usled dejstva endonukleaza dolazi do razgradnje DNK molekula u manje fragmente, veličine oko 180 baznih parova, koji se akumuliraju u ćeliji. Iz tog razloga, apoptotične ćelije koje imaju smanjeni sadržaj

DNK, nakon bojenja sa PI i očitavanja oslobođene fluorescence, mogu da se uoče ispred zdravih ćelija na histogramu prikaza ćelijskog ciklusa. Ova zona karakteristična je za apoptozu i naziva se sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> ili hipodiploidni region. Uzevši u obzir da se PI nespecifično vezuje i za RNK, neophodno je da se ona ukloni iz uzorka primenom RNAze. Ukratko, nakon odgovarajućeg tretmana, ćelije su odlepljene tripsinom, sakupljene u epruvete, oprane dva puta u 1 ml PBS, a zatim je sadržaj svake epruvete finalno resuspendovan u hladnom 70% etanolu. Nakon resuspendovanja, epruvete su ostavljene na +4 °C preko noći. U nastavku procedure ćelije su centrifugirane (800 g/5 minuta/22 °C), oprane sa 1 ml PBS, a ćelijski talog je finalno resuspendovan u 300 µl PBS uz dodatak 0,1% Triton X-100 i 1 mg/ml RNAze. Nakon inkubacije od 15 minuta na 37 °C u svaku epruvetu je dodavano 0,05 mg/ml PI. Uzorci su inkubirani 30 minuta na 37 °C i zatim analizirani na protočnom citometru. Na histogramu distribucije intenziteta crvene fluorescence (FL2), ćelije sa hipodiploidnim sadržajem se uočavaju u sub-G<sub>0</sub> segmentu koji prethodi G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> fazi ćelijskog ciklusa. Dobijeni rezultati su prikazani kao procentualni broj ćelija u sub-G<sub>0</sub> fazi u odnosu na ukupan broj analiziranih ćelija.

### 3.4.2. Određivanje apoptoze i nekroze

Tip ćelijske smrti utvrđen je metodom protočne citofluorimetrije upotrebom dvostrukog bojenja sa aneksin V-fluorescein izotiocijanatom (Aneksin V-FITC) i propidijum jodidom (PI).

Kod zdravih ćelija anjonski lipid fosfatidil-serin se aktivno održava na unutrašnjoj strani ćelijske membrane. Sa druge strane, u ranoj fazi apoptoze, fosfatidil-serin može da se nađe i na spoljašnjoj strani ćelijske membrane čiji je integritet još uvek očuvan, a koji se narušava u kasnoj fazi ovog procesa. Oštećenje ćelijske membrane je obeležje i ćelija koje umiru nekrozom. Aneksin V-FITC predstavlja fluorescentno obeleženi protein mase 35-36 kDa, koji se visokim afinitetom vezuje za fosfatidil-serinske ostatke na spoljašnjoj membrani ćelija (rana faza apoptoze), ali se može vezivati za ovaj lipid i kada je integritet membrane narušen. Za PI je karakteristično da ulazi u ćelije kod kojih je membrana oštećena i vezuje se za DNK (kasna faza apoptoze/nekroza). Nakon pobuđivanja svetlošću talasne dužine 488 nm, Aneksin V-FITC oslobađa zelenu fluorescencu (FL1), a PI crvenu (FL2). Na ovaj način, dvostrukim bojenjem sa aneksin V-FITC i PI mogu da se razlikuju populacije ćelija koje se u kvadrantima tačkastog dijagrama prikazuju kao zdrave (Aneksin-/PI-), rano apoptotične (Aneksin+/PI-) i kasno apoptotične ili nekrotične (Aneksin+/PI+). Priprema uzoraka za analizu sprovedena je prema instrukcijama proizvođača (*BD Pharmingen*, San Diego, California, US). Priprema uzoraka za analizu izvršena je nakon isteka inkubacije tako što su ćelije odlepljene iz bunara (ploče sa 24 bunara i ravnim dnom) upotrebom tripsina i prebačene u odgovarajuće FACS epruvete. Potom je usledilo centrifugiranje (500 g/5 minuta/22 °C) i pranje (1 ml PBS), a dobijeni talog je resuspendovan u 100 µL 10x razblaženog Aneksin-vezujućeg pufera sa Aneksin V-FITC (2 µg/ml) i PI (20 µg/ml). Nakon inkubacije od 15 minuta na 37 °C u svaku epruvetu je dodato još 400 µL razblaženog pufera. Uzorci su analizirani pomoću *CellQuest Pro* softvera (*BD GmbH*, Heidelberg, Germany), a rezultati su prikazani kao procenat odgovarajućih ćelijskih populacija u ukupnom broju analiziranih ćelija.

### 3.4.3. Određivanje aktivacije kaspaza

Aktivacija kaspaza analizirana je metodom protočne citofluorimetrije nakon bojenja ćelija fluorescentno obeleženim pankaspaznim inhibitorom ApoStat prema uputstvu proizvođača (*R&D Systems, Bio-Techne*, Minneapolis, Minnesota).

Kaspaze su enzimi iz familije cistein proteaza koje imaju važnu ulogu u započinjanju i izvršavanju apoptotskog procesa počev od razgradnje ćelijskih proteina, reorganizacije skeleta i fragmentacije DNK molekula. ApoStat, koji je obeležen fluorohromom fluorescein izotiocijanatom (FITC), ima sposobnost da se selektivno veže za aktivirane kaspaze, dok se nevezana forma oslobađa iz ćelije i može da se ukloni ispiranjem. Nakon pobuđivanja laserskom

svetlošću (talasna dužina 488 nm) intenzitet oslobođene zelene fluorescence (FL1) FITC-a direktno je proporcionalan aktivnosti kaspaza u ćelijama.

Ukratko, nakon odgovarajućeg tretmana ćelije su tripsinizovane i prebačene u odgovarajuće FACS epruvete, a potom centrifugirane (500 g/5 minuta/22 °C) i oprane u PBS-u. U nastavku procedure ćelijama je dodato 300 µL kultivacionog medijuma sa fluorescentno obeleženim pankaspaznim inhibitorom ApoStat (finalna koncentracija 0.5 µg/ml). Nakon inkubacije od 30 minuta na 37 °C ćelije su oprane da bi se uklonila nevezana boja i resuspendovane u 500 µL PBS, a zatim analizirane na protočnom citometru. Rezultati su prikazani u obliku histograma raspodele intenziteta FL1 fluorescence tretiranih u odnosu na kontrolne ćelije.

#### 3.4.4. Određivanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta

Ukupna produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) i superoksidnog anjona određivana je metodom protočne citofluorimetrije nakon bojenja redoksenzitivnim bojama dihidrorodamin 123 (DHR) i dihidroetidijum (DHE) koje slobodno ulaze u ćeliju. Nakon reakcije sa RKV, DHR se oksiduje u katjonski rodamin koji emituje zelenu fluorescencu, dok DHE nakon reakcije sa superoksidnim anjon radikalom stvara crveno obojeni proizvod etidijum koji se ugrađuje u DNK. Uzorci su pripremani prema uputstvu proizvođača. DHR je dodavan u kulturu ćelija na početku inkubacije (finalna koncentracija 2 µM), za razliku od DHE koji je dodavan tek po isteku odgovarajućeg tretmana (finalna koncentracija 20 µM) i inkubiran 30 minuta na 37 °C. Nakon toga ćelije su tripsinizovane, prebačene u odgovarajuće FACS epruvete, centrifugirane (500 g/5min/22 °C) i oprane u 1 ml PBS. Na kraju procedure ćelije su resuspendovane u 500 µl PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u obliku histograma raspodele intenziteta fluorescence DHR (FL1) odnosno DHE boje (FL2), pri čemu je pomeraj intenziteta fluorescence tretiranih ćelija udesno u odnosu na kontrolne ukazivao na povećanje produkcije RKV, odnosno superoksidnog anjona.

#### 3.4.5. Određivanje potencijala membrane mitohondrija

Promena potencijala membrane mitohondrija ( $\Delta\Psi$ ), karakteristična za rane stadijume programirane ćelijske smrti, određivana je metodom protočne citometrije nakon bojenja lipofilnom katjonskom bojom 5',6,6 -tetrahaloro1,1',3,tetraetilbenzimidazilkarbocijanin jodid (JC-1). Ovaj fluorohrom, zahvaljujući svom pozitivnom naelektrisanju prolazi kroz membranu mitohondrija kada je ona negativno naelektrisana, odnosno kada je membranski potencijal očuvan. Tada u mitohondrijalnom matriksu dolazi do formiranja agregata (tzv. J-agregati) koji emituju intenzivnu crveno-narandžastu fluorescencu (FL2), što je karakteristično za zdrave ćelije. Međutim, u apoptotskom procesu često dolazi do formiranja pora u mitohondrijalnoj membrani i narušavanja membranskog potencijala, što onemogućava prolazak boje i ona ostaje u svojoj monomernoj formi u citoplazmi pri čemu emituje zelenu fluorescencu (FL1). Dakle, ukoliko postoji povećanje zelene fluorescence u odnosu na crvenu (porast F1/FL2), to označava smanjenje mitohondrijalnog potencijala, odnosno pojavu depolarizacije mitohondrija. Sa druge strane, povećanje crvene fluorescence u odnosu na zelenu (porast FL2/FL1), pokazatelj je porasta mitohondrijalnog potencijala tj. hiperpolarizacije mitohondrija. Ukratko, po završetku inkubacije ćelije su tripsinizovane, i centrifugirane (500 g/5 minuta/22 °C), a nakon toga ćelijski talog je resuspendovan u 100 µl boje JC-1 (finalna koncentracija 5 µg/ml) rastvorene u JC-1 vezujućem puferu. Nakon inkubacije od 20 minuta na 37 °C ćelije su oprane dva puta u 1 ml PBS-a da bi se uklonila nevezana boja. Na kraju procedure, ćelije su resuspendovane u 500 µl PBS, a odnos zelene fluorescence monomera i crvene fluorescence agregata JC-1 boje detektovan je protočnom citometrijom. Rezultati su predstavljeni kao odnos crvene (FL2) i zelene fluorescence (FL1). Porast FL2/FL1 odnosa u poređenju sa kontrolom ukazivao je na povećanje mitohondrijalnog membranskog potencijala (hiperpolarizaciju), dok je smanjenje

ovog odnosa ukazivalo na smanjenje mitohondrijalnog membranskog potencijala (depolarizaciju).

### 3.4.6. Određivanje autofagije u ćelijama

Promena broja i zapremine kiselih ćelijskih vezikula ispitana je metodom protočne citofluorimetrije nakon bojenja ćelija pH senzitivnim bojama akridin oranžom (AO) i lizotreker zelenim (eng. *LysoTracker Green*; LTG). Oba fluorohroma predstavljaju slabo bazne supstance koje slobodno prolaze kroz ćelijske membrane pri neutralnoj pH, ali u organelama sa povišenom kiselosti postaju protonovane čime se njihov izlazak preko membrana onemogućava. Pobuđivanjem laserskim snopom svetlosti talasne dužine 488 nm u kontaktu sa kiselim autolizozomima, AO emituje narandžasto-crvenu fluorescencu (FL3), dok pri neutralnom pH, karakterističnom za citoplazmu, ova fluorofora emituje zelenu fluorescencu (FL1). Sa druge strane, intenzitet zelene fluorescence koju emituje LTG (FL1) se povećava nakon ulaska ove boje u kisele vezikule. Ukratko, po završetku inkubacije ćelije su oprane sa 500  $\mu$ l PBS-a, a potom bojene sa 1  $\mu$ M AO tokom 15 minuta, odnosno 100 nM LTG u trajanju od 5 minuta. Nakon isteka naznačenih termina ćelije su tripsinizovane, centrifugirane (500 g/5 minuta/22 °C) i oprane u 1ml PBS-a. Dobijeni talog ćelija je resuspendovan u 500  $\mu$ l PBS-a a uzorci su analizirani na protočnom citofluorimetru. Izračunavanjem relativnog odnosa intenziteta fluorescence u FL3 i FL1, kao i promene intenziteta zelene fluorescence (FL1) ispituje se zakišeljavanje citoplazme karakteristično za proces autofagije. Rezultati su predstavljeni kao odnos FL3/FL1, pri čemu njegovo povećanje u odnosu na kontrolne ćelije (FL3/FL1=1) i pomeraj fluorescence FL1 u desno ukazuje na povećano nagomilavanje kiselih vezikula.

## 3.5. Imunoblot analiza

Aktivnost proteina značajnih u procesu apoptoze i autofagije je ispitivana imunoblot metodom. Razdvajanje proteina na osnovu molekulske mase iz ukupnog ćelijskog ekstrakta je izvršeno denaturišućom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu, dok je primenom osnovnih principa antigen-antitelo reakcija omogućena njihova krajnja detekcija.

Nakon odgovarajućih tretmana, ćelije mišjeg melanoma i humanog glioma su tokom 20 minuta lizirane na ledu u sveže pripremljenom puferu za liziranje sa dodatkom inhibitora proteaza i fostataza (30 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM fenilmetansulfonil fluorid (*PMSF*) i 20  $\mu$ l/ml koktela proteaznih inhibitora, 2 mM natrijum vanadata – Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> i 50 mM natrijum fluorida – NaF), a zatim centrifugirane na 14000 g/15 minuta/+4 °C. Dobijeni supernatanti, odnosno ukupni ćelijski lizati, su izdvojeni za dalju analizu i čuvani na -20 °C.

### 3.5.1. Određivanje koncentracije proteina

Sadržaj proteina svakog pojedinačnog uzorka je određivan metodom po Bradfordu (Bradford, 1976). Metoda je zasnovana na reakciji između proteina i boje komazi brilijant plavo (engl. *Coomassie Brilliant Blue G-250*, CBB) u kiseloj sredini, što kao posledicu ima prelazak CBB u anjonski oblik i pomeraj apsorbancije iz crvene u plavu oblast vidljivog dela spektra. Intenzitet razvijene plave boje i odgovarajuće vrednosti apsorbanci su proporcionalne koncentraciji proteina u uzorku. Ukratko, uzorak proteina ukupnog ćelijskog lizata je razblaživan dodavanjem Bradfordovog reagensa (0,1 mg/ml *Coomassie Brilliant Blue G-250*, 5% etanol, 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> u destilovanoj vodi) u odnosu 1:1000. Apsorbance su potom očitavane na čitaču za mikrotitracione ploče pri talasnoj dužini od 570 nm (*Sunrise*; Tecan, Dorset, UK). Koncentracije proteina su određene poređenjem sa standardnom krivom koja je konstruisana na osnovu apsorbanci dobijenih upotrebom poznatih koncentracija rastvora albumina seruma govečeta (BSA; 5, 10, 15 i 20 mg/ml) sa CCB bojom.

### 3.5.2. Priprema uzoraka i denaturišuća gel elektroforeza (*SDS page*)

Uzorci za razdvajanje proteina na poliakrilamidnom gelu pripremljeni su kuvanjem ćelijskih ekstrakata uz dodatak odgovarajuće zapremine redukujućeg pufera (sastojci pufera nakon kuvanja imali su finalne koncentracije: 2% natrijum dodecilsulfat, 10% glicerol, 2 mM 2-merkaptotanol, 0,002% bromofenol plavo, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8) tokom 5 minuta na 100 °C. Na ovaj način izvršena je denaturacija proteina dok su primenom natrijum dodecilsulfata proteini obloženi negativno naelektrisanim molekulima. Uzevši u obzir da su nakon ovog postupka svi proteini jednog uzorka postali negativno naelektrisani, bilo je moguće izvršiti njihovo razdvajanje samo na osnovu razlika u molekulskim masama. Da bi se sprečio nastanak disulfidnih veza kod proteina koji su denaturisani u pufer je dodavan 2-merkaptotanol.

Razdvajanje proteina na osnovu razlika u molekulskim masama izvršeno je metodom denaturišuće gel elektroforeze u 8%, 10% ili 12% poliakrilamidnom gelu. Gel za poravnanje proteina (4% akrilamid/0,14% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8) u koji su nalivani uzorci je nanošen na gel za razdvajanje proteina (8% akrilamid/0,28% bisakrilamid, 10% akrilamid/0,34% bisakrilamid ili 12% akrilamid/0,41% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8). U gel za sabijanje proteina su nalivane iste količine uzoraka (10-40 µg u zavisnosti od analiziranog proteina). Polimerizacija gelova je omogućena dodavanjem odgovarajućih katalizatora i to 0,05% amonijumpersulfata i 0,033% TEMED-a. Elektroforetski pufer sastojao se iz 192 mM glicina, 0,1% SDS i 25 mM Tris-HCl, pH 8,3. Razdvajanje proteina elektroforezom izvršeno je pri konstantnom naponu tokom 90 minuta. Napon je održavan na 100 V prvih 20 minuta razdvajanja, a nakon prolaska uzoraka kroz gel za poravnanje proteina, napon je povećan na 150 V. Putovanje uzoraka je teklo do trenutka izlaska fronta boje bromofenol plavo sa gela. Smeša referentnih proteina poznatih molekulskih masa u rasponu od 10 do 250 kDa – *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, US), naneta je na svaki gel da bi se odredile molekulske mase proteina od interesa.

### 3.5.3. Imunoblot i detekcija proteina

Transfer proteina sa gelova na nitrocelulozne membrane (*Hybond C*, *GE Healthcare*, Little Chalfont, UK) izvršen je pomoću aparature za polusubi transfer – *TE 70 Semi-dry transfer unit* (*Amersham Biosciences*, Little Chalfont, UK) neposredno nakon elektroforetskog razdvajanja. Nitrocelulozne membrane su kratko držane u puferu za transfer (192 mM glicin, 20% metanol i 25 mM Tris-HCl, pH 8,3), dok su gelovi blago ispirani istim puferom. Na aparaturu je prvo postavljen sloj filter papira visoke moći adsorpcije natopljen puferom za transfer, zatim nitrocelulozna membrana, potom gel i na kraju još jedan sloj filter papira. Okretanjem membrane ka pozitivnoj elektrodi, a gela prema negativnoj, uz primenu struje konstantne jačine (0,8 mA/cm<sup>2</sup> membrane), omogućeno je putovanje negativno naelektrisanih proteina sa gela ka pozitivnoj elektrodi. Proteini koji su putovali ka anodi su se na ovaj način zaustavljali i vezivali za nitroceluloznu membranu. Transfer proteina se odvijao na sobnoj temperaturi u trajanju od 90 minuta.

Nakon završetka transfera, delovi membrana od interesa su isecani i inkubirani u 5% rastvoru odmašćenog mleka u Tris Puferu (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6) sa 0,05% Tween 20 deterdženta (TBS-T) u trajanju od 45 minuta na sobnoj temperaturi. Na ovaj način blokirana su mesta na membrani za koja bi primenjena antitela mogla nespecifično da se vežu. U daljem postupku, membrane su inkubirane tokom noći sa primarnim zečjim antitelom od interesa, na temperaturi od 4 °C uz konstantno sporo mešanje, čime je omogućeno vezivanje za ciljne proteinske determinante. Antitela su razblažena u rastvoru za blokiranje u sledećem odnosu: 1:600 za anti-p-p38, anti-p-JNK, anti-p-S6K; 1:900 za anti-LC3; 1:1000 za anti PARP-1, anti-p-mTOR, anti-mTOR, anti-p-ERK, anti-ERK, anti-p-AMPK, anti-AMPK, anti-Beklin-1, anti-p-AKT, anti-AKT, anti-p ULK1(Ser 757), anti-ULK1(Ser 757), anti-p38, anti-JNK, anti-S6K (sve od *Cell*

*Signalling Technology*, Danvers, Massachusetts), anti-p62 (*Novus Biologicals*, Littleton, Colorado), anti-CHOP (*Santa Cruz Biotechnology*, Dallas, Texas) i 1:2000 za anti- $\beta$ -aktin (*Cell Signalling Technology*, Danvers, Massachusetts, US). U nastavku procedure membrane su ispirane u TBS-T puferu (3x10 minuta) i inkubirane tokom 60 minuta sa sekundarnim, kozjim anti-zečjim IgG antitelom konjugovanim sa peroksidazom rena (*Jackson ImmunoResearch Laboratories*, West Grove, Pennsylvania, US) koje je razblaženo u puferu za blokiranje (1:8000). Nakon isteka vremena, membrane su ispirane (3x10 minuta) u TBS-T puferu, a potom prelivane supstratom za peroksidazu rena (ECL; *GE Healthcare Life Sciences*, Piscataway, New Jersey) tokom 3 minuta. Ovaj enzim je razlagao vodonik peroksid prisutan u supstratu na vodu i kiseonik. Nastali kiseonik je oksidovao luminol iz supstrata pri čemu je nastajao 3-aminoftalat i emitovana svetlosti. Intenzitet nastale hemiluminiscence, bio je proporcionalan količini proteina vezanog za membranu i detektovan je pomoću automatskog detektora *ChemiDoc Imaging System* (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, California, US), a relativne optičke gustine dobijenih imunoreaktivnih traka su interpretirane korišćenjem računarskog programa *Image Lab* (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, California, US). Aktivnost i ekspresija fosforilisane forme mTOR, S6K, p38, ERK, JNK, AMPK, AKT i ULK1 (Ser 757) izražena je u odnosu na totalne forme navedenih proteina. Sa druge strane, ekspresija LC3-II, Beklina-1 i CHOP proteina je izražena u odnosu na aktin.

### 3.6. Ultrastrukturalna analiza ćelija transmisionom elektronskom mikroskopijom (TEM)

Analiza strukturalnih obeležja apoptoze i autofagije u ćelijama mišjeg melanoma i humanog glioma izvršena je transmisionom elektronskom mikroskopijom. Za potrebe ove procedure ćelije su kultivisane u Petrijevim posudama prečnika 60 mm i nakon 24 h mirovanja tretirane odgovarajućim agensima. Po isteku inkubacije, ćelije u kulturi su pažljivo odlepljivane od podloge tripsinom, prebacivane u epruvete, centrifugirane (500 g/5 minuta/22 °C), a zatim oprane 3 puta u 1ml PBS. Poslednje pranje ćelija je izvršeno pri manjoj brzini (200 g/10 minuta/22 °C). U nastavku procedure ćelije su fiksirane 3% glutaraldehidom, a zatim ispirane u kakodilatnom puferu (pH 7,3) 30 minuta. Naredni postupak podrazumevao je fiksiranje ćelija upotrebom 1% rastvora osmijum tetroksida tokom 60 minuta, a zatim još jedno ispiranje u kakodilatnom puferu. Kontrastiranje ćelija izvršeno tokom noći u 0,5% vodenom rastvoru uranil acetata na temperaturi od 4 °C. Nakon dehidracije taloga u rastućim koncentracijama etanola i propilenoksidu započeto je kalupljenje u epoksidnoj smoli (*Epoxy Embedding Medium kit, 45345, Merk Millipore*, Burlington, Massachusetts, US). Uzorci su kalupljeni i sušeni tokom 24 h na temperaturi od 60°C, a zatim isecani na ultramikrotomu *Leica UltraCut UCT* (*Leica Microsystems*, Wetzlar, Germany). Dobijeni semi tanki iseći obojeni su toluidin plavim. Na semi-tankim isećima su potom odabirani delovi za dobijanje ultra-tankih isečaka koji su postavljani na bakarne mrežice, dok je kontrastiranje isečaka izvršeno pomoću uranil acetata i olovo citrata. Analiza dobijenih uzoraka je izvršena na *Morgagni 268D* elektronskom mikroskopu (*FEI*, Hillsboro, Oregon, US).

### 3.7. Konfokalna fluorescentna mikroskopija

Prisustvo agregacije/puntuacije LC3 proteina koja se smatra obeležjem autofagnog procesa analizirano je konfokalnom fluorescentnom mikroskopijom. Svi metodološki koraci su se odvijali na sobnoj temperaturi osim ukoliko nije naznačeno drugačije. Na početku procedure okrugle staklene pločice prečnika 13 mm (*VWR International*, Radnor, Pennsylvania, US), su oprane rastvorom 75% etanola, osušene na plamenu špiritne lampe, a potom smeštene polistirenske ploče sa 24 bunara. Ćelije su zasejavane i gajene na pločicama do dostizanja 60-80% konfluentnosti, a na kraju odgovarajućih tretmana ispirane PBS-om i potom fiksirane 4%



paraformaldehidom (*Hemofarm*, Šabac, Srbija) u trajanju od 30 minuta. U nastavku, ćelije su permeabilizovane metanolom tokom 10 minuta i inkubirane 60 minuta sa blokirajućim reagensom koji je činio 5% normalni kozji serum (*Capricorn Scientific*, Ebsdorfergrund, Germany) sa 0,1% natrijum azida (*Merk Millipore*, Burlington, Massachusetts, US). Nakon pranja u PBS-u usledila je inkubacija sa primarnim zečjim anti-LC3 antitelom (*Cell Signalling Technology*, Danvers, Massachusetts) (1:200) u blokirajućem reagensu tokom noći na 4 °C u vlažnoj kutiji. Ćelije su zatim prane 3x5 minuta u PBS-u i inkubirane sa sekundarnim *Alexa Fluor 488* obeleženim magarećim anti-zečjim IgG antitelom (*Invitrogen*, Paisley, UK) (1:500) u trajanju od 90 minuta u vlažnoj kutiji. Po isteku vremena ćelije su oprane 3x5 minuta u PBS-u i inkubirane sa 100 µg/ml RNAze (*Merk Millipore*, Burlington, Massachusetts, US) tokom 20 minuta. Nakon toga, ćelije su obojene propidijum jodidom (1:3000) tokom 3 minuta i fiksirane na pločicama pomoću fiksacionog medijuma *Fluoromount-G* (*SouthernBiotech*, Birmingham, Alabama, US). Ćelije su analizirane konfokalnom skening mikroskopijom (*Leica TCS SP2*, *Leica Microsystems*, Wetzlar, Germany), upotrebom *PL APO 63x1,3 Glycerol HCX CS* objektiva pomoću *Leica Confocal Software* računarskog programa. Za svaki uzorak, ukupan broj LC3 agregata/punkta je analiziran na 3 nasumično odabrana vidna polja sa 60 ćelija.

### 3.8. Određivanje nivoa ekspresije iRNK gena značajnih za apoptozu i autofagiju

#### 3.8.1. Izolacija RNK

Proces izolacije ribonukleinskih kiselina iz ćelija mišjeg melanoma i humanog glioma je izvršen upotrebom *TRI Reagent*<sup>®</sup> (*Merk Millipore*, Danvers, Massachusetts). Ukratko, nakon odgovarajućih tretmana, iz ćelijskih kultura je uklanjan medijum, a ćelije su lizirane sa 250 µl *TRI Reagent*<sup>®</sup>. Ćelijski lizati su sakupljeni u plastične epruvete (1.5 ml) (*Eppendorf*, Hamburg, Germany) i inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi, a po isteku vremena u lizate je dodato 50 µl hloroforma. U nastavku procedure, uzorci su vorteksovani, inkubirani 10 minuta na 4 °C, a zatim centrifugirani (12000 g/15 minuta/4 °C). Po završetku centrifugiranja u epruvetama je došlo do obrazovanja gornje vodene faze koja je sadržala RNK, intermedijarne faze sa DNK i donje hloroformske faze sa proteinima i lipidima. Vodena faza je pažljivo sakupljena u plastične epruvete u koje je naknadno dodata jednaka zapremina izopropanola. Sadržaj epruveta je resuspendovan, a ćelije su ostavljene 30 minuta na sobnoj temperaturi i zatim centrifugirane (12000 g/15 minuta/4 °C). Nakon centrifugiranja na dnu epruveta se formirao talog RNK. Supernatanti su odstranjeni, a talog je opran u 70% etanolu i centrifugiran (7500 g/5 minuta/4 °C). Ovaj postupak je ponovljen još jednom, a nakon potpunog odstranjivanja etanola pažljivim pipetiranjem, talog RNK je sušen do uparavanja etanola i potom rastvaran u 20 µl destilovane vode.

#### 3.8.2. Reverzna transkripcija

Nakon određivanja koncentracije RNK na aparatu *GeneQuant pro RNA/DNA Calculator* (*Gemini BV*, Apeldoorn, Netherlands), 1 µg RNK svakog uzorka je rastvaran u 15 µl vode sa 0,2 µg nasumičnih heksamernih prajmera i dezoksিনukleotida (*Life Technologies*, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, US) u finalnoj koncentraciji od 1 mM. Za isključivanje potencijalne kontaminacije, uzorak koji je služio kao negativna kontrola sadržao je destilovanu vodu umesto RNK. Nasumično vezivanje prajmera za RNK omogućeno je inkubacijom rastvora na 70 °C u trajanju od 10 minuta. Uzorci su potom inkubirani na ledu tokom 5 minuta. U narednom koraku je svakom uzorku je dodavano po 4 µl pufera za reverznu transkripciju (*5 x First Strand Buffer*) i *M-MuLV* reverzna transkriptaza (1 µl; 200 U/µl) (oba od *Life Technologies*, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, US). Uzorci su inkubirani 10 minuta na temperaturi od 25 °C, a zatim 60 minuta na temperaturi od 42 °C na kojoj se odvijala reakcija

reverzne transkripcije. Ova reakcija je prekinuta inkubacijom uzoraka na 70 °C tokom 10 minuta. Dobijena komplementarna DNK čuvana je na 4°C do upotrebe u reakciji lančanog umnožavanja.

### 3.8.3. Reakcija lančanog umnožavanja sa detekcijom proizvoda u realnom vremenu

Ekspresija gena značajnih u procesima apoptoze i autofagije je ispitana metodom kvantitativne reakcije lančanog umnožavanja u realnom vremenu (engl. *quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR*). Analiza je urađena na *Realplex2 Mastercycler* aparatu (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) a za inkubaciju uzoraka upotrebljene su optičke ploče sa 96 bunara (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US*). U skladu sa preporučenim protokolom od strane proizvođača upotrebljen je *Maxima Hot start Master Mix 2x* i komercijalno dostupni prajmeri i probe (sve od *Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, US*) za miša p53-ushodno regulisani modulator apoptoze (engl. *p53-upregulated modulator of apoptosis, Puma*; Mm00519268\_m1), homolog fosfataze i tenzina (engl. *Phosphatase and tensin homolog, Pten*; Mm00477208\_m1), protein X povezan sa Bcl-2 (engl. *Bcl-2 associated X protein, Bax*; Mm00432051\_m1), promotor smrti povezan sa Bcl-2 (engl. *Bcl-2 associated death promoter, Bad*; Mm00432042\_m1), Bcl-2 homologni antagonist ubica 1 (engl. *Bcl-2 homologous antagonist killer 1, Bak1*; Mm00432045\_m1), B-ćelijski limfom 2 (engl. *B-cell lymphoma 2, Bcl-2*; Mm00477631\_m1), medijator ćelijske smrti koji interaguje sa Bcl-2 (engl. *Bcl-2 interacting mediator of cell death, Bim*; Mm00437796\_m1), Bcl-xL (engl. *B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xL*; Mm00437783\_m1), *Survivin* (engl. *Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5, Birc5/Survivin*; Mm00599749\_m1), protein 53 povezan sa transformacijom (engl. *Transformation-related protein 53, Trp53*; Mm01731287\_m1) *Atg4b* (Mm00558047\_m1), *Atg5* (Mm00504340\_m1), *Atg7* (Mm00512209\_m1), *Atg12* (Mm00503201\_m1), protein povezan sa receptorom gama-aminobuterne kiseline (engl. *Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein, Gabarap*; Mm00490678\_m1), *Beklin-1* (Mm01265461\_m1), p62/sekvestozom1 (engl. *p62/Sequestosome1, p62/Sqstm1*; Mm00448091\_m1), a kao konstitutivno eksprimiran gen (engl. *house-keeping gene*) korišćena je 18s ribozomalna RNK (*Rn18S*; Mm03928990\_g1). Takođe, TaqMan probe korišćene su i za humane uzorke i to *ATF4* (engl. *Activating transcription factor 4*; Hs00909569\_g1), *ATG3* (Hs00223937\_m1), *ATG13* (Hs00207186\_m1), *FOXO1* (engl. *Forkhead box O1*; Hs01054576\_m1), *FOXO3* (engl. *Forkhead box O3*; Hs00921424\_m1), *BIF-1* (engl. *Bax-interacting factor 1*; Hs00211220\_m1), *AMBRA-1* (engl. *The activating molecule in Beclin-1-regulated autophagy*; Hs00387943\_m1), *VPS-34* (Hs00176908\_m1), *FIP200* (engl. *RB1-inducible coiled-coil protein 1*, Hs1089002\_m1), *UVRAG* (engl. *UV radiation resistance-associated gene protein*; Hs00163433\_m1), *RUBICON* (engl. *Run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein, RBCN*; Hs00943565\_m1), *SQSTM1* (Hs00177654\_m1), *BECN1* (Hs00186838\_m1) i 18s RNK kao konstitutivno eksprimirani gen (*RN18S*; Hs03928985\_g1). Na početku metode RT-PCR uzorci su inkubirani 2 minuta na 50 °C a zatim 10 minuta na 95 °C. Reakcija lančanog umnožavanja je imala 40 ciklusa i to: 15 sekundi topljenja na temperaturi od 95 °C i 1 minut na temperaturi od 60 °C da bi se prajmeri vezali za DNK i da bi se DNK lanac sintetisao. Završni korak predstavljala je inkubacija na 60 °C tokom jednog minuta. Sve analize su rađene u duplikatu, a prag ciklusa Ct (engl. *cycle of threshold*) je podešen na 0,1 relativnih fluorescentnih jedinica. Relativna ekspresija gena je izražena kao  $2^{-\Delta Ct}$  pri čemu je vrednost  $\Delta Ct$  dobijena oduzimanjem prosečnih vrednosti kontrolnih duplikata konstitutivno eksprimiranih gena (18s RNK) od prosečnih vrednosti duplikata gena od interesa (Ct). Rezultati su prikazani kao relativna vrednost  $\Delta Ct$  u odnosu na kontrolu, koja je arbitrarno podešena na vrednost 1.

### 3.9. Transfekcija malom interferirajućom RNK

Smanjenje ekspresije gena od interesa je omogućeno primenom RNK interferencije. Za potrebe eksperimentalnih procedura upotrebljene su sledeće male interferirajuće RNK siRNA (engl. *small interfering RNA*): za mišju ćelijsku liniju LC3, Beklin-1 i AMPK siRNA, a za humanu ćelijsku liniju AMPK i p38 siRNA uz odgovarajuće kontrolne siRNA (sve od *Qiagen*, Valencia, California, US). Obe ćelijske linije su gajene u Petrijevim posudama 100×20 mm u RPMI 1640 medijumu sa dodatkom 5% fetalnog telećeg seruma bez antibiotika i antimikotika do dostizanja 60% konfluentnosti. Nakon toga, ćelije su transfektovane upotrebom siRNA za gene od interesa i odgovarajućih kontrolnih siRNA. Primenom Lipofektamina 2000 (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, US) povećana je efikasnost transfekcije i olakšan transport interferirajućih RNK kroz ćelijsku membranu. Za rastvaranje oligomera siRNA i Lipofektamina 2000 je upotrebljen Opti-MEM, medijum sa redukovanim serumom i bez antibiotika. Dobijeni rastvori siRNA i lipofektamina 2000 su pomešani u istom zapreminskom odnosu inkubirani 20 minuta na sobnoj temperaturi čime je omogućeno formiranje oligomer-lipofektamin kompleksa. Prema preporuci proizvođača, medijum u kojima su ćelije održavane je zamenjen i dodat je lipofektamin-siRNK kompleks (finalna koncentracija siRNA, 100 nM; lipofektamin razblažen 600 puta). Ćelije u kulturi su inkubirane 8 h sa medijumom za transfekciju koji je nakon toga zamenjen standardnim kultivacionim medijumom (RPMI 1640 sa 5% FCS i 1% antibiotika/antimikotika). Nakon mirovanja tokom 24h, ćelije su na već opisan način pripremljene za ispitivanje vijabiliteta i imunoblot analizu.

### 3.10. Chou-Talalay metod

Tip interakcije (aditivni, sinergistički ili antagonistički) između lizozomalnih inhibitora autofagije analiziran je Chou-Talalay metodom (Chou i Talalay, 1984). Ćelije su inkubirane sa različitim dozama pojedinačnih inhibitora i njihovim kombinacijama, a vijabilitet ćelija određivan je kristal violet testom. Izračunavanjem vrednosti kombinatornog indeksa (za aditivnu interakciju =1, sinergističku <1, antagonističku >1) upotrebom Chou-Talalay metode, utvrđen je tip interakcije između bafilomicina, hlorokina i amonijum hlorida.

### 3.11. Statistička analiza

Statistička značajnost razlike analizirana je Studentovim t-testom za nezavisne uzorke ili jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) praćenom Student-Newman-Keuls-ovim testom za više nezavisnih uzoraka. p vrednost koja je smatrana značajnom bila je manja od 0,05 (\*p < 0,05).

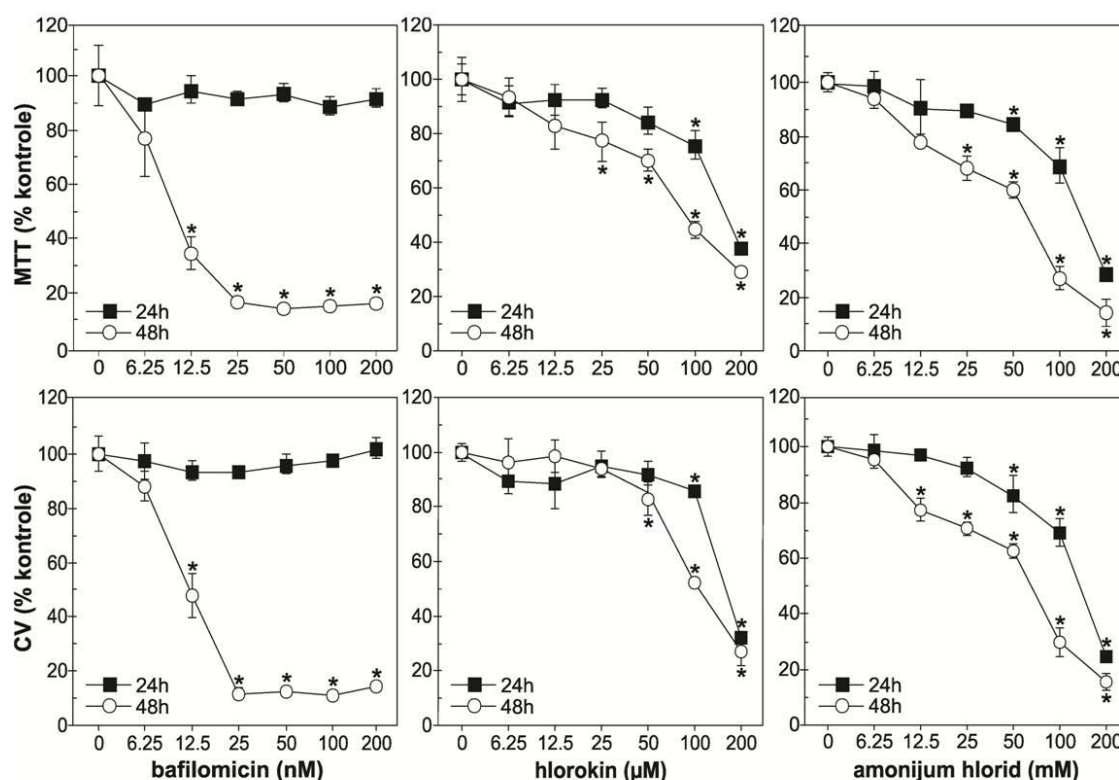


## **4. Rezultati**



## 4.1 LIA smanjuju vijabilitet ćelija mišjeg melanoma

U cilju ispitivanja citotoksičnosti LIA, B16 ćelije mišjeg melanoma su inkubirane sa različitim koncentracijama bafilomicina, hlorokina i amonijum hlorida tokom 24 h ili 48 h. Merenjem aktivnosti mitohondrijalne dehidrogenaze MTT testom i utvrđivanjem relativnog broja ćelija kristal violet testom pokazano je vremenski i dozno zavisno smanjenje vijabiliteta B16 ćelija. U poređenju sa ćelijama koje su tretirane hlorokinom ili amonijum hloridom, citotoksični efekat bafilomicina je ispoljen kasnije, sa značajnim smanjenjem vijabiliteta nakon 48 h (**Slika 1**). Za potrebe eksperimenata opisanih u daljem tekstu korišćena je polovina maksimalne inhibitorne koncentracije (IC<sub>50</sub>) bafilomicina, hlorokina i amonijum hlorida (12,5 nM, 100 μM, i 75 mM) osim ukoliko nije naglašeno drugačije.



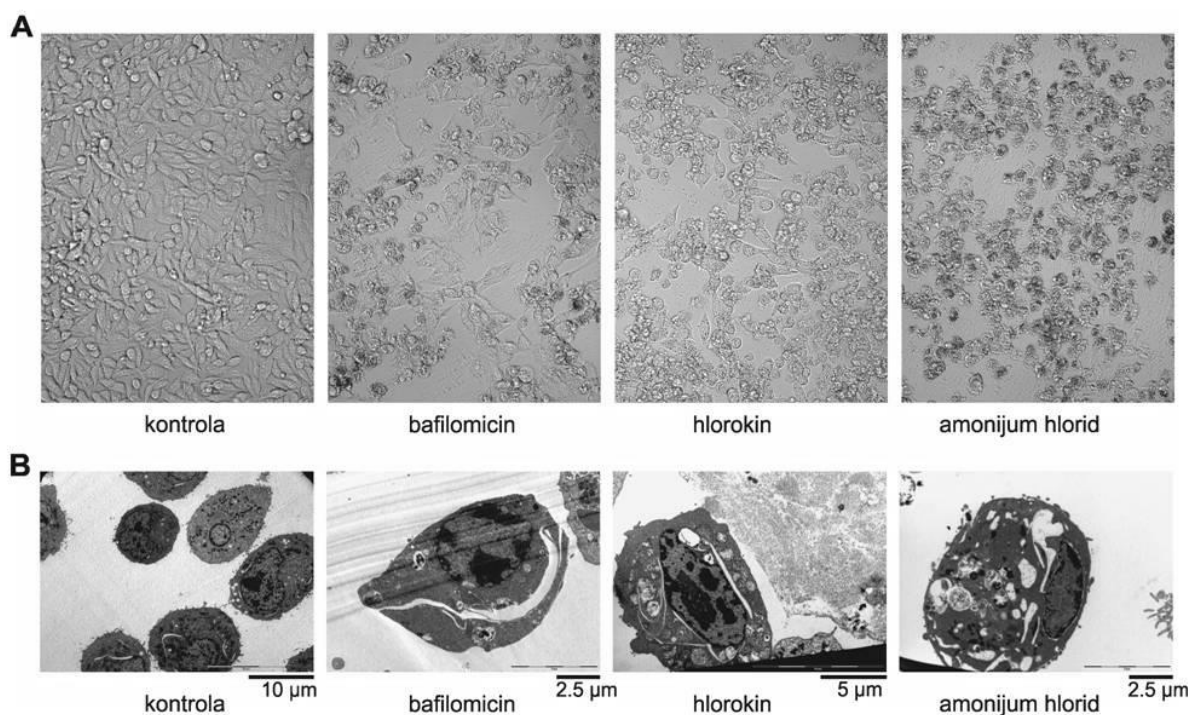
### Slika 1. Citotoksičnost LIA na ćelijama melanoma

B16 ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama BAF, CQ i AH tokom 24 h ili 48 h, a vijabilitet ćelija određen je pomoću MTT ili CV testa. Rezultati reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta prikazani su kao srednje vrednosti ± SD triplikata (\*p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije).

