



Središnja medicinska knjižnica

Lalić, Hrvoje (2015) *Uloga signalnoga puta AMPK/mTOR u diferencijaciji leukemijskih stanica [The role of AMPK/mTOR signaling pathway in differentiation of leukemia cells]. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.*

<http://medlib.mef.hr/2191>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Hrvoje Lalić

**Uloga signalnoga puta AMPK/mTOR u
diferencijaciji leukemijskih stanica**

DISERTACIJA



Zagreb, 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Hrvoje Lalić

**Uloga signalnoga puta AMPK/mTOR u
diferencijaciji leukemijskih stanica**

DISERTACIJA

Zagreb, 2015.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za druge glasnike i Laboratoriju kulture stanica i tkiva Hrvatskog instituta za istraživanje mozga u Zagrebu.

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Dora Višnjić

ZAHVALA

Najviše se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Dori Višnjić. Bez vas ovo ništa ne bi bilo moguće. Vi ste vašim velikim znanjem i neprocjenjivom pomoći najviše pridonijeli ovoj disertaciji. Također sam vam zahvalan na iznimnom zalaganju, strpljenju, podršci i korisnim savjetima od mog prvog uzimanja pipete u ruke pa sve do zadnjeg slova ove disertacije.

Posebno sam zahvalan Dunji Tanković na velikoj pomoći u laboratoriju, ali i na jednom novom prijateljstvu u ozračju kojeg je čitav posao ujedno bio i zabava.

Veliko hvala prof. dr. sc. Hrvoju Banfću koji je svojim znanstvenim iskustvom i savjetima uvelike pomogao u izradi disertacije.

Zahvaljujem se kolegici i prijateljici Vilmi Dembitz na nesebičnoj pomoći i ugodnoj atmosferi tijekom zajedničkog rada.

Hvala doc. dr. sc. Vesni Lukinović-Škudar na korisnim savjetima i pomoći u eksperimentalnom radu.

Hvala mojoj obitelji na ljubavi, strpljenju i podršci.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Signalni put AMPK/mTOR	1
1.1.1. AMPK	1
1.1.1.1. AMPK i metabolizam	1
1.1.1.2. AMPK – građa i mehanizam djelovanja	2
1.1.1.3. AMPK i „uzvodna“ regulacija	4
1.1.1.4. AMPK i „nizvodni“ supstrati	5
1.1.2. Modulatori AMPK-a	6
1.1.2.1. Metformin – mehanizam djelovanja i primjena	6
1.1.2.2. AICAR – mehanizam djelovanja i primjena	7
1.1.3. mTOR	8
1.1.3.1. mTOR – građa i mehanizam djelovanja	8
1.1.3.2. mTOR i „uzvodna“ regulacija	9
1.1.4. Inhibitori mTOR-a	12
1.2. Akutna mijeloična leukemija (AML)	13
1.2.1. AML i sve- <i>trans</i> retinska kiselina (ATRA)	14
1.2.2. Leukemijske linije kao modeli diferencijacije leukemijskih stanica	16
1.2.2.1. Leukemijska linija HL-60	16
1.2.2.2. Leukemijska linija NB4	16
1.2.2.3. Leukemijska linija U937	17
1.2.2.4. Leukemijska linija K562	17
1.2.2.5. Leukemijska linija KG-1	18
1.2.3. DMSO i diferencija leukemijskih stanica	18
2. HIPOTEZA	20
3. CILJEVI	20
3.1. Opći cilj istraživanja	20

3.2. Specifični ciljevi istraživanja	20
4. MATERIJALI I METODE	21
4.1. Kemikalije	21
4.2. Stanična kultura	22
4.3. Inkubacija stanica s ispitivanim tvarima	22
4.4. Mjerenje izražaja površinskih biljega	22
4.5. Analiza staničnog ciklusa	23
4.6. Određivanje apoptoze	23
4.7. Izolacija ukupnih staničnih lizata	23
4.8. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	24
4.9. Analiza Western blot	24
4.10. Inhibiranje izražaja gena pomoću RNA-interferencije	25
4.11. Statistička analiza	25
5. REZULTATI	26
5.1. Učinci mTOR-inhibitora, rapamicina, na stanice leukemijskih linija tretirane DMSO-om	26
5.1.1. Rapamicin pospješuje učinke DMSO-a na smanjenje broja živih stanica leukemijskih linija	26
5.1.2. Rapamicin i DMSO potiču nakupljanje leukemijskih stanica u G ₀ /G ₁ -fazi staničnog ciklusa	28
5.1.3. Rapamicin nema učinka na izražaj diferencijacijskog biljega CD11b u stanicama koje su potaknute DMSO-om	30
5.1.4. Rapamicin pospješuje učinke DMSO-a na poticanje apoptoze	32
5.2. Učinci modulatora AMPK-a na proliferaciju i diferencijaciju kontrolnih stanica i stanica diferenciranih ATRA-om	33
5.2.1. AMPK-aktivatori, AICAR i metformin, smanjuju broj živih stanica leukemijskih linija	33
5.2.2. AICAR potiče apoptozu u stanicama NB4 i U937	35

5.2.3.	AICAR pospješuje izražaj diferencijacijskih biljega.....	37
5.2.4.	AICAR potiče aktivnost MAPK-a u stanicama NB4 i U937.....	41
5.2.5.	Farmakološki inhibitor MAPK koči učinke AICAR-a na izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama U937	43
5.2.6.	Učinci AICAR-a na broj živih stanica U937 i izražaj diferencijacijskih biljega su neovisni o količini AMPK-a.....	45
6.	RASPRAVA	47
6.1.	Rapamicin pospješuje učinke DMSO-a na smanjenje broja živih stanica leukemijskih linija.....	47
6.2.	AICAR pospješuje izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama leukemijskih linija	50
7.	ZAKLJUČCI.....	54
8.	SAŽETAK.....	55
9.	SUMMARY	56
10.	LITERATURA.....	57
11.	ŽIVOTOPIS	75

POPIS KRATICA

ADP – adenzin-difosfat

ACC – acetil-CoA karboksilaza (prema engl. *acetyl-coenzyme A carboxylase*)

AICAR – AICA-ribozid (prema engl. *5-aminoimidazole-carboxamide ribonucleoside*)

Akt/PKB – Akt/proteinska kinaza B

AML – akutna mijeloična leukemija

AMP – adenzin-monofosfat

AMPK – adenzin-monofosfat (AMP)-aktivirana proteinska kinaza

APL – akutna promijelocitna leukemija

ATP – adenzin-trifosfat

ATRA – sve-*trans* retinska kiselina (prema engl. *all-trans retinoic acid*)

BCR/ABL – (prema engl. *breakpoint cluster region*)/(prema engl. *Abelson*)

BSA – albumin goveđeg seruma (prema engl. *bovine serum albumin*)

CD – diferencijacijska skupina (prema engl. *cluster of differentiation*)

C-kraj – karboksi-kraj

DMSO – dimetil-sulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

ERK1/2 – kinaza aktivirana izvanstaničnim signalom 1/2 (prema engl. *extracellular signal-regulated kinase*)

FAB – francusko-američko-britanska (klasifikacija)

FBS – fetusni goveđi serum (prema engl. *fetal bovine serum*)

FITC – fluorescein-izotiocijanat

GLUT – transporter za glukozu

GTP – gvanozin-trifosfat

HMG-CoA reduktaza – 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA reduktaza

IFN- γ – interferon- γ

LKB1 – jetrena kinaza B1 (prema engl. *liver kinase B1*)

MAPK – proteinska kinaza aktivirana mitogenom (prema engl. *mitogen-activated protein kinase*)

MEK/MAPKK – proteinska kinaza kinaza aktivirana mitogenom (prema engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*)

MFI – prosječni intenzitet fluorescencije (prema engl. *mean fluorescence intensity*)

mRNA – glasnička RNA (prema engl. *messenger RNA*)

mTOR – ciljna molekula rapamicina u sisavaca (prema engl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin*)

mTORC1 – kompleks 1 ciljne molekule rapamicina u sisavaca (prema engl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1*)

mTORC2 – kompleks 2 ciljne molekule rapamicina u sisavaca (prema engl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 2*)

N-kraj – amino-kraj

p70 S6K – p70 S6 kinaza

p53 – protein 53

PE – fikoeritrin (prema eng. *phycoerythrin*)

PI3K – fosfatidil-inozitol 3-kinaza

PIP₂ – fosfatidil-inozitol-4,5-bifosfat

PIP₃ – fosfatidil-inozitol-3,4,5-trifosfat

PKC – proteinska kinaza C

PMA – forbol 12-miristat 13-acetat

PML/RAR α – promijelocitna leukemija/receptor retinoične kiseline α (prema engl. *promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor α*)

siRNA – mala interferirajuća RNA (prema engl. *small interfering RNA*)

SIRT1 – sirtuin1 (prema engl. *silent mating type information regulation 2 homolog 1*)

TNF α – čimbenik nekroze tumora α (prema engl. *tumor necrosis factor α*)

TSC1/2 – kompleks tuberozne skleroze 1/2 (prema engl. *tuberous sclerosis complex 1/2*)

1. UVOD

1.1. Signalni put AMPK/mTOR

1.1.1. AMPK

Kinazna aktivnost koja u jetrenim stanicama štakora fosforilira i inaktivira dva ključna enzima u biosintezi masnih kiselina i sterola, acetil-CoA karboksilazu (ACC) i 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA reduktazu (HMG-CoA reduktazu), opisana je još 70-tih godina, a od 1989. godine se naziva adenozin-monofosfat (AMP)-aktivirana proteinska kinaza (AMPK).¹ Ingebritsen i sur. opisali su da se štakorska jetrena mikrosomalna HMG-CoA reduktaza inaktivira tijekom inkubacije s ATP-om i ionima Mg^{2+} , a da se aktivnost vraća na normalnu vrijednost nakon inkubacije s citosolnom fosforilaza-fosfatazom. (Mg)ATP-ovisni enzim koji inaktivira HMG-CoA reduktazu nazvali su "I"; nova kinaza "I" inaktivira se fosforilaza-fosfatazom, a reaktivira proteinskom kinazom neovisnom o cikličkom AMP-u (cAMP), što je već tada uputilo na signalni put „uzvodno“ od AMPK-a.² Yeh i sur.³ su opisali sličan mehanizam regulacije ACC-a u jednostavnom testu u kojem su inkubirali ACC s različitim koncentracijama ATP-a i kombinacijama ATP-a i AMP-a te zaključili da AMP inaktivira ACC, a da je za tu inaktivaciju bitna fosforilacija ACC-a koja se zbiva pri povećanoj koncentraciji AMP-a.³