## 4.2 LIA menjaju morfologiju ćelija mišjeg melanoma

Uticaj LIA na morfološke karakteristike ćelija mišjeg melanoma je ispitivan inverznom svetlosnom mikroskopijom 48 h nakon odgovarajućih tretmana. U skladu sa prethodno opisanim smanjenjem preživljavanja, zapaženo je smanjenje broja ćelija i pojava morfoloških osobenosti karakterističnih za ćelijsku smrt: smanjenje volumena, gubitak normalnog poligonalnog oblika, pojava zaokrugljivanja i odvajanja ćelija od podloge (**Slika 2A**). Ovakve morfološke promene zainteresovale su nas da detaljnije ispitamo uticaj LIA na strukturu ćelija primenom transmisivne elektronske mikroskopije. TEM analizom 32 h nakon tretmana svakim pojedinačnim inhibitorom otkriveno je jedno od karakterističnih obeležja apoptoze – kondenzacija hromatina u obliku prstena ili ogrlice (**Slika 2B**). Zajedno sa morfološkim

promenama, TEM analiza potvrdila je citotoksičnost LIA na ćelijama mišjeg melanoma i ukazala na mogućnost da LIA indukuju apoptozu.



**Slika 2. Uticaj LIA na morfologiju i ultrastrukturne karakteristike melanomskih ćelija**

B16 ćelije tretirane su sa IC<sub>50</sub> BAF, CQ i AH. Ćelijska morfologija ispitana je nakon 48 h, invertnim svetlosnim mikroskopom (A), ili transmissionom elektronskom mikroskopijom nakon 32 h (B).

### 4.3 LIA uzrokuju apoptozu ćelija mišjeg melanoma

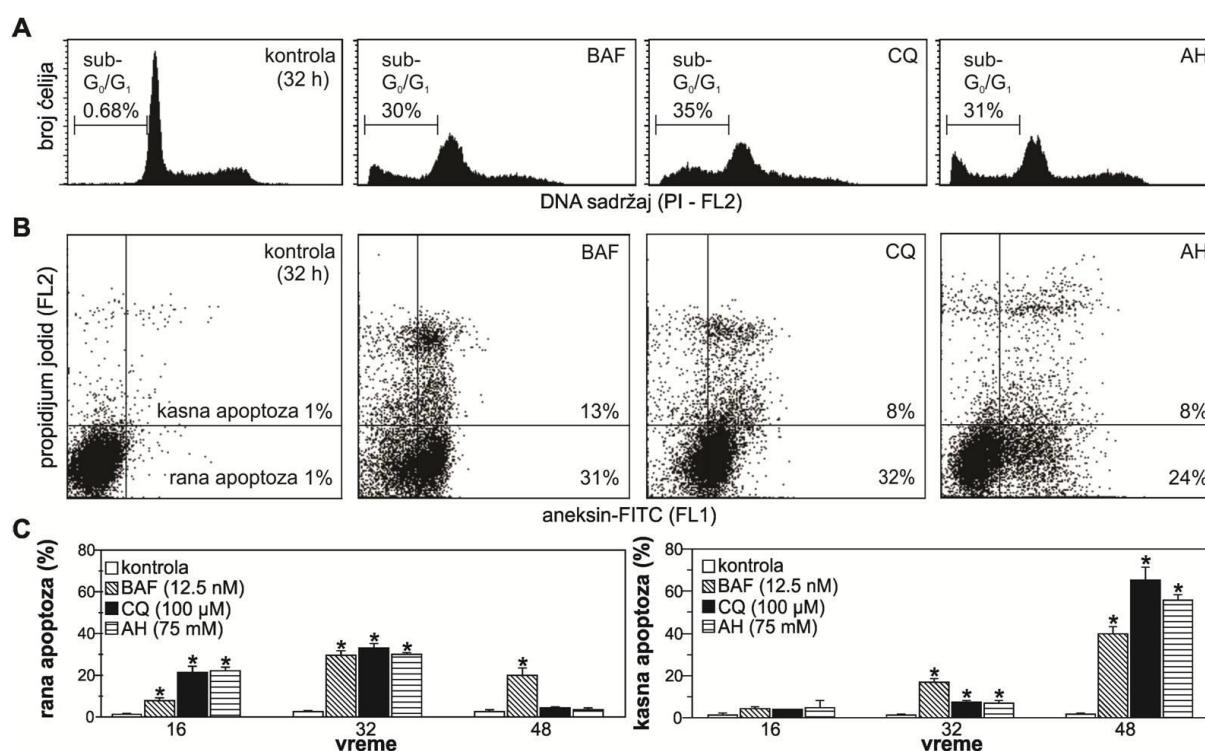
Uzevši u obzir rezultate dobijene analizom ultrastrukturnih morfoloških promena B16 ćelija koji su ukazali na sposobnost LIA da pokrenu apoptozu, u nastavku istraživanja smo upotrebom protočne citometrije želeli da ispitamo njihov uticaj na ćelijski ciklus i potvrdimo tip ćelijske smrti koju izazivaju. Ćelijski ciklus, odnosno prisustvo fragmentirane DNK u B16 ćelijama izloženim inhibitorima autofagije analizirani su primenom fluorohroma propidijum jodida koji se vezuje za DNK. Analizom je otkriveno značajno povećanje broja B16 ćelija sa fragmentiranom DNK, koje se na prikazanim histogramima nalaze u sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> odeljku ćelijskog ciklusa (**Slika 3A**). Sa druge strane, prisustvo fosfatidil-serina na površini ćelija melanoma kao obeležja apoptoze utvrđeno je primenom Aneksin V-FITC fluorohroma. Analiza protočnom citofluorimetrijom je pokazala značajno povećanje broja apoptotskih ćelija sa prisutnim fosfatidil-serinom na spoljašnjoj strani membrane (Aneksin+PI<sup>-</sup> ćelije) već nakon 16 h, sa jasnim porastom nakon 32 h. Ćelije u kasnoj fazi apoptoze (Aneksin+PI<sup>+</sup> ćelije), odnosno one sa oštećenom ćelijskom membranom, zapažene su nakon 48 h (**Slika 3B, C**). Dobijeni rezultati su potvrdili da bafilomicin, hlorokin i amonijum hlorid indukuju apoptotsku smrt ćelija mišjeg melanoma.

### 4.4 LIA indukuju smrt ćelija melanoma zavisnu od kaspaza

Iako kaspaze mogu da imaju veliki značaj u početnim, ali i kasnijim stadijumima apoptoze (Li i Yuan, 2008), apoptotska ćelijska smrt neretko može da se odvija i nezavisno od ovih enzima (Tait i Green, 2008). Pošto smo prethodno pokazali da LIA indukuju apoptozu, u nastavku istraživanja smo želeli da ispitamo ulogu kaspaza u ovom procesu kod B16 ćelija.



Citofluorimetrijskom analizom ćelija obojenih pankaspaznim inhibitorom ApoStat nakon inkubacije sa LIA otkriveno je povećanje intenziteta fluorescence ovog fluorohroma, što je ukazalo na indukciju aktivacije kaspaza (**Slika 4A**). Apoptoza posredovana kaspazama odigrava se isecanjem nekoliko ključnih proteina neophodnih za normalno funkcionisanje ćelija (Fischer i sar., 2003). PARP-1 protein, značajan u remodelovanju hromatina i popravci oštećenog DNK materijala, predstavlja jedan od glavnih supstrata kaspaza čije se isecanje smatra obeležjem apoptoze (Kaufmann i sar., 1993, Tewari i sar., 1995). Iz navedenog razloga je aktivnost kaspaza u ćelijama melanoma izloženim dejstvu LIA potvrđena i posredno, imunoblot detekcijom proteolitičke razgradnje PARP-1 (**Slika 4B**). Sa ciljem da detaljnije ispitamo direktni uticaj kaspaza na ćelijsku smrt, B16 ćelije izložene LIA inkubirane su u prisustvu pankaspaznog inhibitora QVD. Testovima vijabiliteta je utvrđeno značajno smanjenje citotoksičnog efekta LIA nakon primene pankaspaznog inhibitora, čime je potvrđeno direktno učešće kaspaza u procesu apoptoze kod ćelija melanoma (**Slika 4C**).



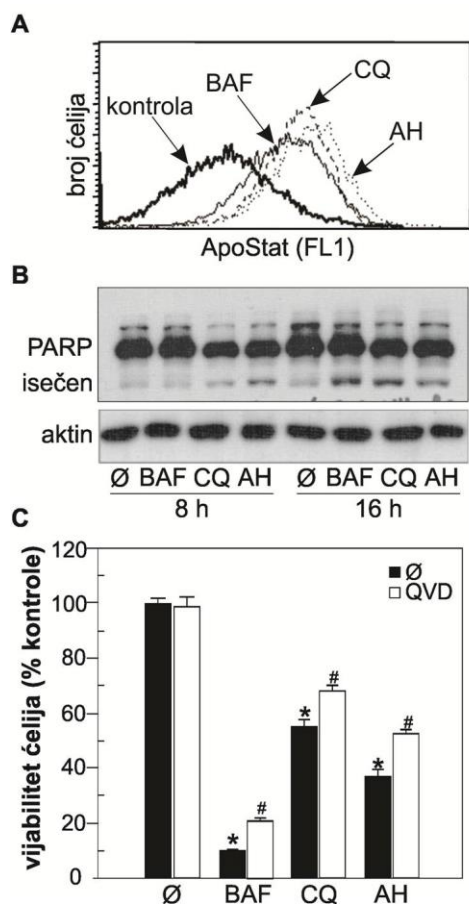
**Slika 3. LIA indukuju apoptozu u ćelijama melanoma**

B16 ćelije su inkubirane sa IC<sub>50</sub> svakog pojedinačnog inhibitora autofagije tokom 48 h. Metodom protočne citometrije analiziran je ćelijski ciklus/prisustvo fragmentacije DNK u ćelijama obojenim propidijum jodidom (**A**), odnosno eksternalizacija fosfatidil-serina kod ćelija obojenih Aneksin V-FITC/propidijum jodidom (**B, C**). Prikazani su reprezentativni histogrami (**A**) i tačkasti dijagrami (**B, C**) sa procentima ćelija u subG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazi ćelijskog ciklusa odnosno u ranoj/kasnoj fazi apoptoze iz dva nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima. (**C**) Podaci iz reprezentativnog od dva nezavisna eksperimenta prikazani su kao srednje vrednosti ± SD triplikata (\*p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije).

#### 4.5 LIA uzrokuju depolarizaciju mitohondrija i oksidativni stres u ćelijama mišjeg melanoma

Poznato je da aktivacija kaspaza može biti povezana sa oslobađanjem malih molekula iz mitohondrija usled permeabilizacije mitohondrijalne membrane praćene promenom membranskog potencijala i oksidativnim stresom (Green i Reed, 1998, Kroemer i Reed, 2000, Ly i sar., 2003). Iz navedenih razloga, u narednim eksperimentima je ispitivan uticaj LIA na depolarizaciju mitohondrija i produkciju reaktivnih vrsta kiseonika u ćelijama melanoma.

Citofluorimetrijskom analizom ćelija tretiranih LIA, a zatim obojenih katjonskom bojom JC-1 otkriveno je vremenski zavisno smanjenje odnosa intenziteta crvene (FL2) i zelene (FL1) fluorescence, koje ukazuje na smanjenje mitohondrijalnog membranskog potencijala, odnosno depolarizaciju mitohondrija (**Slika 5A**). Takođe, primenom redoks-senzitivnih boja DHR (FL1) i DHE (FL2) utvrđeno je povećanje fluorescence navedenih fluorohroma proporcionalno povećanju ukupne produkcije reaktivnih oblika kiseonika (DHR), odnosno superoksidnih anjona (DHE) kod B16 ćelija izloženih dejstvu LIA (**Slika 5B**). Navedeni rezultati ukazuju da je apoptoza B16 ćelija indukovana bafilomicinom, hlorokinom i amonijum hloridom praćena depolarizacijom mitohondrija i pojavom oksidativnog stresa.

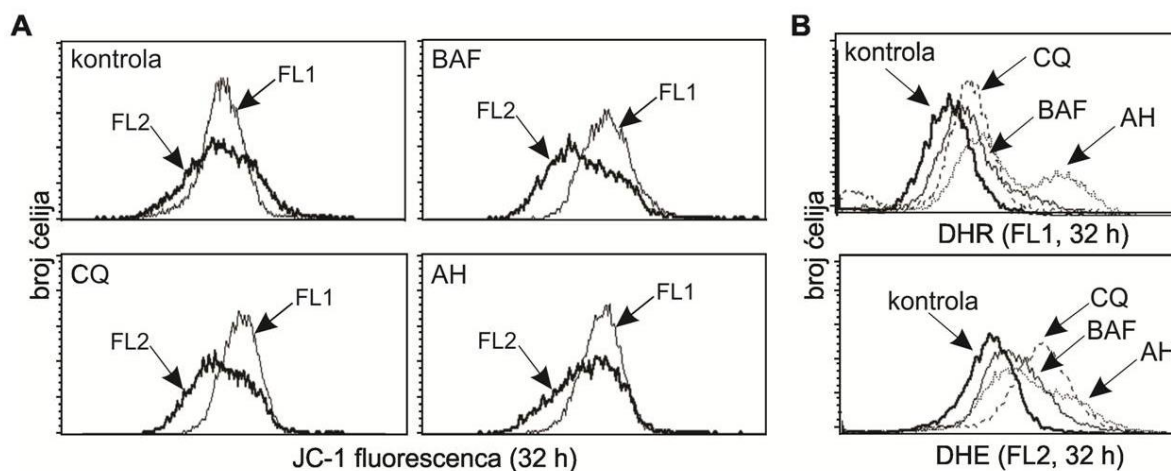


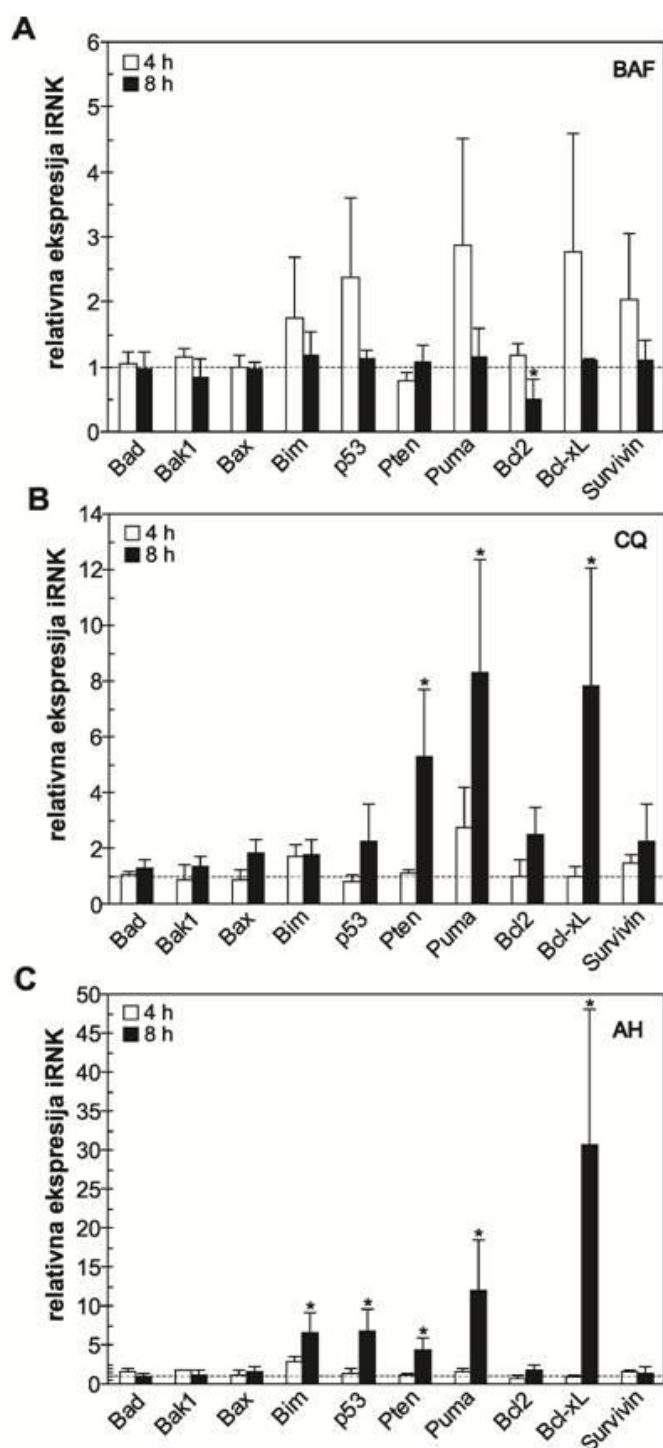
**Slika 4. (levo) LIA indukuju apoptozu posredovanu kaspazama kod B16 ćelija**

Smrt zavisna od kaspaza pokazana je nakon inkubiranja B16 ćelija sa  $IC_{50}$  svakog pojedinačnog inhibitora citofluorimetrijskom analizom ćelija obojenih pankaspaznim inhibitorom ApoStat nakon 32 h (**A**), imunoblot analizom proteolitičke razgradnje PARP-1 proteina nakon naznačenih vremenskih intervala (**B**), kao i merenjem vijabiliteta ćelija (CV test) u prisustvu i odsustvu pankaspaznog inhibitora QVD ( $10 \mu\text{M}$ ) nakon 48 h (**C**). Prikazani su histogram i blot iz reprezentativnog od dva (**A**), odnosno tri eksperimenta (**B**), dok su rezultati ćelijskog vijabiliteta iz jednog od tri nezavisna eksperimenta prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD triplikata ( $*p < 0,05$  i  $\#p < 0,05$  označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, odnosno odgovarajuće kulture bez QVD).

**Slika 5. (dole) LIA indukuju depolarizaciju mitohondrija i produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta**

(**A**) Prikazani su reprezentativni histogrami iz jednog od dva nezavisna eksperimenta, dobijeni protočnom citofluorimetrijom ćelija obojenih JC-1 fluorohromom, koji prikazuju depolarizaciju mitohondrija 32 h nakon tretmana svakim od LIA. (**B**) Prikazani su reprezentativni histogrami iz jednog od dva nezavisna eksperimenta, dobijeni citofluorimetrijskom analizom ukupnih RVK (DHR) i superoksidnih anjona (DHE) 32 h nakon inkubacije ćelija mišjeg melanoma sa svakim od LIA.





**Slika 6. LIA modulišu ekspresiju iRNK za različite pro- i anti-apoptotske molekule**

Ekspresija iRNK za pro-apoptotske i anti-apoptotske molekule u B16 ćelijama tretiranim BAF (A) CQ (B) ili AH (C) analizirana je metodom RT-qPCR nakon naznačenih vremenskih termina. Rezultati reprezentativnog od dva nezavisna eksperimenta prikazani su kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (\* $p < 0,05$  označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije čija ekspresija je prikazana isprekidanom linijom).

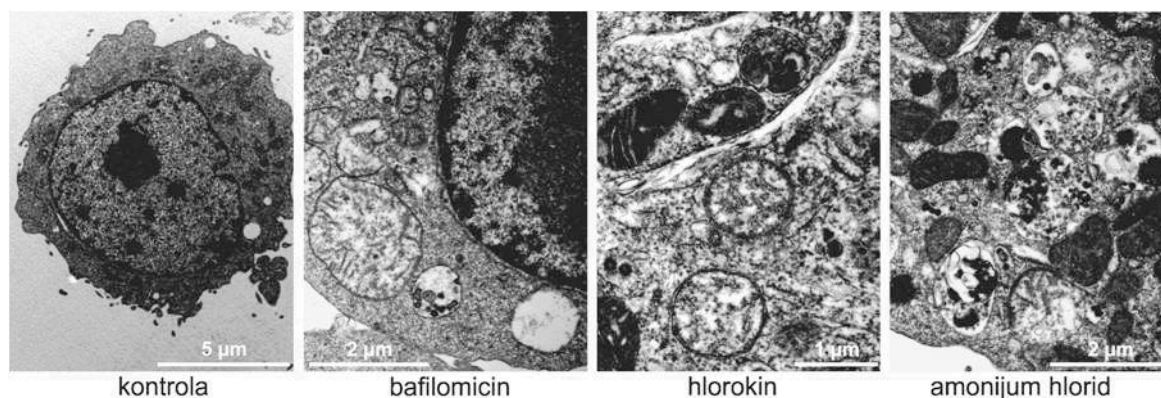
#### 4.6 LIA na različit način regulišu ravnotežu između pro-apoptotskih i anti-apoptotskih molekula u ćelijama melanoma

Permeabilizacija membrane mitohondrija, kao jedan od ključnih događaja u procesu apoptoze, regulisana je ravnotežom između pro-apoptotskih i anti-apoptotskih molekula (Kroemer i sar., 2007). Iz tog razloga, u nastavku istraživanja smo RT-qPCR analizom ispitivali efekat LIA na ekspresiju iRNK različitih pro-apoptotskih (Bad, Bak1, Bax, Bim, p53, Pten i Puma), odnosno anti-apoptotskih (Bcl-2, Bcl-xL i Survivin) molekula u B16 ćelijama. Analizom dobijenih rezultata zapaženo je da se kod ćelija tretiranih bafilomicinom nakon 4 h povećava nivo p53, Puma i Bcl-xL iRNK, ali bez dostizanja statističke značajnosti (Slika 6A). Međutim, nakon 8 h, ovaj inhibitor doveo je do značajnog smanjenja ekspresije anti-apoptotskog molekula Bcl-2

(**Slika 6A**). Sa druge strane, hlorokin i amonijum hlorid su nakon 8 h uzrokovali povećanje nivoa ekspresije iRNK pro-apoptotskih molekula Pten i Puma, kao i anti-apoptotskog Bcl-xL (**Slika 6B, C**). Amonijum hlorid je pored navedenog doveo i do povećanja nivoa ekspresije iRNK pro-apoptotskih molekula Bim i p53 (**Slika 6C**). Dobijeni rezultati potvrđuju da su sva tri inhibitora dovela do povećanja odnosa između pro-apoptotskih i anti-apoptotskih molekula, pri čemu je ovaj odnos kod tretmana hlorokinom i amonijum hloridom postignut povećanjem ekspresije pro-apoptotskih, a kod ćelija tretiranih bafilomicinom smanjenjem anti-apoptotskog molekula.

#### 4.7 LIA indukuju akumulaciju autofagozoma i autolizozoma u ćelijama melanoma

Uzevši u obzir uobičajenu upotrebu bafilomicina, hlorokina i amonijum hlorida kao farmakoloških inhibitora autofagije, želeli smo da potvrdimo ovaj efekat LIA i na ćelijama mišjeg melanoma. Jedna od karakterističnih promena kod ćelija u kojima je autofagija inhibirana jeste povećano nagomilavanje autofagnih vezikula sa nerazgrađenim citoplazmatskim sadržajem (Klionsky i sar., 2012). Akumulacija autofagnih vezikula u ćelijama izloženim dejstvu LIA ispitana je ultrastrukturnom analizom pomoću transmisiona elektronske mikroskopije. Ovom analizom je uočena izražena vakuolizacija ćelija uz prisustvo vezikula nalik autofagozomima, prepoznatljivih po dvostrukoj membrani, kao i autolizozoma sa jednostrukom membranom. Unutar vezikula je zapažen različit, uglavnom nerazgrađen citoplazmatski materijal u kome je bilo i melanozoma karakterističnih za ćelije melanoma (**Slika 7**).



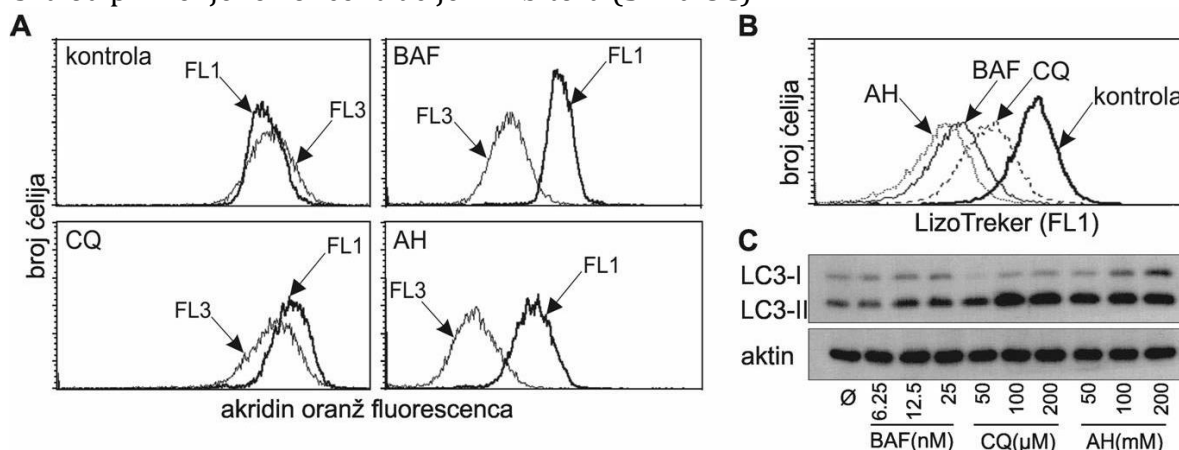
**Slika 7. LIA dovode do nakupljanja autofagnih vezikula u ćelijama melanoma**

TEM analiza melanomskih ćelija inkubiranih sa LIA tokom 16 h pokazuje izraženu vakuolizaciju i vezikule nalik autofagozomima i autolizozomima sa slabo razgrađenim citoplazmatskim sadržajem.

#### 4.8 LIA smanjuju unutarćelijsku kiselost i dovode do inhibicije autofagnog fluksa u ćelijama melanoma

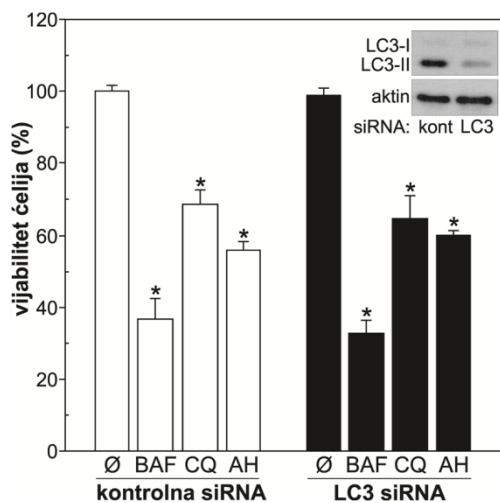
Jedan od pokazatelja inhibicije procesa autofagije, pored nakupljanja autofagnih vezikula jeste promena pH vrednosti kiselih ćelijskih odeljaka, pre svega lizozoma, kao i povećanje nivoa LC3-II proteina usled smanjene razgradnje u autolizozomima. Iz navedenih razloga pomenuti parametri su ispitivani u narednim eksperimentima. Promena unutarćelijske kiselosti B16 ćelija inkubiranih sa LIA ispitivana je protočnom citofluorimetrijom upotrebom pH senzitivnih fluorohroma akridin oranža i LizoTrekerja. Rezultati analize su pokazali da LIA dovode do alkalizacije kiselih ćelijskih odeljaka, što se ogledalo smanjenjem odnosa intenziteta crvene (FL3) prema zelenoj (FL1) fluorescenci AO kao smanjenjem zelene fluorescence LT (**Slika 8A**,

**B).** Takođe, imunoblot analizom je potvrđeno da tretman inhibitorima dovodi do povećanja unutarćelijskog sadržaja LC3-II proteina (**Slika 8C**), glavnog markera autofagozoma, koji se tokom procesa autofagije ujedno i razgrađuje. Navedeni rezultati ukazuju da je smanjenje kiselosti lizozoma uzrokovano LIA dovelo do inhibicije autofagne razgradnje (fluksa) i posledičnog nakupljanja autofagozoma sa visokim sadržajem nerazgrađenog LC3-II proteina. Takođe, imunoblot analizom je zapaženo da, iako su hlorokin i amonijum hlorid bili nešto efikasniji u povećanju nivoa LC3-II proteina u odnosu na bafilomicin, inhibicija autofagije nije zavisila od primenjene koncentracije inhibitora (**Slika 8C**).



### Slika 8. LIA izazivaju alkalizaciju lizozoma i inhibiraju autofagiju u ćelijama melanoma

B16 ćelije su inkubirane sa IC<sub>50</sub> (**A**, **B**) ili različitim koncentracijama (**C**) LIA. Kiselost lizozoma je ispitivana nakon 4 h protočnom citometrijom kod ćelija obojenih akridin oranžom (**A**) i Lizo-Trekerom (**B**). (**C**) Nivoi LC3-II proteina ispitivani su nakon 8 h imunoblot metodom. Prikazani su histogrami i imunoblotovi iz reprezentativnog od tri, odnosno dva nezavisna eksperimenta.



### Slika 9. LIA indukuju smrt melanomskih ćelija nezavisno od inhibicije autofagije

B16 ćelije transfektovane su kontrolnom ili malom interferirajućom RNK na LC3B protein, a potom tretirane sa IC<sub>50</sub> LIA. Čelijski vijabilitet utvrđen je CV testom nakon 48 h, a rezultati reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta prikazani su kao srednje vrednosti + SD triplikata (\*p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije).

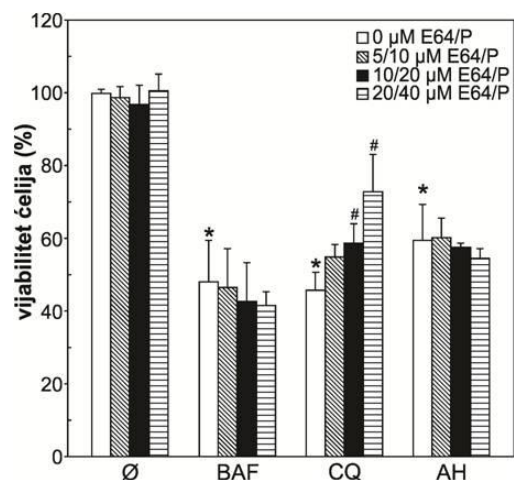
## 4.9 LIA indukuju apoptozu ćelija melanoma nezavisno od inhibicije autofagije

Brojna istraživanja sprovedena do danas opisala su moguća preklapanja u mehanizmima regulacije procesa apoptoze i autofagije i njihovu međusobnu interakciju (Eisenberg-Lerner i sar., 2009, Gump i Thorburn, 2011). S tim u vidu, u daljem istraživanju zanimalo nas je da ispitamo potencijalni uticaj inhibicije autofagije na preživljavanje ćelija melanoma inkubiranih sa LIA. Autofagija je blokirana ushodno od fuzije autofagozoma sa lizozomima, na nivou stvaranja autofagozoma, inhibicijom ekspresije LC3B gena pomoću male interferirajuće RNK, a vijabilitet ćelija je ispitivan kristal violet testom. Rezultati su pokazali da genetska inhibicija LC3B nije dovela do značajne promene u preživljavanju B16 ćelija nakon tretmana svakim

pojedinačnim inhibitorom, jer su i kontrolne i LC3B deficijentne ćelije ispoljile veoma sličnu osetljivost na LIA (**Slika 9**). Ovi podaci ukazuju na to da, iako postoji razlika u sposobnosti inhibicije autofagije između bafilomicina, hlorokina i amonijum hlorida, ovi inhibitori indukuju apoptozu koja je nezavisna od inhibicije autofagije.

#### 4.10 Lizosomalni katepsini su uključeni u ćelijsku smrt izazvanu hlorokinom, ali ne i bafilomicinom ili amonijum hloridom

Iako su rezultati našeg dosadašnjeg ispitivanja potvrdili da LIA inhibiraju autofagiju i da je smrt B16 ćelija nezavisna od ovog procesa, prethodno uočeno smanjenje fluorescence pH senzitivnih fluorohroma (AO i LT), izuzev inhibicije autofagije, može da nastane kao rezultat oštećenja membrane lizozoma (Repnik i sar., 2016). Poznato je da permeabilizacija lizosomalne membrane praćena oslobađanjem katepsina, proteaza čija je osnovna uloga u razgradnji proteina lizozoma, može da pokrene signale za apoptozu. Katepsini najčešće uzrokuju permeabilizaciju membrane mitohondrija i dovode do posledičnog oslobađanja molekula značajnih za odvijanje apoptoze (Boya i Kroemer, 2008). Iz navedenih razloga, u našem istraživanju smo testirali značaj katepsina u citotoksičnosti LIA. Za potrebe ovog eksperimenta ćelije tretirane LIA inkubirane su u prisustvu ili odsustvu pepstatina A – inhibitora katepsina D, i E 64 – inhibitora katepsina B, H i L. Analiza vijabilитета ćelija kristal violet testom pokazala je da kombinacija ova dva inhibitora dovodi do delimičnog smanjenja citotoksičnog efekta hlorokina, ali da nema uticaj na ćelije tretirane bafilomicinom ili amonijum hloridom (**Slika 10**). Dobijeni rezultati ukazuju da katepsini oslobođeni nakon permeabilizacije lizozoma učestvuju u apoptozi B16 ćelija izazvanoj hlorokinom, ali ne i bafilomicinom ili amonijum hloridom.



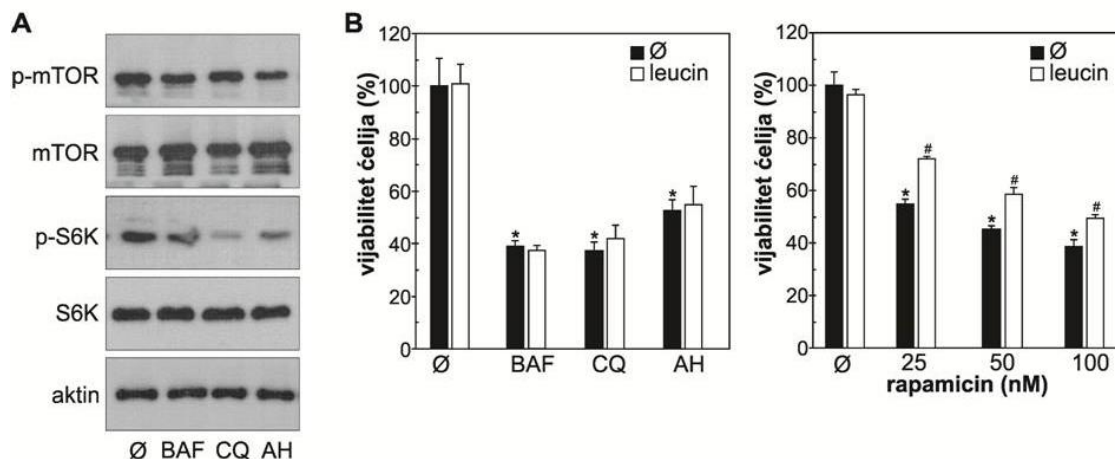
**Slika 10. Hlorokin uzrokuje permeabilizaciju membrane lizozoma u ćelijama melanoma**

B16 ćelije su inkubirane sa LIA u prisustvu ili odsustvu inhibitora katepsina E64 i pepstatina A (P). Vijabilitet ćelija utvrđen je CV testom nakon 48 h i rezultati reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta prikazani su kao srednje vrednosti + SD triplikata (\* $p < 0.05$  i # $p < 0,05$  označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, odnosno odgovarajuće kulture bez E64 i pepstatina).

#### 4.11 Citotoksični efekat LIA je nezavisan od inhibicije mTOR kinaze u ćelijama melanoma

Lizozomi predstavljaju organele sa važnom ulogom u katabolizmu intracelularnog i ekstracelularnog materijala, a poslednjih godina je uočena njihova značajna interakcija sa serin-treonin kinazom mTOR i uticaj na aktivnost ovog enzima u kontroli autofagije (Sancak i sar., 2010, Puertollano, 2014). mTOR kinaza ispoljava plejotropnu funkciju u regulaciji ćelijske smrti. Sa jedne strane može da učestvuje u ćelijskom rastu i progresiji ćelijskog ciklusa, a sa druge da aktivira proces apoptoze (Asnagli i sar., 2004, Schmeisser i Parker, 2019). Iz tog razloga, u nastavku istraživanja smo želeli da ispitamo potencijalni uticaj ove kinaze na citotoksičnost posredovanu LIA u ćelijama melanoma. Aktivacioni status mTOR-a je ispitivan imunoblot metodom, a rezultati su pokazali da sva tri inhibitora autofagije dovode do inhibicije njegove fosforilacije (**Slika 11A**). U skladu sa ovim rezultatom detektovano je smanjenje

aktivnosti p-S6 kinaze, nishodnog supstrata mTOR-a (**Slika 11A**). Da bismo utvrdili da li inhibicija mTOR-a ima direktni uticaj na citotoksični efekat LIA, B16 ćelije inkubirane su sa aktivatorom ove kinaze – leucinom. Analiza vijabiliteta pokazala je da leucin nije imao uticaj na citotoksičnost LIA iako je doveo do delimičnog povećanja preživljavanja ćelija tretiranih rastućim dozama inhibitora mTORa – rapamicina (**Slika 11B**). Dakle, navedeni rezultati ukazuju da je citotoksično dejstvo LIA na B16 ćelije nezavisno od inhibicije mTOR-a.

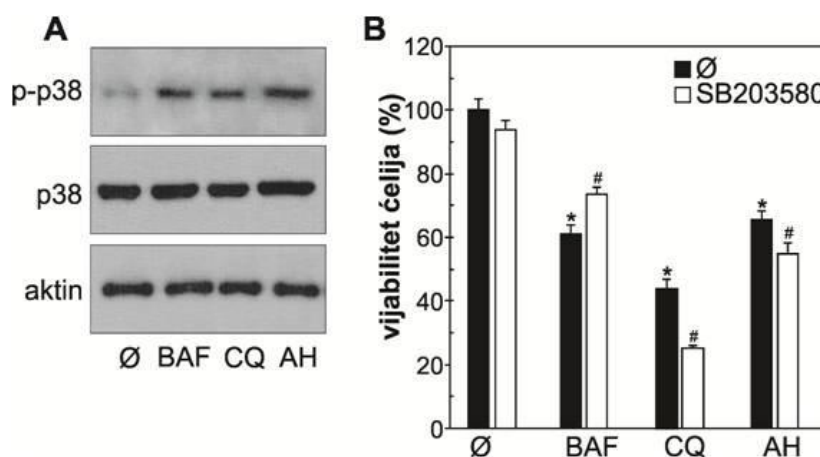


**Slika 11. Citotoksično dejstvo LIA na ćelije melanoma ne zavisi od inhibicije mTOR-a**

(A) B16 ćelije su inkubirane sa IC<sub>50</sub> LIA, a fosforilacioni status mTOR kinaze određen je imunoblot analizom nakon 8 h. (B) B16 ćelije inkubirane su sa IC<sub>50</sub> LIA ili rastućim dozama rapamicina u prisustvu ili odsustvu aktivatora mTOR-a leucina (5 mM), a vijabilitet ćelija ispitan je kristal violet testom nakon 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (\*p < 0,05 i #p < 0,05 označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, odnosno ćelije inkubirane sa LIA/rapamicinom).

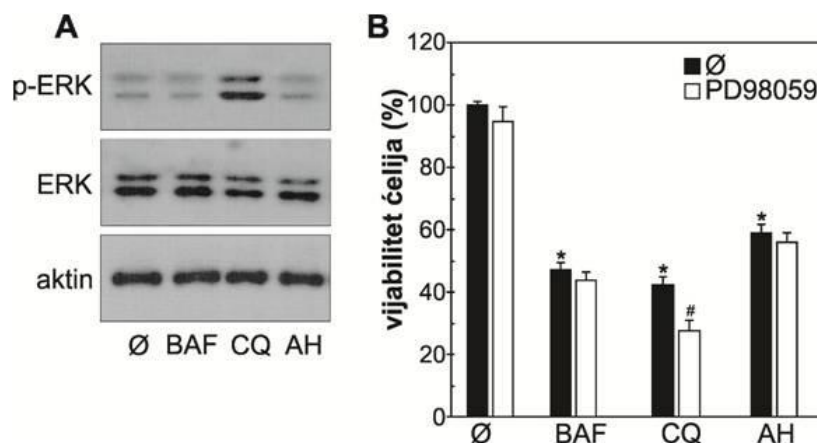
#### 4.12 p38 MAPK različito deluje na citotoksičnost LIA u ćelijama melanoma

Pored mTOR kinaze i superfamilija mitogen-aktiviranih protein kinaza (MAPK) kojoj pripadaju p38 MAPK, ekstracelularnim signalom regulisana kinaza (ERK) i c-Jun N-terminalna kinaza (JNK), takođe ima važnu ulogu u regulaciji ćelijskog rasta, diferencijacije, apoptoze i autofagije (Cargnello i Roux, 2011, Sui i sar., 2014). Kod ćelija melanoma dodatno je opisan i značaj spontane aktivacije signalnog puta p38 MAPK i ERK u procesima migracije i rasta tumora *in vivo* (Estrada i sar., 2009). Mali broj podataka koji se tiču uloge MAPK u citotoksičnosti LIA i činjenica da oni nikada nisu testirani u istim eksperimentalnim uslovima navela nas je da u nastavku istraživanja ispitamo aktivnost i ulogu MAPK u smrti melanomskih ćelija inkubiranih sa LIA. Nakon tretmana ćelija pojedinačnim LIA, fosforilacioni status MAPK je ispitivan imunoblotom. Rezultati analize pokazali su da sva tri inhibitora povećavaju aktivnost p38 MAPK (**Slika 12A**). Da bi detaljnije sagledali potencijalnu ulogu ove kinaze u citotoksičnosti LIA, vijabilitet ćelija je ispitivan u prisustvu selektivnog inhibitora p38 MAPK (SB203580). Rezultati su pokazali da je SB203580 doveo do smanjenja citotoksičnog efekta bafilomicina, dok je sa druge strane uzrokovao smanjenje vijabiliteta ćelija tretiranih hlorokinom, odnosno amonijum hloridom (**Slika 12B**). Na osnovu dobijenih podataka može da se zaključi da p38 MAPK ima značajnu ulogu u citotoksičnosti bafilomicina, dok ispoljava zaštitni efekat u ćelijama melanoma izloženim dejstvu hlorokina i amonijum hlorida.



**Slika 12. Uloga p38 MAPK u citotoksičnom dejstvu LIA na ćelije melanoma**

(A) B16 ćelije su inkubirane sa IC<sub>50</sub> LIA, a fosforilacija p38 MAPK analizirana je imunoblotom nakon 8 h. (B) B16 ćelije su inkubirane sa IC<sub>50</sub> LIA u prisustvu ili odsustvu inhibitora p38 MAPK – SB203580 (5 μM), a vijabilitet ćelija ispitan je kristal violet testom nakon 48 h. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (\*p < 0,05 i #p < 0,05 označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, odnosno ćelije inkubirane sa LIA).



**Slika 13. Uloga ERK u citotoksičnom dejstvu LIA na ćelije melanoma**

(A) B16 ćelije su inkubirane sa IC<sub>50</sub> LIA, a fosforilacija ERK analizirana je imunoblotom nakon 8 h. (B) B16 ćelije su inkubirane sa IC<sub>50</sub> LIA u prisustvu ili odsustvu ERK inhibitora – PD98059 (20 μM), a vijabilitet je ispitan CV testom nakon 48 h. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (\*p < 0,05 i #p < 0,05 označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, odnosno ćelije inkubirane sa LIA).