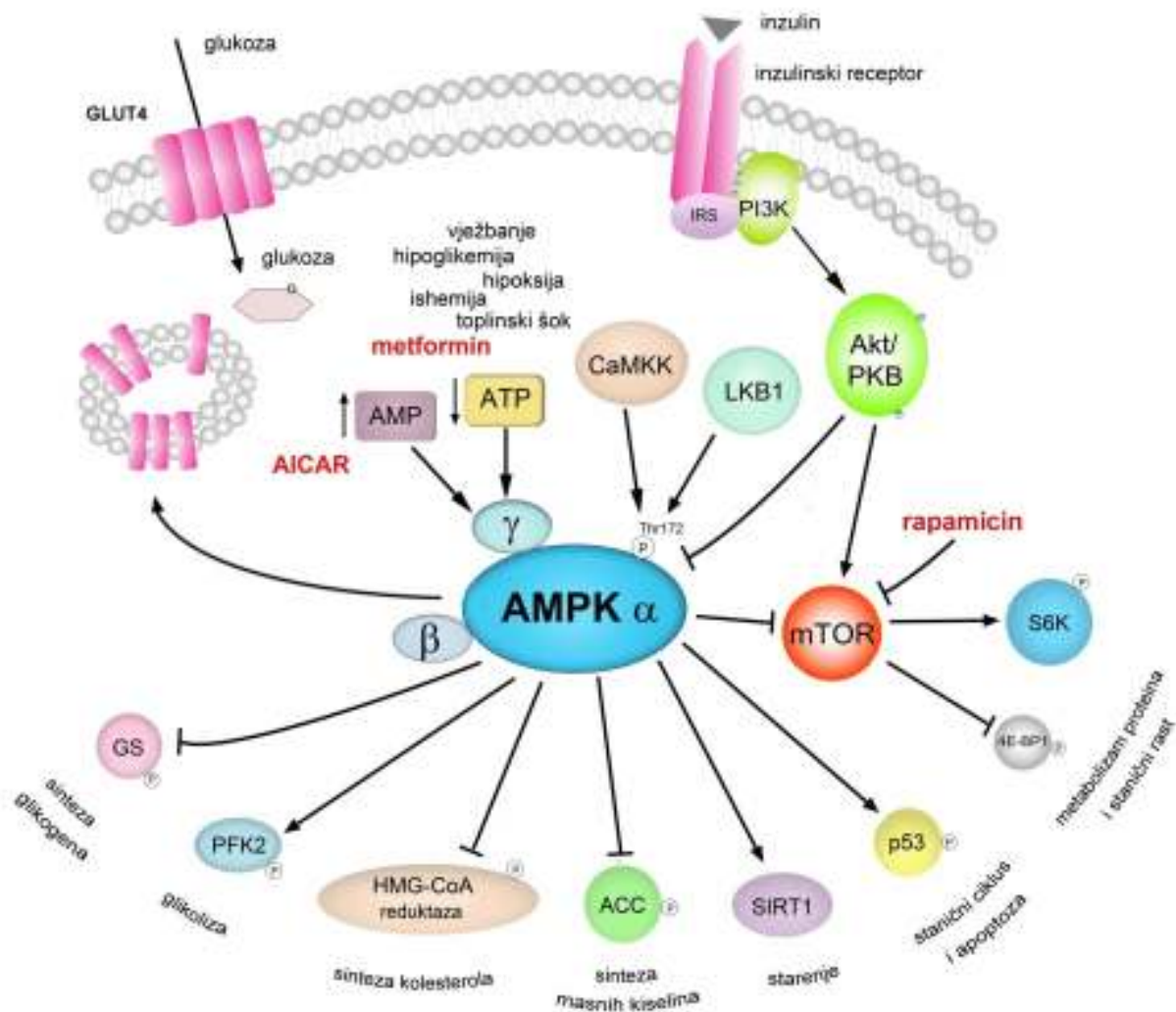
1.1.1.1. AMPK i metabolizam

AMPK se slikovito može zamisliti kao mjerač razine „goriva“ u organizmu; pojednostavljeno, u uvjetima staničnog stresa, kada je razina ATP-a niska, povećava se razina AMP-a i ADP-a koji aktiviraju AMPK, a AMPK zatim reprogramira metaboličke puteve kako bi smanjila anaboličke procese u kojima se troši ATP i NADPH i povećala one kataboličke. Nakon evolucijskog nastanka mitohondrija kao energetske banke stanice u kojoj se odvija oksidativna fosforilacija tako da od molekule glukoze nastane CO_2 i voda uz sintezu ATP-a na unutrašnjoj strani membrane, pojavila se vrlo brzo i potreba za senzorom koji bi u citoplazmi stanice trebao registrirati da je stanica "ispraznila baterije" i to javljati mitohondrijima kako bi se potakla njihova aktivnost. Tu ulogu je dobila AMPK, za koju se pretpostavlja da joj je jedna od prvih funkcija bila očuvanje homeostaze tijekom gladovanja.⁴ Naime, u pokusima s kvascima pokazano je da u uvjetima nedostatka glukoze stanice s aerobne glikolize prelaze na oksidativnu fosforilaciju kojom dobivaju više ATP-a, a za što je potreban funkcionalni kompleks SNF1, koji je analog AMPK-a u kvasaca.⁵ Tako stanica u

gladovanju prelazi s aerobne glikolize, koja se odvija u uvjetima obilja hranjivih tvari i u kojoj se stvara manje ATP-a, ali više intermedijarnih produkata za izgradnju same stanice, na trenutno važniju oksidativnu fosforilaciju. AMPK se, dakle, aktivira u uvjetima bilo kakvog metaboličkog stresa koji dovodi do smanjenja ATP-a, bilo zbog smanjenog nastanka, kao što se zbiva u hipoksiji i gladovanju, ili zbog povećane potrošnje tijekom fizičke aktivnosti. Uloga AMPK-a u funkcioniranju organizma na staničnoj razini je složena tako da ona ne utječe samo na metaboličke putove, već ima važnu ulogu i u autofagiji, staničnom rastu, proliferaciji i polarnosti.^{4,6-8}

1.1.1.2. AMPK – građa i mehanizam djelovanja

AMPK je heterotrimer koji se sastoji od katalitičke podjedinice α i dvije regulacijske podjedinice, β i γ (Slika 1). Ukupno sedam gena kodira sve izoforme podjedinica AMPK-a; dvije izoforme podjedinice α , dvije izoforme β i tri izoforme podjedinice γ . Izoforma $\alpha 2$ nalazi se većinom u skeletnom i srčanom mišiću, a izoforme $\alpha 1$ i $\alpha 2$ su podjednako zastupljene u jetrenoj AMPK.^{4,9,10} Podjedinica α na svom N-kraju sadrži tipičnu serin/treoninsku kinaznu domenu koja se aktivira nakon fosforilacije aktivacijske petlje na treoninskom ostatku na položaju 172 (Thr172). Podjedinica γ sadrži regulacijsko mjesto za vezanje adenin-nukleotida koje se sastoji od ponavljajućih sekvenci CBS (prema engl. *cystathionine β -synthase*).^{9,11} Sekvence oblikuju četiri žlijeba ili vezna mjesta za nukleotide; mjesta 1 i 3 služe kao energetski senzor u užem smislu jer kompetitivno vežu AMP, ADP i ATP, mjesto 4 uvijek čvrsto veže samo AMP, a vezno mjesto 2 ostaje slobodno.^{4,9,11,12} Ukratko, u fiziološkim uvjetima, kada stanica nije izložena stresu, omjer ATP-a i ADP-a je povećan, tako da su mjesta 1 i 3 zauzeta s ATP-om. Međutim, kada stanica prolazi kroz metabolički stres, koncentracije ADP-a i AMP-a postaju relativno veće od ATP-a pa istiskuju ATP s veznih mjesta i tako alosterički aktiviraju AMPK. Za potpunu aktivnost AMPK-a potrebna su, dakle, dva događaja: vezanje AMP-a za γ -podjedinicu i fosforilacija α -podjedinice. Podjedinica β je spojena s podjedinicom α pomoću evolucijski očuvane domene na C-kraju. Iako funkcija β -podjedinice nije do kraja razjašnjena, zna se da ta podjedinica sadrži nekatalitička vezna mjesta za glikogen nazvana CBM (prema engl. *carbohydrate binding motif*).^{13,14} S obzirom da je β -podjedinica bitna za lokalizaciju AMPK-a unutar stanice, najvjerojatnije se zahvaljujući ovoj podjedinici AMPK primiče svojim ciljnim molekulama koje imaju veze s metabolizmom ugljikohidrata pa tako moduliraju aktivnost molekula koje su vezane za glikogen unutar stanice, kao što je glikogen-sintetaza.^{10,14-16}



Slika 1. AMPK – grada, mehanizam djelovanja, “uzvodna“ regulacija i „nizvodni“ supstrati. Kratice (abecednim redom): 4E-BP1 – (prema engl. *eIF4E-binding protein 1*); ACC – acetil-koenzim A karboksilaza; Akt/PKB – Akt/proteinska kinaza B; AICAR (AICA-ribozid) – 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleozid; AMPK – adozin-monofosfat (AMP)-aktivirana proteinska kinaza; CaMKK – (prema engl. *calmodulin-dependent protein kinase kinase*); GLUT4 –transporter za glukozu tipa 4; GS – glikogen-sintetaza; HMG-CoA reduktaza – 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA reduktaza; IRS – supstrat inzulinskog receptora; LKB1 – jetrena kinaza B1; mTOR – (prema engl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin*); p53 – protein 53; PFK2 – fosfofruktokinaza 2 (prema engl. *phosphofructokinase 2*); PI3K – fosfatidil-inozitol 3-kinaza; SIRT1 – sirtuin1; S6K – S6 kinaza.

1.1.1.3. AMPK i „uzvodna“ regulacija

Više od 25 godina, još od otkrića „HMG-CoA reduktaza kinaze“, znalo se kako je za aktivnost AMPK-a potrebna „uzvodna“ kinaza, ali je njezin identitet bio nepoznanica sve do 2003. godine, kada je otkriveno da je kinaza LKB1 (prema engl. *liver kinase B1*) odgovorna za fosforilaciju AMPK-a na treoninskom ostatku 172.¹⁷⁻¹⁹ LKB1 je serin/treoninska kinaza koju kodira gen STK11 (prema engl. *serine-threonine kinase 11*), a mutacija STK11 je odgovorna za gubitak funkcije ovog tumorskog supresora u Peutz-Jeghersovom sindromu.²⁰ Obilježje Peutz-Jeghersovog sindroma su brojni benigni intestinalni polipi koji su skloni malignoj alteraciji, a mutacija gena STK11 zamjećena je i u karcinomima pluća, cerviksa, melanomima i drugim tumorskim bolestima.²¹ Aktivna LKB1 je kompleks triju proteina: LKB1, STRAD (prema engl. *Ste20-related adaptor*) i MO25 (prema engl. *mouse protein 25*).²² S obzirom da je LKB1, za razliku od drugih kinaza, široko rasprostranjena, to je čini najvažnijom kinazom koja regulira AMPK. Druga kinaza koja može aktivirati AMPK je CaMKK β (prema engl. *Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase kinase β*) koja fosforilira i aktivira AMPK u odgovoru na povećanu unutarstaničnu koncentraciju kalcija,²³⁻²⁵ a zastupljena je uglavnom u mozgu te u T-limfocitima, timusu i testisima. Budući da povećanje citosolne koncentracije iona Ca²⁺ fiziološki potiče procese koji troše energiju, pogotovo u neuronima i T-limfocitima, smatra se da aktivacija AMPK-a pomoću CaMKK β predstavlja mehanizam kojim je moguće predvidjeti povećanu potrebu za ATP-om čak i prije nego što ona nastane.⁴ Treća kinaza koja aktivira AMPK je TAK1 (prema engl. *transforming growth factor- β -activated kinase 1*) koju aktiviraju citokini, ali njezina fiziološka uloga još nije do kraja razjašnjena.¹⁰

Ukratko, AMP i ADP nemaju izravnih učinaka na bilo koju od „uzvodnih“ kinaza već se vežu izravno za AMPK te uzrokuju konformacijske promjene AMPK-a koje potom pospješuju fosforilaciju ili koče defosforilaciju treoninskog ostatka 172. AMPK se tako aktivira više od 100 puta pri prijelazu iz nefosforiliranog u fosforilirani oblik, dok alosterička aktivacija nosi manji udio aktivacije.²⁶ Druga istraživanja pripisuju puno veću, pa čak i presudnu važnost alosteričkoj aktivaciji.²⁷ Dakle, iako i dalje traju rasprave o točnim mehanizmima aktivacije AMPK-a te o ulozi AMP-a i ADP-a u alosteričkoj aktivaciji, dosadašnje spoznaje o mehanizmima aktivacije AMPK-a pomoću AMP-a ili ADP-a možemo sažeti na sljedeći način:

- 1) vezanje AMP-a ili ADP-a za AMPK uzrokuje konformacijske promjene koje onda pospješuju fosforilaciju AMPK-a „uzvodnom“ kinazom LKB1,
- 2) vezanje AMP-a ili ADP-a uzrokuje konformacijske promjene koje koče defosforilaciju proteinskim fosfatazama,
- 3) vezanje AMP-a (ali ne i ADP-a) uzrokuje alosteričku aktivaciju već fosforilirane AMPK, a ATP antagonizira svaki od tih događaja.^{4,9,27-29}