#### 4.13 ERK štiti ćelije melanoma od citotoksičnosti hlorokina

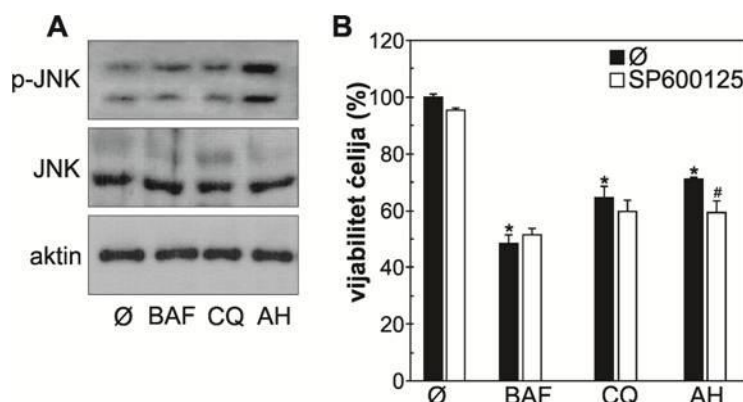
ERK je član MAP kinazne familije koji prevashodno učestvuje u regulaciji ćelijske proliferacije i diferencijacije, ali pod određenim uslovima može da ima i pro-apoptotska svojstva (Lu i Xu, 2006). Da bi se ispitala uloga ERK kinaze u smrti B16 ćelija izazvanoj LIA, aktivnost ovog enzima ispitana je imunoblot analizom statusa njegove fosforilacije. Rezultati su pokazali da je samo kod ćelija tretiranih hlorokinom došlo do povećanja aktivnosti ERK kinaze, dok kod ćelija izloženih dejstvu bafilomicina i amonijum hlorida nije uočena razlika u fosforilaciji u odnosu na netretirane ćelije (**Slika 13A**). U skladu sa imunoblot analizom, primena selektivnog inhibitora ERK (PD98059) dovela je do dodatnog smanjenja vijabilитета ćelija izloženih hlorokinu, dok nije uticala na preživljavanje ćelija tretiranih bafilomicinom, odnosno amonijum hloridom (**Slika 13B**). Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da ERK kinaza ima protektivnu ulogu u smrti



B16 ćelija izazvanoj hlorokinom, dok sa druge strane ne utiče na citotoksičnost bafilomicina i amonijum hlorida.

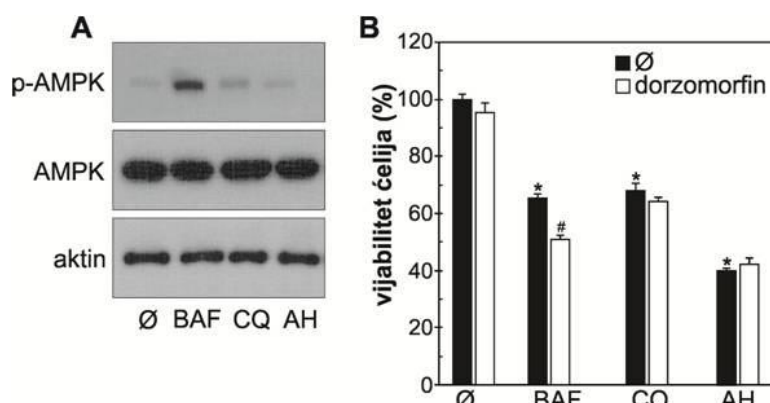
#### 4.14 JNK štiti ćelije melanoma od citotoksičnosti amonijum hlorida

Iako se JNK smatra MAP kinazom koja uobičajeno učestvuje u pro-apoptotskim signalnim putevima, istraživanja su pokazala da ovaj enzim može imati i anti-apoptotsku funkciju u zavisnosti od ćelijskog tipa, prirode stimulusa i dužine njegovog trajanja, ali i učešća drugih signalnih molekula (Liu i Lin, 2005). U skladu sa navedenim, ispitali smo ulogu JNK u citotoksičnosti LIA. Imunoblot analiza je pokazala povećanje aktivnosti JNK enzima samo kod B16 ćelija inkubiranih sa amonijum hloridom (**Slika 14A**). Takođe, inkubacija sa LIA u prisustvu selektivnog inhibitora JNK (SP600125) prouzrokovala je, donekle neočekivano, smanjeno preživljavanje B16 ćelija. Sa druge strane, u skladu sa rezultatima imunoblota, vijabilitet ćelija tretiranih bafilomicinom ili hlorokinom se nije značajno promenio (**Slika 14B**). Dobijeni podaci govore u prilog citoprotektivnoj ulozi JNK u smrti B16 ćelija izazvanoj amonijum hloridom.



**Slika 14. Uloga JNK u citotoksičnom dejstvu LIA na ćelije melanoma**

(A) B16 ćelije su inkubirane sa  $IC_{50}$  LIA, a fosforilacija JNK analizirana je imunoblotom nakon 8 h. (B) B16 ćelije su inkubirane sa  $IC_{50}$  LIA u prisustvu ili odsustvu inhibitora JNK – SP600125 (10  $\mu$ M), a vijabilitet ćelija ispitan je kristal violet testom nakon 48 h. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (\* $p < 0,05$  i # $p < 0,05$  označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, odnosno ćelije inkubirane sa LIA).



**Slika 15. Uloga AMPK u citotoksičnom dejstvu LIA na ćelije melanoma**

(A) B16 ćelije su inkubirane sa  $IC_{50}$  LIA, a fosforilacija AMPK analizirana je imunoblotom nakon 8 h. (B) B16 ćelije su inkubirane sa  $IC_{50}$  LIA u prisustvu ili odsustvu inhibitora AMPK, dorzomorfina (5  $\mu$ M), a vijabilitet ćelija ispitan je kristal violet testom nakon 48 h. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (\* $p < 0,05$  i # $p < 0,05$  označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, odnosno ćelije tretirane LIA).

#### 4.15 AMPK štiti ćelije melanoma od citotoksičnosti bafilomicina

Poznato je da se energetska homeostaza i adaptacija na metabolički stres u ćelijama tumora primarno postižu aktivacijom energetskog senzora AMPK, koji ostvaruje interakciju sa MAP kinazama (Chaube i Bhat, 2016, Jeon, 2016). Uzevši u obzir navedeno, u nastavku istraživanja smo ispitivali učešće AMPK u citotoksičnosti posredovanoj LIA. Imunoblot analizom uočili smo da je jedino bafilomicin uticao na povećanje fosforilacije AMPK (**Slika 15A**). Takođe, primena selektivnog AMPK inhibitora dorzomorfina dovela je do smanjenog preživljavanja ćelija tretiranih bafilomicinom, ali nije imala efekat na vijabilitet ćelija izloženih hlorokinu odnosno amonijum hloridu (**Slika 15B**). Navedeni rezultati ukazuju da AMPK ispoljava protektivni efekat u citotoksičnosti indukovanoj bafilomicinom.

#### 4.16 LIA ispoljavaju međusobno antagonističko dejstvo

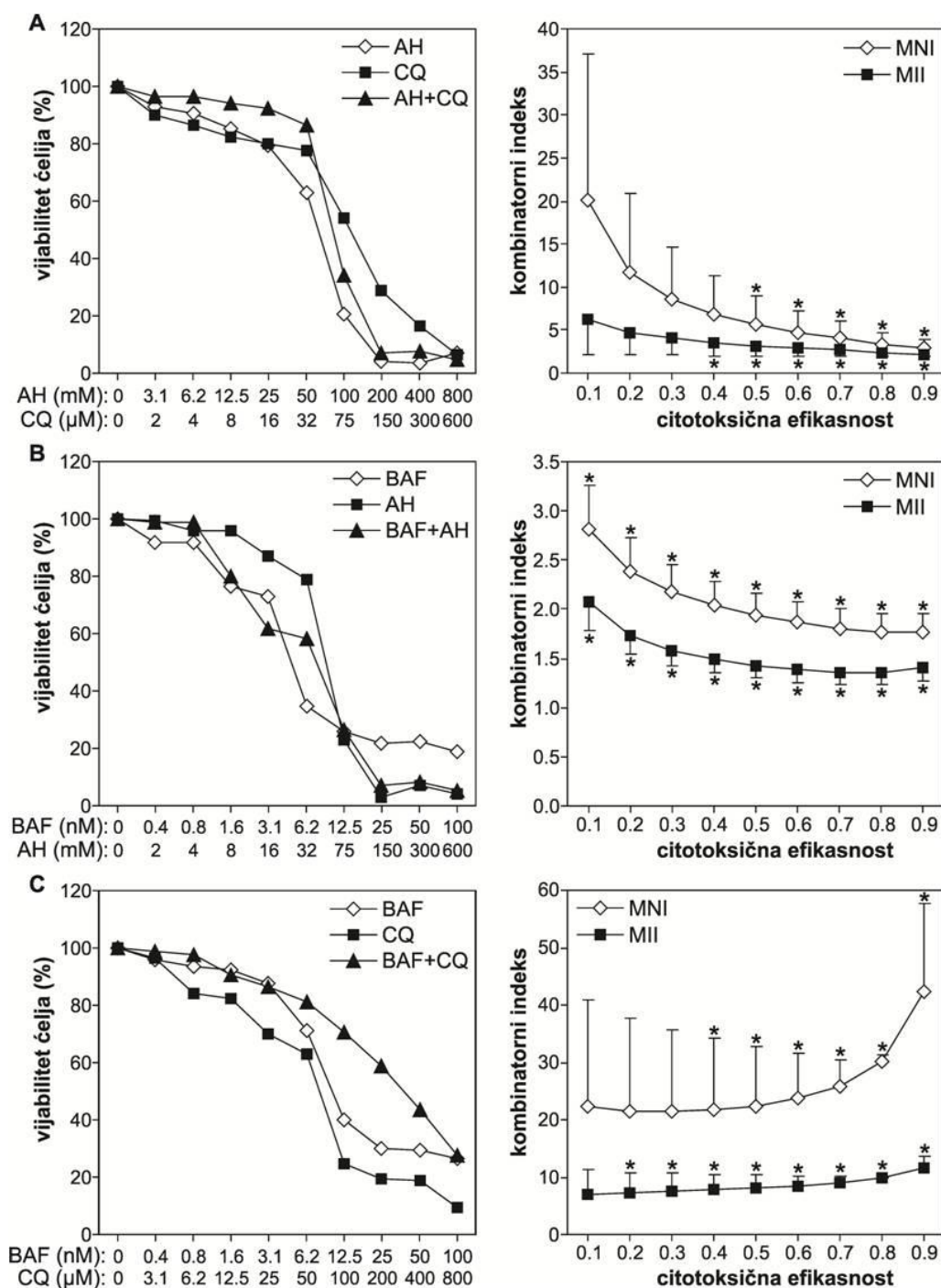
Uzevši u obzir do sada pokazane različite efekte lizosomalnih inhibitora na ćelijama melanoma, zanimala nas je interakcija njihovih citotoksičnih aktivnosti. Naime, iako je pokazano da bafilomicin sprečava ćelijsku smrt indukovanu hlorokinom (Harhaji-Trajkovic i sar., 2012, Pivtoraiko i sar., 2010), interakcije između amonijum hlorida i bafilomicina, kao i između hlorokina i amonijum hlorida, nikada nisu izučavane. Da bi se ispitala priroda interakcije između različitih LIA u citotoksičnom efektu kod B16 ćelija korišćen je Čou-Talalaj metod. Ćelije su tretirane različitim koncentracijama svakog inhibitora pojedinačno i u kombinaciji sa druga dva inhibitora, a ćelijski vijabilitet je određen nakon 48 h kristal violet bojenjem. Rezultati su pokazali da je Čou-Talalaj kombinatorni indeks bio značajno veći od 1 pri rasponu efikasnosti od 0,1-0,99 za svaku kombinaciju inhibitora (**Slika 16A-C**), što ukazuje na sposobnost LIA da međusobno antagonizuju citotoksični efekat na ćelijama mišjeg melanoma.

#### 4.17 LIA smanjuju vijabilitet U251 ćelija glioma

Iako dobijeni rezultati pružaju uvid u mehanizme kojima LIA ostvaruju citotoksični efekat na ćelijama mišjeg melanoma, ostaje nepoznanica da li ovi inhibitori upotrebljeni pod istim eksperimentalnim uslovima ispoljavaju sličan efekat i na humanim ćelijskim linijama tumora. Zbog terapijskog izazova koji predstavljaju tumori centralnog nervnog sistema poput glioblastoma multiforme, deo eksperimenata usmerenih na ispitivanje citotoksičnosti LIA sproveden je na U251 ćelijskoj liniji humanog glioma. Ćelije su tretirane rastućim koncentracijama svakog pojedinačnog inhibitora tokom 24 h ili 48 h, a vijabilitet ćelija je određivan MTT ili kristal violet testom. Rezultati analize su pokazali doznu i vremensku zavisnost smanjenja vijabiliteta U251 ćelija. Uočena razlika u odnosu na ćelije mišjeg melanoma odnosila se na povećanu osetljivost U251 ćelija na bafilomicin, koji je svoje citotoksično dejstvo ispoljio nakon 24 h (**Slika 17**).

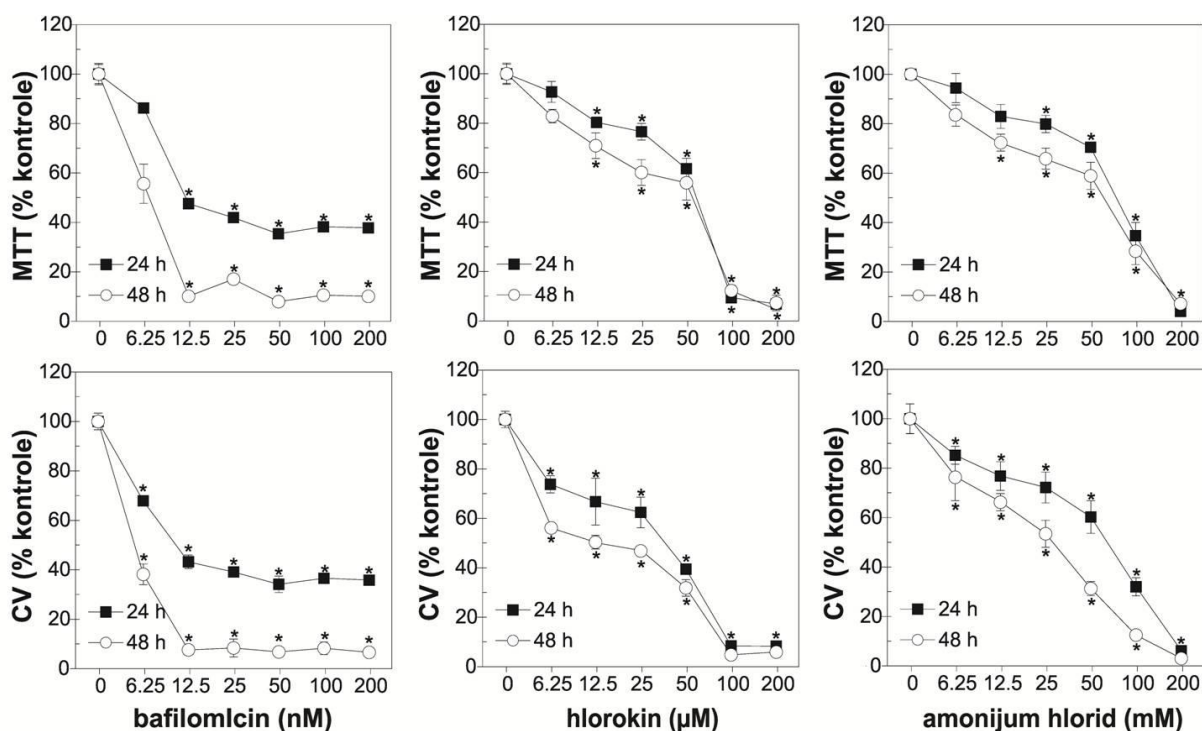
#### 4.18 LIA menjaju morfologiju ćelija humanog glioma

U skladu sa prethodno prikazanim rezultatima vijabiliteta, inhibitori autofagije doveli su i do morfoloških promena na ćelijama humanog glioma. Očekivano, smanjeno preživljavanje ćelija bilo je praćeno morfološkim promenama karakterističnim za ćelijsku smrt koja se ogledala u gubitku normalnog poligonalnog oblika, pojave zaokrugljivanja i odlepljivanja ćelija od podloge, slično ćelijama mišjeg melanoma (**Slika 18**). U eksperimentima opisanim u nastavku korišćena je polovina maksimalne inhibitorne koncentracije ( $IC_{50}$ ) bafilomicina (12,5 nM), hlorokina (75  $\mu$ M) i amonijum hlorida (75 mM), dobijena na osnovu rezultata testova vijabiliteta.



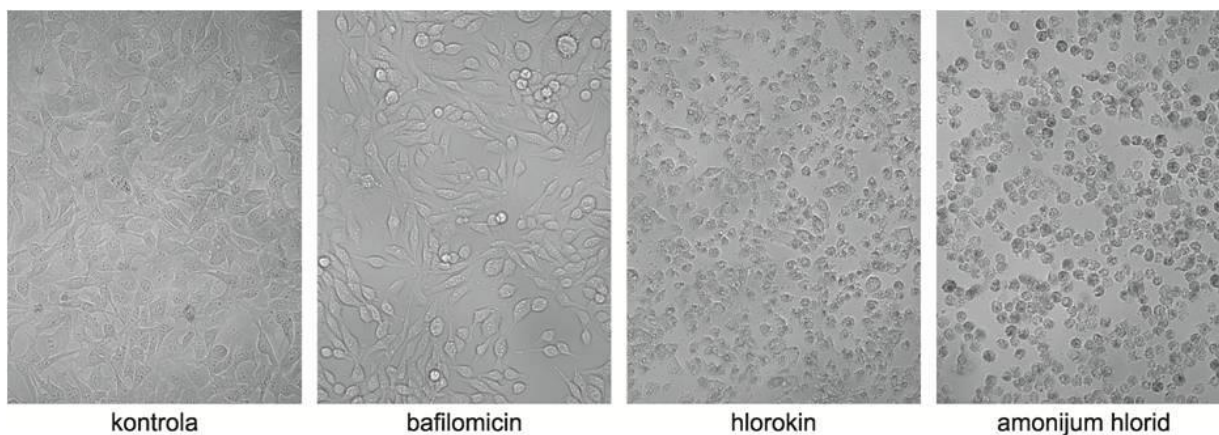
### Slika 16. LIA međusobno antagonizuju citotoksično dejstvo

B16 ćelije su inkubirane u prisustvu ili odsustvu različitih koncentracija svakog LIA pojedinačno i u kombinaciji sa druga dva inhibitora. Ćelijski vijabilitet određen je CV testom (A-C, levi panel). Čou-Talalaj kombinatorni indeks (A-C, desni panel) izračunat je na osnovu rezultata dobijenih određivanjem ćelijskog vijabiliteta, a podaci su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (\* $p < 0,05$  označava vrednosti koje se značajno razlikuju od 1); \*MNI – međusobno neisključiva interakcija, MII – međusobno isključiva interakcija



**Slika 17. Citotoksičnost LIA na ćelijama humanog glioma U251**

U251 ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama BAF, CQ i AH kao što je naznačeno, a vijabilitet ćelija meren je MTT ili CV testom nakon odgovarajućih vremenskih intervala. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. (\* $p < 0,05$  označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije).



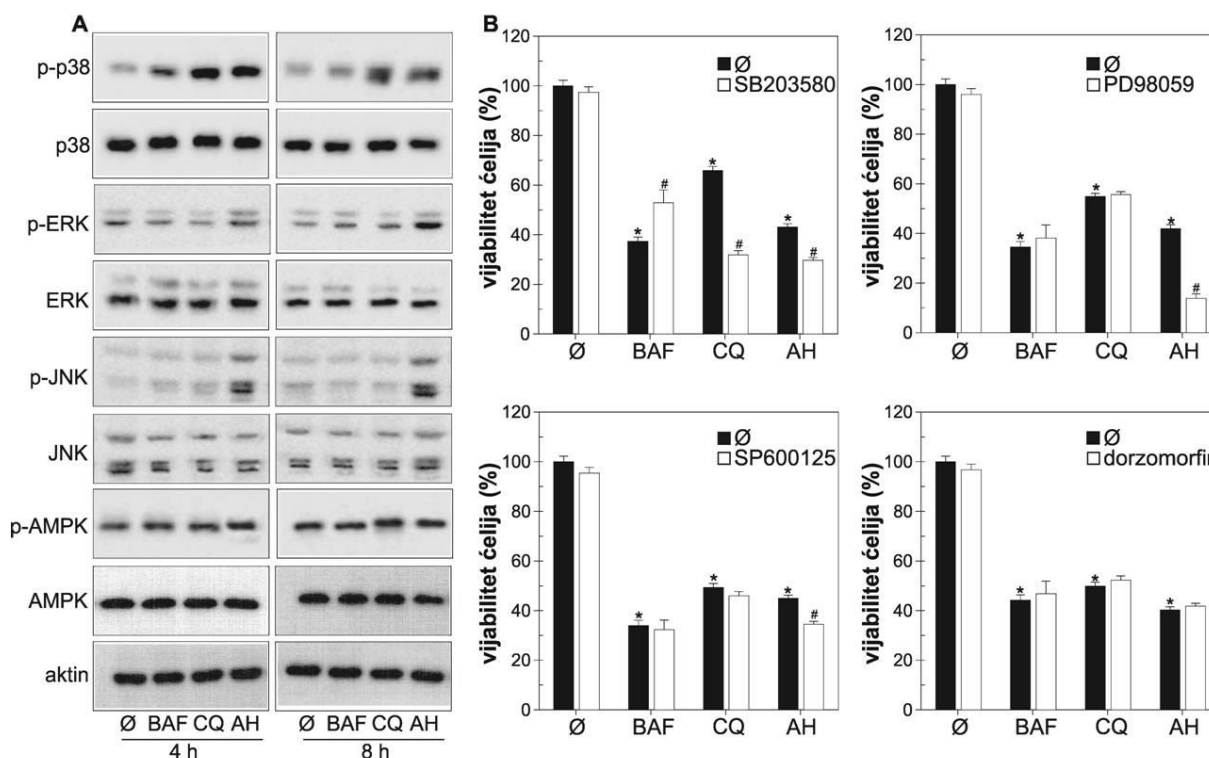
**Slika 18. LIA menjaju morfologiju U251 ćelija**

Morfologija U251 ćelija tretiranih bafilomicinom (12,5 nM), hlorokinom (75  $\mu\text{M}$ ) i amonijum hloridom (75 mM) nakon 24 h ispitana je invertnim svetlosnim mikroskopom.

#### 4.19 Obrazac aktivacije MAPK i AMPK signalnog puta u citotoksičnom dejstvu LIA na U251 ćelije humanog glioma

Uzevši u obzir da farmakološki inhibitori autofagije imaju različite mehanizme dejstva na različitim tipovima ćelija, sličnosti i razlike u mehanizmima dejstva LIA između ćelijskih linija humanog glioma U251 i mišjeg melanoma B16 smo analizirali ispitivanjem aktivnosti i uloge MAP kinaza i energetskog senzora AMPK. Aktivnost kinaza merena je imunoblot analizom, a njihova uloga u citotoksičnosti LIA ispitana je upotrebom selektivnih enzimskih inhibitora. Rezultati analize su pokazali da kod ćelija humanog glioma sva tri inhibitora dovode do povećanja aktivnosti p38 MAPK (**Slika 19A**), slično kao kod B16 ćelija. Sa druge strane,

promena aktivacionog statusa ERK i JNK kinaze odigrala se samo kod ćelija izloženih amonijum hloridu (**Slika 19A**). Takođe, za razliku od B16 ćelija, kod ćelija humanog glioma nijedan od inhibitora nije uticao na fosforilaciju AMPK (**Slika 19A**). Rezultati CV testa su pokazali da je primena selektivnog inhibitora p38 MAPK (SB203580) dovela do povećanje vijabiliteta U251 ćelija tretiranih bafilomicinom, dok je povećala citotoksični efekat hlorokina i amonijum hlorida (**Slika 19B**). Takođe, citotoksičnost amonijum hlorida je pojačana primenom inhibitora ERK (PD 98059) i JNK kinaze (SP600125), dok je ostala nepromenjena u slučaju bafilomicina odnosno hlorokina (**Slika 19B**). U skladu sa rezultatima imunoblot analize, primena selektivnog inhibitora AMPK, dorzomorfina, nije dovela do promena u citotoksičnosti LIA kod ćelija humanog glioma (**Slika 19B**). Iz ovih rezultata može se zaključiti da je slično ćelijama mišjeg melanoma, kod U251 ćelija p38 MAPK učestvovala u citotoksičnosti bafilomicina, dok je ispoljavala zaštitni efekat kod ćelija tretiranih hlorokinom, odnosno amonijum hloridom. Sa druge strane, ERK i donekle neočekivano JNK kinaza, su ispoljile protektivni efekat kod ćelija humanog glioma tretiranih amonijum hloridom, dok nisu imale uticaj na preživljavanje ćelija tretiranih bafilomicinom odnosno hlorokinom. Za razliku od protektivnog dejstva AMPK na B16 ćelije izložene bafilomicinu, ova kinaza nije imala uticaj na preživljavanje ćelija U251 glioma tretiranih LIA. Svi navedeni rezultati ukazuju na drugačiji obrazac aktivacije i uloge MAPK kinaza u tretmanu LIA kod ćelija humanog glioma u poređenju sa B16 ćelijama.

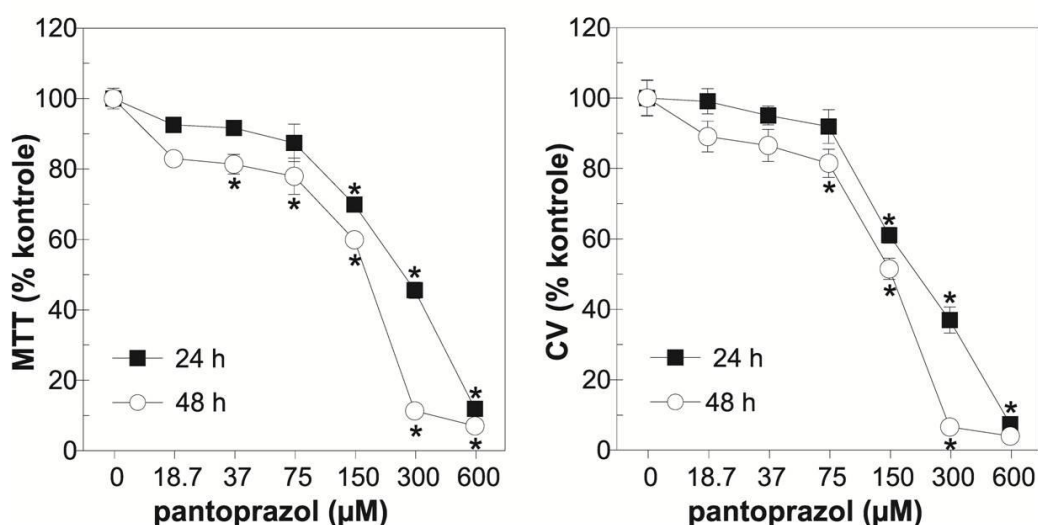


**Slika 19. Uloga MAPK i AMPK u citotoksičnom dejstvu LIA na ćelije U251 glioma**

(A) U251 ćelije su inkubirane sa bafilomicinom (12,5 nM), hlorokinom (75  $\mu$ M) ili amonijum hloridom (75 mM), a fosforilacija p38, ERK, JNK i AMPK analizirana je imunoblotom nakon 4 i 8 h. (B) U251 ćelije su inkubirane sa IC<sub>50</sub> LIA u prisustvu ili odsustvu inhibitora p38 MAPK – SB203580 (5  $\mu$ M), inhibitora ERK – PD98059 (20  $\mu$ M), inhibitora JNK – SP600125 (10  $\mu$ M) i inhibitora AMPK – dorzomorfina (5  $\mu$ M). Vijabilitet ćelija ispitan je kristal violet testom nakon 24 h. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (\*p < 0,05 i #p < 0,05 označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, odnosno ćelije tretirane LIA).

## 4.20 Pantoprazol smanjuje vijabilitet ćelija mišjeg melanoma

Neosporan značaj farmakoloških inhibitora autofagije u bazičnim istraživanjima i rastući potencijal njihove upotrebe u kliničkim ispitivanjima u lečenju maligniteta, nameće stalnu potrebu za pronalaženjem i testiranjem novih supstanci koje bi mogle da ispoljavaju sličan efekat. U novije vreme je pokazano da bi inhibitori protonske pumpe kao što je pantoprazol mogli da zadovolje ove kriterijume. S obzirom na mehanizam dejstva sličan bafilomicinu, želeli smo da ispitamo da li i pantoprazol ispoljava sličan citotoksični efekat. Iz tog razloga, uticaj pantoprazola na vijabilitet B16 ćelija mišjeg melanoma ispitan je nakon inkubacije sa rastućim koncentracijama ovog leka tokom 24 i 48 h. Primenom MTT i CV testa, slično kao i kod tretmana klasičnim LIA, pokazano je dozno i vremenski zavisno smanjenje vijabiliteta ćelija inkubiranih sa pantoprazolom (**Slika 20**). Na osnovu ovih rezultata određene su srednje maksimalne inhibitorne koncentracije (IC<sub>50</sub>) pantoprazola nakon 24 h (300 µM), odnosno 48 h (150 µM), koje su korišćene u ostalim eksperimentima sem ukoliko nije drugačije naglašeno.



**Slika 20. Citotoksični efekat pantoprazola na B16 ćelijama**

B16 ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama pantoprazola kao što je naznačeno, a vijabilitet ćelija je određen MTT ili CV testom nakon 24 ili 48 h. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (\*p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije).

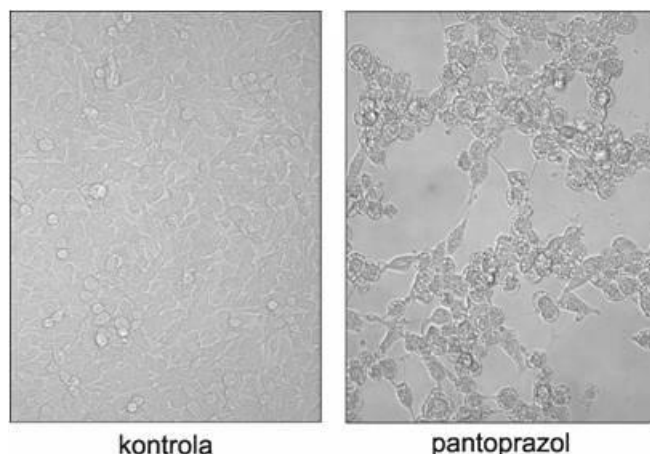
## 4.21 Pantoprazol menja morfologiju ćelija mišjeg melanoma

U skladu sa smanjenjem preživljavanja, kod ćelija tretiranih pantoprazolom uočene su i morfološke promene karakteristične za ćelijsku smrt: smanjenje volumena, zaokrugljivanje i odlepljivanje ćelija od podloge, slično kao i kod klasičnih LIA (**Slika 21**). Iako su promene imale jasna obeležja ćelijske smrti, svaki inhibitor, uključujući pantoprazol, je na ćelijama melanoma ostavio jedinstveni morfološki potpis (**Slika 2A, Slika 21**). Ove razlike u morfološkim promenama sugerišu postojanje različitih citotoksičnih mehanizama, što je već pokazano u slučaju bafilomicina, hlorokina i amonijum hlorida.

## 4.22 Pantoprazol izaziva fragmentaciju DNK i apoptozu ćelija mišjeg melanoma

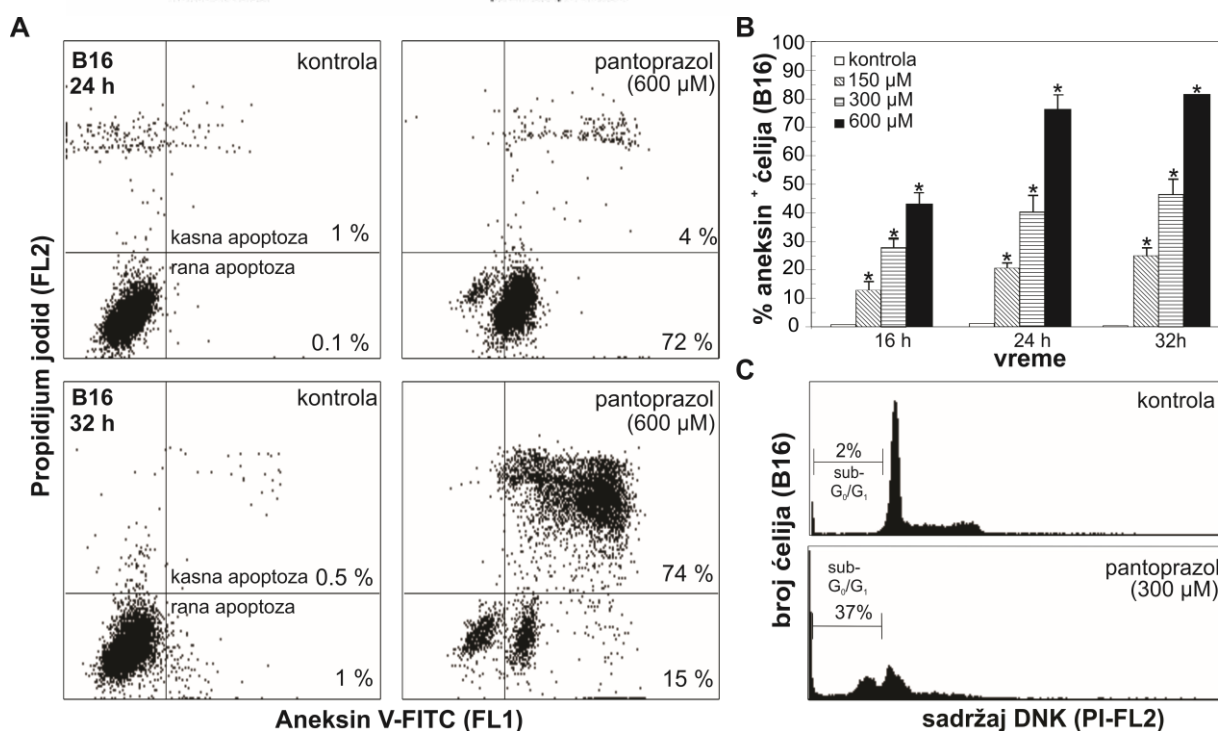
Nakon što smo utvrdili značajne promene u vijabilitetu i morfologiji B16 ćelija, u nastavku istraživanja želeli smo da ispitamo da li se, slično ostalim LIA, u osnovi citotoksičnosti

pantoprazola nalazi indukcija apoptoze. U skladu sa ovim ciljem, primenom protočne citofluorimetrije ispitivani su efekti pantoprazola na tip ćelijske smrti i ćelijski ciklus B16 ćelija. Praćenjem prisustva fosfatidil-serina na spoljašnjoj strani ćelijske membrane upotrebom fluorohroma Aneksin V-FITC i oštećenja membrane bojenjem DNK propidijum jodidom, uočena je pojava ćelija u ranoj (Aneksin<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), kao i onih u kasnoj fazi apoptoze (Aneksin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) (Slika 22A). Pro-apoptotsko dejstvo pantoprazola bilo je dozno i vremenski zavisno (Slika 22B). Takođe, analiza ćelijskog ciklusa nakon bojenja B16 ćelija propidijum jodidom ukazala je na povećano prisustvo ćelija sa hipodiploidnim sadržajem, odnosno fragmentiranom DNK, u sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> odeljku prikazanih histograma (Slika 22C). Rezultati sprovedene analize kojom je detektovano prisustvo Aneksin<sup>+</sup> ćelija i fragmentacije DNK nakon tretmana pantoprazolom potvrđuju da, kao i klasični LIA, ovaj lek indukuje apoptozu.



**Slika 21. Uticaj pantoprazola na morfologiju B16 ćelija**

Morfologija B16 ćelija 24 h nakon tretmana pantoprazolom (300 µM) ispitana je invertnim svetlosnim mikroskopom.

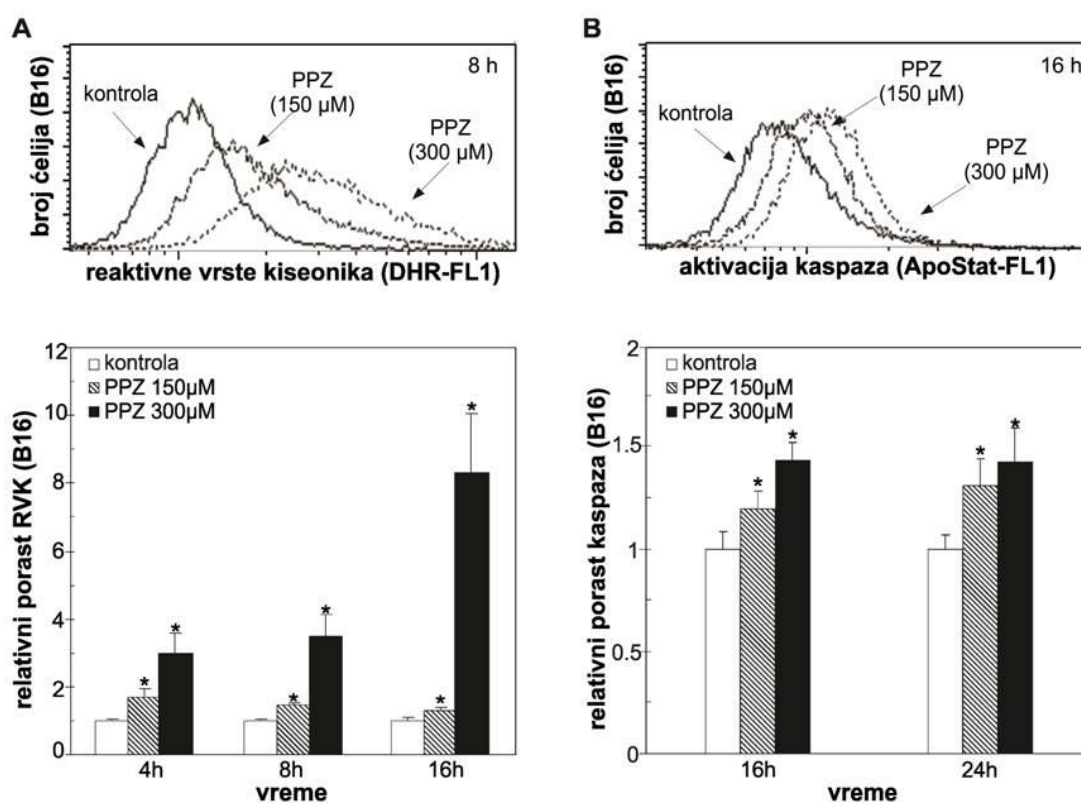


**Slika 22. Pantoprazol indukuje apoptozu B16 ćelija**

(A) Tip ćelijske smrti određivan je metodom protočne citometrije nakon inkubacije B16 ćelija sa pantoprazolom (150, 300 i 600 µM) nakon 16, 24 i 32 h. Prikazani su reprezentivni histogrami iz dva nezavisna ekperimenta. (B) Procentualna zastupljenost Aneksin<sup>+</sup> ćelija u navedenim vremenskim tačkama prikazana je kao srednja vrednost ± SD iz dva nezavisna eksperimenta (\*p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije). (C) Prisustvo fragmentacije DNK analizirano je nakon 16 h protočnom citometrijom ćelija obojenih propidijum jodidom. Prikazani su reprezentivni tačkasti dijagrami iz dva nezavisna eksperimenta.

### 4.23 Pantoprazol izaziva oksidativni stres i aktivira kaspaze u ćelijama mišjeg melanoma

Indukcija apoptoze u ćelijama je često prouzrokovana povećanjem produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (RVK) i posledičnom aktivacijom kaspaza koje učestvuju u razgradnji ćelijskih proteina i fragmentaciji DNK molekula (Redza-Dutordoir i Averill-Bates, 2016). Da bi smo ispitali da li pantoprazol dovodi do povećane produkcije RVK i aktivacije kaspaza u ćelijama mišjeg melanoma, primenjena je metoda protočne citofluorimetrije. Nakon bojenja redoks-senzitivnom bojom dihidrodaminom, kod tretiranih ćelija je uočena rana i vremenski zavisna pojava produkcije RVK (**Slika 23A**). Takođe, upotreba pankaspaznog inhibitora ApoStat pokazala je da je paralelno sa maksimalnom produkcijom RVK, a pre pojave značajnog broja apoptotskih ćelija, došlo i do aktivacije efektorskih enzima apoptoze, kaspaza (**Slika 23B**). Navedeni rezultati pokazuju da pantoprazol dovodi do apoptotske smrti ćelija melanoma kojoj prethode oslobađanje RVK i aktivacija kaspaza.



**Slika 23. Pantoprazol izaziva oksidativni stres i aktivira kaspaze u B16 ćelijama**

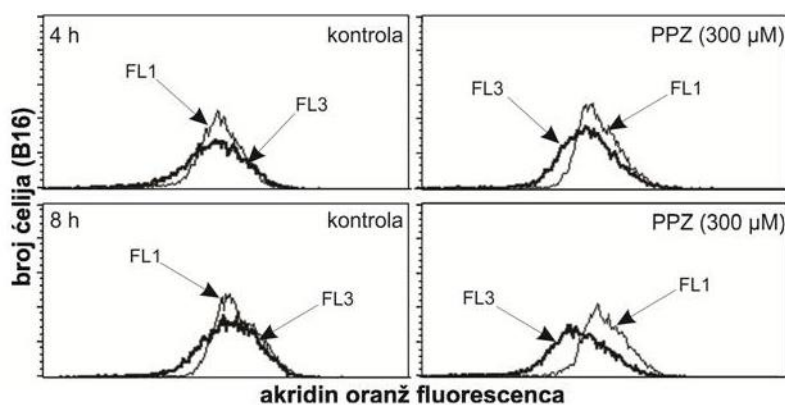
B16 ćelije su inkubirane sa pantoprazolom (PPZ, 150 i 300 μM). Nakon bojenja sa fluorohromima DHR i ApoStat analizirano je prisustvo reaktivnih kiseoničnih vrsta (A) i aktivacije kaspaza (B) metodom protočne citometrije. Rezultati su prikazani kao histogrami iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (gornji panel) i dijagrami relativnog porasta fluorescencije kiseoničnih vrsta/aktiviranih kaspaza (donji panel) nakon naznačenih vremenskih intervala (\* $p < 0,05$  označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije).

### 4.24 Pantoprazol smanjuje unutarćelijsku kiselost kod ćelija mišjeg melanoma

Pored svoje osnovne funkcije – inhibicije  $K^+/H^+$  ATPaze koja učestvuje u regulaciji produkcije želudačne kiseline (Shin i Sachs, 2008), pokazano je da pantoprazol, slično bafilomicinu, utiče i na funkciju vakuolarne ATPaze (V-ATPaze), značajne za održavanje kiselosti organela sa



niskom pH, pre svega lizozoma (Spugnini i sar., 2010, Pamarthy i sar., 2018). Zbog toga smo u narednim eksperimentima ispitivali dejstvo pantoprazola na kisele ćelijske odeljke upotrebom protočne citometrije. U skladu sa tim, B16 ćelije su inkubirane sa pantoprazolom, a potom obojene pH senzitivnim fluorohrom – akridin oranž. Analiza je pokazala postepeno smanjenje odnosa intenziteta crvene (FL3) i zelene (FL1) fluorescence AO tokom 4 h i 8 h, proporcionalno inhibiciji intracelularne acidifikacije B16 ćelija (**Slika 24**). Dakle, dobijeni rezultati su potvrdili da pantoprazol, kao i ostali LIA, smanjuje unutarćelijsku kiselost kod ćelija mišjeg melanoma.



#### Slika 24. Smanjenje intracelularnog pH nakon tretmana B16 ćelija pantoprazolom

B16 ćelije su inkubirane sa pantoprazolom (PPZ, 300 µM). Kiselost lizozoma je ispitivana nakon 4 h ili 8 h protočnom citometrijom ćelija obojenih akridin oranžom. Prikazani su histogrami iz reprezentativnog od dva nezavisna eksperimenta.

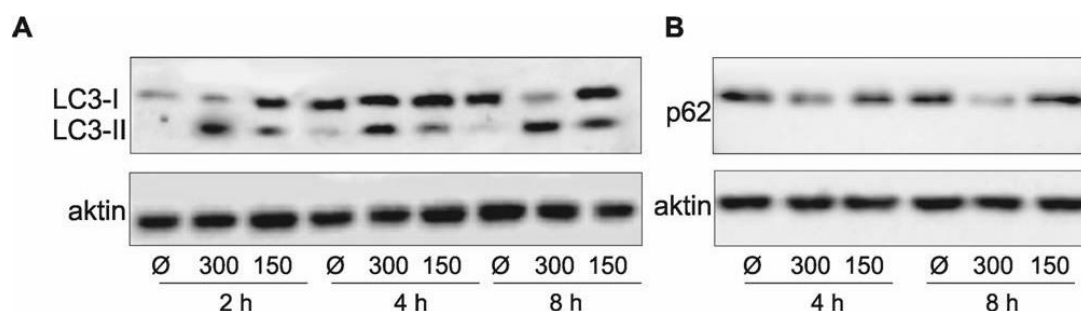
### 4.25 Pantoprazol povećava nivo LC3-II i smanjuje nivo p62 u ćelijama mišjeg melanoma

Uzevši u obzir uočene sličnosti u mehanizmima citotoksičnosti i alkalizaciji kiselih odeljaka između pantoprazola i klasičnih LIA, želeli smo da ispitamo da li ovakva sličnost postoji i u efektima na proces autofagije kod B16 ćelija. Naime, studije na nekoliko ćelijskih linija su pokazale da, kao i klasični inhibitori lizozoma, lekovi poput pantoprazola mogu da inhibiraju autofagiju (Udelnow i sar., 2011, Tan i sar., 2017) Međutim, postojanje podataka o mogućnosti aktivacije procesa autofagije ovim lekom (Chueca i sar., 2016) baca senku na lakoću tumačenja njegovih efekata i nameće potrebu za detaljnijim sagledavanjem ovog problema. Aktivnost autofagije u B16 ćelijama tretiranim pantoprazolom ispitana je imunoblot analizom konverzije LC3-I u marker autofagozoma LC3-II, kao i nivoa glavnog supstrata autofagije – kargo receptora p62. Rezultati ove analize su pokazali dozno i vremenski zavisno povećanje nivoa LC3-II (**Slika 25A**), kao i pomalo neočekivano blago smanjenje nivoa p62, koji se razgrađuje kada je autofagija aktivirana (**Slika 25B**). Navedeni rezultati ukazuju na mogućnost da, suprotno očekivanju, pantoprazol dovodi do aktivacije procesa autofagije kod B16 ćelija.

### 4.26 Pantoprazol aktivira autofagni fluks u B16 ćelijama

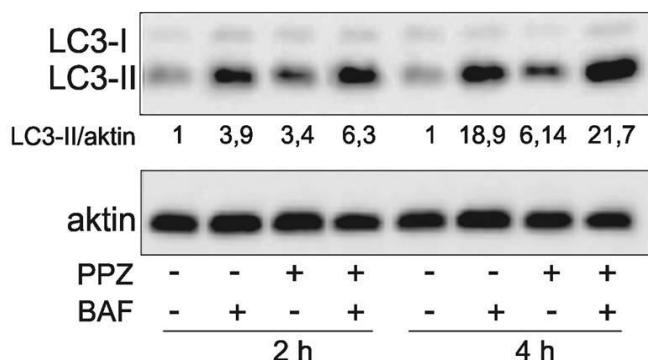
Prilikom tumačenja prikazanih rezultata ne treba zaboraviti činjenicu da povećanje količine LC3-II može da nastane kao posledica nagomilavanja autofagozoma usled njihovog pojačanog stvaranja kada je autofagija aktivirana, ali i zbog blokade autofagije i nemogućnosti prelaska u narednu fazu u kojoj bi se ovaj protein razgradio (Loos i sar., 2020). Sa druge strane, p62 je uključen u mnogobrojne procese u ćeliji i može biti i transkripciono modulisan (Alegre i sar., 2018). Prema važećim preporukama za ispitivanje autofagije, jedan od načina merenja njene aktivnosti podrazumeva imunoblot analizu autofagnog fluksa primenom inhibitora proteolize

kao što je bafilomicin (Klionsky i sar., 2021). Bafilomicin inhibira razgradnju LC3-II u autolizozomima, tako da svako dodatno povećanje nivoa LC3-II potvrđuje njegovo povećano stvaranje, odnosno aktivaciju autofagije. Da bismo ispitali aktivnost autofagije analizom autofagnog fluksa, B16 ćelije tretirane pantoprazolom su inkubirane u prisustvu ili odsustvu bafilomicina. Imunoblot analizom je utvrđeno vremenski zavisno povećanje nivoa LC3-II kod ćelija koje su tretirane kombinacijom bafilomicina i pantoprazola, u odnosu na one tretirane samo pojedinačnim inhibitorom (**Slika 26**) Na ovaj način je potvrđeno da kod ćelija mišjeg melanoma pantoprazol zaista dovodi do povećanja autofagnog fluksa, odnosno aktivacije autofagije.



**Slika 25. Pantoprazol indukuje konverziju LC3-I u LC3-II i smanjuje nivo p62 u ćelijama mišjeg melanoma**

B16 ćelije su inkubirane sa pantoprazolom (150 i 300  $\mu\text{M}$ ). Nivoi LC3-II (**A**) i p62 proteina (**B**) ispitivani su nakon naznačenih termina imunoblot metodom. Prikazani su blotovi iz reprezentativnog od tri (**A**), odnosno dva (**B**) nezavisna eksperimenta.



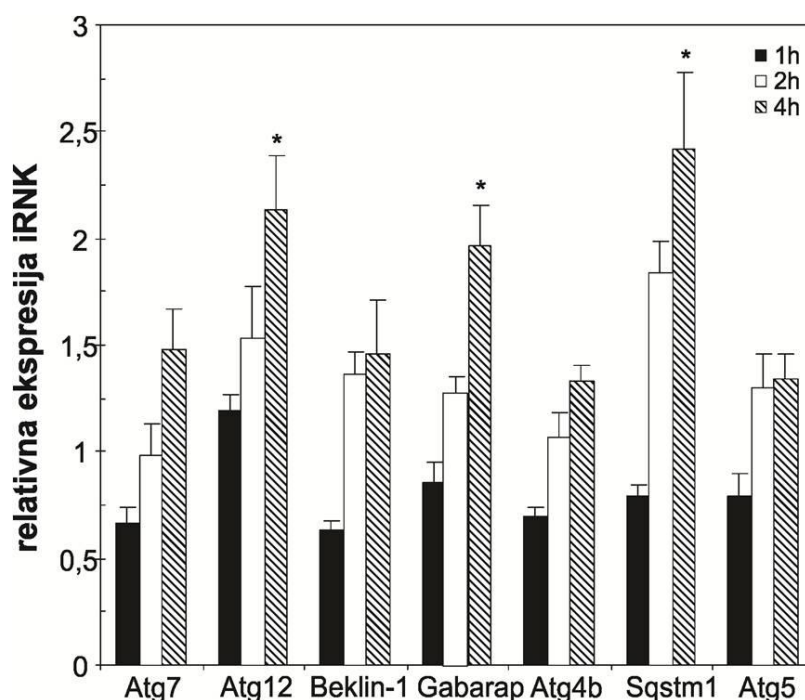
**Slika 26. Pantoprazol aktivira autofagni fluks u ćelijama mišjeg melanoma**

B16 ćelije tretirane pantoprazolom (300  $\mu\text{M}$ ) inkubirane su u prisustvu ili odsustvu bafilomicina (20 nM). Nivoi LC3-II proteina su ispitivani nakon 2 h i 4 h imunoblot metodom. Prikazani su blotovi iz jednog od dva nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima.

#### 4.27 Pantoprazol u ćelijama melanoma povećava ekspresiju ključnih gena koji regulišu autofagiju

Regulacija autofagije kao glavnog kataboličkog procesa eukariotskih ćelija posredovana je grupom evolutivno konzerviranih Atg proteina. Skoro svi Atg proteini su neophodni za nastanak autofagozoma, počev od formiranja fagofore do njenog zatvaranja, pa sve do spajanja sa lizozomima (Levine i Kroemer, 2019). Iako uglavnom regulisana post-translaciono, modifikacijom i međusobnom interakcijom Atg proteina, indukcija autofagije je često praćena povećanjem transkripcije Atg gena. Stoga je u nastavku eksperimenata RT-qPCR analizom ispitana ekspresija glavnih autofagnih gena u B16 ćelijama tretiranim pantoprazolom. Uočeno je statistički značajno povećanje nivoa iRNK za Atg12, koji je glavni medijator u kompleksima odgovornim za formiranje autofagnih vezikula, lipidaciju proteina Gabarap familije i njihovo vezivanje za membranu autofagnih vezikula. U skladu sa povećanjem Atg12, u istoj vremenskoj tački otkriveno je povećanje nivoa iRNK za Gabarap, koji učestvuje u biogenezi vezikula i odvajanju sadržaja citoplazme koji će biti razgrađen u autolizozomima. Sa druge strane,

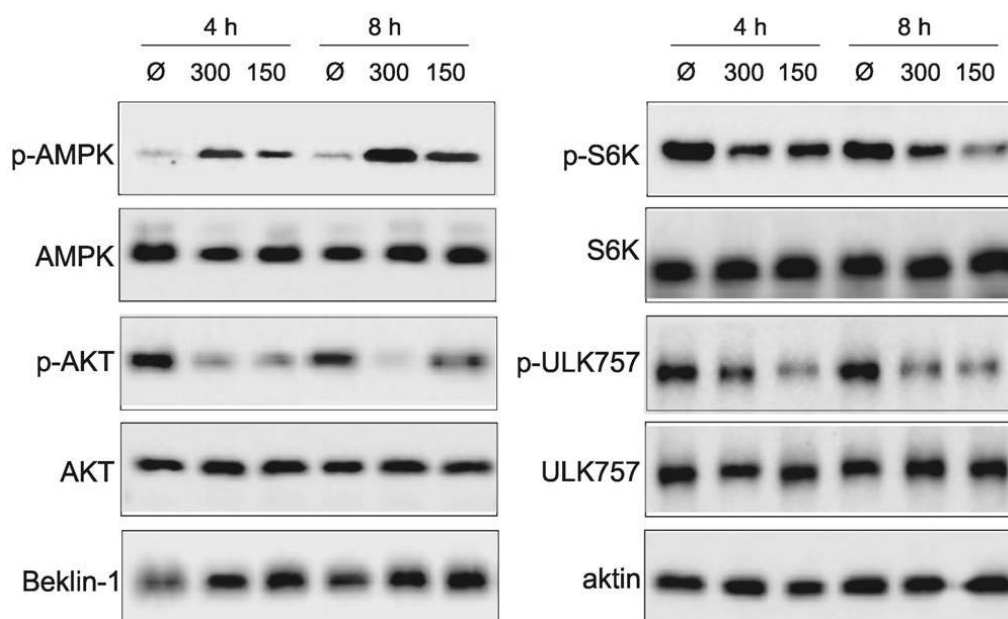
paralelno sa smanjenjem p62 proteina detektovanim imunoblotom, zapaženo je povećanje ekspresije gena ovog glavnog kargo receptora i selektivnog supstrata autofagne proteolize (**Slika 27**). Dobijeni rezultati govore u prilog transkripcione aktivacije autofagije u ćelijama melanoma tretiranim pantoprazolom.



**Slika 27. Pantoprazol povećava ekspresiju ključnih gena za regulaciju autofagije u B16 ćelijama**  
Ekspresija iRNK za ključne regulatore autofagije u B16 ćelijama tretiranim pantoprazolom (300  $\mu$ M) analizirana je RT-qPCR metodom u naznačenim vremenskim tačkama. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD iz dva nezavisna eksperimenta (\* $p < 0,05$  označava statistički značajnu razliku u odnosu na ekspresiju u netretiranim ćelijama, koja je arbitrarno podešena na vrednost 1).

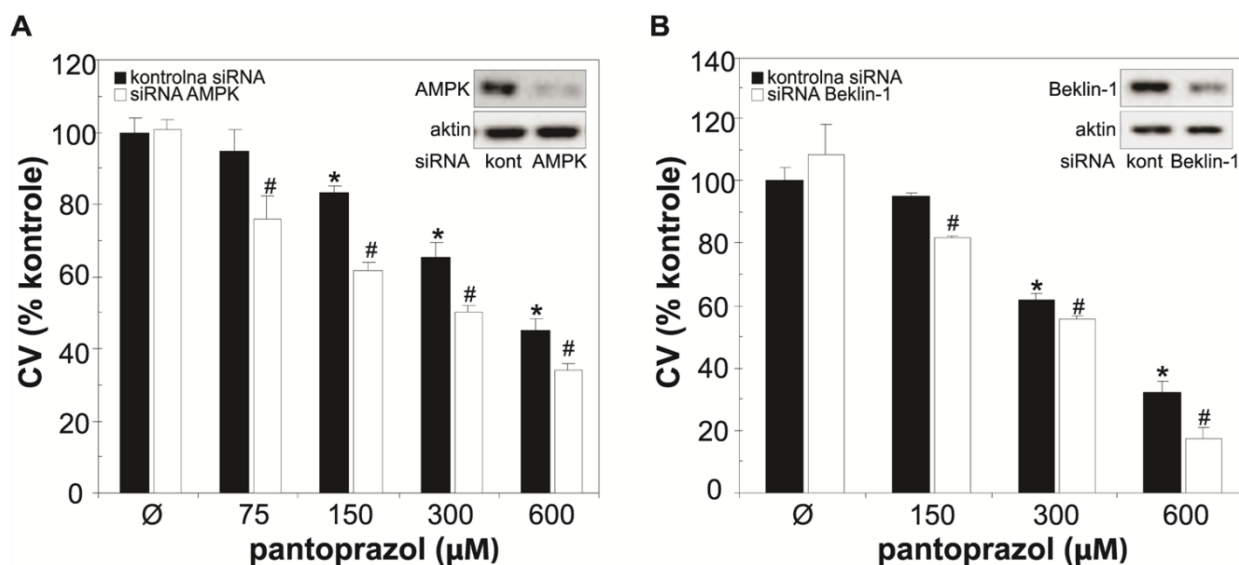
#### 4.28 Pantoprazol aktivira AMPK i inhibira AKT/mTOR u B16 ćelijama

Pored Atg molekula u regulaciji autofagije veliki značaj imaju energetske senzori stresa koji čine sastavni deo AMPK/AKT/mTOR signalnog puta. Ukratko, u stresnim uslovima dolazi do aktivacije AMPK, koja inhibira mTOR i tako aktivira autofagiju. Aktivnost AKT pozitivno reguliše mTOR kinazu koja fosforiliše svoje nishodne supstrate, S6 kinazu i ULK1, tačnije njegovu aminokiselinu serin na poziciji 757, što dovodi do inhibicije autofagije (He i Klionsky, 2009). Uzevši u obzir navedeno, u nastavku istraživanja je ispitivan uticaj pantoprazola na AMPK/AKT/mTOR signalni put u B16 ćelijama. Imunoblot analizom je pokazano da pantoprazol dovodi do povećanja fosforilisane forme energetskog senzora AMPK (**Slika 28**). Sa druge strane, uz smanjenu aktivnost AKT kinaze detektovano je i smanjenje fosforilacije nishodnih supstrata mTOR-a, S6K i ULK1 (Ser757) (**Slika 28**). Takođe, otkriveno je i povećanje nivoa Beklina-1, koji ima centralno mesto u indukciji autofagije. Navedeni rezultati ukazuju da je kod ćelija melanoma pantoprazol verovatno pokrenuo autofagiju aktivacijom AMPK i inhibicijom AKT/mTOR signalnog puta.



**Slika 28. Pantoprazol aktivira AMPK i inhibira AKT/mTOR signalni put**

Status aktivacije AMPK/AKT/mTOR signalnog puta kod B16 ćelija tretiranih pantoprazolom (300  $\mu\text{M}$ ) određen je imunoblot metodom. Prikazani su blotovi iz jednog od dva eksperimenta sa sličnim rezultatima.



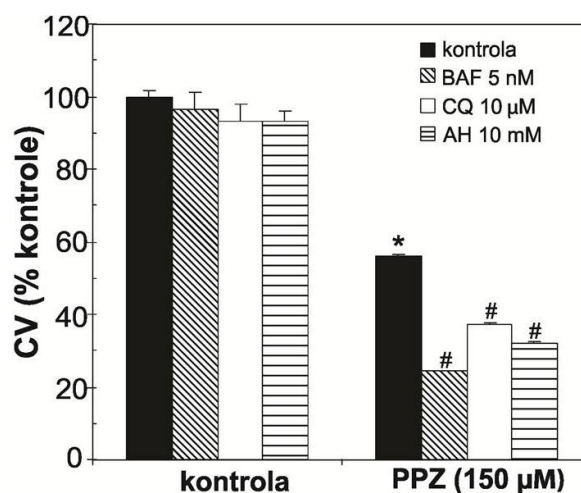
**Slika 29. AMPK i Beklin-1 štite B16 ćelije od citotoksičnosti pantoprazola**

B16 ćelije su transfektovane kontrolnom ili malom interferirajućom RNK za AMPK (A) ili Beklin-1 (B), a potom tretirane različitim dozama pantoprazola kao što je naznačeno. Ćelijski vijabilitet utvrđen je CV testom nakon 24 h. Rezultati reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta prikazani su kao srednje vrednosti + SD triplikata (\* $p < 0,05$  označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNA bez pantoprazola; # $p < 0,05$  označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNA tretirane odgovarajućom dozom pantoprazola).

#### 4.29 AMPK i Beklin-1 štite ćelije mišjeg melanoma od citotoksičnosti pantoprazola

Poznato je da AMPK i Beklin-1 indukcijom protektivne autofagije štite tumorske ćelije od citotoksičnosti hemioterapeutika (Li i Chen, 2017, Wu i sar., 2019). Sa druge strane, i AMPK i Beklin-1 mogu da imaju antitumorsko dejstvo u određenim okolnostima (Okoshi i sar., 2008,

Huang i sar., 2014). Iz navedenih razloga, a uzevši u obzir rezultate prethodne imunoblot analize, naredni eksperimenti su bili usmereni na rasvetljavanje uloge AMPK i Beklina-1 u citotoksičnosti pantoprazola kod B16 ćelija. Ekspresija AMPK i Beklina-1 inhibirana je primenom RNK interferencije, ćelije su tretirane pantoprazolom, a njihov vijabilitet je ispitan pomoću kristal violet testa nakon 24 h. Rezultati su pokazali da je inhibicija AMPK i Beklina-1 dodatno smanjila vijabilitet B16 ćelija izloženih pantoprazolu (**Slika 29A, B**), slično prethodno uočenim efektima bafilomicina. Navedeni rezultati ukazuju da AMPK i Beklin-1 imaju zaštitni efekat u citotoksičnosti indukovanoj pantoprazolom, najverovatnije indukcijom citoprotektivne autofagije.



**Slika 30. Autofagija indukovana pantoprazolom kod B16 ćelija je citoprotektivna**

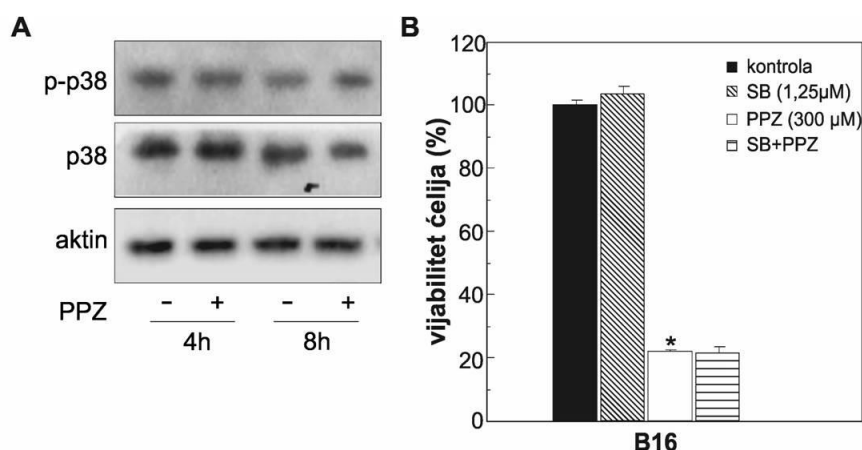
B16 ćelije su inkubirane u prisustvu ili odsustvu lizozomalnih inhibitora autofagije BAF (5 nM), CQ (10 µM) ili AH (10 mM), a zatim tretirane pantoprazolom (PPZ, 150 µM). Vijabilitet ćelija određen je CV testom nakon 48 h. Rezultati reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta prikazani su kao srednje vrednosti + SD triplikata (\* $p < 0,05$  i # $p < 0,05$  označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, odnosno ćelije tretirane samo pantoprazolom).

#### 4.30 LIA stimulišu citotoksično dejstvo pantoprazola na ćelije mišjeg melanoma

Kod tumora, autofagija se često smatra mačem sa dve oštrice, a njena uloga naziva paradoksalnom jer, u zavisnosti od ćelijskog tipa i vrste stimulusa, ona može da bude citoprotektivna ili citotoksična (Folkerts i sar., 2019). Međutim, ne treba izostaviti mogućnost da modulacija autofagije ne mora da nužno da utiče na ishod preživljavanja ćelija (Gewirtz, 2014). Ove važne karakteristike nameću kao obavezu pažljivo proučavanje uloge autofagije u progresiji tumora i modulacije ovog procesa u novim pristupima lečenju maligniteta. U skladu sa pomenutim, želeli smo da dodatno ispitamo ulogu autofagije u citotoksičnom dejstvu pantoprazola na ćelije melanoma. Da bismo ispunili navedeni cilj, inhibirali smo kasnu fazu autofagije upotrebom lizozomalnih inhibitora autofagije – bafilomicina, hlorokina i amonijum hlorida upotrebom netoksičnih doza za koje je ranije potvrđeno da inhibiraju autofagiju (Bosnjak i sar., 2014). Ukratko, ćelije mišjeg melanoma su inkubirane sa ili bez farmakoloških inhibitora, a potom tretirane pantoprazolom. Stepenn preživljavanja ćelija je određen primenom CV testa. Nakon 48 h uočeno je značajno smanjenje vijabiliteta B16 ćelija u kombinaciji sa svakim pojedinačnim LIA u odnosu na ćelije tretirane samo pantoprazolom (**Slika 30**). Ovako dobijeni rezultati potvrđuju da je autofagija pokrenuta pantoprazolom u ćelijama mišjeg melanoma citoprotektivna.

### 4.31 p38 MAPK ne utiče na citotoksičnost pantoprazola u ćelijama mišjeg melanoma

Od svih ispitanih MAPK, po svojoj sposobnosti da moduliše citotoksičnost LIA posebno se ističe p38 MAPK. Ova kinaza može da ima dvostruku ulogu u procesu autofagije kao njen pozitivni ili negativni regulator, u zavisnosti od vrste stimulusa i stepena aktivacije signalnih puteva u kojima učestvuje (Webber, 2010). Sa druge strane, povezanost AMPK i MAPK kinaza u citotoksičnosti i regulaciji procesa autofagije je pokazana u različitim eksperimentalnim modelima (Qiang i sar., 2013, Kim i Kim, 2019). Iz navedenih razloga je u daljem toku istraživanja ispitivano učešće p38 MAPK u citotoksičnom dejstvu pantoprazola na ćelije melanoma. Aktivnost p38 MAPK je određena imunoblot metodom, a rezultati analize su pokazali da nakon inkubacije sa pantoprazolom ne dolazi do značajne promene nivoa ovog enzima u odnosu na kontrolne ćelije (**Slika 31A**). Takođe, u skladu sa ovim rezultatom je bilo zapaženo i odsustvo promene citotoksičnog efekta pantoprazola nakon primene selektivnog inhibitora p38 MAPK, (SB203580), što je pokazano CV testom (**Slika 31B**). Navedeni rezultati pokazuju da p38 MAPK nema značajnu ulogu u efektima pantoprazola na ćelije mišjeg melanoma.



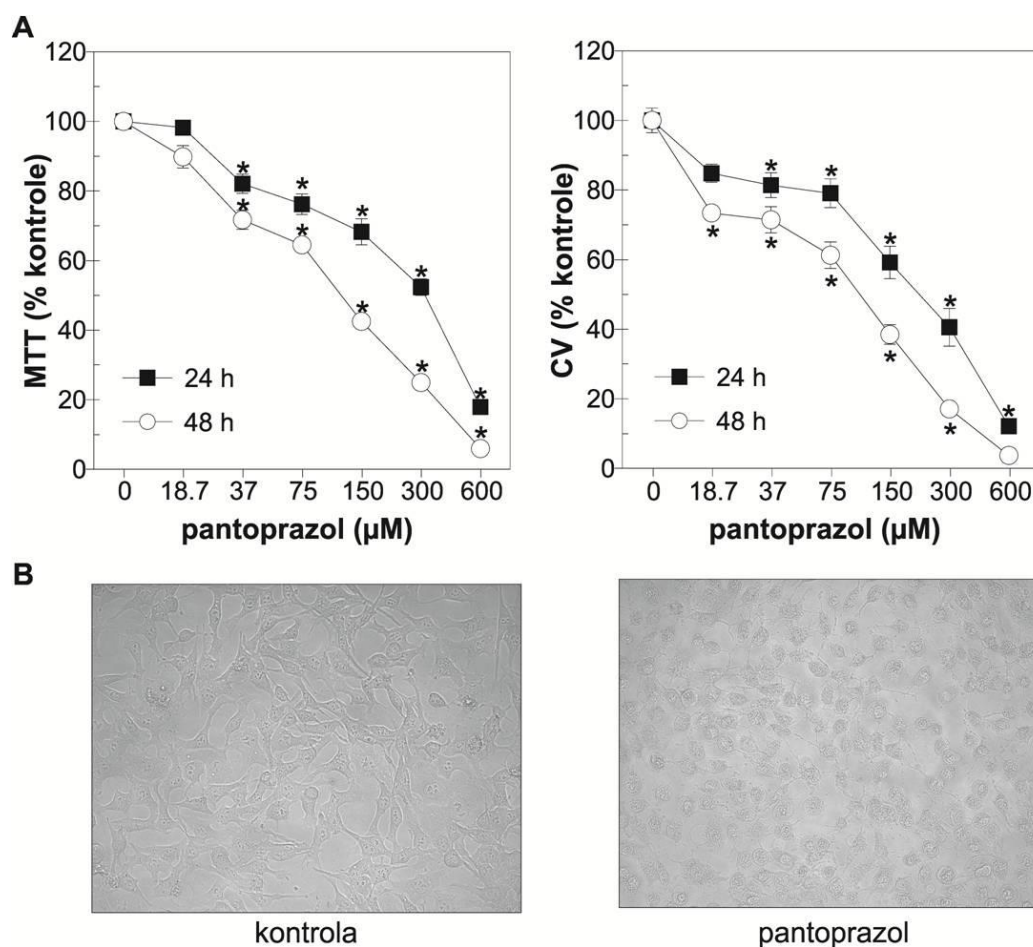
#### Slika 31. Uloga p38 MAPK u citotoksičnosti indukovanoj pantoprazolom kod B16 ćelija

(A) B16 ćelije su inkubirane sa  $IC_{50}$  pantoprazola (PPZ), a fosforilacija p38 MAPK određena je imunoblot analizom nakon 4 ili 8 h. (B) B16 ćelije su inkubirane sa pantoprazolom (300  $\mu$ M) u prisustvu ili odsustvu inhibitora p38 MAPK – SB203580 (1,25  $\mu$ M), a vijabilitet ćelija ispitan je kristal violet testom nakon 24 h. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (\* $p < 0,05$  označava statističku značajnost razlike u odnosu na netretirane ćelije).

### 4.32 Pantoprazol ispoljava citotoksično dejstvo i dovodi do morfoloških promena kod ćelija humanog glioma

Detaljno sagledavanje molekularnih mehanizama citotoksičnosti je neophodan korak u evaluaciji efekata određenog leka. Sa druge strane, izuzetno je važno ovakve efekte ispitati i na populaciji humanih ćelija zbog fundamentalnih razlika između vrsta, a posebno ukoliko se radi o maligno transformisanim ćelijama teško izlečivih ili neizlečivih tumora. Iz navedenih razloga, u narednim eksperimentima su ispitivani efekti pantoprazola na ćelijskoj liniji humanog glioma U251. Slično B16 ćelijama, U251 ćelije su izlagane rastućim dozama pantoprazola tokom 24 h ili 48 h, a promene u vijabilitetu su ispitivane upotrebom MTT i CV testa i posmatranjem ćelija fazno-kontrastnom mikroskopijom. Dobijeni rezultati su jasno pokazali da pantoprazol ispoljava dozno i vremenski zavisno citotoksično dejstvo (**Slika 32A**) i dovodi do morfoloških

promena u vidu zaokrugljivanja, smanjenja volumena ćelija i njihovog odlepljivanja od podloge (**Slika 32B**), slično kao kod B16 ćelija.

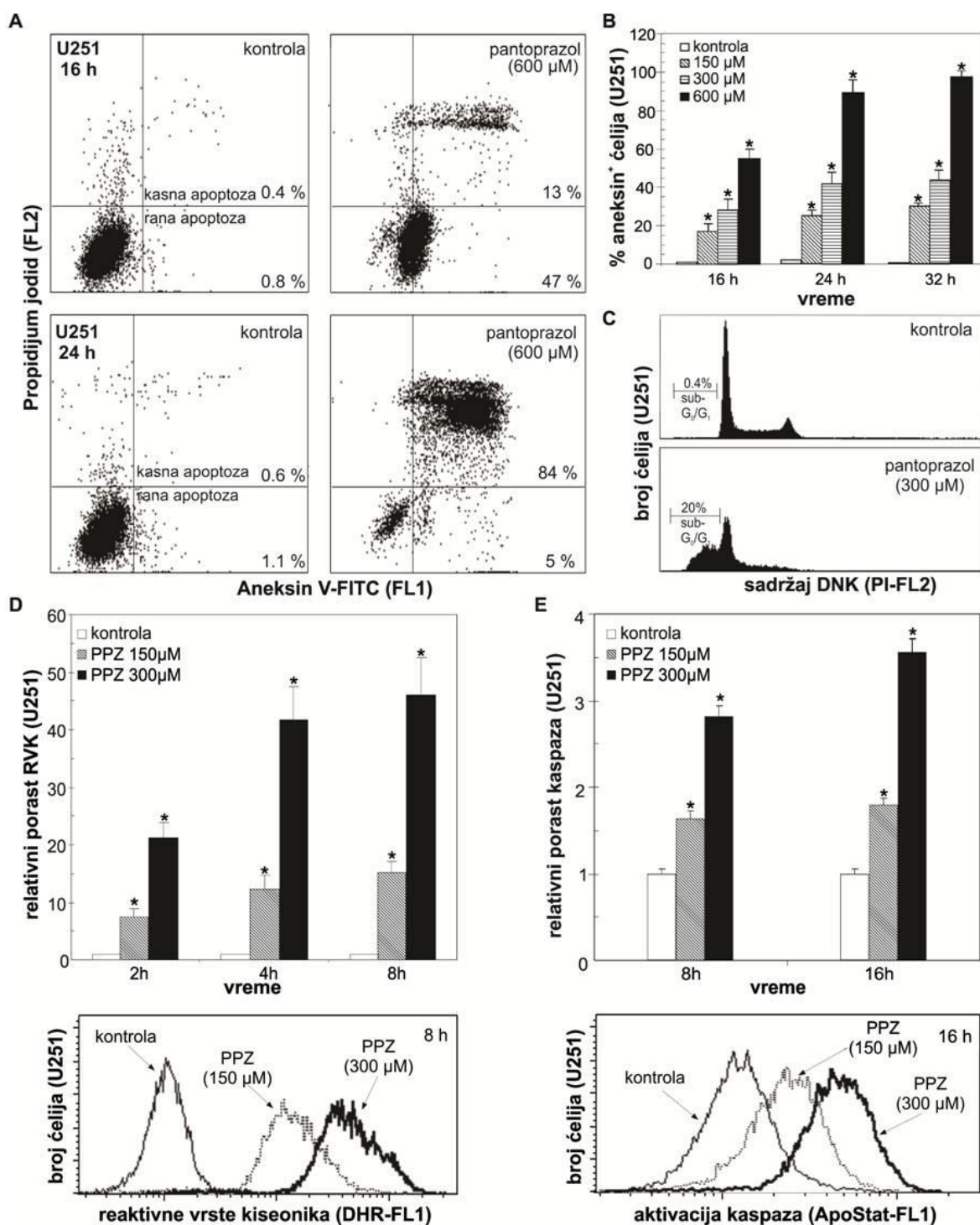


### Slika 32. Pantoprazol smanjuje preživljavanje i menja morfologiju U251 ćelija

U251 ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama pantoprazola kao što je naznačeno, a vijabilitet ćelija je određen pomoću MTT ili CV testa nakon odgovarajućih vremenskih intervala. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD triplicate iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (\* $p < 0,05$  označava statističku značajnost razlike u odnosu na netretirane ćelije). (B) Morfologija U251 ćelija 24 h nakon tretmana pantoprazolom (300  $\mu$ M) ispitana je invertnim svetlosnim mikroskopom.

### 4.33 Pantoprazol u ćelijama humanog glioma indukuje apoptozu, oksidativni stres i aktivaciju kaspaza

Detaljniji uvid u prirodu citotoksičnog dejstva pantoprazola kod U251 ćelija dobijen je određivanjem tipa ćelijske smrti, citometrijskom analizom ćelijskog ciklusa, ispitivanjem oksidativnog stresa, kao i posmatranjem efekta na aktivaciju kaspaza. Dvostrukim bojenjem tretiranih U251 ćelija pomoću Aneksina-V i propidijum jodida utvrđeno je vremenski zavisno nakupljanje Aneksin-pozitivnih ćelija karakterističnih za ranu i kasnu apoptozu (**Slika 33A, B**), kao i ćelija sa hipodiploidnim sadržajem, odnosno fragmentiranom DNK (**Slika 33C**). Takođe je uočeno, upotrebom fluorescentnih boja DHR i Apostat, da je tretman ćelija pantoprazolom doveo do dozno i vremenski zavisne produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (**Slika 33D**) i aktivacije kaspaza (**Slika 33E**). Navedeni rezultati pokazuju da, slično kao kod B16 ćelija, pantoprazol u ćelijama U251 glioma indukuje apoptozu praćenu produkcijom reaktivnih vrsta kiseonika i aktivacijom kaspaza.



### Slika 33. Pantoprazol dovodi do apoptoze U251 ćelija

Tip ćelijske smrti U251 ćelija određivan je metodom protočne citometrije nakon 16, 24 i 32 h inkubacije sa pantoprazolom (PPZ, 150, 300, 600  $\mu$ M) (A), dok je procentualna zastupljenost Aneksin<sup>+</sup> ćelija prikazana na dijagramu (B). Ćelijski ciklus/prisustvo fragmentacije DNK sadržaja nakon 16 h (C), prisustvo RVK (D) i aktivacije kaspaza (E) U251 ćelija tretiranih pantoprazolom (150, 300  $\mu$ M), analiziran je protočnom citometrijom upotrebom PI, DHR ili ApoStat fluorohroma. Prikazani su reprezentivni tačkasti dijagrami sa procentualnim brojem ćelija u ranoj i kasnoj apoptozi (A), odnosno histogrami sa procentom ćelija u sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazi ćelijskog ciklusa (C), RVK (D) i aktiviranim kaspazama (E). Rezultati na dijagramima (B, D, E) su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD triplikata iz reprezentativnog od dva nezavisna eksperimenta (\* $p$  < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije).



#### 4.34 Pantoprazol aktivira autofagiju u ćelijama humanog glioma U251

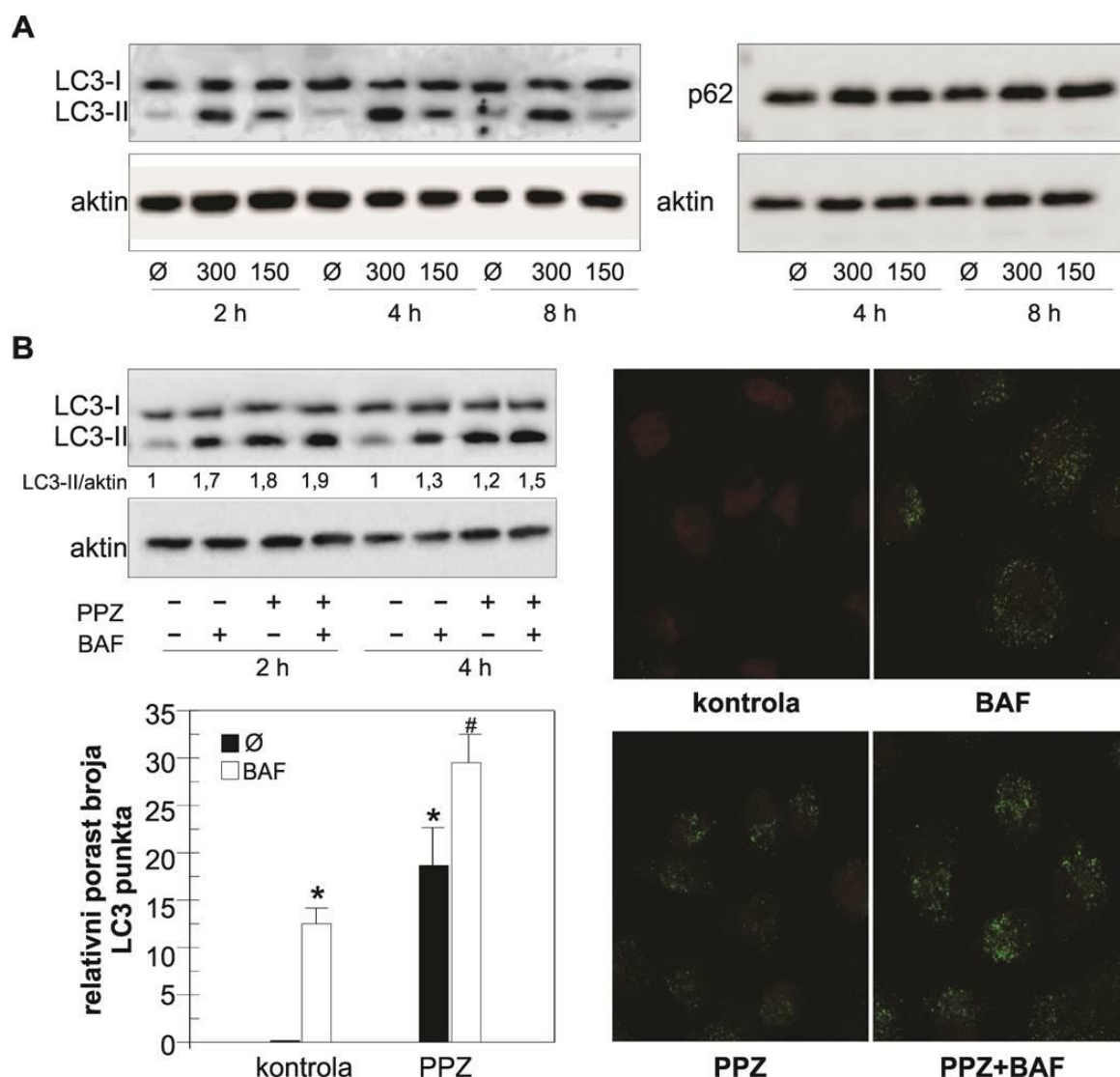
Uzevši u obzir prethodno zapažene sličnosti u citotoksičnosti pantoprazola između ćelijskih linija mišjeg melanoma i humanog glioma, želeli smo da ispitamo da li ove sličnosti postoje i u uticaju na proces autofagije. Zaista, kao kod B16 ćelija, imunoblot analizom zapažena je vremenski i dozno zavisna konverzija glavnog markera autofagije, LC3-I u LC3-II. Međutim, za razliku od ćelija mišjeg melanoma, kod tretiranih u odnosu na kontrolne ćelije glioma nije uočena značajna promena u nivou p62 (**Slika 34A**). Uzevši u obzir da na osnovu dobijenih rezultata ne može da se donese zaključak o aktivnosti autofagije, ovaj proces je inhibiran korišćenjem bafilomicina, a zatim je posmatran nivo konverzije LC3-I u LC3-II kao merilo autofagnog fluksa. Nakon tretmana ćelija pantoprazolom u prisustvu ili odsustvu bafilomicina, imunoblot analizom je zapaženo blago povećanje LC3-II u naznačenim vremenskim intervalima (**Slika 34B**). Za potvrdu statusa autofagije izvršena je i analiza ćelija pomoću konfokalne mikroskopije 4 h nakon odgovarajućih tretmana, brojanjem LC3-II pozitivnih punkta u citoplazmi. Rezultati su pokazali povećanje broja i intenziteta zelene fluorescence detektovanih punkta kod ćelija tretiranih kombinacijom bafilomicina i pantoprazola u poređenju sa ćelijama tretiranim svakim agensom pojedinačno. Prikazani rezultati ukazuju da pantoprazol indukuje autofagiju i u U251 ćelijama.

#### 4.35 Pantoprazol povećava ekspresiju ključnih Atg gena u U251 ćelijama

Sa ciljem otkrivanja mehanizama indukcije autofagije, u nastavku istraživanja je ispitivan efekat pantoprazola na ekspresiju Atg gena u U251 ćelijama. Primenom RT-qPCR analize nakon 1 ili 2 h inkubacije sa pantoprazolom zapaženo je statistički značajno povećanje nivoa iRNK za Atg13 i FIP200, koji učestvuju u nastanku fagofora. Slično je bilo i sa iRNK za UVRAG, AMBRA1 i Vps34, koji takođe učestvuju u inicijaciji nastanka autofagozoma. Među genima sa povišenom ekspresijom su detektovani i Sqstm1 odnosno p62, kao i transkripcioni faktor Atf4 koji se smatra transkripcionim aktivatorom autofagije (**Slika 35**). Izraženo povećanje tokom sva tri vremenska intervala je zapaženo kod Foxo3 – regulatora transkripcije nekoliko različitih autofagnih gena. Ovi rezultati govore da, u poređenju sa ćelijama mišjeg melanoma, kod U251 ćelija tretiranih pantoprazolom postoji drugačiji obrazac ekspresije gena značajnih u regulaciji početne faze procesa autofagije.

#### 4.36 AMPK/AKT/mTOR signalni put učestvuje u regulaciji citoprotektivne autofagije u U251 ćelijama tretiranim pantoprazolom

Uzevši u obzir da su drugačiji Atg geni bili eksprimirani kod ćelija humanog glioma u odnosu na B16 ćelije tretirane pantoprazolom, želeli smo da ispitamo njegov uticaj na AMPK/AKT/mTOR signalni put. Rezultati imunoblota su pokazali da je, slično kao kod B16 ćelija, pantoprazol doveo do povećanja nivoa fosforilacije AMPK, a smanjenja fosforilacije AKT i nishodnih supstrata mTOR-a – S6K i ULK1 (ser757). Za razliku od B16 ćelija, nije došlo do značajne promene u nivou Beklina-1 (**Slika 36A**). Uzevši u obzir da autofagija može da ima različitu ulogu u regulaciji ćelijske smrti, u nastavku istraživanja proučavali smo ulogu autofagije u citotoksičnosti pantoprazola kod ćelija humanog glioma U251. Autofagija je farmakološki inhibirana netoksičnim dozama LIA, a zatim je posmatran efekat pantoprazola na vijabilitet ćelija humanog glioma nakon 48 h. Rezultati CV testa su pokazali da kod U251 ćelija tretiranih kombinacijom pantoprazola i svakog pojedinačnog LIA dolazi do značajnog povećanja citotoksičnosti u odnosu na ćelije tretirane samo pantoprazolom (**Slika 36B**). Navedeni rezultati pokazuju da pantoprazol indukuje AMPK/AKT/mTOR-zavisnu citoprotektivnu autofagiju u ćelijama humanog glioma.