1.1.1.4. AMPK i „nizvodni“ supstrati

Kao ključni enzim u održavanju energetske ravnoteže unutar stanice, AMPK djeluje na mnoge enzime koji su potrebni za održavanje normalne koncentracije ATP-a u stanici. Aktivirana AMPK potiče, primjerice, ulazak glukoze pomoću nosača GLUT1 i GLUT4, aktivnost 6-fosfofrukto-2-kinaze i glikolizu te ulazak masnih kiselina u stanicu i njihovu oksidaciju. AMPK koči sintezu glikogena tako što fosforilira i inaktivira glikogen-sintetazu, koči sintezu kolesterola fosforilacijom HMG-CoA reduktaze, koči sintezu masnih kiselina fosforilacijom ACC1, a triglicerida i fosfolipida inaktivacijom glicerolfosfat acil-transferaze. Također, AMPK koči transkripciju gena koji nose uputu za sintezu enzima zaduženih za glukoneogenezu, kao što su glukoza-6-fosfataza i fosfoenolpiruvat-karboksikinaza.^{4,7,30-33} Aktivacija AMPK-a utječe na starenje jer aktivira SIRT1 (sirtuin1, prema engl. *silent mating type information regulation 2 homolog 1*), a SIRT1 sudjeluje u održavanju duljine telomera te modulira mitohondrijsku funkciju tako što smanjuje slobodne kisikove radikale koji štete stanici i uzrokuju starenje.³⁴ Pri manjku glukoze, AMPK fosforilira protein p53 na serinskom ostatku 15 i tako uzrokuje zastoj u staničnom ciklusu.³⁵ Također, AMPK koči sintezu proteina jer koči kompleks mTORC1 (prema engl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1*) (Slika 1).

Zbog navedenih učinaka AMPK-a na zastoj u staničnom ciklusu i kočenje sinteze makromolekula bitnih u staničnom rastu, pretpostavljeno je da bi AMPK mogla imati važnu ulogu u supresiji tumora. Stoga se krenulo s istraživanjem moguće uloge AMPK-aktivatora metformina, dotad samo lijeka koji utječe na metabolizam te se primjenjuje u liječenju šećerne bolesti tipa II, kao lijeka koji bi mogao imati povoljni učinak u liječenju karcinoma.

1.1.2. Modulatori AMPK-a

1.1.2.1. Metformin – mehanizam djelovanja i primjena

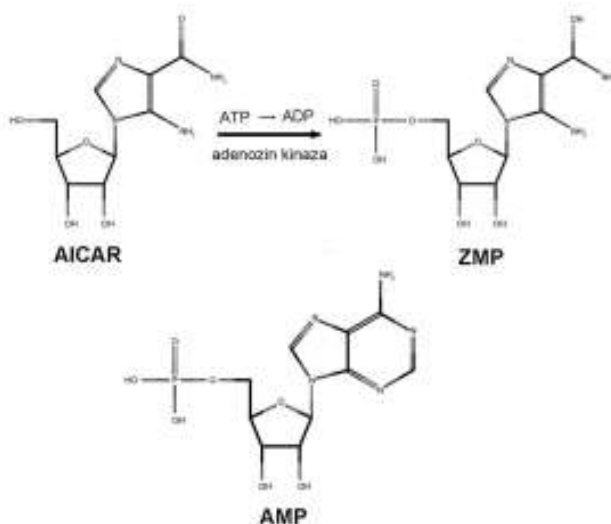
Metformin (1,1-dimetilbigvanid) je širom svijeta najkorišteniji lijek za liječenje hiperglikemije kod oboljelih od šećerne bolesti tipa II, te je, uz modifikaciju životnih navika, preporučen kao lijek prvog izbora kod takvih bolesnika. Iako je u kliničkoj uporabi još od 50-tih godina, točan mehanizam djelovanja metformina još nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da je jedan od razloga njegove antitumorske aktivnosti upravo djelovanje na AMPK, čiju su fosforilaciju tj. aktivaciju metforminom još prije 13 godina pokazali Zhou i sur.³⁶ Metformin najvjerojatnije ne aktivira izravno niti LKB1 niti AMPK već je to njegovo djelovanje sekundarno, zbog učinaka metformina na mitohondrije.^{12,37} Zbog svoje visoke kiseline disocijacijske konstante, metformin se u organizmu nalazi kao pozitivno nabijena protonirana molekula koja pasivnom difuzijom može samo djelomično proći kroz membranu te stoga metformin u stanicu ulazi putem nosača OCT1/OCT2 (prema engl. *organic cation transporter 1 i 2*). Pretpostavlja se da se zbog svog pozitivnog naboja metformin nakuplja unutar matriksa mitohondrija kamo ga vuče membranski potencijal, dok je hidrofobni kraj zadužen za vezanje za fosfolipide mitohondrijske membrane.³⁸ U mitohondriju, metformin inhibira respiracijski lanac na mitohondrijskoj membrani, posebno na razini kompleksa I, dok ne utječe ni na koji drugi korak u radu mitohondrija.³⁷⁻⁴⁰ Ovo jedinstveno svojstvo metformina smanjuje oksidaciju NADH, izbacivanje protona preko unutrašnje membrane mitohondrija i potrošnju kisika, što sve vodi do smanjenja gradijenta protona i posljedično manje sinteze ATP-a. Sve navedeno uzrokuje da zbog smanjenog omjera ATP-a i AMP-a metformin posredno aktivira AMPK. Drugi mogući mehanizam djelovanja metformina uključuje nastajanje sve više reaktivnih dušikovih spojeva (ONOO⁻) zbog inhibicije kompleksa I respiratornog lanca. ONOO⁻ aktiviraju PKC- ζ koja fosforilira LKB1 na Ser 428, a ta fosforilacija je potrebna kako bi se LKB1 premjestila iz jezgre u citoplazmu i tako aktivirala AMPK.^{41,42}