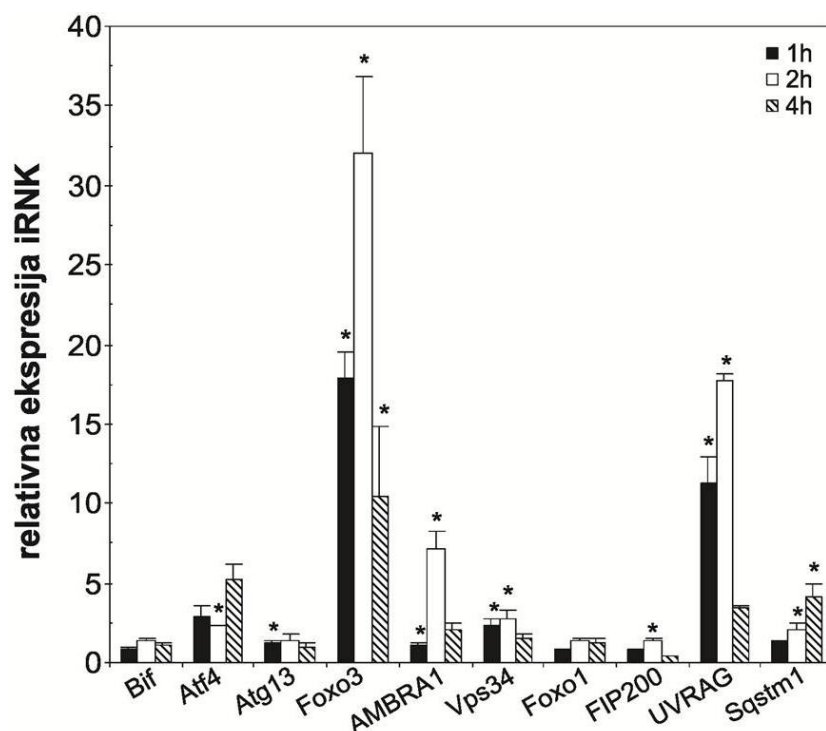


**Slika 34. Pantoprazol aktivira autofagiju u U251 ćelijama**

(A) U251 ćelije su inkubirane sa pantoprazolom (PPZ, 150  $\mu$ M ili 300  $\mu$ M), a nivoi LC3-II i p62 proteina ispitivani su nakon naznačenih termina imunoblot metodom. (B) Autofagni fluks je ispitivan nakon inkubacije ćelija tretiranih pantoprazolom (300  $\mu$ M) u prisustvu/odsustvu bafilomicina (20 nM), merenjem nivoa LC3-II proteina imunoblot metodom, odnosno pomoću konfokalne mikroskopije analizom relativnog broja punkta sa vezanim anti-LC3B-Alexa Fluor 488 antitelom (uveličanje 63x4). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i mikrografije iz tri (A) odnosno dva (B) nezavisna eksperimenta, a rezultati na dijagramu u (B) su srednje vrednosti  $\pm$  SD broja punkta u 60 ćelija po uzorku sa bar tri mikroskopska polja (\* $p < 0,05$  označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, a # $p < 0,05$  u odnosu na ćelije tretirane samo pantoprazolom).

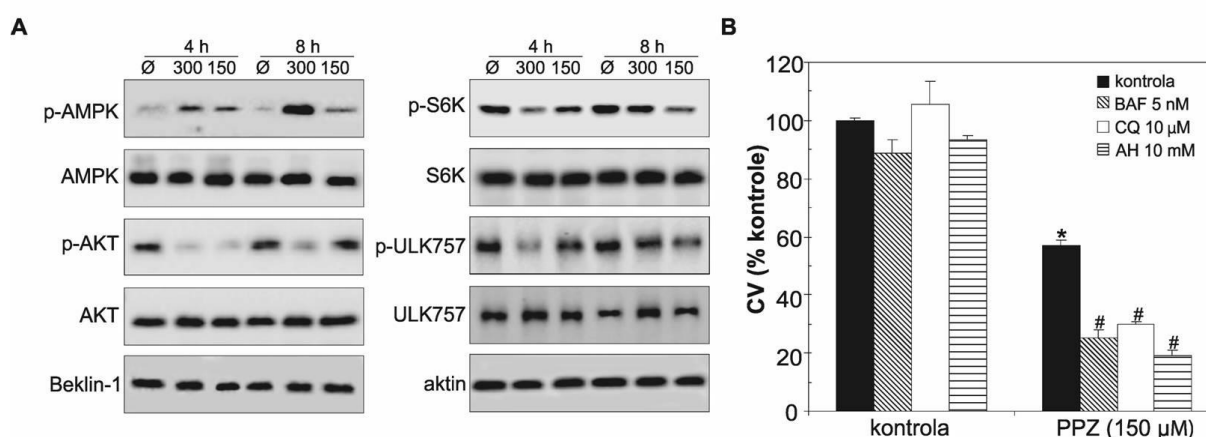
#### 4.37 pAMPK ispoljava protektivni efekat na ćelijama humanog glioma tretiranim pantoprazolom

Zbog mogućeg učešća u autofagiji i apoptozi uloga energetskog senzora AMPK u citotoksičnom dejstvu pantoprazola na ćelije humanog glioma ispitana je RNK interferencijom i upotrebom farmakološkog inhibitora AMPK, dorzomorfina. Genetska inhibicija ekspresije AMPK u ćelijama humanog glioma dovela je do značajnog smanjenja vijabiliteta ćelija inkubiranih sa pantoprazolom tokom 24 h u poređenju sa kontrolnim ćelijama (Slika 37A), a ovaj efekat je bio još izraženiji u slučaju farmakološke inhibicije (Slika 37B). Navedeni rezultati, slično kao kod B16 ćelijske linije, govore u prilog zaštitnom efektu AMPK u U251 ćelijama tretiranim pantoprazolom.



**Slika 35. Pantoprazol dovodi do povećanja ekspresije gena značajnih za regulaciju autofagije kod U251 ćelija**

Ekspresija iRNK glavnih gena uključenih u regulaciju procesa autofagije kod U251 ćelija tretiranih pantoprazolom (300  $\mu$ M) analizirana je metodom RT-qPCR nakon naznačenih vremenskih termina. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD iz dva nezavisna eksperimenta (\* $p < 0,05$  označava statistički značajnu razliku u odnosu na ekspresiju u netretiranim ćelijama koja je arbitrarno podešena na vrednost 1).

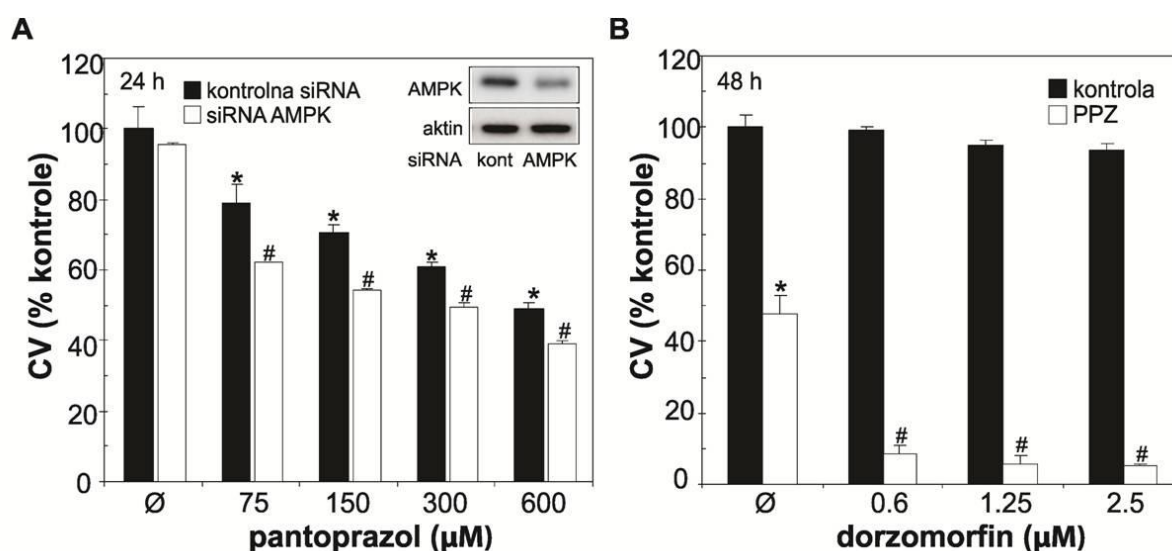


**Slika 36. Indukcija citoprotektivne autofagije pantoprazolom povezana je sa aktivacijom AMPK i inhibicijom AKT/mTOR signalnog puta u ćelijama humanog glioma**

(A) Status aktivacije AMPK/AKT/mTOR signalnog puta u U251 ćelijama tretiranim pantoprazolom (PPZ, 300, 150  $\mu$ M) analiziran je imunoblot metodom. Prikazani su reprezentativni blotovi iz jednog od dva eksperimenta sa sličnim rezultatima. (B) Uloga autofagije u citotoksičnosti pantoprazola utvrđena je inkubiranjem U251 ćelija u prisustvu ili u odsustvu BAF (5 nM), CQ (10  $\mu$ M) ili AH (10 mM), koje su zatim tretirane pantoprazolom (150  $\mu$ M). Vijabilitet ćelija određen je CV testom nakon 48 h. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. (\* $p < 0,05$  i # $p < 0,05$  označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, odnosno ćelije tretirane samo pantoprazolom).

### 4.38 Aktivacija p38 MAPK pantoprazolom ima protektivni efekat u ćelijama humanog glioma

Prethodno je utvrđeno da p38 MAPK ima važnu ulogu u citotoksičnosti LIA kod ćelija melanoma i glioma. Takođe, nekoliko studija je pokazalo značaj interakcije energetskog senzora AMPK i p38 MAPK u preživljavanju različitih vrsta ćelija (Li i sar., 2005, Gu i sar., 2018, Lanna i sar., 2014). Sa druge strane, sve je više dokaza o učešću MAPK signalnog puta u regulaciji procesa autofagije (Chen i sar., 2018a, McClung i sar., 2010). Iz navedenih razloga smo kod ćelija humanog glioma tretiranih pantoprazolom ispitali ulogu p38 MAPK. Rezultati imunoblot analize su pokazali vremenski zavisno povećanje aktivnosti p38 MAPK u U251 ćelijama tretiranim pantoprazolom tokom 4 h, odnosno 8 h (**Slika 38A**), što je još jedna značajna razlika u odnosu na B16 ćelije. Uloga p38 MAPK u ćelijama humanog glioma tretiranih pantoprazolom ispitana je RNK interferencijom, kao i farmakološkom inhibicijom p38 MAPK pomoću SB203580. Nakon transfekcije kontrolnom ili p38 siRNA, vijabilitet ćelija određen je nakon 24 h tretmana pantoprazolom. Rezultati su pokazali da je genetska inhibicija p38 dovela do povećanja citotoksičnosti pantoprazola. Slično, kod ćelija koje su inkubirane u prisustvu selektivnog inhibitora p38 MAPK zapaženo je smanjenje vijabiliteta u odnosu na ćelije tretirane samo pantoprazolom (**Slika 38B**). Dakle, p38 MAPK ima protektivni efekat u citotoksičnosti pantoprazola kod U251 ćelija.

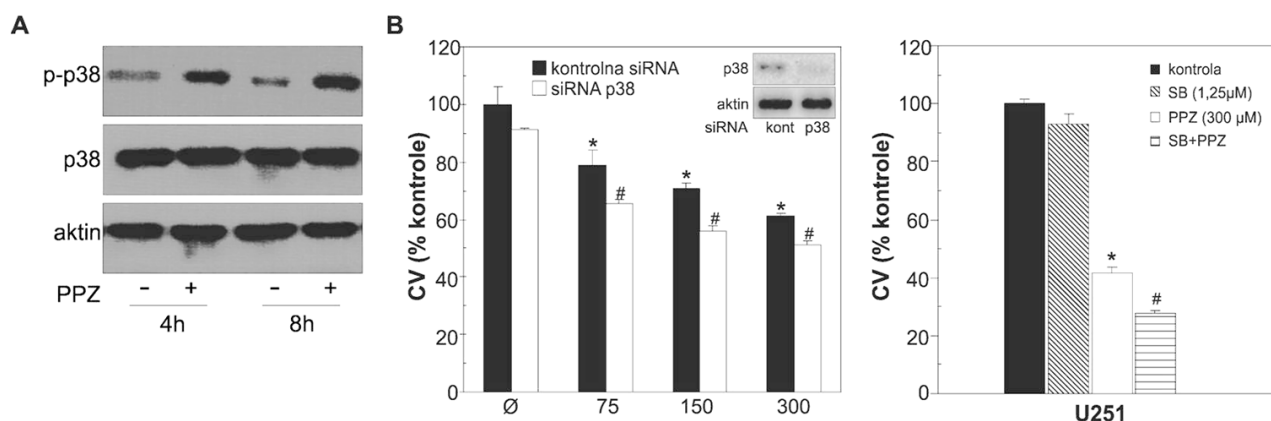


**Slika 37. Protektivna uloga AMPK u citotoksičnosti indukovanoj pantoprazolom kod U251 ćelija** (A) U251 ćelije su transfektovane kontrolnom ili interferirajućom RNK za AMPK, a potom tretirane različitim dozama pantoprazola (PPZ). (B) U251 ćelije su inkubirane sa pantoprazolom (300 µM) u prisustvu/odsustvu inhibitora AMPK dorzomorfina (5 µM) (B). Vijabilitet ćelija ispitan je kristal violet testom nakon 24 ili 48 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD triplikata dva nezavisna eksperimenta (\*p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNA/netretirane ćelije, a #p < 0,05 u odnosu na odgovarajuće ćelije transfektovane AMPK siRNA, odnosno ćelije tretirane samo pantoprazolom).

### 4.39 p38 MAPK učestvuje u indukciji autofagije i ER stresa pantoprazolom u ćelijama humanog glioma

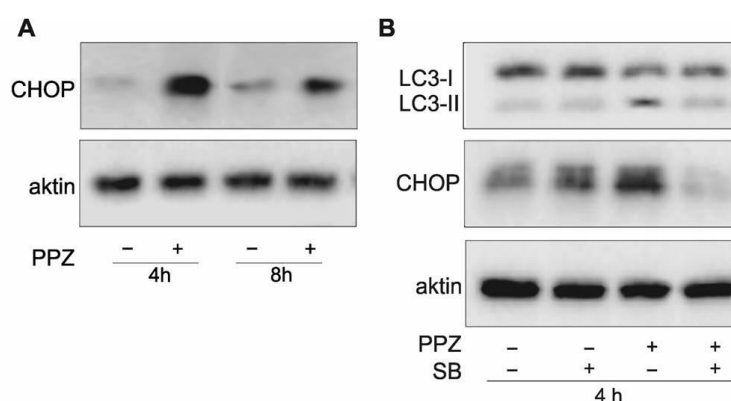
Istraživanje na ćelijama gastričnog adenokarcinoma je pokazalo uticaj pantoprazola na pojavu stresa endoplazmatskog retikuluma (engl. *ER stress*) (Yu Cao 2018). Transkripcioni faktor CHOP je jedan od glavnih markera ER stresa, koji kao supstrat p38 MAPK može da učestvuje u aktivaciji programirane ćelijske smrti, ali i u regulaciji autofagije. Nakon uočenog zaštitnog

efekta p38 MAPK želeli smo da ispitamo nivo CHOP proteina, njegovu vezu sa ovom kinazom i potencijalni uticaj na autofagiju u U251 ćelijama tretiranim pantoprazolom. Imunoblot analizom je otkriveno povećanje koncentracije CHOP kao glavnog markera ER stresa (**Slika 39A**). Da bismo ispitali njegovu vezu sa p38 MAPK i autofagijom, ćelije su inkubirane sa ili bez p38 MAPK inhibitora SB203580, a potom tretirane pantoprazolom. Imunoblotom su ispitani nivoi CHOP proteina i konverzije LC3-I u LC3-II. Rezultati ove analize su pokazali da inhibicija p38 MAPK dovodi do smanjenja ekspresije CHOP, ali i do smanjene akumulacije autofagnog markera LC3-II (**Slika 39B**). Pored uticaja pantoprazola na indukciju ER stresa, dobijeni rezultati ukazuju i na postojanje povezanosti p38 MAPK i CHOP aktivacije u indukciji autofagije pantoprazolom.



**Slika 38. Uloga p38 MAPK u citotoksičnosti indukovanoj pantoprazolom kod U251 ćelija**

(A) U251 ćelije su inkubirane sa IC<sub>50</sub> pantoprazola (PPZ), a fosforilacija p38 MAPK analizirana je imunoblot analizom nakon 4 ili 8 h. (B) U251 ćelije su transfektovane kontrolnom ili interferirajućom RNK za p38 MAPK, a potom tretirane različitim dozama pantoprazola. (C) U251 ćelije su inkubirane sa pantoprazolom (300 µM) u prisustvu ili odsustvu inhibitora p38 MAPK - SB203580 (1,25 µM) (B). Vijabilitet ćelija (B, C) ispitan je kristal violet testom nakon 24 h. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SD triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (\*p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom siRNA/netretirane ćelije, a #p < 0,05 u odnosu na odgovarajuće ćelije transfektovane p38 MAPK siRNA, odnosno ćelije tretirane samo pantoprazolom).

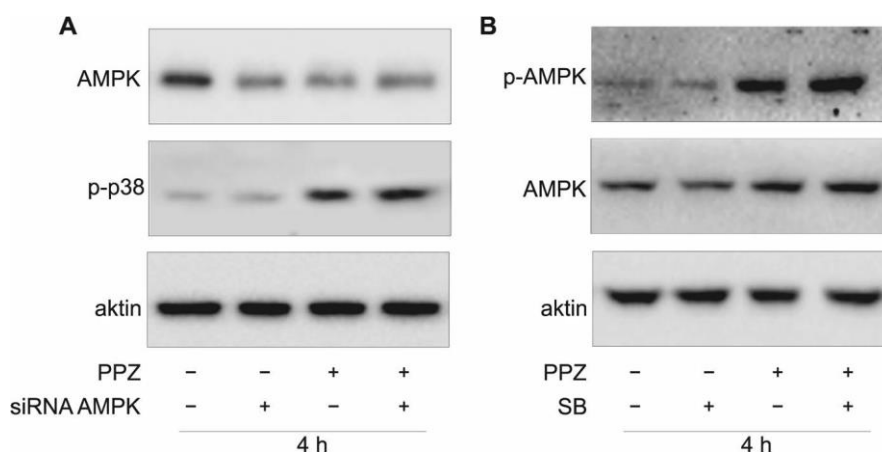


**Slika 39. p38 MAPK učestvuje u indukciji autofagije i ER stresa u U251 ćelijama tretiranim pantoprazolom**

(A) U251 ćelije su inkubirane sa pantoprazolom (PPZ, 300 µM) a nivo CHOP proteina u naznačenim vremenskim tačkama je ispitan imunoblot metodom. (B) U251 ćelije su inkubirane sa pantoprazolom (300 µM) u prisustvu ili odsustvu inhibitora p38 MAPK - SB203580 (1,25 µM), a nivoi LC3-II i CHOP su određivani su nakon 4 h imunoblot metodom. Prikazani su reprezentativni blotovi iz dva eksperimenta sa sličnim rezultatima.

#### 4.40 Aktivacija AMPK i p38 MAPK pantoprazolom su međusobno nezavisne

Uzevši u obzir da su kod ćelija humanog glioma enzimi AMPK i p38 MAPK ispoljili zaštitnu ulogu u citotoksičnosti indukovanoj pantoprazolom, želeli smo da ispitamo da li postoji direktna povezanost aktivnosti ova dva enzima. Naime, poznato je da p38 MAPK može da bude kontrolisana od strane AMPK u uslovima stresa, kao i da p38 MAPK svoje efekte može da ostvaruje dejstvom na AMPK (Li i sar., 2005, Jing i sar., 2015). Ekspresija AMPK u ćelijama humanog glioma je inhibirana RNK interferencijom, a ćelije su potom inkubirane sa pantoprazolom. Imunoblot analiza aktivacionog statusa p38 MAPK kinaze pokazala je da inhibicija ekspresije AMPK ne utiče na aktivaciju p38 MAPK u ćelijama humanog glioma tretiranim pantoprazolom (**Slika 40A**). Suprotan scenario, odnosno mogućnost da p38 MAPK reguliše aktivnost AMPK, testirana je upotrebom farmakološkog inhibitora SB203580. Rezultati analize su pokazali da inhibicija p38 MAPK ne dovodi do promene aktivnosti AMPK u ćelijama glioma tretiranim pantoprazolom (**Slika 40B**). Ovi rezultati ukazuju da AMPK i p38 MAPK ispoljavaju međusobno nezavisno dejstvo u citotoksičnosti indukovanoj pantoprazolom kod ćelija humanog glioma.



#### Slika 40. p38 MAPK i AMPK ostvaruju međusobno nezavisno dejstvo na ćelijama humanog glioma tretiranih pantoprazolom

(A) U251 ćelije su transfektovane kontrolnom ili AMPK siRNA, a zatim tretirane pantoprazolom (PPZ, 300  $\mu$ M). Fosforilacija AMPK i p38 MAPK je analizirana imunoblotom nakon 4 h. (B) U251 ćelije tretirane pantoprazolom inkubirane su u prisustvu ili odsustvu inhibitora p38 (SB203580; 1,25  $\mu$ M), a fosforilacija AMPK je analizirana imunoblotom. Prikazani su reprezentativni blotovi iz dva nezavisna eksperimenta sa sličnim rezultatima.

## **5. Diskusija**





U istraživanju iz kojeg je proistekla ova doktorska disertacija prvi put je pod istim eksperimentalnim uslovima izvršena uporedna analiza citotoksičnosti lizozomalnih inhibitora autofagije bafilomicina, hlorokina i amonijum hlorida na ćelijama mišjeg melanoma i humanog glioma. Naše istraživanje je pokazalo da su sva tri inhibitora dovela do apoptotske ćelijske smrti nezavisno od mTOR kinaze i inhibicije autofagije, ali sa različitim efektima na permeabilizaciju lizozoma, balans pro- i anti-apoptotskih molekula Bcl-2 familije i aktivaciju AMPK/MAPK signalnih puteva. Takođe, u ovom istraživanju je sprovedeno *in vitro* ispitivanje molekularnih mehanizama citotoksičnosti inhibitora protonske pumpe pantoprazola, kojim je otkriveno da, iako je po svom osnovnom mehanizmu dejstva sličan LIA, ovaj lek indukuje transkripciono regulisanu citoprotektivnu autofagiju praćenu promenama AMPK/AKT/mTOR signalnih molekula kod B16 ćelija, uz dodatno učešće p38 MAP kinaze i CHOP proteina, glavnog markera ER stresa kod U251 ćelija.

U bazičnim istraživanjima na polju autofagije lizozomalni inhibitori – bafilomicin, hlorokin i amonijum hlorid predstavljaju nezaobilazne komponente u eksperimentalnom radu. LIA danas zavređuju sve više pažnje i u kliničkoj praksi, uzevši u obzir da se modulacija autofagije ispituje kao novi terapijski pristup u lečenju maligniteta. Iako se u kontekstu blokade autofagije efekti lizozomalnih inhibitora smatraju specifičnim, poznato je da zavisno od primenjene koncentracije i ćelijskog tipa oni mogu da ispoljavaju citotoksično dejstvo, što ograničava njihovu upotrebu u bazičnim i kliničkim studijama.

Poznato je da apoptozu mogu da indukuju različiti tipovi stresa koji rezultiraju promenom potencijala mitohondrijalne membrane i dovode do njene permeabilizacije uz stvaranje kiseoničnih radikala (Wu i Bratton, 2013). Proučavajući efekte LIA zapazili smo da bafilomicin, hlorokin i amonijum hlorid u ćelijama melanoma indukuju apoptozu praćenu produkcijom reaktivnih oblika kiseonika i depolarizacijom mitohondrija. U prethodno sprovedenim studijama uočeni su slični efekti amonijum hlorida i hlorokina u *in vivo* i *in vitro* ulovima (Cheng i sar., 2015, Kim i sar., 2010). Pored navedenih događaja, aktivacija kaspaza predstavlja jedno od glavnih obeležja apoptoze, iako ćelijska smrt često može da se odigrava i nezavisno od aktivnosti ovih enzima (Porter i Janicke, 1999, Liu i sar., 2016a). Tako je pokazano da bafilomicin dovodi do smrti ćelija hepatocelularnog karcinoma i određenih leukemija nezavisno od učešća kaspaza (Yan i sar., 2016, Yuan i sar., 2015), dok hlorokin ovakav efekat ispoljava predominantno na netumorskim ćelijama (Zaidi i sar., 2001, Maclean i sar., 2008). Sa druge strane, značajan porast kaspazne aktivnosti koja je rezultirala apoptozom zapažen je kod ćelija neuroblastoma tretiranih bafilomicinom (Pivtoraiko i sar., 2010), slično efektima hlorokina na ćelijama cervikalnog karcinoma, glioblastoma i limfoma (Kim i sar., 2010, Boya i sar., 2003, Masud Alam i sar., 2016) i amonijum hlorida u *in vivo* i *in vitro* uslovima (Suzuki i sar., 2002, Cheng i sar., 2015). Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je pored aktivacije kaspaza, smrt ćelija melanoma praćena isecanjem PARP-1 proteina, supstrata ovih enzima koji učestvuje u reparaciji DNK, što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim podacima (Chen i sar., 2012, Hong i sar., 2013, Lin i sar., 2017, Gao i sar., 2015, Lakhter i sar., 2013). Zapaženi skroman protektivni efekat inhibicije kaspaza u našem istraživanju ukazuje da se apoptoza indukovana LIA kod ćelija melanoma delom odvija i nezavisno od ovih enzima, što može da pomiri međusobno suprotstavljene rezultate prethodno sprovedenih studija.

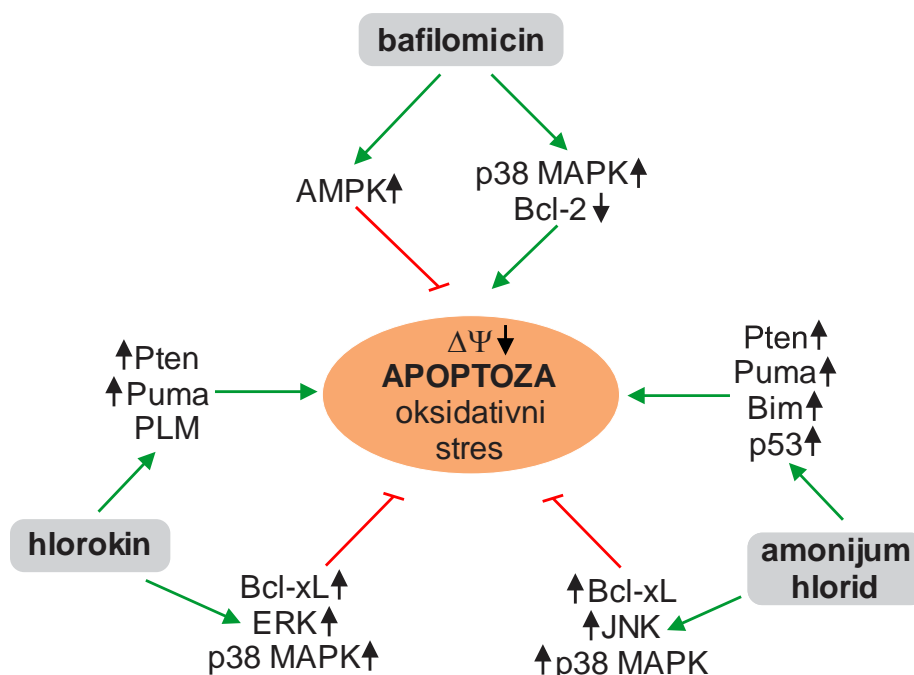
Poslednjih godina sve je više podataka o mogućem preplitanju signalnih puteva uključenih u regulaciju apoptoze i autofagije (Yonekawa i Thorburn, 2013). Yan i saradnici su pokazali da bafilomicin svoje citotoksično dejstvo ostvaruje inhibicijom PI3K/AKT/mTOR/pS6K signalnog puta (Yan i sar., 2016). U istraživanju na akutnim B limfoblastnim leukemijama utvrđeno je da bafilomicin deluje na rani i kasni stadijum autofagije aktivacijom mTOR kinaze i inhibicijom stvaranja autofagozoma, ali ujedno dovodi do vezivanja Beklina-1 za Bcl-2 i tako indukuje apoptozu (Yuan i sar., 2015). Sa druge strane, citotoksičnost hlorokina se nije menjala nakon inhibicije ekspresije Atg7, Atg12 ili beklina-1 kod ćelija karcinoma dojke, kao ni u slučaju inhibicije PI3K III klase kod ćelija humanog neuroblastoma

(Maycotte i sar., 2012, Gallagher i sar., 2017, Pivtoraiko i sar., 2010). Suprotno navedenom, nedavna studija pokazuje da novosintetisani analozi hlorokina indukcijom autofagije dovode do apoptotske smrti tumorskih ćelija (Heakal i sar., 2020). U našem istraživanju sva tri LIA su uspešno blokirala autofagiju inhibicijom degradativne funkcije lizozoma, što je potvrđeno alkalizacijom ovih organela, povećanjem nivoa LC3-II proteina i posledičnim nakupljanjem autofagozoma. Međutim, odsustvo korelacije između nivoa akumuliranog LC3-II proteina i uočene citotoksičnosti, kao i slična osetljivost kontrolnih i ćelija melanoma sa inhibiranom ekspresijom LC3-II ukazuju da je ćelijska smrt do koje dovode LIA verovatno nezavisna od inhibicije autofagije. U skladu sa navedenim, rezultati prethodnih studija su pokazali da upotreba nižih koncentracija lizozomalnih inhibitora i/ili kraći inkubacioni period mogu da povećaju osetljivost ćelija na različite citotoksične stimulse bez pokretanja ćelijske smrti (Bosnjak i sar., 2014, Harhaji-Trajkovic i sar., 2009, Isakovic i sar., 2017, Krmpot i sar., 2010, Vucicevic i sar., 2011). Dakle, sama inhibicija autofagije nije dovoljna da bi se indukovala smrt ćelija, već su za to verovatno neophodni dodatni mehanizmi koji se aktiviraju višim koncentracijama lizozomalnih inhibitora i/ili tokom dužeg inkubacionog perioda. Jedan od pretpostavljenih mehanizama bi mogla da bude permeabilizacija membrane lizozoma sa posledičnim oslobađanjem katepsina koji indukuju apoptozu (Boya i Kroemer, 2008). Naime, u studijama na ćelijama karcinoma pluća, pankreasa i glioblastoma (Enzenmuller i sar., 2013, Fu i sar., 2018b, Hsu i sar., 2018, Seitz i sar., 2013), slično našim podacima na ćelijama melanoma, inhibicija katepsina dovodi do smanjenja citotoksičnog efekta hlorokina. Sa druge strane bafilomicin i amonijum hlorid nemaju uticaj na permeabilizaciju lizozoma ćelija melanoma, što je u saglasnosti sa istraživanjima sprovedenim na drugim ćelijskim linijama (Denamur i sar., 2011, Jessop i sar., 2017, Persson i sar., 2012). Ovi podaci ukazuju da su permeabilizacija lizozoma i apoptoza posredovana katepsinima jedinstvena svojstva hlorokina.

Pokretanje apoptoze i integritet mitohondrijalne membrane reguliše ravnoteža između pro-apoptotskih i anti-apoptotskih molekula među kojima su članovi Bcl-2 familije i tumor supresori Pten i p53 (Elkholi i sar., 2014). U našem istraživanju je otkriveno da bafilomicin utiče na smanjenje nivoa Bcl-2 što je slično prethodno sprovedenim studijama (Gao i sar., 2018, Hettiarachchi i sar., 2006). Smanjenje Bcl-2 moglo bi da onemogući adekvatnu neutralizaciju pro-apoptotskih članova Bcl-2 familije ovim molekulom i da tako doprinese citotoksičnom efektu bafilomicina. Takođe, Bcl-2 se nalazi u ćelijskim odeljcima u kojima se stvaraju reaktivni oblici kiseonika, a nekoliko studija je ukazalo na postojanje recipročnog odnosa između ove dve komponente. Naime, reaktivne kiseonične vrste mogu da utiču na smanjenje nivoa Bcl-2, što se smatra načinom senzitivacije ćelija na apoptozu (Hildeman i sar., 2003, Pugazhenth i sar., 2003). Zaista, naši podaci su konzistentni sa pokazanom povećanom osetljivošću B16 ćelija na apoptozu indukovanu oksidativnim stresom i posledičnom inhibicijom Bcl-2 (Ferrer i sar., 2007, Mena i sar., 2007). Za razliku od bafilomicina, citotoksični efekat hlorokina i amonijum hlorida na ćelijama melanoma ostvaren je uglavnom povećanjem ekspresije pro-apoptotskih molekula Pten i Puma, dok je amonijum hlorid dodatno uticao i na povećanje transkripcije pro-apoptotskih regulatora Bim i p53. Dok je ekspresija Puma sa jedne strane kontrolisana transkripcionim faktorom p53 koji se aktivira oštećenjem DNK i oksidativnim stresom, interakcija Puma i Bim sa druge strane utiče na stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta nakon oštećenja mitohondrijalne membrane i tako pojačava efektorske signale uključene u ćelijsku smrt (Yu i Zhang, 2008, Vela i sar., 2013). Međutim, čak i pojedinačno povećanje ekspresije Pten, Puma, Bim ili p53 može da dovede do indukcije apoptoze u različitim tipovima tumorskih ćelija (Li i sar., 2007, Liu i sar., 2005, Shao i sar., 2000, Zhang i sar., 2006). Rezultati našeg istraživanja ukazuju da lizozomalni inhibitori pokreću mitohondrijani put apoptoze ili inhibicijom anti-apoptotskog molekula Bcl-2, kao u slučaju bafilomicina, ili povećanjem pro-apoptotskih medijatora Pten, Puma, Bim i p53 kod ćelija tretiranih hlorokinom, odnosno amonijum hloridom. Na budućim studijama ostaje da utvrde da li bi uticaj na post-translacionu

modifikaciju članova Bcl-2 familije i tumor supresora mogao da doprinese pro-apoptotskom dejstvu lizozomalnih inhibitora.

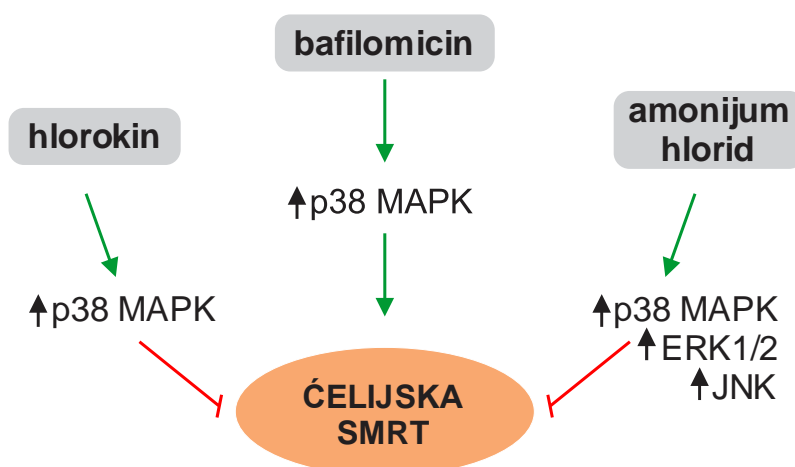
Pored sposobnosti da različito utiču na ekspresiju pro-apoptotskih i anti-apoptotskih molekula, lizozomalni inhibitori autofagije se ističu po jedinstvenom obrascu aktivacije kinaza značajnih u regulaciji apoptoze kod ćelija mišjeg melanoma i humanog glioma. Poznato je da mTOR, MAPK i AMPK stimulišu preživljavanje ćelija, ali isto tako mogu i da doprinesu ćelijskoj smrti, što je pokazano na različitim tipovima zdravih i tumorskih ćelija (Populo i sar., 2012, Akhavan i sar., 2010). Kao što je pomenuto ranije, mTOR kinaza je evolutivno konzervisana serin/treonin kinaza koja reguliše rast i deobu ćelija u odgovoru na energetske promene, signale za rast i hranljive materije, a čija disregulacija, između ostalog, može da prouzrokuje nastanak maligniteta (Laplante i Sabatini, 2012). Takođe, pokazano je da mTOR u sklopu mTORC1 kompleksa ima važnu ulogu u funkcionisanju lizozoma tako što reguliše stvaranje, distribuciju i aktivaciju ovih organela (Asrani i sar., 2019). Posebno je interesantna činjenica da se u prisustvu aminokiselina, aktivna forma mTOR-a, glavnog promotera anaboličkih procesa, translocira na lizosome, ključne organele u procesima katabolizma (Sancak i sar., 2010) i da aminokiseline prisutne u ovim organelama modulišu aktivnost mTORC1 preko V-ATPaze (Zoncu i sar., 2011). U našem istraživanju, iako je pokazano da su kod B16 ćelija sva tri LIA inhibirala fosforilaciju mTOR i njegovog nishodnog supstrata pS6 kinaze, što je u saglasnosti sa prethodnim studijama (Li i sar., 2013) i ulozi lizozoma u aktivaciji mTOR-a, inhibicija ove kinaze nije imala uticaj na citotoksičnost inhibitora autofagije. Ovi rezultati jasno ukazuju da se smrt ćelija mišjeg melanoma odigrala nezavisno od učešća mTOR-a. Sa druge strane, ispitivanjem aktivnosti ostalih kinaza pokazano je da su sva tri inhibitora uticala na aktivaciju p38 MAPK, dok je isključivo bafilomicin aktivirao AMPK, hlorokin ERK, a amonijum hlorid JNK kinazu. Neke od ranijih studija na različitim tipovima zdravih i tumorskih ćelija pokazale su da sva tri inhibitora mogu da aktiviraju p38 MAPK (Chen i sar., 2005, Pan i sar., 2010, Shrode i sar., 1997, Yan i sar., 2016), bafilomicin AMPK (Marrone i sar., 2018), hlorokin ERK (Bell i sar., 2016, Said i sar., 2014), a amonijum hlorid JNK (Novoselova i sar., 2012). U našem istraživanju, citotoksičnost bafilomicina na ćelijama mišjeg melanoma je delom zavisila od p38 MAPK, a ovakav pro-apoptotski efekat zapažen je kod ćelija kolorektalnog (Wu i sar., 2009b) i hepatocelularnog karcinoma (Yan i sar., 2016). Pro-apoptotska uloga p38 MAPK u određenim modelima ćelijskog stresa najčešće se odvija putem fosforilacije Bcl-2 (De Chiara i sar., 2006, Torcia i sar., 2001). Tako je kod B16 ćelija tretiranih inhibitorom tirozinaze uočena uloga p38 MAPK u apoptozi praćenju depolarizacijom mitohondrija, produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta i smanjenjem nivoa Bcl-2 proteina (Ma i sar., 2017). Slično tirozinaznom inhibitoru, u našem istraživanju bafilomicin je značajno smanjio ekspresiju Bcl-2, što bi mogao da bude mehanizam pro-apoptotske aktivnosti p38 MAPK u tretmanu ovim LIA. Suprotno, p38 MAPK je antagonizovala citotoksični efekat hlorokina i amonijum hlorida kod ćelija melanoma. Iako nema podataka o ulozi p38 MAPK u citotoksičnosti ova dva inhibitora, odavno je pokazano da p38 može da posreduje u preživljavanju ćelija i da je ova uloga u bliskoj vezi sa regulacijom aktivnosti proteina Bcl-2 familije. Tako na primer, ugljen monoksid štiti od reperfuziono-ishemijskog oštećenja endotelnih ćelija arterija kroz p38 zavisno povećanje nivoa Bcl-2 i Bcl-xL (Zhang i sar., 2003), slično UV indukovanoj aktivaciji p38 kod humane ćelijske linije keratinocita koja je rezultirala povećanjem Bcl-xL (Bachelor i Bowden, 2004). Anti-apoptotska uloga p38 MAPK zapažena je i kod ćelija hronične mijeloidne i akutne promijelocitne leukemije (Verma i sar., 2002), kolorektalnog karcinoma (Comes i sar., 2007), ali i kod fibroblasta (Heron-Milhavet i LeRoith, 2002) i neurona u procesu diferencijacije (Okamoto i sar., 2000). Pored navedenog značaja p38 MAPK, naši rezultati su prvi put pokazali selektivni citoprotektivni efekat AMPK, ERK i JNK kinaze u citotoksičnosti indukovanoj bafilomicinom, hlorokinom i amonijum hloridom kod ćelija melanoma (**Shema 6**).



**Shema 6. Obrazac aktivacije MAPK i njihova uloga u smrti ćelija mišjeg melanoma tretiranih lizozomalnim inhibitorima autofagije** (Zelene strelice označavaju da je određeni proces aktiviran, dok crvene označavaju njegovu inhibiciju;  $\Delta\Psi$  - potencijal membrane mitohondrija)

Homeostaza i adaptacija na stres kod različitih malignih ćelija može da se odigrava aktivacijom energetskog senzora AMPK i njegovih nishodnih supstrata kao što je p38 MAPK (Chaube i Bhat, 2016). Međutim, u našem istraživanju je pokazano da iako bafilomicin dovodi do aktivacije oba enzima, oni imaju suprotne uloge u preživljavanju ćelija melanoma. Chen i autori su pokazali da kod ćelija melanoma aktivacija AMPK može da inhibira njihovo preživljavanje i proliferaciju (Chen i sar., 2016), dok suprotno ovome Kfoury i kolege zapažaju da ukoliko se ovaj senzor inhibira, ćelije melanoma umiru apoptotskom smrću, što kao i u našim rezultatima ukazuje na zaštitnu ulogu AMPK (Kfoury i sar., 2018). Ovi podaci potvrđuju pretpostavku da uloga AMPK, slično ostalim kinazama, može da zavisi kako od prirode stimulusa, tako i od dužine njegovog trajanja. U kontekstu uloge MAPK u ćelijama melanoma, važno je napomenuti da ERK predstavlja jednog od najznačajnijih regulatora proliferacije i diferencijacije melanocita. Međutim, ova kinaza je i ključna za ranu fazu transformacije pigmentnih ćelija, nastanak melanoma, njegovu progresiju i preživljavanje, zbog čega predstavlja primamljivu metu u antitumorskoj terapiji (Wellbrock i Arozarena, 2016, Mattia i sar., 2018). Takođe je zapaženo da je konstitutivna istovremena aktivacija p38 MAPK i ERK neophodna za *in vivo* rast melanoma (Estrada i sar., 2009). U našem istraživanju nije zapažen porast p38 i ERK MAPK kod kontrolnih, već isključivo kod ćelija izloženih hlorokinu. Odsustvo konstitutivne aktivacije MAPK kod B16 ćelija moglo bi da se objasni genetskim karakteristikama ove ćelijske linije. Naime, konstitutivnu aktivaciju ERK i moguću interakciju sa p38 MAPK prouzrokuju mutacije u BRAF i RAS genima prisutnim u određenom procentu ćelija melanoma (Amaral i sar., 2017), dok analiza genoma B16 ćelija ukazuje na odsustvo ovih mutacija (Melnikova i sar., 2004). Pored AMPK, ERK i p38 MAPK, JNK ima značajno mesto u preživljavanju ćelija melanoma. Naime iako se smatra enzimom koji je prevashodno uključen u ćelijsku smrt, JNK može da ima i anti-apoptotsko dejstvo (Liu i Lin, 2005, Cubero i sar., 2011), što je u skladu sa našim rezultatima koji pokazuju protektivni efekat ove kinaze u citotoksičnosti amonijum hlorida. Noviji podaci pokazuju da proliferacija i sposobnost metastaziranja ćelija melanoma zavise od aktivacije JNK (Wang i sar., 2017b), kao i da je ovaj enzim ključan u razvijanju njihove rezistencije na terapiju (Hammouda i sar., 2020).

Ispitivanje aktivnosti i uloge AMPK i MAPK u citotoksičnosti LIA na ćelijama humanog glioma U251, dala nam je jedinstvenu mogućnost uporedne analize njihovih efekata u odnosu na ćelijsku liniju mišjeg melanoma. Dobijeni rezultati su ukazali da je, slično B16 ćelijama, i kod U251 ćelija p38 MAPK ispoljavala pro-apoptotski efekat u citotoksičnosti bafilomicina, za razliku od hlorokina i amonijum hlorida gde je njena aktivnost bila anti-apoptotska (**Shema 7**).

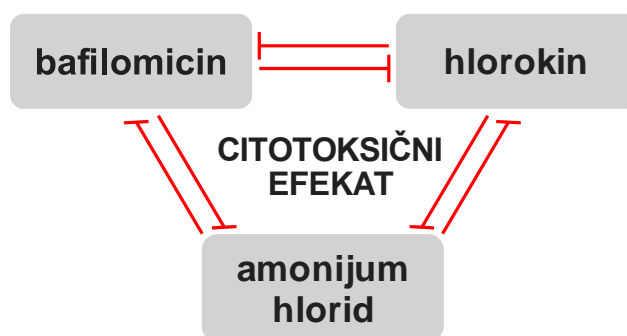


**Shema 7. Obrazac aktivacije MAPK i njihova uloga u smrti ćelija humanog glioma tretiranih lizozomalnim inhibitorima autofagije** (Zelene strelice označavaju da je određeni proces aktiviran, dok crvene označavaju njegovu inhibiciju)

Takođe, podaci dobijeni u našem istraživanju ukazuju da su ERK i JNK sprečile smrt ćelija humanog glioma tretiranih amonijum hloridom, dok nisu imale uticaj na preživljavanje ćelija tretiranih bafilomicinom ili hlorokinom. Iako nema dostupnih podataka o efektu amonijum hlorida na ERK i JNK, protektivno dejstvo ovih enzima pokazano je u nekoliko različitih studija sprovedenih na zdravom tkivu i tumorskim ćelijama, među kojima su i ćelije glioblastoma (Matsuda i sar., 2012, Liu i sar., 2018, Wu i sar., 2013, Sadoshima i sar., 2002, Hu i sar., 2017). Dodatno, za razliku od otkrivenog zaštitnog uticaja AMPK kod B16 ćelija izloženih bafilomicinu, ovaj enzim nije imao uticaj na preživljavanje ćelija humanog glioma tretiranih lizozomalnim inhibitorima. Svi navedeni rezultati ukazuju na drugačiji obrazac aktivacije i uloge MAP kinaza kod ćelija humanog glioma u poređenju sa B16 ćelijama tretiranim LIA. Uzevši u obzir mogućnost učešća MAP kinaza u apoptozi i autofagiji, na budućim istraživanjima ostaje da detaljno istraže da li inhibicija autofagije utiče na smrt ćelija humanog glioma i potencijalni značaj MAP kinaza u regulaciji ovog procesa.

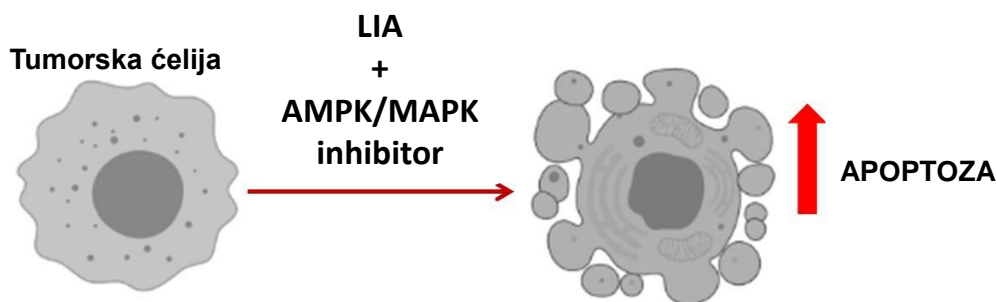
Uzevši u obzir različite mehanizme citotoksičnosti lizozomalnih inhibitora autofagije kod B16 ćelija, nije iznenađujuće što smo otkrili da su njihove međusobne interakcije bile dominantno antagonističke pre nego aditivne ili sinergističke (**Shema 8**). Iako su prethodne studije ukazale da bi bafilomicin mogao da inhibira smrt ćelija indukovanu hlorokinom (Boya i sar., 2003, Harhaji-Trajkovic i sar., 2012, Pivtoraiko i sar., 2010, Shacka i sar., 2006b), u našem istraživanju prvi put je opisan antagonizam između amonijum hlorida i bafilomicina, kao i između amonijum hlorida i hlorokina. Šta više, dobijeni rezultati pružaju bolji uvid u potencijalne mehanizme koji se nalaze u osnovi antagonističkog delovanja lizozomalnih inhibitora. Tako bi na primer alkalizacija lizozomalnog sadržaja mogla da smanji doprinos permeabilizacije lizozomalne membrane u smrti ćelija izazvanoj hlorokinom, što je u skladu sa prethodno pretpostavljenim antagonizmom između bafilomicina i hlorokina (Harhaji-Trajkovic i sar., 2012, Shacka i sar., 2006b). Takođe, s obzirom da je Bcl-xL efikasniji u represiji apoptoze (Fiebig i sar., 2006), porast Bcl-xL indukovano hlorokinom i amonijum hloridom mogao bi da se suprotstavi smanjenju Bcl-2 i posledičnoj indukciji apoptoze bafilomicinom. Na kraju, selektivna citoprotektivna aktivacija AMPK, ERK i JNK bafilomicinom, hlorokinom i

amonijum hloridom bi mogla da smanji citotoksični potencijal LIA prilikom njihove kombinovane primene.



**Shema 8. Antagonističko dejstvo lizozomalnih inhibitora autofagije**

Specifični mehanizmi dejstva nezavisni od inhibicije autofagije, pokazani u našem istraživanju, moraju biti uzeti u obzir kada se lizozomalni inhibitori koriste kao inhibitori ovog procesa, kako u bazičnim, tako i u kliničkim istraživanjima. Takođe, dobijeni rezultati pružaju mogućnost drugačijeg pristupa u poboljšanju antitumorskog efekta lizozomalnih inhibitora autofagije. Poznato je da su hlorokin i njegovi derivati zbog povoljnih karakteristika kao što su niska cena, zadovoljavajuća bezbednost i dostupnost, jedini do sada odobreni farmakološki inhibitori autofagije u terapijskoj modulaciji ovog procesa, koji predstavlja jedan od mogućih pristupa u lečenju maligniteta. On se zasniva na poboljšanju citotoksičnih efekata hemioterapeutika koji indukuju citoprotektivnu autofagiju u kombinaciji sa netoksičnim koncentracijama inhibitora ovog procesa, odnosno hlorokina (Liu i sar., 2020). Studije slučajeva pokazuju da primena hlorokina i njegovih derivata kod odgovarajućih pacijenata i u adekvatnim koncentracijama mogu da daju dobre rezultate čak i u slučaju postojeće rezistencije na hemioterapeutike i nemogućnosti eliminacije pokretača maligne transformacije, kao što su pojedine mutacije (Levy i sar., 2014, Kinsey i sar., 2019). Drugi pristup bi mogao da bude poboljšanje antitumorskih efekata lizozomalnih inhibitora autofagije, pre svega hlorokina, inhibicijom MAPK. U skladu sa navedenim, najnovije studije predlažu kombinovanu primenu hidroksihlorokina i ERK inhibitora u terapiji pankreasnog duktalnog adenokarcinoma, kolorektalnog karcinoma i melanoma koje karakteriše konstitutivna aktivacija pomenute kinaze (Kinsey i sar., 2019, Truong i sar., 2020, Bryant i sar., 2019). Ovo otvara mogućnost da se na sličan način postupi i u slučajevima kada su detektovani neki od protektivnih mehanizama u citotoksičnim dejstvu određenog agensa. Konkretno, u slučaju LIA, protektivni efekti p38 MAPK ili AMPK predstavljaju slabe tačke u citotoksičnosti ovih agenasa koja bi mogla da se pojača primenom odgovarajućih kinaznih inhibitora (**Shema 9**).



**Shema 9. Novi pristup u lečenju maligniteta upotrebom LIA**

Uzevši u obzir ćelijski specifične obrasce u mehanizmima dejstva LIA, za uspešnost ovog pristupa potrebno je podrobno ispitivanje njihovih efekata na različitim zdravim i tumorskim

ćelijskim linijama, ali i u *in vivo* uslovima. Jedna od manjkavosti našeg istraživanja, kao i većine prethodnih studija, predstavlja izostanak ispitivanja efekata na primarnim ćelijskim kulturama. Takođe, trudeći se da ispitamo veliki broj unutarćelijskih procesa u potrazi za mogućim razlikama između lizozomalnih inhibitora, njihove međusobne interakcije nisu detaljno ispitane. Stoga, na budućim studijama ostaje da ove nedostatke prevaziđu, kao i da detaljno analiziraju molekularne mehanizme kombinovane primene lizozomalnih inhibitora autofagije.

Navedene mogućnosti upotrebe lizozomalnih inhibitora u terapijske svrhe nameću potrebu za pronalaženjem novih netoksičnih supstanci koje će ispoljavati slično dejstvo. Poslednjih godina, dosta pažnje je usmereno na proučavanje antitumorskog efekta inhibitora protonskih pumpi, ali uz nedovoljno istražen uticaj na proces autofagije. Naime, predstavnici ove grupe lekova, među kojima je i pantoprazol, svoje dejstvo ostvaruju inhibicijom  $K^+/H^+$  ATPaze, enzima zaduženog za regulaciju kiselosti želudačne sredine, što predstavlja osnovu upotrebe ovih lekova (Shin i Sachs, 2008). Međutim, pored navedenog, pantoprazol zajedno sa ostalim inhibitorima iz ove grupe, utiče i na vakuolarnu ATPazu (V-ATPazu), enzim zastupljen u ćelijskim odeljcima u kojima je neophodno održavanje adekvatne kiselosti, kao što su lizozomi (Spugnini i sar., 2010, Pamarthy i sar., 2018). Ovakav mehanizam dejstva je sličan bafilomicinu, ali za razliku od klasičnog inhibitora autofagije čija je upotreba ograničena zbog toksičnosti, pantoprazol predstavlja lek koji je u širokoj upotrebi u kliničkoj praksi. Zbog navedene sličnosti sa bafilomicinom sa jedne strane, a zadovoljavajuće tolerabilnosti sa druge, pantoprazol bi mogao da se smatra novim, poboljšanim inhibitorom autofagije. Pored samostalne primene pantoprazola, otvara se mogućnost njegove kombinovane primene sa drugim antitumorskim agensima, uzevši u obzir da delovanjem na protonske pumpe ovaj lek može da smanji kiselost tumorske mikrosredine i učini tumore osetljivijim na određene hemioterapeutike (Patel i sar., 2013, Paskeviciute i Petrikaite, 2019).

Dodatni cilj našeg istraživanja bio je usmeren na sticanje detaljnijeg uvida u mehanizme dejstva pantoprazola na ćelije mišjeg melanoma i humanog glioma, uz utvrđivanje sličnosti i razlika u odnosu na klasične lizozomalne inhibitore. Rezultati analize su pokazali da je citotoksični efekat pantoprazola na navedenim ćelijskim linijama, slično LIA, ostvaren kroz pokretanje apoptotske smrti kojoj su prethodili oksidativni stres i aktivacija kaspaza, pri čemu su sva tri procesa bila vremenski i dozno zavisna. Ovakvo antitumorsko svojstvo pantoprazola prethodno je pokazano na ćelijama humanog karcinoma želuca uz odsustvo citotoksičnosti na zdravim ćelijama želudačnog tkiva (Yeo i sar., 2004) što predstavlja važan pokazatelj njegovog selektivnog dejstva. Zapažena razlika između tumorskih i zdravih ćelija mogla bi da se objasni karakteristikama kisele tumorske mikrosredine koja rezultira povećanjem broja protonskih pumpi kod tumorskih ćelija (Taylor i sar., 2015) i samim tim efikasnijim dejstvom pantoprazola koji se u kiseloj sredini aktivira (Shin i Sachs, 2008). Takođe, i ostali lekovi iz grupe inhibitora protonskih pumpi, omeprazol i esomeprazol, indukovali su apoptozu kod humanih B ćelijskih tumora, melanoma, karcinoma dojke i glioma (De Milito i sar., 2007, Marino i sar., 2010, Ihraiz i sar., 2020, Liu i sar., 2017, Geeviman i sar., 2018). Pored pokretanja apoptotske ćelijske smrti, još jedna sličnost inhibitora protonske pumpe sa lizozomalnim inhibitorima autofagije uočena je i u sposobnosti pantoprazola da smanjuje zakišeljavanje lizozoma. Ovakav rezultat je bio očekivan uzevši u obzir pomenuti mehanizam dejstva sličan bafilomicinu i u saglasnosti je sa prethodno sprovedenim studijama u kojima je pokazano da inhibitori protonske pumpe uspešno vrše alkalizaciju kiselih ćelijskih odeljaka, pre svega lizozoma (De Milito i sar., 2007, Cao i sar., 2018). Inhibicija zakišeljavanja lizozoma predstavlja jedan od načina inhibicije autofagije, tako da je logično pretpostaviti da bi i pantoprazol mogao da ispoljava slično dejstvo. Ovo potvrđuju studije sprovedene na ćelijskim linijama karcinoma pankreasa, dojke, prostate i želuca, u kojima je pokazano da omeprazol i pantoprazol mogu da inhibiraju autofagiju (Tan i sar., 2017, Feng i sar., 2021). Međutim, postoje i studije koje ukazuju da pantoprazol dovodi do indukcije ovog procesa, što navodi na pretpostavku da njegovi efekti mogu da zavise od ćelijskog tipa ali i nekih dodatnih faktora, kao što su koncentracija i vreme inkubacije (Marino

i sar., 2010, Chueca i sar., 2016, Cao i sar., 2018). U našem istraživanju na ćelijama mišjeg melanoma pantoprazol je doveo do povećanja nivoa glavnog markera autofagije LC3-II, dok je sa druge strane uzrokovao neznatno smanjenje proteina p62, glavnog supstrata razgradnje u ovom procesu. Na osnovu ovako dobijenih rezultata moglo bi da se pretpostavi da pantoprazol indukuje autofagiju kod B16 ćelija. Međutim, nivoi pomenutih proteina ne ukazuju sa sigurnošću da li je autofagija aktivirana ili inhibirana, s obzirom da povećanje LC3-II može da bude posledica pojačanog stvaranja autofagozoma, ali i blokade njegove proteolize (Loos i sar., 2020). Sa druge strane, p62 ima veliki broj funkcija u ćeliji jer kao adapterski protein učestvuje u signalnim putevima značajnim za proliferaciju, preživljavanje i smrt tako što reguliše aktivnost transkripcionih faktora i učestvuje u razgradnji proteina interakcijom sa ubikvitinom (Alegre i sar., 2018, Puissant i sar., 2012). Takođe, u procesu autofagije p62 omogućava aktivaciju mTORC1 na lizozomima i predstavlja receptor nosač za ubikvitirane proteinske agregate (tzv. p62 tela) koji se razgrađuju u autolizozomima (Bjorkoy i sar., 2005). Poslednjih godina, uloga p62 i korelacija njegovog nivoa sa autofagnim fluksom smatra se dominantno zavisnom od tipa ćelija i eksperimentalnih uslova (Liu i sar., 2016b). Zbog svega navedenog, stvarna procena statusa autofagije izvršena je kroz analizu fluksa LC3 proteina, koja je pokazala da kod ćelija melanoma pantoprazol zaista dovodi do indukcije autofagije. Sa druge strane, kod ćelija humanog glioma pantoprazol je doveo do blagog povećanja nivoa p62 i LC3-II proteina. Iako ovakav rezultat ukazuje na potencijalnu inhibiciju autofagije, analiza broja LC3 pozitivnih punkta pokazala je da i kod ćelija humanog glioma pantoprazol dovodi do aktivacije procesa autofagije. Sa druge strane, povećana, ali nedovoljno upadljiva konverzija LC3-I u LC3-II detektovana imunoblotom ukazuje na delimičnu inhibiciju fluksa. Ovi rezultati navode na zaključak da iako dovodi do aktivacije autofagije, pantoprazol ujedno i inhibira autofagni fluks, verovatno na nivou fuzije sa lizozomima usled inhibicije zakišeljavanja ovih organela, slično klasičnim LIA.

U procesu autofagije razgradnja unutarćelijskog sadržaja pomoću lizozoma posredovana je evolutivno konzervisanim Atg genima. Oni su neophodni za nastanak autofagozoma, počev od formiranja fagofore i njenog zatvaranja, pa sve do spajanja sa lizozomima (Levine i Kroemer, 2019). U našem istraživanju prvi put je ispitan uticaj inhibitora protonske pumpe na ekspresiju Atg gena. Analiza na ćelijskoj liniji mišjeg melanoma pokazala je da pantoprazol dovodi do povećanja ekspresije iRNK za Atg12, Gabarap i p62. Poznato je da se Atg12 nalazi u sastavu kompleksa koji su odgovorni za započinjanje procesa autofagije i elongaciju fagofora (Ohsumi, 2001, Mizushima i sar., 1998, Mizushima i sar., 2003). Pored navedenog, Atg12 ima ulogu i u lipidaciji LC3 proteina, odnosno njegovom vezivanju za fosfatidiletanolamin (Hanada i sar., 2007). Sa druge strane, Gabarap je značajan za nastanak funkcionalnih autofagozoma i njihovu fuziju sa lizozomima (Schaaf i sar., 2016). Gabarap familija proteina interakcijom sa adapterskim proteinima kao što je p62 ostvaruje ključnu ulogu u zatvaranju ćelijskog sadržaja koji treba da se razgradi autofagijom (Wild i sar., 2014). U našem istraživanju, iako transkripciono povišen, p62 se uspešno razgrađuje u autofagiji koju je u ćelijama mišjeg melanoma indukovao pantoprazol. Slično razlici u mehanizmima dejstva LIA uočenim između ćelijskih linija mišjeg melanoma i humanog glioma, i efekti pantoprazola na ovim ćelijama su bili donekle drugačiji. Naime, iako je pantoprazol indukovao autofagiju kod B16 i U251 ćelija, geni koji kontrolišu početnu fazu autofagije su imali drugačiji obrazac ekspresije. Kod ćelija humanog glioma zapažen je porast nivoa iRNK za Atg13 i FIP200 koji sačinjavaju kompleks značajan za indukciju autofagije i nastanak fagofora (Ganley i sar., 2009), dok sam FIP200 vezivanjem za p62 učestvuje u formiranju autofagozoma (Turco i sar., 2019). Takođe, zapaženi porast iRNK za UVRAG, AMBRA1 i Vps34, uobičajen je u inicijaciji nastanka autofagozoma (Morris i sar., 2015). Među genima sa povišenom ekspresijom detektovan je i transkripcioni faktor Atf4 koji se smatra transkripcionim aktivatorom autofagije (Moeckel i sar., 2019), ali i ključnim signalnim molekulom u autofagiji pokrenutoj ER stresom (Matsumoto i sar., 2013). Takođe je zapaženo i povećanje iRNK za transkripcioni faktor Foxo3 tokom svih



vremenskih intervala nakon tretmana pantoprazolom. Poznato je da članovi Foxo familije regulišu autofagiju kroz transkripciono zavisne i nezavisne mehanizme. Naime, u jedru oni utiču na aktivaciju transkripcije nekoliko autofagnih gena uključenih u različite faze autofagije, a nakon translokacije u citosol nastavljaju da regulišu ovaj proces kroz direktnu interakciju sa autofagnim proteinima koji se tamo nalaze (Cheng, 2019). U regulaciji aktivnosti Foxo3 poseban značaj imaju AMPK i AKT. AMPK stabilizuje Foxo3 u uslovima stresa, stimuliše njegovu akumulaciju u jedru i pokreće autofagiju transkripcionim ili epigenetskim mehanizmima (Shin i sar., 2016, Fasano i sar., 2019). Sa druge strane, AKT dovodi do fosforilacije i posledične degradacije Foxo3 u citoplazmi (Li i sar., 2012b, Grant i sar., 2002, Stern, 2000, Guo i Sonenshein, 2004). Pored Foxo3, slično ćelijama mišjeg melanoma, i kod U251 ćelija je nakon tretmana pantoprazolom zapažen porast iRNA za p62. Blagi porast p62 koji je zapažen i imunoblot analizom mogao bi, pored transkripcione aktivacije, da se objasni i delimičnom inhibicijom autofagnog fluksa izazvanom ovim inhibitorom. U skladu sa tim, noviji podaci ukazuju da je povećanje nivoa p62 u ćelijama karcinoma želuca posledica proteolitičke blokade koju pantoprazol izaziva pored povećanja biogeneze autofagnih vezikula i indukcije autofagije, a koja može da rezultira povećanjem nivoa ovog proteina (Cao i sar., 2018).

Pored aktivacije Atg gena u kontroli autofagije veliki značaj imaju i molekuli AMPK/AKT/mTOR signalnog puta. Uloga AMPK u citotoksičnosti indukovanoj pantoprazolom do sada nikada nije ispitivana. Rezultati našeg istraživanja su prvi put pokazali da u ćelijama mišjeg melanoma i humanog glioma ovaj inhibitor protonske pumpe dovodi do aktivacije AMPK, poznatog negativnog regulatora aktivnosti mTOR-a i aktivatora autofagije (Alers i sar., 2012). Sa druge strane, neke od prethodnih studija su pokazale da kod ćelija adenokarcinoma želuca tretman pantoprazolom dovodi do smanjenja ekspresije iRNK za PI3K, AKT i mTOR i inhibicije PI3K/AKT/mTOR signalnog puta (Chen i sar., 2018b, Cao i sar., 2018). Takođe, zapaženo je da pantoprazol blokadom ovog signalnog puta indukuje apoptozu nekih tipova leukemijskih ćelija (Liu i sar., 2017) i povećava osetljivost ćelija oralnog karcinoma tretiranih vinkristinom (Lu i sar., 2019). Slično uticaju esomeprazola na ćelije humanog melanoma (Marino i sar., 2010) i u našem istraživanju kod B16 i U251 ćelija izloženih pantoprazolu zapažen je pad aktivnosti pS6 kinaze, glavnog supstrata mTORC1. Dodatno, naša analiza je pokazala da pantoprazol smanjuje fosforilaciju AKT-a, ushodnog aktivatora mTORC1, kao i fosforilaciju mTORC1 supstrata ULK1 (Ser 757), čiji aktivacioni status u kontekstu efekata inhibitora protonske pumpe nikada ranije nije ispitivan. Ovakav obrazac aktivacije AMPK/AKT/mTORC1 signalnog puta otkriven kod B16 i U251 ćelija tretiranih pantoprazolom karakterističan je za aktivaciju autofagije u ćelijama sisara (Kim i sar., 2011). Pored navedenog signalnog puta, u regulaciji autofagije značaj ima i Beklin-1 koji učestvuje u formiranju izolacione membrane i maturaciji autofagozoma (Morris i sar., 2015). Dok je uticaj pantoprazola proučavan kod ćelija sa genetski inhibiranom ekspresijom Beklina-1 (Tan i sar., 2016, Marino i sar., 2010), efekti inhibitora protonske pumpe na aktivnost ovog proteina nisu do sada ispitivani. Iako je u našem istraživanju pantoprazol na isti način regulisao aktivnost molekula AMPK/AKT/mTORC1 signalne osovine kod obe ćelijske linije, samo je kod ćelija mišjeg melanoma došlo do povećanja nivoa Beklina-1, što ukazuje na odsustvo uloge ovog proteina u regulaciji autofagije kod U251 ćelija tretiranih pantoprazolom. Tumačenje uloge Beklina-1 otežano je jer on predstavlja sponu između procesa autofagije i apoptoze i njihove međusobne interakcije. Poznato je da anti-apoptotski proteini Bcl-2 i Bcl-xL interaguju sa Beklinom-1 preko BH3 domena, čime se blokira proces autofagije (He i Levine, 2010, Maiuri i sar., 2007b), dok se oslobađanjem Beklina-1 iz ovog kompleksa omogućava njegovo učešće u procesu autofagije (Erlich i sar., 2007). Sa druge strane, NOXA i ostali pro-apoptotski proteini koji sadrže BH3 domen mogu da zauzmu mesto članova Bcl-2 familije u kompleksu sa Beklinom-1, čime se poništava inhibicija autofagije i stimuliše autofagna ćelijska smrt (Elgendy i sar., 2011). Dodatno, Beklin-1 može da bude isečen aktiviranim kaspazama, pri čemu fragment koji tako nastaje ima pro-apoptotski efekat i ćelijsku sudbinu od autofagije dodatno usmerava

prema apoptozi (Luo i Rubinsztein, 2010, Zhang i sar., 2015, Wirawan i sar., 2010). U prilog kompleksnosti uloge Beklina-1 u ćeliji govore i rezultati istraživanja sprovedenog na ćelijama humanog glioma, koji su pokazali da povećana ekspresija Beklina-1 smanjuje proliferaciju i indukuje programiranu ćelijsku smrt apoptozom (Huang i sar., 2014). Sa druge strane, u našem istraživanju inhibicija ekspresije Beklina-1 RNK interferencijom u ćelijama mišjeg melanoma dovela je do njihovog smanjenog preživljavanja, ukazujući na zaštitnu ulogu ovog proteina u citotoksičnosti indukovanoj pantoprazolom. Slično, inhibicija energetskog senzora i glavnog regulatora procesa autofagije AMPK dovela je do smanjenja vijabiliteta ćelija tretiranih pantoprazolom, što govori u prilog zaštitnoj ulozi ove kinaze u smrti ćelija mišjeg melanoma i humanog glioma. Protektivno dejstvo AMPK i Beklina-1 bar delimično je zavisilo od njihove uloge u procesu autofagije, jer je inhibicijom ovog procesa netoksičnim dozama bafilomicina, hlorokina i amonijum hlorida pokazano da pantoprazol indukuje citoprotektivnu autofagiju u ćelijama mišjeg melanoma i humanog glioma. U skladu sa tim, citotoksični efekat pantoprazola bio je značajno povećan u različitim tipovima tumorskih ćelija kod kojih je proteoliza inhibirana bortezomibom ili autofagija blokirana hlorokinom (Cao i sar., 2018).

Pored AMPK/AKT/mTOR signalnih molekula, sve je više podataka o značaju MAPK u regulaciji autofagije (He i sar., 2018, Lee i sar., 2019, Mukherjee i sar., 2017, Zhou i sar., 2015). Tokom istraživanja citotoksičnosti lizozomalnih inhibitora autofagije na B16 i U251 ćelijama posebno se istakao značaj p38 MAPK u preživljavanju, odnosno smrti ćelija. Pored ovih poznatih uloga, u različitim studijama uočeno je da p38 MAPK može da funkcioniše kao pozitivni i negativni regulator procesa autofagije. Uloga p38 u indukciji autofagije interakcijom sa različitim signalnim molekulima među kojima su i proteini ER stresa, prethodno je pokazana u astrocitima, neuronima, kao i ćelijama osteosarkoma, adenokarcinoma pluća i karcinoma grlića materice (Tang i sar., 2008, Webber i Tooze, 2010, Slobodnyuk i sar., 2019). Suprotno, negativna regulacija autofagije ovom kinazom zapažena je kod CD8<sup>+</sup> T-limfocita i ćelija mikroglije, kolorektalnog i karcinoma grlića materice (He i sar., 2018, Henson i sar., 2014, Comes i sar., 2007, Webber i Tooze, 2010). Dodatno, kod ćelija karcinoma kože uočeno je da se aktivnost p38 MAPK povećava kada je proces autofagije inhibiran (Qiang i sar., 2013). Uticaj inhibitora protonskih pumpi na MAPK signalne puteve prvi put su ispitivani na nekoliko različitih ćelijskih linija karcinoma raka želuca, gde je pokazan značaj selektivne aktivacije p38 MAPK u indukciji apoptoze u odnosu na netumorske ćelije želudačnog tkiva (Yeo i sar., 2004). Sa druge strane, na mišjem modelu multiple intestinalne neoplazije pokazano je da pantoprazol dovodi do inhibicije p38 MAPK (Han i sar., 2014), kao i da ispoljava anti-inflamatorno dejstvo supresijom p38 MAPK u polimorfonuklearnim leukocitima (Koshio i sar., 2010). Novija studija pokazala je postojanje povezanosti produkcije reaktivnih oblika kiseonika sa povećanjem aktivnosti p38 MAPK kod različitih tipova tumorskih ćelija tretiranih pantoprazolom (Cao i sar., 2018). Suprotno navedenom, rezultati našeg istraživanja na B16 ćelijama pokazali su da se ćelijska smrt indukovana pantoprazolom odvija nezavisno od p38 MAPK, uzevši u obzir činjenicu da inhibitor protonske pumpe nije doveo do promene aktivacionog statusa ovog enzima i da njegova inhibicija nije rezultirala promenom u preživljavanju ćelija. Sa druge strane, pantoprazol je aktivirao p38 MAPK u ćelijama humanog glioma, a farmakološka inhibicija ovog enzima dodatno je smanjila vijabilitet ćelija, ukazujući na njegovu citoprotektivnu ulogu. Poređenjem ovih podataka sa podacima o ulozi p38 MAPK u citotoksičnosti LIA uočavaju se sličnosti, ali i izvesne razlike. Kod B16 ćelija odsustvo uticaja p38 MAPK na citotoksičnost pantoprazola jasno stoji nasuprot pro- i anti-apoptotskim ulogama ove kinaze u citotoksičnosti LIA. Sa druge strane, kod ćelija humanog glioma pokazano je da p38 MAPK aktivirana hlorokinom ili amonijum hloridom ima protektivnu ulogu slično ćelijama tretiranim pantoprazolom, dok je u citotoksičnosti bafilomicina, koji je po mehanizmu dejstva najbliži pantoprazolu, paradoksalno zapažena pro-apoptotska uloga ove kinaze. Ovakav rezultat bi delimično mogao da se objasni različitim efektima bafilomicina i pantoprazola na autofagiju u ćelijama glioma. Naime, smrt U251 ćelija indukovana bafilomicinom je nezavisna od inhibicije

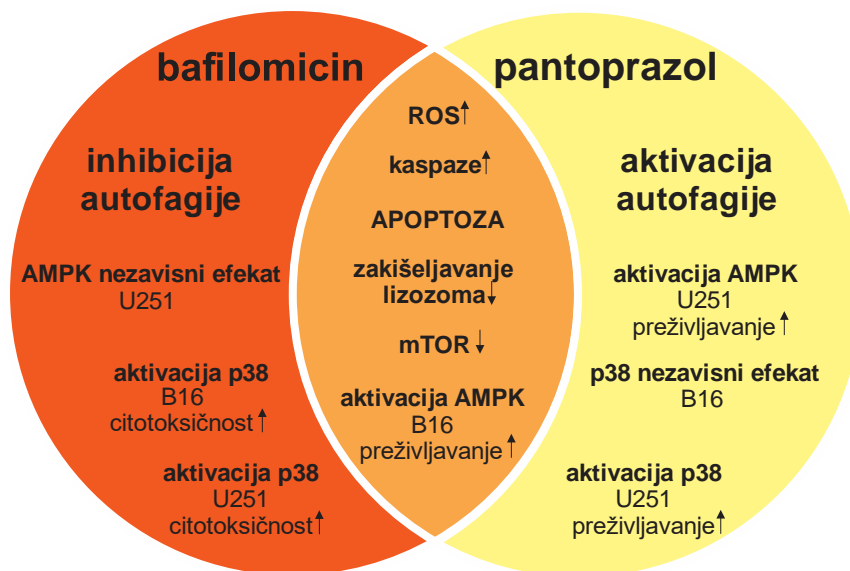
autofagije, dok pantoprazol deluje tako što pored delimične blokade autofagnog fluksa pokreće citoprotektivnu autofagiju koja zavisi od aktivacije p38 MAPK.

Osim učesća u regulaciji autofagije, p38 MAPK često predstavlja deo signalnih puteva uključenih u pokretanje ER stresa (Darling i Cook, 2014), dok koji je sa druge strane u bliskoj vezi sa procesom autofagije (Lin i sar., 2019). Zbog toga nije iznenađujuće što se putem p38 MAPK ostvaruje interakcija između ova dva procesa u ćeliji. U senzitivizaciji ćelija na ER stres jednu od važnih komponenti predstavlja transkripcioni faktor CHOP koji može da inhibira proliferaciju ćelija i utiče na progresiju DNK oštećenja (Woo i sar., 2009). Ekspresija CHOP-a nalazi se pod kontrolom transkripcionog faktora Atf4 koji se aktivira različitim signalima poput nedostatka aminokiselina i oksidativnog oštećenja, sa osnovnom funkcijom da omogući ćeliji adaptaciju na ER stres modulacijom metaboličke aktivnosti (Harding i sar., 2003). Atf4 je takođe i ključni signal za autofagiju indukovanu ER stresom, a posledično povećanje ekspresije CHOP-a odgovorno je za prelazak autofagije u apoptozu (Matsumoto i sar., 2013, Liu i sar., 2012). Poznato je da p38 MAPK fosforiliše CHOP i u odgovoru na ćelijski stres (Wang i Ron, 1996), a krajnji ishod interakcije ovih molekula može da bude različit. U *in vivo* uslovima ova fosforilacija je neophodna za inhibiciju diferencijacije ćelija adipoznog tkiva (Aouadi i sar., 2006) i za smanjenje preživljavanja ćelija karcinoma grlića materice (Lin i sar., 2018). Jiang i saradnici su pokazali da je kod leukemijskih ćelija u uslovima stresa interakcija Atf4 i CHOP-a ključna za indukciju autofagije, dok p38 MAPK dovodi do povećanja ekspresije ovih molekula i ujedno učestvuje u apoptozi, ali i u indukciji autofagije (Jiang i sar., 2013). Uticaj inhibitora protonskih pumpi na pojavu ER stresa do sada je ispitivan samo na ćelijskoj liniji adenokarcinoma želuca kod koje je pantoprazol uzrokovao inhibiciju proteazoma sa posledičnim nagomilavanjem proteina i indukcijom ER stresa, iskazanom kroz povećanje aktivnosti CHOP proteina (Cao i sar., 2018). U skladu sa tim, rezultati našeg istraživanja pokazali su da i kod ćelija humanog glioma pantoprazol dovodi do aktivacije CHOP-a kao markera ER stresa. Dodatno, u našem istraživanju je pokazano da se CHOP nalazi pod direktnim uticajem p38 MAPK, čija inhibicija ne samo da je dovela do smanjenja ovog proteina, već je uzrokovala i smanjenje akumulacije autofagnog markera LC3-II, što ukazuje na moguću ulogu interakcije ove kinaze sa CHOP proteinom u indukciji autofagije. Dakle, indukcija autofagije pantoprazolom mogla bi sa jedne strane da se odvija modulacijom AMPK/AKT/mTOR signalnog puta, a sa druge aktivacijom p38 MAPK-Atf4 osovine, uzevši u obzir da je pantoprazol doveo i do povećanje ekspresije navedenog transkripcionog faktora. Posledična aktivacija CHOP-a mogla bi da bude faktor koji usmerava ćelijsku sudbinu od autofagije ka apoptozi, kao i da objasni povećanje nivoa p62, s obzirom da je u prethodnim studijama pokazano da CHOP aktivira transkripciju ovog autofagnog receptora (B'Chir i sar., 2013). Sam ER stres nije obuhvaćen našim istraživanjem, ali predstavlja otvoreno polje za dalja ispitivanja, posebno zbog bliske povezanosti sa autofagijom i činjenicom da su oba procesa važne mete najnovijih terapijskih pristupa.

Ispitujući signalne puteve značajne za regulaciju autofagije i preživljavanje ćelija humanog glioma zapažen je protektivni efekat AMPK i p38 MAPK. Poznato je da ove dve kinaze mogu međusobno da se regulišu. Caube i saradnici su pokazali da je aktivacija p38 MAPK od strane AMPK neophodna za energetske homeostazu, preživljavanje i biogenezu mitohondrija kod tumorskih ćelija (Chaube i Bhat, 2016). Takođe, smatra se da interakcija ove dve kinaze može da doprinese sprečavanju ishemijskog oštećenja srca (Li i sar., 2005), ali i da indukuje apoptozu tumorskih ćelija miša (Hsu i sar., 2010) i starenje T-limfocita (Lanna i sar., 2014). Sa druge strane, pokazano je da p38 MAPK funkcioniše kao negativni regulator AMPK u održavanju procesa glukoneogeneze (Jing i sar., 2015). Uticaj inhibitora protonske pumpe na interakciju p38 i AMPK nikada do sada nije ispitivan. Podaci dobijeni na ćelijskoj liniji humanog glioma ukazuju da u citotoksičnosti pantoprazola inhibicija ekspresije AMPK ne utiče na aktivacioni status p38 MAPK. Slično, farmakološka inhibicija p38 MAPK ne dovodi do promene

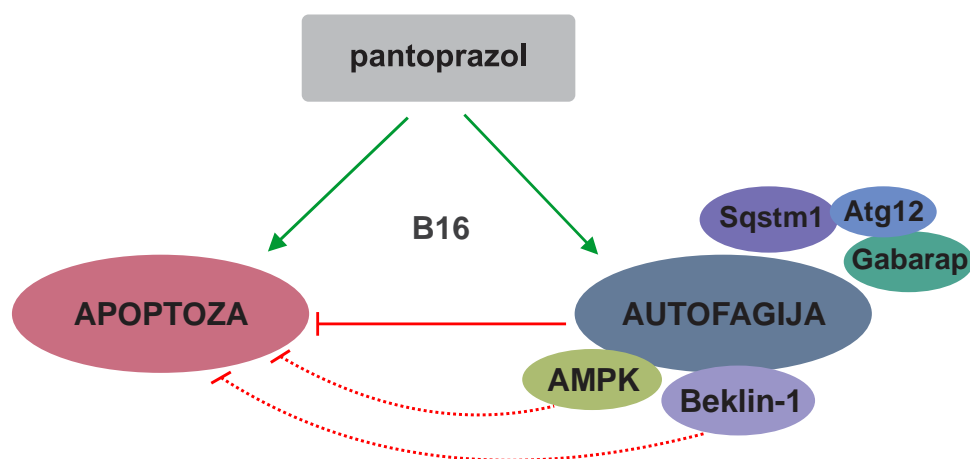
nivoa AMPK, što potvrđuje međusobno nezavisno protektivno dejstvo ove dve kinaze u ćelijama U251 glioma.

Analizom podataka dobijenih u ovom istraživanju uočene su jasne sličnosti i razlike između klasičnih lizozomalnih inhibitora – pre svega bafilomicina, i inhibitora protonske pumpe pantoprazola. Sličnost u osnovnom mehanizmu dejstva, odnosno sposobnost inhibicije V-ATPaze učinio je poređenje ova dva agensa još interesantnijim. Međutim, iako indukuje apoptozu ćelija mišjeg melanoma i humanog glioma, smanjuje zakišeljavanje lizozoma i na sličan način utiče na regulaciju mTOR-a u B16 i U251 ćelijama kao i AMPK u B16 ćelijama, pantoprazol, za razliku od bafilomicina, indukuje autofagiju koja štiti ove tumorske ćelije od umiranja (**Shema 10**).

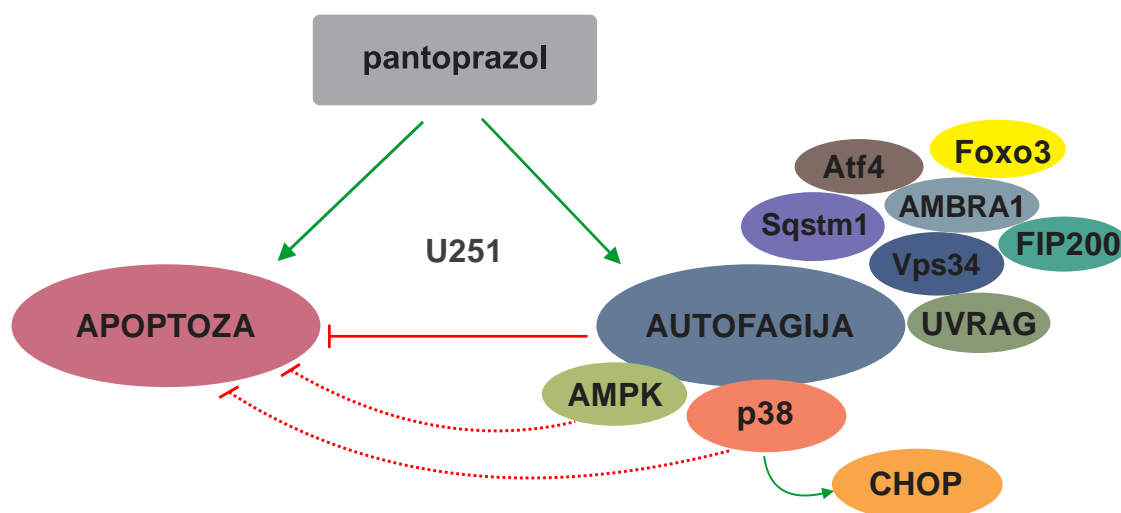


**Shema 10. Uporedni prikaz sličnosti i razlika u efektima inhibitora V-ATPaze – bafilomicina i pantoprazola u ćelijama mišjeg melanoma i humanog glioma**

U tom kontekstu, pretpostavka da bi pantoprazol mogao da funkcioniše kao poboljšana verzija farmakološkog inhibitora autofagije – bafilomicina, mora biti odbačena bar kada se radi o efektima ovog leka na ćelije mišjeg melanoma i humanog glioblastoma. Međutim, uzevši u obzir pokazani antitumorski efekat i povoljne karakteristike pantoprazola, pre svega njegovu čestu kliničku upotrebu i nisku toksičnost, novootkriveni mehanizmi dejstva ovog leka otvaraju mogućnost za potencijalno poboljšanje njegovog učinka u terapiji tumora. Do sada su inhibitori protonskih pumpi ispitivani prevashodno sa ciljem poboljšanja citotoksičnosti lekova čiji je efekat smanjen zbog neadekvatnog preuzimanja usled kisele tumorske mikrosredine. Ovakva sredina nastaje kao rezultat povećanog broja protonskih pumpi, pre svega V-ATPaza, kod tumorskih ćelija (Whitton i sar., 2018) i odgovorna je za brži rast, progresiju i metastatski potencijal tumora (Andreucci i sar., 2020). Pantoprazol delovanjem na protonske pumpe vrši njihovu reverziju, što rezultira poboljšanim preuzimanjem hemioterapeutika i tako pojačava njihovo antitumorsko dejstvo (Ikemura i sar., 2017). Sličan princip kombinovane primene pantoprazola i drugih inhibitora protonske pumpe u kombinaciji sa hemioterapeuticima, našao se i u osnovi kliničkih studija kod pacijenata sa karcinomom prostate i drugim solidnim tumorima (NCT01748500, NCT01069081). Naše istraživanje na B16 ćelijama pokazalo je da je mehanizam dejstva pantoprazola daleko kompleksniji od njegove pretpostavljene uloge, uzevši u obzir da pored indukcije apoptoze, on aktivira i citoprotektivnu autofagiju, uz karakterističan obrazac aktivacije AMPK/AKT/mTOR signalnog puta i povećanje ekspresije Atg gena uključenih u inicijaciju ovog procesa (**Shema 11**).