U kohortnoj studiji koja je obuhvaćala 12 000 oboljelih od šećerne bolesti tipa II, Evans i sur. su još 2005. godine ukazali na povezanost terapije metforminom sa smanjenim rizikom nastanka karcinoma.⁴³ Od tada, protutumorski učinak metformina dokazan je na stanicama mnogih solidnih tumora *in vitro*, kao što su tumori dojke, prostate, gušterače, kolona, pluća, jajnika i jetre.⁴⁴ U hematološkim bolestima, pokazano je da metformin ima značajno protuleukemijsko djelovanje *in vivo* u modelu miševa kojima je transplantirana

humana stanična linija AML,⁴⁵ da sprječava rast prekursora kronične mijeloične leukemije (CML) i rast stanica akutne limfatične leukemije (ALL) koje su pozitivne na Philadelphia kromosom,⁴⁶ te da koči proliferaciju T-stanične akutne limfatične leukemije (T-ALL)^{47,48} i limfoma.⁴⁹

1.1.2.2. AICAR – mehanizam djelovanja i primjena

AICAR (5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleozid ili 5-amino-1-β-D-ribofuranozil-imidazol-4-karboksamid, akadezin) je prvi i najčešće korišten spoj u svrhu aktivacije AMPK-a. Sullivan i sur. su 1994. godine opisali da AICAR prolazi kroz stanicu i stvara ZMP koji zbog svoje strukturne sličnosti s adenin nukleotidom oponaša sve alosteričke učinke AMP-a na AMPK.^{50,51} Uistinu, nakon ulaska u stanicu putem nosača za purinske nukleozide,⁵² AICAR ili AICA-ribozid se fosforilira pod djelovanjem adenozijske kinaze⁵³ u monofosforilirani oblik ZMP ili AICA-ribotid (Z se odnosi na imidazol), a ZMP potom aktivira AMPK istim mehanizmom kao i AMP (Slika 2). AICAR je i normalni intermedijarni metabolit u sintezi purina *de novo*.⁵⁴



Slika 2. Adenozijska kinaza fosforilira AICAR u aktivni oblik ZMP, a ZMP oponaša učinke AMP-a. Kratice (abecednim redom): AICAR (AICA-ribozid) – 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleozid; AMP – adenozin-monofosfat; ZMP (AICA-ribotid) – 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleotid.

Uloga AICAR-a u sintezi purina detaljno je istražena u kvasaca, a u ljudi se još istražuje uloga AICAR-a i enzima koji sudjeluju u sintezi purina u nastanku nekih metaboličkih bolesti nakupljanja.⁵⁴ Neovisno o učinku AICAR-a na AMPK, AICAR je isprva korišten kako bi blokirao ponovnu pohranu adenozina u ishemičnom srcu i tako smanjio ishemičnu ozljedu.⁵⁵ Nakon što je opisano da AICAR aktivirajući AMPK može uzrokovati hipoglikemiju u miševa,⁵⁶ povećalo se zanimanje za istraživanje metaboličkih učinaka AICAR-a u stanici te se AICAR danas koristi u brojnim studijama koje se bave metabolizmom i signalnim putevima inzulina. AICAR je postao iznova popularan kada je 2008. godine objavljeno da djeluje kao "vježbanje u tableti" jer je pokazano da u miševa dovodi do povećanja broja sporih aerobnih mišićnih vlakana i smanjenja brzih anaerobnih, a uz veću potrošnju masti,⁵⁷ a to je ubrzo rezultiralo i zlouporabom AICAR-a kod nekih sportaša. Od kada su opisani protutumorski učinci metformina kao aktivatora AMPK-a, i AICAR se sve više koristi u istraživanjima kao antitumorski agens u liječenju mnogih solidnih tumora.⁵⁸ U hematološkim bolestima, AICAR je pokazao citotoksične učinke na B-staničnu kroničnu limfocitnu leukemiju (B-CLL),⁵⁹ na B-stanice limfoma plaštenih stanica i limfoma stanica marginalne zone slezene,⁶⁰ CML⁴⁶ i stanice ALL-a.⁴⁸

1.1.3. mTOR

AMPK „nizvodno“ negativno regulira još jednu važnu kinazu, mTOR (prema engl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin*) te na taj način ove dvije evolucijski očuvane kinaze čine sponu između metaboličkog statusa stanice i regulacije staničnog rasta.

1.1.3.1. mTOR – građa i mehanizam djelovanja

mTOR je serin/treoninska proteinska kinaza u eukariota koja u stanici ima ključnu ulogu u mnogim biološkim procesima, kao što su kontrola staničnog ciklusa, diferencijacija, migracija stanica i energetska homeostaza. Kinaza mTOR ima bitnu ulogu u dijabetesu tipa II i rezistenciji na inzulinske učinke, a križna je točka mnogih signalnih putova za koje je dokazano da su konstitutivno aktivni u tumorima. Kao katalitička podjedinica, mTOR sudjeluje u stvaranju dvaju kompleksa: mTORC1 i mTORC2 (prema engl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1 i 2*) (Slika 3). Zasada je bolje istražen kompleks mTORC1 koji se sastoji od sljedećih proteina: mTOR, RAPTOR (prema engl. *regulatory-associated protein of mTOR*), PRAS40 (prema engl. *40kDa proline-rich AKT substrate*), DEPTOR (prema engl. *DEP domain-containing mTOR-interacting protein*) i mLST8 (prema engl. *mammalian lethal with SEC13 protein 8*). Proteini RAPTOR i PRAS40