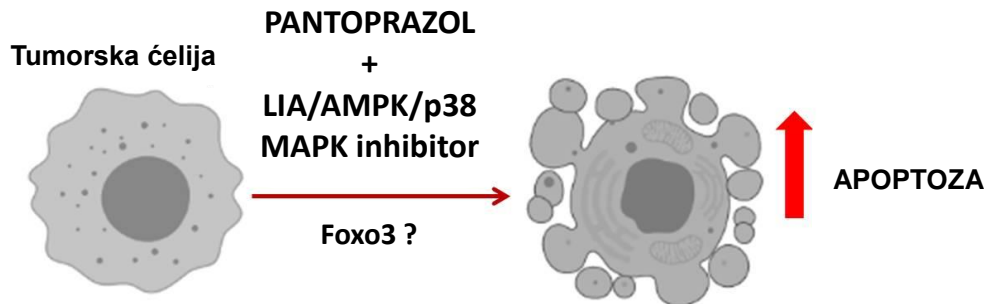
**Shema 11. Mehanizmi citotoksičnosti pantoprazola na ćelijama mišjeg melanoma**  
(Zelene strelice označavaju da je određeni proces aktiviran, dok crvene označavaju njegovu inhibiciju)



**Shema 12. Mehanizmi citotoksičnosti pantoprazola na ćelijama humanog glioma**  
(Zelene strelice označavaju da je određeni proces aktiviran, dok crvene označavaju njegovu inhibiciju)

Dobijene rezultate trebalo bi uzeti u obzir kada se razmatra kako samostalna, tako i kombinovana primena pantoprazola sa drugim agensima u budućim *in vitro* ali i *in vivo* i kliničkim studijama. Jedan od mogućih načina za poboljšanje antitumorskog delovanja pantoprazola mogao bi da bude kombinovanje sa niskim dozama klasičnih lizozomalnih inhibitora autofagije pomoću kojih bi se suprimirao citoprotektivni efekat indukovane autofagije, što je i pokazano u rezultatima našeg ispitivanja. U ovom slučaju bi svakako najracionalnije bilo kombinovati pantoprazol sa hlorokinom, koji je, kao što je već pomenuto, zbog svojih povoljnijih osobina jedini od svih LIA odobren za kliničku inhibiciju autofagije kao novom pristupu u terapiji tumora. Ispitujući dejstvo pantoprazola na dve različite ćelijske linije stekli smo bolji uvid u njegove efekte potencijalno značajne za dizajniranje budućih *in vivo* eksperimenata, kao i kliničkih studija. Kod ćelija humanog glioma pantoprazol je pored indukcije apoptoze uticao na ekspresiju drugačijih Atg gena u odnosu na B16 ćelije, sa posebno izraženim povećanjem Foxo3 transkripcionog faktora (**Shema 12**). Uzevši u obzir moguću vezu između aktivacije Foxo3 i povećanja rezistencije tumora na terapiju (Xu i sar., 2017, Qian i sar., 2017), ovaj transkripcioni faktor bi mogao da bude jedna od meta za poboljšanje terapijskog efekta pantoprazola u lečenju tumora (**Shema 13**). Takođe, otkrivena uloga AMPK i p38 MAPK u indukciji citoprotektivne autofagije u ćelijama humanog glioma proširuje mogućnosti

kombinovanja pantoprazola ne samo sa LIA, već i sa selektivnim inhibitorima ovih kinaza. Na budućim studijama ostaje da ove efekte detaljnije ispituju kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* uslovima.



Shema 13. Mogućnosti za poboljšanje antitumorskog efekta pantoprazola

## **6. Závěry**





---

Uzevši u obzir postavljene ciljeve ove doktorske disertacije, na osnovu dobijenih rezultata mogu da se izvedu sledeći zaključci:

- Bafilomicin, hlorokin, amonijum hlorid i pantoprazol su citotoksični za ćelije mišjeg melanoma i humanog glioma.
- Bafilomicin, hlorokin, amonijum hlorid i pantoprazol indukuju apoptozu tumorskih ćelija zavisnu od aktivacije kaspaza, praćenu produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta i depolarizacijom mitohondrija.
- Bafilomicin, hlorokin i amonijum hlorid indukuju apoptozu tumorskih ćelija nezavisno od modulacije autofagije i aktivnosti mTOR kinaze, različitim uticajem na ravnotežu pro- i anti-apoptotskih molekula Bcl-2 familije, permeabilizaciju lizozoma i aktivaciju AMPK/MAPK signalnih puteva.
- Pantoprazol indukuje transkripciono regulisanu citoprotektivnu autofagiju modulacijom AMPK/AKT/mTOR signalnih molekula u B16 ćelijama melanoma, odnosno aktivacijom p38 MAP kinaze, ER stresa i transkripcionog faktora CHOP u U251 ćelijama glioma.



## **7. Literatura**



- AHMED, K., TABUCHI, Y. i KONDO, T. 2015. Hyperthermia: an effective strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Apoptosis*, 20, 1411-9.
- AITA, V. M., LIANG, X. H., MURTY, V. V., i sar. 1999. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*, 59, 59-65.
- AKHAVAN, D., CLOUGHESY, T. F. i MISCHEL, P. S. 2010. mTOR signaling in glioblastoma: lessons learned from bench to bedside. *Neuro Oncol*, 12, 882-9.
- AL-BARI, M. A. 2015. Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. *J Antimicrob Chemother*, 70, 1608-21.
- ALEGRE, F., MORAGREGA, A. B., POLO, M., i sar. 2018. Role of p62/SQSTM1 beyond autophagy: a lesson learned from drug-induced toxicity in vitro. *Br J Pharmacol*, 175, 440-455.
- ALERS, S., LOFFLER, A. S., WESSELBORG, S., i sar. 2012. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol*, 32, 2-11.
- ALTMAN, J. K., SZILARD, A., GOUSSETIS, D. J., i sar. 2014. Autophagy is a survival mechanism of acute myelogenous leukemia precursors during dual mTORC2/mTORC1 targeting. *Clin Cancer Res*, 20, 2400-9.
- AMARAL, T., SINNBERG, T., MEIER, F., i sar. 2017. The mitogen-activated protein kinase pathway in melanoma part I - Activation and primary resistance mechanisms to BRAF inhibition. *Eur J Cancer*, 73, 85-92.
- ANDREUCCI, E., PEPPICELLI, S., RUZZOLINI, J., i sar. 2020. The acidic tumor microenvironment drives a stem-like phenotype in melanoma cells. *J Mol Med (Berl)*, 98, 1431-1446.
- AOUADI, M., LAURENT, K., PROT, M., i sar. 2006. Inhibition of p38MAPK increases adipogenesis from embryonic to adult stages. *Diabetes*, 55, 281-9.
- ARRIOLA, E. L., RODRIGUEZ-LOPEZ, A. M., HICKMAN, J. A., i sar. 1999. Bcl-2 overexpression results in reciprocal downregulation of Bcl-X(L) and sensitizes human testicular germ cell tumours to chemotherapy-induced apoptosis. *Oncogene*, 18, 1457-64.
- ASGHARZADEH, M. R., BARAR, J., POURSEIF, M. M., i sar. 2017. Molecular machineries of pH dysregulation in tumor microenvironment: potential targets for cancer therapy. *Bioimpacts*, 7, 115-133.
- ASHBURN, T. T. i THOR, K. B. 2004. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 673-83.
- ASHKENAZI, A. i DIXIT, V. M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-8.
- ASNAGHI, L., BRUNO, P., PRIULLA, M., i sar. 2004. mTOR: a protein kinase switching between life and death. *Pharmacol Res*, 50, 545-9.
- ASRANI, K., MURALI, S., LAM, B., i sar. 2019. mTORC1 feedback to AKT modulates lysosomal biogenesis through MiT/TFE regulation. *J Clin Invest*, 129, 5584-5599.
- B'CHIR, W., MAURIN, A. C., CARRARO, V., i sar. 2013. The eIF2alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res*, 41, 7683-99.
- BACHELOR, M. A. i BOWDEN, G. T. 2004. Ultraviolet A-induced modulation of Bcl-XL by p38 MAPK in human keratinocytes: post-transcriptional regulation through the 3'-untranslated region. *J Biol Chem*, 279, 42658-68.
- BAEK, E., KIM, C. L., KIM, M. G., i sar. 2016. Chemical inhibition of autophagy: Examining its potential to increase the specific productivity of recombinant CHO cell lines. *Biotechnol Bioeng*, 113, 1953-61.
- BAO, Q. i SHI, Y. 2007. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ*, 14, 56-65.
- BELL, A. M., GUTIERREZ-MECINAS, M., POLGAR, E., i sar. 2016. Spinal neurons that contain gastrin-releasing peptide seldom express Fos or phosphorylate extracellular signal-regulated kinases in response to intradermal chloroquine. *Mol Pain*, 12.

- BJORKOY, G., LAMARK, T., BRECH, A., i sar. 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 171, 603-14.
- BJORKOY, G., LAMARK, T., PANKIV, S., i sar. 2009. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*, 452, 181-97.
- BORTNER, C. D., OLDENBURG, N. B. i CIDLOWSKI, J. A. 1995. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol*, 5, 21-6.
- BOSNJAK, M., RISTIC, B., ARSIKIN, K., i sar. 2014. Inhibition of mTOR-dependent autophagy sensitizes leukemic cells to cytarabine-induced apoptotic death. *PLoS One*, 9, e94374.
- BOULARES, A. H., YAKOVLEV, A. G., IVANOVA, V., i sar. 1999. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem*, 274, 22932-40.
- BOWMAN, E. J., SIEBERS, A. i ALTENDORF, K. 1988. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 7972-6.
- BOYA, P., GONZALEZ-POLO, R. A., PONCET, D., i sar. 2003. Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene*, 22, 3927-36.
- BOYA, P. i KROEMER, G. 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*, 27, 6434-51.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRAICU, C., BUSE, M., BUSUIOC, C., i sar. 2019. A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers (Basel)*, 11.
- BRYANT, K. L., STALNECKER, C. A., ZEITOUNI, D., i sar. 2019. Combination of ERK and autophagy inhibition as a treatment approach for pancreatic cancer. *Nat Med*, 25, 628-640.
- CAI, Y., ARIKKATH, J., YANG, L., i sar. 2016. Interplay of endoplasmic reticulum stress and autophagy in neurodegenerative disorders. *Autophagy*, 12, 225-44.
- CAMPBELL, K. J. i TAIT, S. W. G. 2018. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol*, 8.
- CAO, L., WANG, J., MA, D., i sar. 2016. Heme oxygenase-1 contributes to imatinib resistance by promoting autophagy in chronic myeloid leukemia through disrupting the mTOR signaling pathway. *Biomed Pharmacother*, 78, 30-38.
- CAO, Y., CHEN, M., TANG, D., i sar. 2018. The proton pump inhibitor pantoprazole disrupts protein degradation systems and sensitizes cancer cells to death under various stresses. *Cell Death Dis*, 9, 604.
- CARGNELLO, M. i ROUX, P. P. 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75, 50-83.
- CHAACHOUAY, H., OHNESEIT, P., TOULANY, M., i sar. 2011. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. *Radiother Oncol*, 99, 287-92.
- CHAITANYA, G. V., STEVEN, A. J. i BABU, P. P. 2010. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal*, 8, 31.
- CHANG, H. i ZOU, Z. 2020. Targeting autophagy to overcome drug resistance: further developments. *J Hematol Oncol*, 13, 159.
- CHAUBE, B. i BHAT, M. K. 2016. AMPK, a key regulator of metabolic/energy homeostasis and mitochondrial biogenesis in cancer cells. *Cell Death Dis*, 7, e2044.
- CHEN, B., LONGTINE, M. S. i NELSON, D. M. 2012. Hypoxia induces autophagy in primary human trophoblasts. *Endocrinology*, 153, 4946-54.

- CHEN, D., WU, X., ZHENG, J., i sar. 2018a. Autophagy regulates proliferation and biliary differentiation of hepatic oval cells via the MAPK/ERK signaling pathway. *Mol Med Rep*, 17, 2565-2571.
- CHEN, J. L., DAVID, J., COOK-SPAETH, D., i sar. 2017. Autophagy Induction Results in Enhanced Anoikis Resistance in Models of Peritoneal Disease. *Mol Cancer Res*, 15, 26-34.
- CHEN, L., CHEN, Q., DENG, G., i sar. 2016. AMPK activation by GSK621 inhibits human melanoma cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 480, 515-521.
- CHEN, M., LU, J., WEI, W., i sar. 2018b. Effects of proton pump inhibitors on reversing multidrug resistance via downregulating V-ATPases/PI3K/Akt/mTOR/HIF-1alpha signaling pathway through TSC1/2 complex and Rheb in human gastric adenocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Onco Targets Ther*, 11, 6705-6722.
- CHEN, T. H., CHANG, P. C., CHANG, M. C., i sar. 2005. Chloroquine induces the expression of inducible nitric oxide synthase in C6 glioma cells. *Pharmacol Res*, 51, 329-36.
- CHEN, Z. H., KIM, H. P., SCIURBA, F. C., i sar. 2008. Egr-1 regulates autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*, 3, e3316.
- CHEN, Z. H., LAM, H. C., JIN, Y., i sar. 2010. Autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain-3B (LC3B) activates extrinsic apoptosis during cigarette smoke-induced emphysema. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 18880-5.
- CHENG, C. H., YANG, F. F., LING, R. Z., i sar. 2015. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Aquat Toxicol*, 164, 61-71.
- CHENG, Z. 2019. The FoxO-Autophagy Axis in Health and Disease. *Trends Endocrinol Metab*, 30, 658-671.
- CHICHEPORTICHE, Y., BOURDON, P. R., XU, H., i sar. 1997. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem*, 272, 32401-10.
- CHOI, C. H., JUNG, Y. K. i OH, S. H. 2010. Autophagy induction by capsaicin in malignant human breast cells is modulated by p38 and extracellular signal-regulated mitogen-activated protein kinases and retards cell death by suppressing endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Mol Pharmacol*, 78, 114-25.
- CHOU, T. C. i TALALAY, P. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*, 22, 27-55.
- CHUECA, E., APOSTOLOVA, N., ESPLUGUES, J. V., i sar. 2016. Proton Pump Inhibitors Display Antitumor Effects in Barrett's Adenocarcinoma Cells. *Front Pharmacol*, 7, 452.
- COHEN, G. M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 326 ( Pt 1), 1-16.
- COLOSETTI, P., PUISSANT, A., ROBERT, G., i sar. 2009. Autophagy is an important event for megakaryocytic differentiation of the chronic myelogenous leukemia K562 cell line. *Autophagy*, 5, 1092-8.
- COMES, F., MATRONE, A., LASTELLA, P., i sar. 2007. A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death Differ*, 14, 693-702.
- COOK, K. L., WARRI, A., SOTO-PANTOJA, D. R., i sar. 2014. Hydroxychloroquine inhibits autophagy to potentiate antiestrogen responsiveness in ER+ breast cancer. *Clin Cancer Res*, 20, 3222-32.
- CORAZZARI, M., RAPINO, F., CICCOSANTI, F., i sar. 2015. Oncogenic BRAF induces chronic ER stress condition resulting in increased basal autophagy and apoptotic resistance of cutaneous melanoma. *Cell Death Differ*, 22, 946-58.
- CUBERO, F. J., ZHAO, G. i TRAUTWEIN, C. 2011. JNK: a double-edged sword in tumorigenesis. *Hepatology*, 54, 1470-2.
- CUI, L., SONG, Z., LIANG, B., i sar. 2016. Radiation induces autophagic cell death via the p53/DRAM signaling pathway in breast cancer cells. *Oncol Rep*, 35, 3639-47.

- DARLING, N. J. i COOK, S. J. 2014. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 2150-63.
- DE CHIARA, G., MARCOCCI, M. E., TORCIA, M., i sar. 2006. Bcl-2 Phosphorylation by p38 MAPK: identification of target sites and biologic consequences. *J Biol Chem*, 281, 21353-21361.
- DE DUVE, C. 1963. The lysosome. *Sci Am*, 208, 64-72.
- DE DUVE, C. i WATTIAUX, R. 1966. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol*, 28, 435-92.
- DE MILITO, A., CANESE, R., MARINO, M. L., i sar. 2010. pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. *Int J Cancer*, 127, 207-19.
- DE MILITO, A. i FAIS, S. 2005. Proton pump inhibitors may reduce tumour resistance. *Expert Opin Pharmacother*, 6, 1049-54.
- DE MILITO, A., IESSI, E., LOGOZZI, M., i sar. 2007. Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cell tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species. *Cancer Res*, 67, 5408-17.
- DEGENHARDT, K., MATHEW, R., BEAUDOIN, B., i sar. 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 10, 51-64.
- DEGTYAREV, M., DE MAZIERE, A., ORR, C., i sar. 2008. Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents. *J Cell Biol*, 183, 101-16.
- DENAMUR, S., TYTECA, D., MARCHAND-BRYNAERT, J., i sar. 2011. Role of oxidative stress in lysosomal membrane permeabilization and apoptosis induced by gentamicin, an aminoglycoside antibiotic. *Free Radic Biol Med*, 51, 1656-65.
- DEWEY, W. C., LING, C. C. i MEYN, R. E. 1995. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 33, 781-96.
- DOS REIS NETO, E. T., KAKEHASI, A. M., DE MEDEIROS PINHEIRO, M., i sar. 2020. Revisiting hydroxychloroquine and chloroquine for patients with chronic immunity-mediated inflammatory rheumatic diseases. *Adv Rheumatol*, 60, 32.
- DU, C., FANG, M., LI, Y., i sar. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102, 33-42.
- DUAN, W. J., LI, Q. S., XIA, M. Y., i sar. 2011. Silibinin activated p53 and induced autophagic death in human fibrosarcoma HT1080 cells via reactive oxygen species-p38 and c-Jun N-terminal kinase pathways. *Biol Pharm Bull*, 34, 47-53.
- EGUCHI, Y., SHIMIZU, S. i TSUJIMOTO, Y. 1997. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res*, 57, 1835-40.
- EISENBERG-LERNER, A., BIALIK, S., SIMON, H. U., i sar. 2009. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*, 16, 966-75.
- ELGENDY, M., SHERIDAN, C., BRUMATTI, G., i sar. 2011. Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol Cell*, 42, 23-35.
- ELKHOLI, R., RENAULT, T. T., SERASINGHE, M. N., i sar. 2014. Putting the pieces together: How is the mitochondrial pathway of apoptosis regulated in cancer and chemotherapy? *Cancer Metab*, 2, 16.
- ELLINGTON, A. A., BERHOW, M. A. i SINGLETARY, K. W. 2006. Inhibition of Akt signaling and enhanced ERK1/2 activity are involved in induction of macroautophagy by triterpenoid B-group soyasaponins in colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 27, 298-306.
- ENZENMULLER, S., GONZALEZ, P., DEBATIN, K. M., i sar. 2013. Chloroquine overcomes resistance of lung carcinoma cells to the dual PI3K/mTOR inhibitor PI103 by lysosome-mediated apoptosis. *Anticancer Drugs*, 24, 14-9.
- ERLICH, S., MIZRACHY, L., SEGEV, O., i sar. 2007. Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. *Autophagy*, 3, 561-8.



- ESTRADA, Y., DONG, J. i OSSOWSKI, L. 2009. Positive crosstalk between ERK and p38 in melanoma stimulates migration and in vivo proliferation. *Pigment Cell Melanoma Res*, 22, 66-76.
- FANG, J., RHYASEN, G., BOLANOS, L., i sar. 2012. Cytotoxic effects of bortezomib in myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia depend on autophagy-mediated lysosomal degradation of TRAF6 and repression of PSMA1. *Blood*, 120, 858-67.
- FANOURIAKIS, A., BERTSIAS, G. K. i BOUMPAS, D. T. 2020. Chloroquine as alternative antimalarial in systemic lupus erythematosus. Response to '2019 update of the EULAR recommendations for the management of SLE: don't forget chloroquine' by Figueroa-Parra et al. *Ann Rheum Dis*, 79, e115.
- FASANO, C., DISCIGLIO, V., BERTORA, S., i sar. 2019. FOXO3a from the Nucleus to the Mitochondria: A Round Trip in Cellular Stress Response. *Cells*, 8.
- FENG, S., QIU, G., YANG, L., i sar. 2021. Omeprazole improves chemosensitivity of gastric cancer cells by m6A demethylase FTO-mediated activation of mTORC1 and DDIT3 up-regulation. *Biosci Rep*, 41.
- FENG, S., ZHENG, Z., FENG, L., i sar. 2016. Proton pump inhibitor pantoprazole inhibits the proliferation, selfrenewal and chemoresistance of gastric cancer stem cells via the EMT/betacatenin pathways. *Oncol Rep*, 36, 3207-3214.
- FERRARO-PEYRET, C., QUEMENEUR, L., FLACHER, M., i sar. 2002. Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. *J Immunol*, 169, 4805-10.
- FERRER, P., ASENSI, M., PRIEGO, S., i sar. 2007. Nitric oxide mediates natural polyphenol-induced Bcl-2 down-regulation and activation of cell death in metastatic B16 melanoma. *J Biol Chem*, 282, 2880-90.
- FIEBIG, A. A., ZHU, W., HOLLERBACH, C., i sar. 2006. Bcl-XL is qualitatively different from and ten times more effective than Bcl-2 when expressed in a breast cancer cell line. *BMC Cancer*, 6, 213.
- FISCHER, U., JANICKE, R. U. i SCHULZE-OSTHOFF, K. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 10, 76-100.
- FITZWALTER, B. E., TOWERS, C. G., SULLIVAN, K. D., i sar. 2018. Autophagy Inhibition Mediates Apoptosis Sensitization in Cancer Therapy by Relieving FOXO3a Turnover. *Dev Cell*, 44, 555-565 e3.
- FOLKERTS, H., HILGENDORF, S., VELLENGA, E., i sar. 2019. The multifaceted role of autophagy in cancer and the microenvironment. *Med Res Rev*, 39, 517-560.
- FOLKERTS, H., HILGENDORF, S., WIERENGA, A. T. J., i sar. 2017. Inhibition of autophagy as a treatment strategy for p53 wild-type acute myeloid leukemia. *Cell Death Dis*, 8, e2927.
- FU, X. T., SHI, Y. H., ZHOU, J., i sar. 2018a. MicroRNA-30a suppresses autophagy-mediated anoikis resistance and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, 412, 108-117.
- FU, Z., CHENG, X., KUANG, J., i sar. 2018b. CQ sensitizes human pancreatic cancer cells to gemcitabine through the lysosomal apoptotic pathway via reactive oxygen species. *Mol Oncol*, 12, 529-544.
- FULDA, S. i DEBATIN, K. M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25, 4798-811.
- GALLAGHER, L. E., RADHI, O. A., ABDULLAH, M. O., i sar. 2017. Lysosomotropism depends on glucose: a chloroquine resistance mechanism. *Cell Death Dis*, 8, e3014.
- GALLUZZI, L., BRAVO-SAN PEDRO, J. M., LEVINE, B., i sar. 2017. Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat Rev Drug Discov*, 16, 487-511.
- GALLUZZI, L., MORSELLI, E., KEPP, O., i sar. 2010. Mitochondrial gateways to cancer. *Mol Aspects Med*, 31, 1-20.

- GANLEY, I. G., LAM DU, H., WANG, J., i sar. 2009. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*, 284, 12297-305.
- GAO, G., YU, Z., YAN, J., i sar. 2015. Poly (ADPribose) polymerase and cytochrome c mediated apoptosis induces hepatocyte injury in a rat model of hyperammonia-induced hepatic failure. *Mol Med Rep*, 11, 4211-9.
- GAO, X., HAN, L., DING, N., i sar. 2018. Bafilomycin C1 induces G0/G1 cell-cycle arrest and mitochondrial-mediated apoptosis in human hepatocellular cancer SMMC7721 cells. *J Antibiot (Tokyo)*, 71, 808-817.
- GARRISON, S. P., PHILLIPS, D. C., JEFFERS, J. R., i sar. 2012. Genetically defining the mechanism of Puma- and Bim-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 19, 642-9.
- GE, J., LIU, Y., LI, Q., i sar. 2013. Resveratrol induces apoptosis and autophagy in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by inhibiting Akt/mTOR and activating p38-MAPK. *Biomed Environ Sci*, 26, 902-11.
- GEEVIMAN, K., BABU, D. i PRAKASH BABU, P. 2018. Pantoprazole Induces Mitochondrial Apoptosis and Attenuates NF-kappaB Signaling in Glioma Cells. *Cell Mol Neurobiol*, 38, 1491-1504.
- GEWIRTZ, D. A. 2014. The four faces of autophagy: implications for cancer therapy. *Cancer Res*, 74, 647-51.
- GONG, C., BAUVY, C., TONELLI, G., i sar. 2013. Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene*, 32, 2261-72, 2272e 1-11.
- GRANT, S., QIAO, L. i DENT, P. 2002. Roles of ERBB family receptor tyrosine kinases, and downstream signaling pathways, in the control of cell growth and survival. *Front Biosci*, 7, d376-89.
- GREEN, D. R. i KROEMER, G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305, 626-9.
- GREEN, D. R. i REED, J. C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-12.
- GU, X., CAI, Z., CAI, M., i sar. 2018. AMPK/SIRT1/p38 MAPK signaling pathway regulates alcohol-induced neurodegeneration by resveratrol. *Mol Med Rep*, 17, 5402-5408.
- GUMP, J. M. i THORBURN, A. 2011. Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends Cell Biol*, 21, 387-92.
- GUO, J. Y. i WHITE, E. 2016. Autophagy, Metabolism, and Cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 81, 73-78.
- GUO, K., SEARFOSS, G., KROLIKOWSKI, D., i sar. 2001. Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell Death Differ*, 8, 367-76.
- GUO, S. i SONENSHEIN, G. E. 2004. Forkhead box transcription factor FOXO3a regulates estrogen receptor alpha expression and is repressed by the Her-2/neu/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Mol Cell Biol*, 24, 8681-90.
- HACKER, G. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*, 301, 5-17.
- HAMMOUDA, M. B., FORD, A. E., LIU, Y., i sar. 2020. The JNK Signaling Pathway in Inflammatory Skin Disorders and Cancer. *Cells*, 9.
- HAN, Y. M., HAHM, K. B., PARK, J. M., i sar. 2014. Paradoxically augmented anti-tumorigenic action of proton pump inhibitor and Gastrin/APCMin/+ intestinal polyposis model. *Neoplasia*, 16, 73-83.
- HANADA, T., NODA, N. N., SATOMI, Y., i sar. 2007. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem*, 282, 37298-302.
- HARDING, H. P., ZHANG, Y., ZENG, H., i sar. 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*, 11, 619-33.
- HARHAJI-TRAJKOVIC, L., ARSIKIN, K., KRAVIC-STEVOVIC, T., i sar. 2012. Chloroquine-mediated lysosomal dysfunction enhances the anticancer effect of nutrient deprivation. *Pharm Res*, 29, 2249-63.

- HARHAJI-TRAJKOVIC, L., VILIMANOVICH, U., KRAVIC-STEVOVIC, T., i sar. 2009. AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. *J Cell Mol Med*, 13, 3644-54.
- HE, C. i KLIONSKY, D. J. 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, 43, 67-93.
- HE, C. i LEVINE, B. 2010. The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol*, 22, 140-9.
- HE, Y., SHE, H., ZHANG, T., i sar. 2018. p38 MAPK inhibits autophagy and promotes microglial inflammatory responses by phosphorylating ULK1. *J Cell Biol*, 217, 315-328.
- HEAKAL, Y., PATEL, D., CAO, P., i sar. 2020. Discovery of Autophagy-Inducing Chloroquine Analogs with Potent Anticancer Activity in Breast Cancer Cells. *Medicinal Chemistry*, 10.
- HEINLE, S., STUNKEL, K., ZAHNER, H., i sar. 1988. Immunosuppressive effects of the macrolide antibiotic bafilomycin towards lymphocytes and lymphoid cell lines. *Arzneimittelforschung*, 38, 1130-3.
- HENSENS, O. D., MONAGHAN, R. L., HUANG, L., i sar. 1983. Structure of the sodium and potassium ion activated adenosine triphosphatase inhibitor L-681,110. *Journal of the American Chemical Society*, 105, 3672-3679.
- HENSON, S. M., LANNA, A., RIDDELL, N. E., i sar. 2014. p38 signaling inhibits mTORC1-independent autophagy in senescent human CD8(+) T cells. *J Clin Invest*, 124, 4004-16.
- HERCEG, Z. i WANG, Z. Q. 1999. Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 19, 5124-33.
- HERON-MILHAVET, L. i LEROITH, D. 2002. Insulin-like growth factor I induces MDM2-dependent degradation of p53 via the p38 MAPK pathway in response to DNA damage. *J Biol Chem*, 277, 15600-6.
- HETTIARACHCHI, K. D., ZIMMET, P. Z. i MYERS, M. A. 2006. The plecomacrolide vacuolar-ATPase inhibitor bafilomycin, alters insulin signaling in MIN6 beta-cells. *Cell Biol Toxicol*, 22, 169-81.
- HILDEMAN, D. A., MITCHELL, T., ARONOW, B., i sar. 2003. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15035-40.
- HILLARY, R. F. i FITZGERALD, U. 2018. A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis. *J Biomed Sci*, 25, 48.
- HOFFMANN, P. R., DECATHELINEAU, A. M., OGDEN, C. A., i sar. 2001. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol*, 155, 649-59.
- HOMEWOOD, C. A., WARHURST, D. C., PETERS, W., i sar. 1972. Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine. *Nature*, 235, 50-2.
- HONG, S. K., KIM, J. H., STARENKI, D., i sar. 2013. Autophagy sensitivity of neuroendocrine lung tumor cells. *Int J Oncol*, 43, 2031-8.
- HSU, S. P. C., KUO, J. S., CHIANG, H. C., i sar. 2018. Temozolomide, sirolimus and chloroquine is a new therapeutic combination that synergizes to disrupt lysosomal function and cholesterol homeostasis in GBM cells. *Oncotarget*, 9, 6883-6896.
- HSU, Y. C., MENG, X., OU, L., i sar. 2010. Activation of the AMP-activated protein kinase-p38 MAP kinase pathway mediates apoptosis induced by conjugated linoleic acid in p53-mutant mouse mammary tumor cells. *Cell Signal*, 22, 590-9.
- HU, Y. R., MA, H., ZOU, Z. Y., i sar. 2017. Activation of Akt and JNK/Nrf2/NQO1 pathway contributes to the protective effect of coptisine against AAPH-induced oxidative stress. *Biomed Pharmacother*, 85, 313-322.
- HUANG, L., ALBERS-SCHONBERG, G., MONAGHAN, R. L., i sar. 1984. Discovery, production and purification of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> activated ATPase inhibitor, L-681,110 from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. MA-5038. *J Antibiot (Tokyo)*, 37, 970-5.

- HUANG, S., OKAMOTO, K., YU, C., i sar. 2013. p62/sequestosome-1 up-regulation promotes ABT-263-induced caspase-8 aggregation/activation on the autophagosome. *J Biol Chem*, 288, 33654-33666.
- HUANG, X., QI, Q., HUA, X., i sar. 2014. Beclin 1, an autophagy-related gene, augments apoptosis in U87 glioblastoma cells. *Oncol Rep*, 31, 1761-7.
- IHRAIZ, W. G., AHRAM, M. i BARDAWEEL, S. K. 2020. Proton pump inhibitors enhance chemosensitivity, promote apoptosis, and suppress migration of breast cancer cells. *Acta Pharm*, 70, 179-190.
- IKEMURA, K., HIRAMATSU, S. i OKUDA, M. 2017. Drug Repositioning of Proton Pump Inhibitors for Enhanced Efficacy and Safety of Cancer Chemotherapy. *Front Pharmacol*, 8, 911.
- IOMMARINI, L., GHELLI, A., GASPARRE, G., i sar. 2017. Mitochondrial metabolism and energy sensing in tumor progression. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1858, 582-590.
- ISAKOVIC, A. M., DULOVIC, M., MARKOVIC, I., i sar. 2017. Autophagy suppression sensitizes glioma cells to IMP dehydrogenase inhibition-induced apoptotic death. *Exp Cell Res*, 350, 32-40.
- ISLAM, M. A., SOORO, M. A. i ZHANG, P. 2018. Autophagic Regulation of p62 is Critical for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*, 19.
- ITAKURA, E., KISHI-ITAKURA, C. i MIZUSHIMA, N. 2012. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, 151, 1256-69.
- JANG, J. E., EOM, J. I., JEUNG, H. K., i sar. 2017. AMPK-ULK1-Mediated Autophagy Confers Resistance to BET Inhibitor JQ1 in Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Clin Cancer Res*, 23, 2781-2794.
- JEON, S. M. 2016. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med*, 48, e245.
- JESSOP, F., HAMILTON, R. F., JR., RHODERICK, J. F., i sar. 2017. Phagolysosome acidification is required for silica and engineered nanoparticle-induced lysosome membrane permeabilization and resultant NLRP3 inflammasome activity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 318, 58-68.
- JI, C., ZHANG, Z., CHEN, L., i sar. 2016. Endoplasmic reticulum stress-induced autophagy determines the susceptibility of melanoma cells to dabrafenib. *Drug Des Devel Ther*, 10, 2491-8.
- JIA, B., XUE, Y., YAN, X., i sar. 2018. Autophagy inhibitor chloroquine induces apoptosis of cholangiocarcinoma cells via endoplasmic reticulum stress. *Oncol Lett*, 16, 3509-3516.
- JIANG, L., XU, L., XIE, J., i sar. 2015. Inhibition of autophagy overcomes glucocorticoid resistance in lymphoid malignant cells. *Cancer Biol Ther*, 16, 466-76.
- JIANG, Q., LI, F., SHI, K., i sar. 2013. ATF4 activation by the p38MAPK-eIF4E axis mediates apoptosis and autophagy induced by selenite in Jurkat cells. *FEBS Lett*, 587, 2420-9.
- JIANG, X. i WANG, X. 2000. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem*, 275, 31199-203.
- JIM SMITH, L. H.-S. 2011. *Food Additives Data Book, 2nd Edition*.
- JIN, H. O., HONG, S. E., PARK, J. A., i sar. 2016. Inhibition of JNK-mediated autophagy enhances NSCLC cell sensitivity to mTORC1/2 inhibitors. *Sci Rep*, 6, 28945.
- JING, Y., LIU, W., CAO, H., i sar. 2015. Hepatic p38alpha regulates gluconeogenesis by suppressing AMPK. *J Hepatol*, 62, 1319-27.
- KABEYA, Y., MIZUSHIMA, N., UENO, T., i sar. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 19, 5720-8.
- KALE, J., OSTERLUND, E. J. i ANDREWS, D. W. 2018. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ*, 25, 65-80.
- KALUDJEROVIC, G. N., MILJKOVIC, D., MOMCILOVIC, M., i sar. 2005. Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *Int J Cancer*, 116, 479-86.

- KAUFMANN, S. H., DESNOYERS, S., OTTAVIANO, Y., i sar. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, 53, 3976-85.
- KAUSHIK, S. i CUERVO, A. M. 2018. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19, 365-381.
- KAWAI, A., UCHIYAMA, H., TAKANO, S., i sar. 2007. Autophagosome-lysosome fusion depends on the pH in acidic compartments in CHO cells. *Autophagy*, 3, 154-7.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. i CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- KFOURY, A., ARMARO, M., COLLODET, C., i sar. 2018. AMPK promotes survival of c-Myc-positive melanoma cells by suppressing oxidative stress. *EMBO J*, 37.
- KIM, D. E., KIM, Y., CHO, D. H., i sar. 2015a. Raloxifene induces autophagy-dependent cell death in breast cancer cells via the activation of AMP-activated protein kinase. *Mol Cells*, 38, 138-44.
- KIM, E. L., WUSTENBERG, R., RUBSAM, A., i sar. 2010. Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. *Neuro Oncol*, 12, 389-400.
- KIM, J., KUNDU, M., VIOLLET, B., i sar. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13, 132-41.
- KIM, K. Y., PARK, K. I., KIM, S. H., i sar. 2017. Inhibition of Autophagy Promotes Salinomycin-Induced Apoptosis via Reactive Oxygen Species-Mediated PI3K/AKT/mTOR and ERK/p38 MAPK-Dependent Signaling in Human Prostate Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 18.
- KIM, S. H. i KIM, H. 2019. Astaxanthin Modulation of Signaling Pathways That Regulate Autophagy. *Mar Drugs*, 17.
- KIM, Y. M., JUNG, C. H., SEO, M., i sar. 2015b. mTORC1 phosphorylates UVRAG to negatively regulate autophagosome and endosome maturation. *Mol Cell*, 57, 207-18.
- KIMMELMAN, A. C. 2011. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev*, 25, 1999-2010.
- KINOSHITA, K., WARITANI, T., NOTO, M., i sar. 1996. Bafilomycin A1 induces apoptosis in PC12 cells independently of intracellular pH. *FEBS Lett*, 398, 61-6.
- KINSEY, C. G., CAMOLOTTO, S. A., BOESPFLUG, A. M., i sar. 2019. Protective autophagy elicited by RAF-->MEK-->ERK inhibition suggests a treatment strategy for RAS-driven cancers. *Nat Med*, 25, 620-627.
- KLEJMAN, A., WEGRZYNOWICZ, M., SZATMARI, E. M., i sar. 2005. Mechanisms of ammonia-induced cell death in rat cortical neurons: roles of NMDA receptors and glutathione. *Neurochem Int*, 47, 51-7.
- KLIONSKY, D. J. 2008. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy*, 4, 740-3.
- KLIONSKY, D. J., ABDALLA, F. C., ABELIOVICH, H., i sar. 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 8, 445-544.
- KLIONSKY, D. J., ABDEL-AZIZ, A. K., ABDELFATAH, S., i sar. 2021. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy*, 1-382.
- KLIONSKY, D. J. i SCHULMAN, B. A. 2014. Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 21, 336-45.
- KOSHIO, O., TANSHO, S., UBAGAI, T., i sar. 2010. Suppression of phosphorylation of extracellular-signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in polymorphonuclear leukocytes by the proton pump inhibitor lansoprazole. *J Infect Chemother*, 16, 100-6.
- KOUROKU, Y., FUJITA, E., TANIDA, I., i sar. 2007. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ*, 14, 230-9.

- KRMPOT, A. J., JANJETOVIC, K. D., MISIRKIC, M. S., i sar. 2010. Protective effect of autophagy in laser-induced glioma cell death in vitro. *Lasers Surg Med*, 42, 338-47.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L. i BRENNER, C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 87, 99-163.
- KROEMER, G., MARINO, G. i LEVINE, B. 2010. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 40, 280-93.
- KROEMER, G. i REED, J. C. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, 6, 513-9.
- KUMARI, S., BADANA, A. K., G, M. M., i sar. 2018. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomark Insights*, 13, 1177271918755391.
- LADDHA, S. V., GANESAN, S., CHAN, C. S., i sar. 2014. Mutational landscape of the essential autophagy gene BECN1 in human cancers. *Mol Cancer Res*, 12, 485-90.
- LAKHTER, A. J., SAHU, R. P., SUN, Y., i sar. 2013. Chloroquine promotes apoptosis in melanoma cells by inhibiting BH3 domain-mediated PUMA degradation. *J Invest Dermatol*, 133, 2247-54.
- LANNA, A., HENSON, S. M., ESCORS, D., i sar. 2014. The kinase p38 activated by the metabolic regulator AMPK and scaffold TAB1 drives the senescence of human T cells. *Nat Immunol*, 15, 965-72.
- LAPLANTE, M. i SABATINI, D. M. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149, 274-93.
- LEE, C. S., LEE, L. C., YUAN, T. L., i sar. 2019. MAP kinase and autophagy pathways cooperate to maintain RAS mutant cancer cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 4508-4517.
- LEVINE, B. i KROEMER, G. 2019. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell*, 176, 11-42.
- LEVY, J. M., THOMPSON, J. C., GRIESINGER, A. M., i sar. 2014. Autophagy inhibition improves chemosensitivity in BRAF(V600E) brain tumors. *Cancer Discov*, 4, 773-80.
- LI, H. i CHEN, C. 2017. Inhibition of autophagy enhances synergistic effects of Salidroside and anti-tumor agents against colorectal cancer. *BMC Complement Altern Med*, 17, 538.
- LI, J., MILLER, E. J., NINOMIYA-TSUJI, J., i sar. 2005. AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart. *Circ Res*, 97, 872-9.
- LI, J. i YUAN, J. 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27, 6194-206.
- LI, J. P., YANG, Y. X., LIU, Q. L., i sar. 2015. The investigational Aurora kinase A inhibitor alisertib (MLN8237) induces cell cycle G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via p38 MAPK and Akt/mTOR signaling pathways in human breast cancer cells. *Drug Des Devel Ther*, 9, 1627-52.
- LI, L. Y., LUO, X. i WANG, X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412, 95-9.
- LI, M., KHAMBU, B., ZHANG, H., i sar. 2013. Suppression of lysosome function induces autophagy via a feedback down-regulation of MTOR complex 1 (MTORC1) activity. *J Biol Chem*, 288, 35769-80.
- LI, W. W., LI, J. i BAO, J. K. 2012a. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*, 69, 1125-36.
- LI, X., LIN, G., WU, B., i sar. 2007. Overexpression of PTEN induces cell growth arrest and apoptosis in human breast cancer ZR-75-1 cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 39, 745-50.
- LI, Z., ZHANG, H., CHEN, Y., i sar. 2012b. Forkhead transcription factor FOXO3a protein activates nuclear factor kappaB through B-cell lymphoma/leukemia 10 (BCL10) protein and promotes tumor cell survival in serum deprivation. *J Biol Chem*, 287, 17737-17745.
- LIANG, C., FENG, P., KU, B., i sar. 2006. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol*, 8, 688-99.

- LIANG, C., LEE, J. S., INN, K. S., i sar. 2008. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol*, 10, 776-87.
- LIANG, X. H., JACKSON, S., SEAMAN, M., i sar. 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402, 672-6.
- LIBERTI, M. V. i LOCASALE, J. W. 2016. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*, 41, 211-218.
- LIM, J. H., PARK, J. W., KIM, M. S., i sar. 2006. Bafilomycin induces the p21-mediated growth inhibition of cancer cells under hypoxic conditions by expressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol Pharmacol*, 70, 1856-65.
- LIN, C. L., LEE, C. H., CHEN, C. M., i sar. 2018. Protodioscin Induces Apoptosis Through ROS-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress via the JNK/p38 Activation Pathways in Human Cervical Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem*, 46, 322-334.
- LIN, Y., JIANG, M., CHEN, W., i sar. 2019. Cancer and ER stress: Mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response. *Biomed Pharmacother*, 118, 109249.
- LIN, Y. C., LIN, J. F., WEN, S. I., i sar. 2017. Chloroquine and hydroxychloroquine inhibit bladder cancer cell growth by targeting basal autophagy and enhancing apoptosis. *Kaohsiung J Med Sci*, 33, 215-223.
- LIU, B., CHENG, Y., ZHANG, B., i sar. 2009. Polygonatum cyrtoneura lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS-p38-p53 pathway. *Cancer Lett*, 275, 54-60.
- LIU, G., SU, L., HAO, X., i sar. 2012. Salermide up-regulates death receptor 5 expression through the ATF4-ATF3-CHOP axis and leads to apoptosis in human cancer cells. *J Cell Mol Med*, 16, 1618-28.
- LIU, G., ZOU, H., LUO, T., i sar. 2016a. Caspase-Dependent and Caspase-Independent Pathways Are Involved in Cadmium-Induced Apoptosis in Primary Rat Proximal Tubular Cell Culture. *PLoS One*, 11, e0166823.
- LIU, H., HE, Z. i SIMON, H. U. 2014. Autophagy suppresses melanoma tumorigenesis by inducing senescence. *Autophagy*, 10, 372-3.
- LIU, J. i LIN, A. 2005. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res*, 15, 36-42.
- LIU, M., TANG, R. i JIANG, Y. 2017. Pantoprazole Induces Apoptosis of Leukemic Cells by Inhibiting Expression of P-Glycoprotein/Multidrug Resistance-Associated Protein-1 Through PI3K/AKT/mTOR Signaling. *Indian J Hematol Blood Transfus*, 33, 500-508.
- LIU, T., ZHANG, J., LI, K., i sar. 2020. Combination of an Autophagy Inducer and an Autophagy Inhibitor: A Smarter Strategy Emerging in Cancer Therapy. *Front Pharmacol*, 11, 408.
- LIU, W., SONG, X. L., ZHAO, S. C., i sar. 2018. Antitumor Activity and Mechanism of a Reverse Transcriptase Inhibitor, Dapivirine, in Glioblastoma. *J Cancer*, 9, 117-128.
- LIU, W. J., YE, L., HUANG, W. F., i sar. 2016b. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett*, 21, 29.
- LIU, Z., LU, H., SHI, H., i sar. 2005. PUMA overexpression induces reactive oxygen species generation and proteasome-mediated stathmin degradation in colorectal cancer cells. *Cancer Res*, 65, 1647-54.
- LOCKSLEY, R. M., KILLEEN, N. i LENARDO, M. J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104, 487-501.
- LOOS, B., DU TOIT, A. i HOFMEYER, J. H. 2014. Defining and measuring autophagosome flux-concept and reality. *Autophagy*, 10, 2087-96.
- LOOS, B., KLIONSKY, D. J., DU TOIT, A., i sar. 2020. On the relevance of precision autophagy flux control in vivo - Points of departure for clinical translation. *Autophagy*, 16, 750-762.
- LU, Z. i XU, S. 2006. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life*, 58, 621-31.

- LU, Z. N., SHI, Z. Y., DANG, Y. F., i sar. 2019. Pantoprazole pretreatment elevates sensitivity to vincristine in drug-resistant oral epidermoid carcinoma in vitro and in vivo. *Biomed Pharmacother*, 120, 109478.
- LUCIANI, F., SPADA, M., DE MILITO, A., i sar. 2004. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *J Natl Cancer Inst*, 96, 1702-13.
- LUO, S., GARCIA-ARENCEBIA, M., ZHAO, R., i sar. 2012. Bim inhibits autophagy by recruiting Beclin 1 to microtubules. *Mol Cell*, 47, 359-70.
- LUO, S. i RUBINSZTEIN, D. C. 2010. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. *Cell Death Differ*, 17, 268-77.
- LV, L., LI, D., ZHAO, D., i sar. 2011. Acetylation targets the M2 isoform of pyruvate kinase for degradation through chaperone-mediated autophagy and promotes tumor growth. *Mol Cell*, 42, 719-30.
- LY, J. D., GRUBB, D. R. i LAWEN, A. 2003. The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi(m)$ ) in apoptosis; an update. *Apoptosis*, 8, 115-28.
- MA, L., XU, Y., WEI, Z., i sar. 2017. Deoxyarbutin displays antitumour activity against melanoma in vitro and in vivo through a p38-mediated mitochondria associated apoptotic pathway. *Sci Rep*, 7, 7197.
- MA, X. H., PIAO, S. F., DEY, S., i sar. 2014. Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *J Clin Invest*, 124, 1406-17.
- MACLEAN, K. H., DORSEY, F. C., CLEVELAND, J. L., i sar. 2008. Targeting lysosomal degradation induces p53-dependent cell death and prevents cancer in mouse models of lymphomagenesis. *J Clin Invest*, 118, 79-88.
- MAES, H., KUCHNIO, A., CARMELIET, P., i sar. 2016. Chloroquine anticancer activity is mediated by autophagy-independent effects on the tumor vasculature. *Mol Cell Oncol*, 3, e970097.
- MAES, H., KUCHNIO, A., PERIC, A., i sar. 2014. Tumor vessel normalization by chloroquine independent of autophagy. *Cancer Cell*, 26, 190-206.
- MAIURI, M. C., LE TOUMELIN, G., CRIOLLO, A., i sar. 2007a. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J*, 26, 2527-39.
- MAIURI, M. C., ZALCKVAR, E., KIMCHI, A., i sar. 2007b. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 741-52.
- MANDAL, D., MOITRA, P. K., SAHA, S., i sar. 2002. Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett*, 513, 184-8.
- MANIC, G., OBRIST, F., KROEMER, G., i sar. 2014. Chloroquine and hydroxychloroquine for cancer therapy. *Mol Cell Oncol*, 1, e29911.
- MARINKOVIC, M., SPRUNG, M., BULJUBASIC, M., i sar. 2018. Autophagy Modulation in Cancer: Current Knowledge on Action and Therapy. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 8023821.
- MARINO, G., SALVADOR-MONTOLIU, N., FUEYO, A., i sar. 2007. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem*, 282, 18573-83.
- MARINO, M. L., FAIS, S., DJAVAHARI-MERGNY, M., i sar. 2010. Proton pump inhibition induces autophagy as a survival mechanism following oxidative stress in human melanoma cells. *Cell Death Dis*, 1, e87.
- MARRONE, G., DE CHIARA, F., BOTTCHER, K., i sar. 2018. The adenosine monophosphate-activated protein kinase-vacuolar adenosine triphosphatase-pH axis: A key regulator of the profibrogenic phenotype of human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 68, 1140-1153.
- MARTENS, S. 2016. No ATG8s, no problem? How LC3/GABARAP proteins contribute to autophagy. *J Cell Biol*, 215, 761-763.
- MASUD ALAM, M., KARIYA, R., KAWAGUCHI, A., i sar. 2016. Inhibition of autophagy by chloroquine induces apoptosis in primary effusion lymphoma in vitro and in vivo through induction of endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis*, 21, 1191-201.



- MATHEW, J. T. i BIO, L. L. 2012. Injectable ammonium chloride used enterally for the treatment of persistent metabolic alkalosis in three pediatric patients. *J Pediatr Pharmacol Ther*, 17, 98-103.
- MATSUDA, K., SATO, A., OKADA, M., i sar. 2012. Targeting JNK for therapeutic depletion of stem-like glioblastoma cells. *Sci Rep*, 2, 516.
- MATSUMOTO, H., MIYAZAKI, S., MATSUYAMA, S., i sar. 2013. Selection of autophagy or apoptosis in cells exposed to ER-stress depends on ATF4 expression pattern with or without CHOP expression. *Biol Open*, 2, 1084-90.
- MATTIA, G., PUGLISI, R., ASCIONE, B., i sar. 2018. Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies. *Cell Death Dis*, 9, 112.
- MAUTHE, M., ORHON, I., ROCCHI, C., i sar. 2018. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 14, 1435-1455.
- MAUVEZIN, C. i NEUFELD, T. P. 2015. Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 11, 1437-8.
- MAYCOTTE, P., ARYAL, S., CUMMINGS, C. T., i sar. 2012. Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. *Autophagy*, 8, 200-12.
- MCCLUNG, J. M., JUDGE, A. R., POWERS, S. K., i sar. 2010. p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298, C542-9.
- MEHRPOUR, M., ESCLATINE, A., BEAU, I., i sar. 2010. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res*, 20, 748-62.
- MELNIKOVA, V. O., BOLSHAKOV, S. V., WALKER, C., i sar. 2004. Genomic alterations in spontaneous and carcinogen-induced murine melanoma cell lines. *Oncogene*, 23, 2347-56.
- MENA, S., BENLLOCH, M., ORTEGA, A., i sar. 2007. Bcl-2 and glutathione depletion sensitizes B16 melanoma to combination therapy and eliminates metastatic disease. *Clin Cancer Res*, 13, 2658-66.
- MIN, H., XU, M., CHEN, Z. R., i sar. 2014. Bortezomib induces protective autophagy through AMP-activated protein kinase activation in cultured pancreatic and colorectal cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 74, 167-76.
- MIZUSHIMA, N. 2005. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2, 1535-41.
- MIZUSHIMA, N., KUMA, A., KOBAYASHI, Y., i sar. 2003. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci*, 116, 1679-88.
- MIZUSHIMA, N., NODA, T., YOSHIMORI, T., i sar. 1998. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395, 395-8.
- MOECKEL, S., LAFRANCE, K., WETSCH, J., i sar. 2019. ATF4 contributes to autophagy and survival in sunitinib treated brain tumor initiating cells (BTICs). *Oncotarget*, 10, 368-382.
- MORRIS, D. H., YIP, C. K., SHI, Y., i sar. 2015. Beclin 1-Vps34 Complex Architecture: Understanding the Nuts and Bolts of Therapeutic Targets. *Front Biol (Beijing)*, 10, 398-426.
- MUKHERJEE, S., DASH, S., LOHITESH, K., i sar. 2017. The dynamic role of autophagy and MAPK signaling in determining cell fate under cisplatin stress in osteosarcoma cells. *PLoS One*, 12, e0179203.
- NAIK, P. P., MUKHOPADHYAY, S., PANDA, P. K., i sar. 2018. Autophagy regulates cisplatin-induced stemness and chemoresistance via the upregulation of CD44, ABCB1 and ADAM17 in oral squamous cell carcinoma. *Cell Prolif*, 51.

- NAKAMURA, S. i YOSHIMORI, T. 2017. New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J Cell Sci*, 130, 1209-1216.
- NAKANO, K. i VOUSDEN, K. H. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, 7, 683-94.
- NCT01069081. *Docetaxel and Cisplatin Chemotherapy With or Without High Dose Proton Pump Inhibitor in Metastatic Breast Cancer* [Online]. ClinicalTrials.gov National Library of Medicine. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01069081> [Accessed januar 2021].
- NCT01748500. *Pantoprazole and Docetaxel for Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer - a Single Arm Phase II Clinical Trial With a Predefined Reference Group (PANDORA)* [Online]. ClinicalTrials.gov National Library of Medicine. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01748500> [Accessed januar 2021].
- NEHRA, A. K., ALEXANDER, J. A., LOFTUS, C. G., i sar. 2018. Proton Pump Inhibitors: Review of Emerging Concerns. *Mayo Clin Proc*, 93, 240-246.
- NEMES, Z., JR., FRIIS, R. R., AESCHLIMANN, D., i sar. 1996. Expression and activation of tissue transglutaminase in apoptotic cells of involuting rodent mammary tissue. *Eur J Cell Biol*, 70, 125-33.
- NOVOSELOVA, E. G., PARFENIUK, S. B., GLUSHKOVA, O. V., i sar. 2012. [Effects of several inhibitors of intracellular signaling on production of cytokines and signal proteins in RAW 264.7 cells cultivated with low dose ammonium]. *Biofizika*, 57, 437-45.
- O'CONNOR, L., STRASSER, A., O'REILLY, L. A., i sar. 1998. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J*, 17, 384-95.
- OGIER-DENIS, E., PATTINGRE, S., EL BENNA, J., i sar. 2000. Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells. *J Biol Chem*, 275, 39090-5.
- OHSUMI, Y. 2001. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 211-6.
- OJHA, R., JHA, V., SINGH, S. K., i sar. 2014. Autophagy inhibition suppresses the tumorigenic potential of cancer stem cell enriched side population in bladder cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1842, 2073-86.
- OKAMOTO, S., KRAINC, D., SHERMAN, K., i sar. 2000. Antiapoptotic role of the p38 mitogen-activated protein kinase-myocyte enhancer factor 2 transcription factor pathway during neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7561-6.
- OKOSHI, R., OZAKI, T., YAMAMOTO, H., i sar. 2008. Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *J Biol Chem*, 283, 3979-87.
- PAMARTHY, S., KULSHRESTHA, A., KATARA, G. K., i sar. 2018. The curious case of vacuolar ATPase: regulation of signaling pathways. *Mol Cancer*, 17, 41.
- PAN, C. F., ZHU, S. M. i ZHENG, Y. Y. 2010. Ammonia induces upregulation of aquaporin-4 in neocortical astrocytes of rats through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Chin Med J (Engl)*, 123, 1888-92.
- PANIERI, E. i SANTORO, M. M. 2016. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis*, 7, e2253.
- PANKIV, S., ALEMU, E. A., BRECH, A., i sar. 2010. FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J Cell Biol*, 188, 253-69.
- PANKIV, S., CLAUSEN, T. H., LAMARK, T., i sar. 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, 282, 24131-45.
- PARK, E. J., MIN, K. J., CHOI, K. S., i sar. 2016. Chloroquine enhances TRAIL-mediated apoptosis through up-regulation of DR5 by stabilization of mRNA and protein in cancer cells. *Sci Rep*, 6, 22921.

- PARZYCH, K. R. i KLIONSKY, D. J. 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 20, 460-73.
- PASKEVICIUTE, M. i PETRIKAITE, V. 2019. Proton Pump Inhibitors Modulate Transport Of Doxorubicin And Its Liposomal Form Into 2D And 3D Breast Cancer Cell Cultures. *Cancer Manag Res*, 11, 9761-9769.
- PATEL, K. J., LEE, C., TAN, Q., i sar. 2013. Use of the proton pump inhibitor pantoprazole to modify the distribution and activity of doxorubicin: a potential strategy to improve the therapy of solid tumors. *Clin Cancer Res*, 19, 6766-76.
- PENG, Y. F., SHI, Y. H., DING, Z. B., i sar. 2013. Autophagy inhibition suppresses pulmonary metastasis of HCC in mice via impairing anoikis resistance and colonization of HCC cells. *Autophagy*, 9, 2056-68.
- PERSSON, H. L., VAINIKKA, L. K., SEGE, M., i sar. 2012. Leaky lysosomes in lung transplant macrophages: azithromycin prevents oxidative damage. *Respir Res*, 13, 83.
- PIVORAICO, V. N., HARRINGTON, A. J., MADER, B. J., i sar. 2010. Low-dose bafilomycin attenuates neuronal cell death associated with autophagy-lysosome pathway dysfunction. *J Neurochem*, 114, 1193-204.
- POPULO, H., LOPES, J. M. i SOARES, P. 2012. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*, 13, 1886-918.
- PORTER, A. G. i JANICKE, R. U. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6, 99-104.
- PUERTOLLANO, R. 2014. mTOR and lysosome regulation. *F1000Prime Rep*, 6, 52.
- PUGAZHENTHI, S., NESTEROVA, A., JAMBAL, P., i sar. 2003. Oxidative stress-mediated down-regulation of bcl-2 promoter in hippocampal neurons. *J Neurochem*, 84, 982-96.
- PUISSANT, A., FENOUILLE, N. i AUBERGER, P. 2012. When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *Am J Cancer Res*, 2, 397-413.
- QIAN, Z., REN, L., WU, D., i sar. 2017. Overexpression of FoxO3a is associated with glioblastoma progression and predicts poor patient prognosis. *Int J Cancer*, 140, 2792-2804.
- QIANG, L., WU, C., MING, M., i sar. 2013. Autophagy controls p38 activation to promote cell survival under genotoxic stress. *J Biol Chem*, 288, 1603-11.
- QIN, L., WANG, Z., TAO, L., i sar. 2010. ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy. *Autophagy*, 6, 239-47.
- QIU, S., SUN, L., JIN, Y., i sar. 2017. Silencing of BAG3 promotes the sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin via inhibition of autophagy. *Oncol Rep*, 38, 309-316.
- QU, X., YU, J., BHAGAT, G., i sar. 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest*, 112, 1809-20.
- RATIKAN, J. A., SAYRE, J. W. i SCHAUE, D. 2013. Chloroquine engages the immune system to eradicate irradiated breast tumors in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 87, 761-8.
- REDZA-DUTORDOIR, M. i AVERILL-BATES, D. A. 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, 1863, 2977-2992.
- RENEHAN, A. G., BOOTH, C. i POTTEN, C. S. 2001. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ*, 322, 1536-8.
- REPNIK, U., CESEN, M. H. i TURK, B. 2016. The Use of Lysosomotropic Dyes to Exclude Lysosomal Membrane Permeabilization. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016.
- ROBERT, G., GASTALDI, C., PUISSANT, A., i sar. 2012. The anti-apoptotic Bcl-B protein inhibits BECN1-dependent autophagic cell death. *Autophagy*, 8, 637-49.
- ROSENFELDT, M. T., O'PREY, J., MORTON, J. P., i sar. 2013. p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature*, 504, 296-300.
- ROUSCHOP, K. M., VAN DEN BEUCKEN, T., DUBOIS, L., i sar. 2010. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest*, 120, 127-41.

- RUBIO-MOSCARDO, F., BLESÁ, D., MESTRE, C., i sar. 2005. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*, 106, 3214-22.
- RZYMSKI, T., MILANI, M., PIKE, L., i sar. 2010. Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia. *Oncogene*, 29, 4424-35.
- SADOSHIMA, J., MONTAGNE, O., WANG, Q., i sar. 2002. The MEKK1-JNK pathway plays a protective role in pressure overload but does not mediate cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*, 110, 271-9.
- SAID, A., BOCK, S., LAJQI, T., i sar. 2014. Chloroquine promotes IL-17 production by CD4+ T cells via p38-dependent IL-23 release by monocyte-derived Langerhans-like cells. *J Immunol*, 193, 6135-43.
- SAKAHIRA, H., ENARI, M. i NAGATA, S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391, 96-9.
- SALAZAR, M., CARRACEDO, A., SALANUEVA, I. J., i sar. 2009. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest*, 119, 1359-72.
- SANCAK, Y., BAR-PELED, L., ZONCU, R., i sar. 2010. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*, 141, 290-303.
- SANCHEZ-MARTIN, P. i KOMATSU, M. 2018. p62/SQSTM1 - steering the cell through health and disease. *J Cell Sci*, 131.
- SANTANA-CODINA, N., MANCIAS, J. D. i KIMMELMAN, A. C. 2017. The Role of Autophagy in Cancer. *Annu Rev Cancer Biol*, 1, 19-39.
- SARDANA, K., SINHA, S. i SACHDEVA, S. 2020. Hydroxychloroquine in Dermatology and Beyond: Recent Update. *Indian Dermatol Online J*, 11, 453-464.
- SAX, J. K. i EL-DEIRY, W. S. 2003. p53 downstream targets and chemosensitivity. *Cell Death Differ*, 10, 413-7.
- SCHAAF, M. B., KEULERS, T. G., VOOIJS, M. A., i sar. 2016. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB J*, 30, 3961-3978.
- SCHMEISSER, K. i PARKER, J. A. 2019. Pleiotropic Effects of mTOR and Autophagy During Development and Aging. *Front Cell Dev Biol*, 7, 192.
- SEITZ, C., HUGLE, M., CRISTOFANON, S., i sar. 2013. The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 and chloroquine synergize to trigger apoptosis via mitochondrial-lysosomal cross-talk. *Int J Cancer*, 132, 2682-93.
- SEWELL, J. C. i KLIONSKY, D. J. 2018. The phagophore in four dimensions-a study in wood. *Autophagy*, 1-3.
- SHACKA, J. J., KLOCKE, B. J. i ROTH, K. A. 2006a. Autophagy, bafilomycin and cell death: the "a-B-cs" of plecomacrolide-induced neuroprotection. *Autophagy*, 2, 228-30.
- SHACKA, J. J., KLOCKE, B. J., SHIBATA, M., i sar. 2006b. Bafilomycin A1 inhibits chloroquine-induced death of cerebellar granule neurons. *Mol Pharmacol*, 69, 1125-36.
- SHAO, J., FUJIWARA, T., KADOWAKI, Y., i sar. 2000. Overexpression of the wild-type p53 gene inhibits NF-kappaB activity and synergizes with aspirin to induce apoptosis in human colon cancer cells. *Oncogene*, 19, 726-36.
- SHIN, H. J., KIM, H., OH, S., i sar. 2016. AMPK-SKP2-CARM1 signalling cascade in transcriptional regulation of autophagy. *Nature*, 534, 553-7.
- SHIN, J. M. i KIM, N. 2013. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the proton pump inhibitors. *J Neurogastroenterol Motil*, 19, 25-35.
- SHIN, J. M. i SACHS, G. 2008. Pharmacology of proton pump inhibitors. *Curr Gastroenterol Rep*, 10, 528-34.

- SHRODE, L. D., RUBIE, E. A., WOODGETT, J. R., i sar. 1997. Cytosolic alkalinization increases stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase (SAPK/JNK) activity and p38 mitogen-activated protein kinase activity by a calcium-independent mechanism. *J Biol Chem*, 272, 13653-9.
- SIMPSON, C. D., ANYIWE, K. i SCHIMMER, A. D. 2008. Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett*, 272, 177-85.
- SLEE, E. A., HARTE, M. T., KLUCK, R. M., i sar. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*, 144, 281-92.
- SLOBODNYUK, K., RADIC, N., IVANOVA, S., i sar. 2019. Autophagy-induced senescence is regulated by p38alpha signaling. *Cell Death Dis*, 10, 376.
- SMEELICK, G. S., HEFFRON, T. P., CHU, L., i sar. 2013. Prevalence of acid-reducing agents (ARA) in cancer populations and ARA drug-drug interaction potential for molecular targeted agents in clinical development. *Mol Pharm*, 10, 4055-62.
- SOLDANI, C. i SCOVASSI, A. I. 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis*, 7, 321-8.
- SPUGNINI, E. P., CITRO, G. i FAIS, S. 2010. Proton pump inhibitors as anti vacuolar-ATPases drugs: a novel anticancer strategy. *J Exp Clin Cancer Res*, 29, 44.
- STAMBOLIC, V., MACPHERSON, D., SAS, D., i sar. 2001. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell*, 8, 317-25.
- STEFAN-KHARICHA, M., KHARICHA, A., MOGERITSCH, J., i sar. 2018. Review of Ammonium Chloride–Water Solution Properties. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 63, 3170-3183.
- STENNICKE, H. R., JURGENSMEIER, J. M., SHIN, H., i sar. 1998. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem*, 273, 27084-90.
- STERN, D. F. 2000. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: ErbB family receptor tyrosine kinases. *Breast Cancer Res*, 2, 176-83.
- STRAND, D. S., KIM, D. i PEURA, D. A. 2017. 25 Years of Proton Pump Inhibitors: A Comprehensive Review. *Gut Liver*, 11, 27-37.
- STROHECKER, A. M., GUO, J. Y., KARSLI-UZUNBAS, G., i sar. 2013. Autophagy sustains mitochondrial glutamine metabolism and growth of BrafV600E-driven lung tumors. *Cancer Discov*, 3, 1272-85.
- SUI, X., KONG, N., YE, L., i sar. 2014. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett*, 344, 174-9.
- SULIMAN, A., LAM, A., DATTA, R., i sar. 2001. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*, 20, 2122-33.
- SUN, R., LUO, Y., LI, J., i sar. 2015. Ammonium chloride inhibits autophagy of hepatocellular carcinoma cells through SMAD2 signaling. *Tumour Biol*, 36, 1173-7.
- SUN, T., LI, D., WANG, L., i sar. 2011. c-Jun NH2-terminal kinase activation is essential for up-regulation of LC3 during ceramide-induced autophagy in human nasopharyngeal carcinoma cells. *J Transl Med*, 9, 161.
- SUSIN, S. A., LORENZO, H. K., ZAMZAMI, N., i sar. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397, 441-6.
- SUZUKI, H., YANAKA, A., SHIBAHARA, T., i sar. 2002. Ammonia-induced apoptosis is accelerated at higher pH in gastric surface mucous cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283, G986-95.
- TABATA, K., MATSUNAGA, K., SAKANE, A., i sar. 2010. Rubicon and PLEKHM1 negatively regulate the endocytic/autophagic pathway via a novel Rab7-binding domain. *Mol Biol Cell*, 21, 4162-72.

- TAIT, S. W. i GREEN, D. R. 2008. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene*, 27, 6452-61.
- TAKAHASHI, Y., COPPOLA, D., MATSUSHITA, N., i sar. 2007. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol*, 9, 1142-51.
- TAKAMURA, A., KOMATSU, M., HARA, T., i sar. 2011. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev*, 25, 795-800.
- TAN, Q., JOSHUA, A. M., SAGGAR, J. K., i sar. 2015. Effect of pantoprazole to enhance activity of docetaxel against human tumour xenografts by inhibiting autophagy. *Br J Cancer*, 112, 832-40.
- TAN, Q., JOSHUA, A. M., WANG, M., i sar. 2017. Up-regulation of autophagy is a mechanism of resistance to chemotherapy and can be inhibited by pantoprazole to increase drug sensitivity. *Cancer Chemother Pharmacol*, 79, 959-969.
- TAN, Q., WANG, M., YU, M., i sar. 2016. Role of Autophagy as a Survival Mechanism for Hypoxic Cells in Tumors. *Neoplasia*, 18, 347-55.
- TANG, G., YUE, Z., TALLOCY, Z., i sar. 2008. Autophagy induced by Alexander disease-mutant GFAP accumulation is regulated by p38/MAPK and mTOR signaling pathways. *Hum Mol Genet*, 17, 1540-55.
- TANIDA, I., UENO, T. i KOMINAMI, E. 2004. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 2503-18.
- TAYLOR, S., SPUGNINI, E. P., ASSARAF, Y. G., i sar. 2015. Microenvironment acidity as a major determinant of tumor chemoresistance: Proton pump inhibitors (PPIs) as a novel therapeutic approach. *Drug Resist Updat*, 23, 69-78.
- TEWARI, M., QUAN, L. T., O'ROURKE, K., i sar. 1995. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*, 81, 801-9.
- THOMSON, B. J. 2001. Viruses and apoptosis. *Int J Exp Pathol*, 82, 65-76.
- TONG, Y., HUANG, H. i PAN, H. 2015. Inhibition of MEK/ERK activation attenuates autophagy and potentiates pemetrexed-induced activity against HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 456, 86-91.
- TORCIA, M., DE CHIARA, G., NENCIONI, L., i sar. 2001. Nerve growth factor inhibits apoptosis in memory B lymphocytes via inactivation of p38 MAPK, prevention of Bcl-2 phosphorylation, and cytochrome c release. *J Biol Chem*, 276, 39027-36.
- TRENTI, A., GRUMATI, P., CUSINATO, F., i sar. 2014. Cardiac glycoside ouabain induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells via a JNK-dependent decrease of Bcl-2. *Biochem Pharmacol*, 89, 197-209.
- TRUONG, A., YOO, J. H., SCHERZER, M. T., i sar. 2020. Chloroquine Sensitizes GNAQ/11-mutated Melanoma to MEK1/2 Inhibition. *Clin Cancer Res*, 26, 6374-6386.
- TSUJIMOTO, Y. 1997. Apoptosis and necrosis: intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death Differ*, 4, 429-34.
- TURCO, E., WITT, M., ABERT, C., i sar. 2019. FIP200 Claw Domain Binding to p62 Promotes Autophagosome Formation at Ubiquitin Condensates. *Mol Cell*, 74, 330-346 e11.
- UDELNOW, A., KREYES, A., ELLINGER, S., i sar. 2011. Omeprazole inhibits proliferation and modulates autophagy in pancreatic cancer cells. *PLoS One*, 6, e20143.
- VELA, L., GONZALO, O., NAVAL, J., i sar. 2013. Direct interaction of Bax and Bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation. *J Biol Chem*, 288, 4935-46.
- VERMA, A., MOHINDRU, M., DEB, D. K., i sar. 2002. Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to arsenic trioxide. *J Biol Chem*, 277, 44988-95.

- VUCICEVIC, L., MISIRKIC, M., JANJETOVIC, K., i sar. 2011. Compound C induces protective autophagy in cancer cells through AMPK inhibition-independent blockade of Akt/mTOR pathway. *Autophagy*, 7, 40-50.
- WALSH, M., FAIS, S., SPUGNINI, E. P., i sar. 2015. Proton pump inhibitors for the treatment of cancer in companion animals. *J Exp Clin Cancer Res*, 34, 93.
- WANG, B. Y., ZHANG, J., WANG, J. L., i sar. 2015. Intermittent high dose proton pump inhibitor enhances the antitumor effects of chemotherapy in metastatic breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 34, 85.
- WANG, C., HU, Q. i SHEN, H. M. 2016. Pharmacological inhibitors of autophagy as novel cancer therapeutic agents. *Pharmacol Res*, 105, 164-75.
- WANG, L. J., CHEN, P. R., HSU, L. P., i sar. 2014. Concomitant induction of apoptosis and autophagy by prostate apoptosis response-4 in hypopharyngeal carcinoma cells. *Am J Pathol*, 184, 418-30.
- WANG, X., LIU, C., WANG, J., i sar. 2017a. Proton pump inhibitors increase the chemosensitivity of patients with advanced colorectal cancer. *Oncotarget*, 8, 58801-58808.
- WANG, X. Z. i RON, D. 1996. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science*, 272, 1347-9.
- WANG, Y., ZHANG, G., JIN, J., i sar. 2017b. MALT1 promotes melanoma progression through JNK/c-Jun signaling. *Oncogenesis*, 6, e365.
- WEBB, A. E. i BRUNET, A. 2014. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem Sci*, 39, 159-69.
- WEBBER, J. L. 2010. Regulation of autophagy by p38alpha MAPK. *Autophagy*, 6, 292-3.
- WEBBER, J. L. i TOOZE, S. A. 2010. Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *EMBO J*, 29, 27-40.
- WELLBROCK, C. i AROZARENA, I. 2016. The Complexity of the ERK/MAP-Kinase Pathway and the Treatment of Melanoma Skin Cancer. *Front Cell Dev Biol*, 4, 33.
- WENG, L., BROWN, J. i ENG, C. 2001. PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositol-3-kinase/Akt-dependent and -independent pathways. *Hum Mol Genet*, 10, 237-42.
- WERNER, G., HAGENMAIER, H., DRAUTZ, H., i sar. 1984. Metabolic products of microorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Production, isolation, chemical structure and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)*, 37, 110-7.
- WHITE, E. 2012. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*, 12, 401-10.
- WHITTON, B., OKAMOTO, H., PACKHAM, G., i sar. 2018. Vacuolar ATPase as a potential therapeutic target and mediator of treatment resistance in cancer. *Cancer Med*, 7, 3800-3811.
- WIEDMER, T., BLANK, A., PANTASIS, S., i sar. 2017. Autophagy Inhibition Improves Sunitinib Efficacy in Pancreatic Neuroendocrine Tumors via a Lysosome-dependent Mechanism. *Mol Cancer Ther*, 16, 2502-2515.
- WIERSMA, V. R., DE BRUYN, M., WEI, Y., i sar. 2015. The epithelial polarity regulator LGALS9/galectin-9 induces fatal frustrated autophagy in KRAS mutant colon carcinoma that depends on elevated basal autophagic flux. *Autophagy*, 11, 1373-88.
- WILD, P., MCEWAN, D. G. i DIKIC, I. 2014. The LC3 interactome at a glance. *J Cell Sci*, 127, 3-9.
- WIRAWAN, E., VANDE WALLE, L., KERSSE, K., i sar. 2010. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis*, 1, e18.
- WOJTKOWIAK, J. W., ROTHBERG, J. M., KUMAR, V., i sar. 2012. Chronic autophagy is a cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironments. *Cancer Res*, 72, 3938-47.

- WOO, C. W., CUI, D., ARELLANO, J., i sar. 2009. Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling. *Nat Cell Biol*, 11, 1473-80.
- WOOD, K. A. i YOULE, R. J. 1994. Apoptosis and free radicals. *Ann N Y Acad Sci*, 738, 400-7.
- WU, C. C. i BRATTON, S. B. 2013. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*, 19, 546-58.
- WU, C. L., LIU, J. F., LIU, Y., i sar. 2019. Beclin1 inhibition enhances paclitaxel-mediated cytotoxicity in breast cancer in vitro and in vivo. *Int J Mol Med*, 43, 1866-1878.
- WU, C. L., ZHANG, S. M., LIN, L., i sar. 2018. BECN1-knockout impairs tumor growth, migration and invasion by suppressing the cell cycle and partially suppressing the epithelial-mesenchymal transition of human triple-negative breast cancer cells. *Int J Oncol*, 53, 1301-1312.
- WU, H., WANG, M. C. i BOHMANN, D. 2009a. JNK protects *Drosophila* from oxidative stress by transcriptionally activating autophagy. *Mech Dev*, 126, 624-37.
- WU, T., WANG, M. C., JING, L., i sar. 2015. Autophagy facilitates lung adenocarcinoma resistance to cisplatin treatment by activation of AMPK/mTOR signaling pathway. *Drug Des Devel Ther*, 9, 6421-31.
- WU, X., XU, T., LI, D., i sar. 2013. ERK/PP1a/PLB/SERCA2a and JNK pathways are involved in luteolin-mediated protection of rat hearts and cardiomyocytes following ischemia/reperfusion. *PLoS One*, 8, e82957.
- WU, Y. C., WU, W. K., LI, Y., i sar. 2009b. Inhibition of macroautophagy by bafilomycin A1 lowers proliferation and induces apoptosis in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 382, 451-6.
- XIE, Z., XIE, Y., XU, Y., i sar. 2014. Bafilomycin A1 inhibits autophagy and induces apoptosis in MG63 osteosarcoma cells. *Mol Med Rep*, 10, 1103-7.
- XU, K., ZHANG, Z., PEI, H., i sar. 2017. FoxO3a induces temozolomide resistance in glioblastoma cells via the regulation of beta-catenin nuclear accumulation. *Oncol Rep*, 37, 2391-2397.
- XU, R., JI, Z., XU, C., i sar. 2018. The clinical value of using chloroquine or hydroxychloroquine as autophagy inhibitors in the treatment of cancers: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 97, e12912.
- YAMAMOTO, A., TAGAWA, Y., YOSHIMORI, T., i sar. 1998. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct*, 23, 33-42.
- YAN, Y., JIANG, K., LIU, P., i sar. 2016. Bafilomycin A1 induces caspase-independent cell death in hepatocellular carcinoma cells via targeting of autophagy and MAPK pathways. *Sci Rep*, 6, 37052.
- YANG, L., OMORI, K., OMORI, K., i sar. 2003a. GABAC receptor agonist suppressed ammonia-induced apoptosis in cultured rat hippocampal neurons by restoring phosphorylated BAD level. *J Neurochem*, 87, 791-800.
- YANG, Q. H., CHURCH-HAJDUK, R., REN, J., i sar. 2003b. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev*, 17, 1487-96.
- YANG, Z. i KLIONSKY, D. J. 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*, 12, 814-22.
- YANG, Z. J., CHEE, C. E., HUANG, S., i sar. 2011. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther*, 10, 1533-41.
- YEO, M., KIM, D. K., KIM, Y. B., i sar. 2004. Selective induction of apoptosis with proton pump inhibitor in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res*, 10, 8687-96.
- YONEKAWA, T. i THORBURN, A. 2013. Autophagy and cell death. *Essays Biochem*, 55, 105-17.
- YU, J. i ZHANG, L. 2008. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*, 27 Suppl 1, S71-83.



- YU, L., CHEN, Y. i TOOZE, S. A. 2018. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*, 14, 207-215.
- YUAN, N., SONG, L., ZHANG, S., i sar. 2015. Bafilomycin A1 targets both autophagy and apoptosis pathways in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 100, 345-56.
- YUE, Z., JIN, S., YANG, C., i sar. 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15077-82.
- ZAIDI, A. U., MCDONOUGH, J. S., KLOCKE, B. J., i sar. 2001. Chloroquine-induced neuronal cell death is p53 and Bcl-2 family-dependent but caspase-independent. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60, 937-45.
- ZENG, R. X., ZHANG, Y. B., FAN, Y., i sar. 2014. p62/SQSTM1 is involved in caspase-8 associated cell death induced by proteasome inhibitor MG132 in U87MG cells. *Cell Biol Int*, 38, 1221-6.
- ZENG, X., LIU, L., ZHENG, M., i sar. 2016. Pantoprazole, an FDA-approved proton-pump inhibitor, suppresses colorectal cancer growth by targeting T-cell-originated protein kinase. *Oncotarget*, 7, 22460-73.
- ZHANG, C., SYED, T. W., LIU, R., i sar. 2017a. Role of Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy, and Inflammation in Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med*, 4, 29.
- ZHANG, J., CHEN, J., LIU, L., i sar. 2006. Different gene expression profiles of AD293 and HEK293 cell lines that show contrasting susceptibility to apoptosis induced by overexpression of Bim L. *Acta Biochim Pol*, 53, 525-30.
- ZHANG, L., WANG, H., DING, K., i sar. 2015. FTY720 induces autophagy-related apoptosis and necroptosis in human glioblastoma cells. *Toxicol Lett*, 236, 43-59.
- ZHANG, X., HU, X. i RAO, X. 2017b. Apoptosis induced by Staphylococcus aureus toxins. *Microbiol Res*, 205, 19-24.
- ZHANG, X., SHAN, P., ALAM, J., i sar. 2003. Carbon monoxide modulates Fas/Fas ligand, caspases, and Bcl-2 family proteins via the p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway during ischemia-reperfusion lung injury. *J Biol Chem*, 278, 22061-70.
- ZHAO, H., DUPONT, J., YAKAR, S., i sar. 2004. PTEN inhibits cell proliferation and induces apoptosis by downregulating cell surface IGF-IR expression in prostate cancer cells. *Oncogene*, 23, 786-94.
- ZHOU, Y. Y., LI, Y., JIANG, W. Q., i sar. 2015. MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. *Biosci Rep*, 35.
- ZHU, H., LUO, H., ZHU, X., i sar. 2017. Pyruvate kinase M2 (PKM2) expression correlates with prognosis in solid cancers: a meta-analysis. *Oncotarget*, 8, 1628-1640.
- ZHU, L., WANG, Y., HE, J., i sar. 2018. Cytoplasmic SQSTM1/ P62 Accumulation Predicates a Poor Prognosis in Patients with Malignant Tumor. *J Cancer*, 9, 4072-4086.
- ZONCU, R., BAR-PELED, L., EFEYAN, A., i sar. 2011. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science*, 334, 678-83.







## Spisak skraćenica:

4EBP1 – engl. *Translaton initiation factor 4E-binding protein*  
AH - amonijum hlorid  
AIF – engl. *Apoptosis inducing factor*  
AMBRA1 – engl. *Activation molecule in Beclin -1 regulated autophagy*  
AMPK - engl. *Adenosine monophosphate-activated protein kinase*  
Apaf -1 – engl. *Apoptotic protease activating factor 1*  
Apo2L – engl. *Apo2 ligand*  
Atf4 – eng. *Activating transcription factor 4*  
ATF6 $\alpha$  – engl. *Activating Transcription factor 6 alpha*  
Atg - engl. *AuTophagy related*  
BA - bafilomicin  
Bad – engl. *B-cell lymphoma 2 antagonist of cell death*  
Bak – engl. *B-cell lymphoma 2 antagonist killer 1*  
Bax – engl. *B-cell lymphoma 2 associated X protein*  
Bcl-2 – engl. *B-cell lymphoma 2*  
Bcl-w – engl. *Bcl-2 like 2*  
Bcl-xL – engl. *B-cell lymphoma extra large*  
Bid – engl. *BH3 interacting domain death agonist*  
Bif-1 – engl. *Bax-interacting factor 1*  
Bim – engl. *B-cell lymphoma interacting protein Bim*  
Bmf - engl. *B-cell modifying factor*  
Bnip3 - engl. *B-cell lymphoma 2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting 3*  
Bok – engl. *B-cell lymphoma 2 related ovarian killer*  
BSA – engl. *Bovine serum albumin*  
CAD – engl. *Caspase-activated DNase*  
CHOP – engl. *C/EBP homologous protein*  
CQ - hlorokin  
DHE – dihidroetidijum  
DHR – dihidrorodamin  
DMSO – dimetilsulfoksid  
DR – engl. *Death receptor*  
EDTA – etilendiamino tetrasirćetna kiselina  
eIF2 $\alpha$  – engl. *Eucaryotic initiation factor 2 alpha*  
ERK – engl. *Extracellular signal-regulated kinase*  
FasL – engl. *Fatty acid synthetase ligand*  
FasR- engl. *Fatty acid synthetase receptor*  
FIP200 - engl. *Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa*  
Foxo – engl. *Forkhead box protein O*  
Hrk – *harakiri*  
HtrA2/Omi – engl. *High temperature requirement protein A2*  
JNK – engl. *c-Jun N-terminal kinase*  
LC3 - engl. *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*  
LTR – lizotreker zeleno (engl. *LysoTracker Green*)  
MAPK – engl. *Mitogen activated protein kinase*  
M-MuLV - engl. *Moloney Murine Leukemia Virus*  
mTOR- engl. *Mammalian target of rapamycin*  
mTORC1 – engl. *Mammalian target of rapamycin complex 1*  
mTORC2 – engl. *Mammalian target of rapamycin complex 2*  
Noxa/Pmaip – engl. *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein-1*

p62/Sqstm1 – engl. *Sequestozom 1*  
p70S6K – engl. *Ribosomal protein S6 kinase-1*  
PARP-1 – engl. *Poly (ADP-ribose) polymerase*  
PERK – engl. *Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase*  
PI – propidijum jodid  
PI3K - engl. *Phosphoinositid 3-kinase*  
PIC – koktel za inhibiciju proteaza (engl. *Protease inhibitor cocktail*)  
PIKK - engl. *Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase*  
PMSF – fenil-metil-sulfonil-fluorid  
PPZ - aantoprazol  
Puma – engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*  
Rubicon – engl. *Run domain Beclin-1 interacting and cysteine-rich domain-containing protein*  
SDS – natrijum dodecil sulfat (engl. *Sodium dodecyle sulphate*)  
siRNA – mala interferirajuća RNK (engl. *Small interfering RNA*)  
SMACK/DIABLO – engl. *Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct inhibitor of apoptosis binding protein with low pI*  
SNARE -engl. *Soluble N-ethymale-imide-sensitive factor-attachment protein receptors*  
TEMED – 3-(4,5-N,N,N',N' –tetrametiletlen-1,2-diamin  
TNFR1- engl. *Tumor necrosis factor receptor 1*  
TNF- $\alpha$  – engl. *Tumor necrosis factor alpha*  
ULK 1/2 – engl. *Unc-51 like autophagy activating kinase*  
UVRAG – engl. *UV irradiation resistance-associated gene*  
Vakuolarna V-ATPaza - V-ATPaza

## Biografija

Dr Marina M. Stamenković je rođena 23.3.1984. godine u Beogradu. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,09. Iste godine, na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, upisuje Doktorske studije smeru Molekularna medicina.

Za saradnika u nastavi, za užu naučnu oblast Imunologija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, izabrana je 2014, a u isto zvanje reizabrana je 2015. godine. Zvanje asistenta stekla je 2016. godine u koje je reizabrana 2019. godine. Specijalizaciju iz Imunologije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, započela je 2015. godine.

Kao istraživač saradnik od 2012. godine radila je na projektu „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“, broj III41025, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod rukovodstvom prof. dr Vladimira Trajkovića, na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju.

Dr Marina M. Stamenković, kao jedan od članova istraživačkog tima, dobitnik je granta programa Pokreni se za nauku (“Start Up For Science”), za realizaciju naučnog projekta pod nazivom „Molekularni mehanizmi delovanja pantoprazola na indukciju apoptoze i /ili autofagije u nesitnoćelijskom karcinomu pluća (NSCLC) *in vitro*“. Dr Marina M. Stamenković je koautor 9 publikacija objavljenih u celini u časopisima indeksiranim u Institute of Science Index (SCI) bazi podataka.





## Prilog 1.

# Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: **Marina M. Stamenković**

Broj indeksa: **MM08/12**

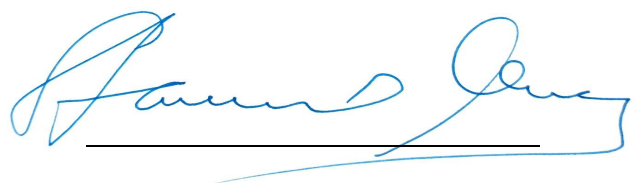
### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

**„Mehanizmi citotoksičnosti farmakoloških inhibitora autofagije *in vitro*“**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena 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 kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**



U Beogradu, 27. 4. 2021. godine



## Prilog 2.

# Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime: **Marina M. Stamenković**

Broj indeksa: **MM08/12**

Studijski program: **Molekularna medicina**

Naslov rada „**Mehanizmi citotoksičnosti farmakoloških inhibitora autofagije *in vitro***“

Mentor: **Profesor dr Vladimir Trajković**

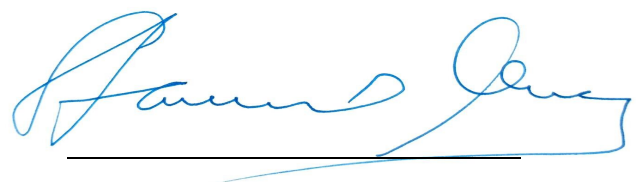
Komentor: **Naučni saradnik dr Kristina Janjetović**

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu 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.

**Potpis doktoranda**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Marina M. Stamenković', written over a horizontal line.

U Beogradu, 27. 4. 2021. godine



## Prilog 3.

# Izjava o korišćenju

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

**„Mehanizmi citotoksičnosti farmakoloških inhibitora autofagije *in vitro*“**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo

2. Autorstvo – nekomercijalno

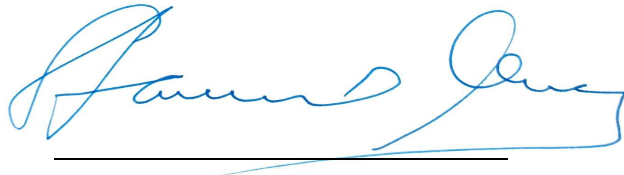
③ 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

**Potpis doktoranda**

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line. The signature is cursive and appears to read 'Lana Jovanovic'.

U Beogradu, 27. 4. 2021. godine