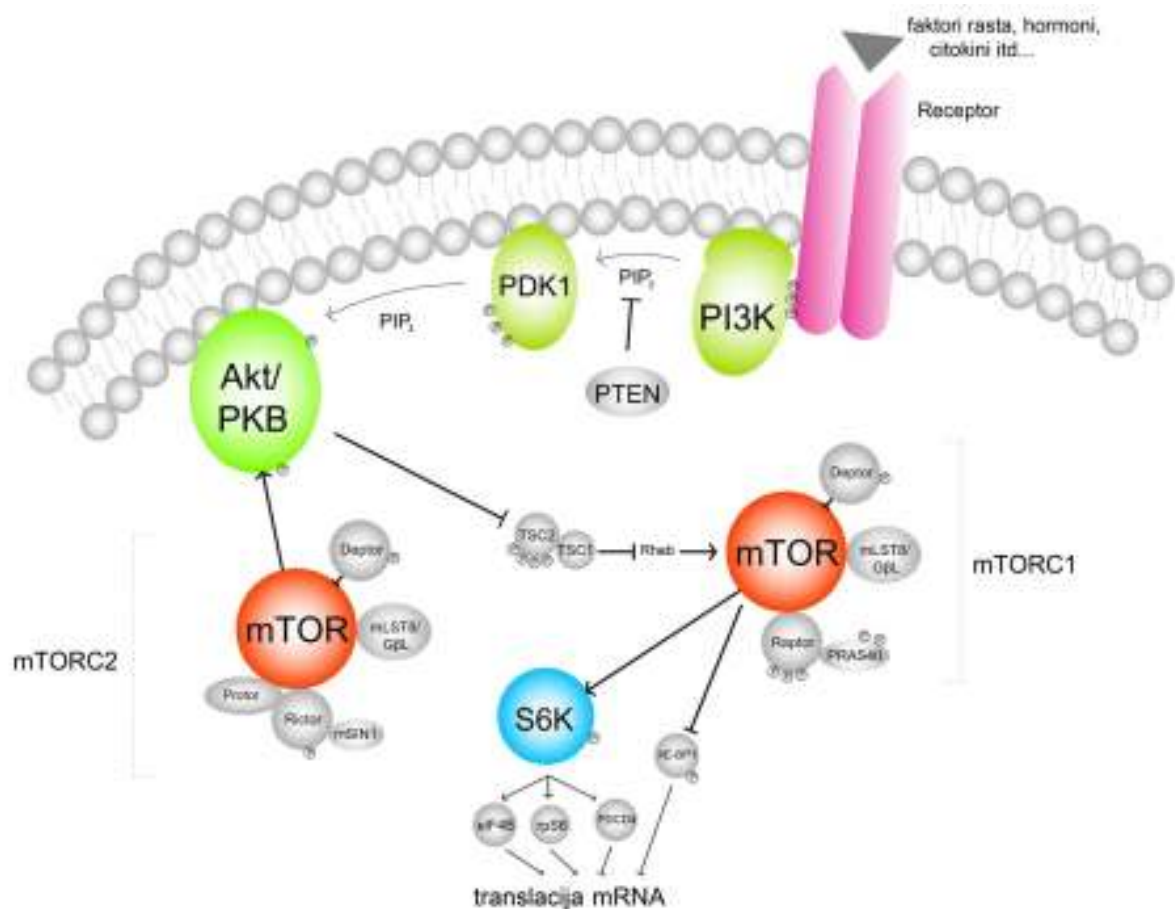
se nalaze isključivo u mTORC1, a ostali proteini su isti u oba kompleksa. mTORC1 ima ključnu ulogu u staničnom rastu jer regulira biosintezu ribosoma i translaciju proteina. Naime, mTOR fosforilira i aktivira p70 S6-kinazu, a p70 S6K potom veže ili fosforilira druge proteine koji su bitni za translaciju proteina, kao što su eIF4B (prema engl. *eukaryotic initiation factor 4B*), eEF2K (prema engl. *eukaryotic elongation factor 2 kinase*) i rpS6 (prema engl. *ribosomal protein S6*). Druga ciljna molekula mTORC1 je molekula 4E-BP1, koju mTOR fosforilira te tako inaktivira. Aktivna ili defosforilirana 4E-BP1 sprječava translaciju mRNA tako da se veže za eIF4E (prema engl. *eukaryotic initiation factor 4E*). Nakon što mTORC1 fosforilira 4E-BP1, molekula se odvaja od eIF4E, a eIF4E potom veže eIF4G i započinje translaciju.⁶¹⁻⁶⁴ Logično, u uvjetima obilja hranjivih tvari i povećanih koncentracija inzulina, mTOR i sinteza proteina su aktivirani djelovanjem mnogih čimbenika rasta i to putem signalnog puta fosfatidil-inozitol 3-kinaza (PI3K)/Akt/mTOR, dok s druge strane, u već spomenutim situacijama staničnog stresa, AMPK inhibira aktivnost mTOR-a i sprječava rasipanje prijeko potrebne energije na sintezu proteina.

AMPK inhibira aktivnost mTOR-a tako što aktivira kompleks tuberozne skleroze 1/2 (TSC1/TSC2, prema engl. *tuberous sclerosis complex 1/2*) fosforilacijom TSC2 na treoninskom ostatku 1227 i serinskom ostatku 1345, a TSC1/TSC2 potom inaktivira Rheb i smanjuje aktivnost mTOR-a.⁶⁵ Drugi mehanizam kojim AMPK inhibira aktivnost mTOR-a je izravna fosforilacija RAPTOR-a na Ser-722 i Ser-792,⁶⁶ što uzrokuje vezanje RAPTOR-a za proteine 14-3-3 i inaktivaciju kompleksa mTORC1.^{4,28,31,58,63,64}

1.1.3.2. mTOR i „uzvodna“ regulacija

Signalni put PI3K/Akt/mTOR ima ključnu ulogu u raznim fiziološkim procesima, kao što su stanični ciklus, transkripcija, translacija, diferencijacija, apoptoza i metabolizam, ali predstavlja i jedan od glavnih putova koji su konstitutivno aktivni u mnogim tumorima uključujući i hematološke maligne bolesti.^{61,67-70}

Obitelj PI3-kinaza fosforilira fosfatidil-inozitole i fosfoinozitide na položaju 3' u molekuli inozitola. Obitelj PI3K sastoji se od tri skupine, a najbolje istražena je skupina I, kako u signalnom putu inzulina i različitih čimbenika rasta, tako i u povezanosti s onkogenezom. PI3K skupine I su heterodimeri koji se sastoje od regulatorne i katalitičke podjedinice, a dodatno se dijele na dvije podskupine u ovisnosti o tipu receptora za koje su vezane; podskupina IA se aktivira pomoću receptorskih tirozinskih kinaza, a podskupina IB se aktivira interakcijom s $\beta\gamma$ -podjedinicom G-proteina.⁷¹



Slika 3. Signalni put PI3K/Akt/mTOR – „uzvodna“ regulacija i „nizvodni“ supstrati. Kratice (abecednim redom): 4E-BP1 – (prema engl. *eIF4E-binding protein 1*); Akt/PKB – Akt/proteinska kinaza B; DEPTOR – (prema engl. *DEP domain-containing mTOR-interacting protein*); eIF4B – (prema engl. *eukaryotic initiation factor 4B*); mLST8/GβL – (prema engl. *mammalian lethal with SEC13 protein 8/G protein β subunit-like*); mSIN1 – (prema engl. *mammalian stress-activated protein kinase (SAPK)-interacting protein-1*); mTORC1 – kompleks 1 ciljne molekule rapamicina u sisavaca; mTORC2 – kompleks 2 ciljne molekule rapamicina u sisavaca; PDCD4 – (prema engl. *programmed cell death protein 4*); PDK1 – (prema engl. *3-phosphoinositide dependent protein kinase-1*); PI3K – fosfatidil-inozitol 3-kinaza; PIP₃ – fosfatidil-inozitol-3,4,5-trifosfat; PRAS40 – (prema engl. *proline-rich AKT substrate 40*); PROTOR – (prema engl. *protein observed with RICTOR*); PTEN – (prema engl. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*); RAPTOR – (prema engl. *regulatory-associated protein of mTOR*); Rheb – (prema engl. *Ras homologue enriched in brain*); RICTOR – (prema engl. *rapamycin-insensitive companion of mTOR*); rpS6 – (prema engl. *ribosomal protein S6*); S6K – S6 kinaza; TSC1/2 – kompleks tuberozne skleroze 1/2

Vežanje nekog čimbenika rasta ili inzulina za receptor potiče njegovu autofosforilaciju na tirozinskim ostacima i aktivaciju. Ta autofosforilacija receptora uzrokuje premještanje PI3K-a iz citoplazme prema staničnoj membrani, PI3K se potom veže za fosfotirozinske ostatke receptora izravno ili putem nekog adaptora, kao što je primjerice molekula IRS (prema engl. *insulin receptor substrate*). Aktivirana PI3K fosforilira fosfatidil-inozitol-4,5-bisfosfat (PI-4,5-P₂, PIP₂) u fosfatidil-inozitol-3,4,5-trisfosfat (PI-3,4,5-P₃, PIP₃). PIP₃ je drugi glasnik kojega vežu druge molekule pomoću svoje domene PH (prema engl. *pleckstrin homology*), a takve domene nalaze se u molekuli PDK1 (prema engl. *3-phosphoinositide dependent protein kinase-1*) i molekuli Akt. Akt je serin/treoninska kinaza koja se još naziva i proteinska kinaza B (PKB). Nakon premještanja uz membranu, Akt se u potpunosti aktivira fosforilacijom na treoninskom ostatku 308 pomoću kinaze PDK te fosforilacijom na serinskom ostatku 473 koju posreduje mTORC2.^{62,72-74} Akt fosforilira brojne supstrate, a prvi supstrat koji je odgovoran za susljednu regulaciju mTOR-a je tuberin ili TSC2. TSC2 je protein koji ima aktivnost GTP-aze i koji s hamartinom ili proteinom TSC1 tvori heterodimerni kompleks tuberozne skleroze TSC1/2. Nakon što Akt fosforilira TSC2, smanjuje se njezina GTP-azna aktivnost, a to omogućuje nakupljanje malog G-proteina Rheb (prema engl. *Ras homologue enriched in brain*), direktnog supstrata TSC2, u aktivnom obliku koji veže GTP (Rheb-GTP). Ovako aktivirani Rheb aktivira „nizvodnu“ proteinsku kinazu mTOR, ali nije još do kraja razjašnjeno kojim točno mehanizmom.^{62-64,74} Zanimljivo je spomenuti da je uloga TSC1 i TSC2 u regulaciji staničnog rasta po prvi puta opisana u modelu vinske mušice (*D. melanogaster*) u kojemu je mutacija homologa Tsc1 i Tsc2 uzrokovala prekomjerni rast organa zbog aktivacije proteina Rheb i mTOR.^{75,76} Akt posredno regulira aktivnost mTOR-a i putem proteina PRAS40 koji normalno koči mTOR jer fosforilira PRAS40 i tako uklanja njegov inhibicijski učinak.^{62-64,74}

Jednom aktivirana, kinaza mTOR mehanizmom negativne povratne sprege koči aktivnost proksimalnih komponenti signalnog puta. Tako se prekomjerna aktivacija mTOR-a u šećernoj bolesti tipa II povezuje s rezistencijom perifernih tkiva na učinke inzulina. Kronična aktivacija mTOR-a, koja nastaje zbog opetovane stimulacije signalnog puta PI3K/Akt i trajno povećane koncentracije ATP-a, potiče fosforilaciju i aktivaciju p70 S6K, a aktivirana p70 S6K fosforilira i koči aktivnost IRS-a. Zbog inaktivacije IRS-a, inzulin više ne može aktivirati signalne putove pa tako ni potaknuti ulazak glukoze u stanicu.^{62,63,77}

Brojna istraživanja pokazala su da su signalni putovi koji reguliraju aktivnost mTOR-a konstitutivno aktivni u malignim bolestima.^{61,68-70} Tako je već pojašnjena uloga LKB1 u

Peutz-Jeghersovom sindromu. Tuberozna skleroza je još jedan nasljedni sindrom kojeg karakteriziraju tumori u različitim organima, a uzrokovan je mutacijom TSC1 ili TSC2. U mnogim tumorima povećana je aktivnost signalnog puta PI3K/Akt zbog manjka aktivnosti male fosfataze PTEN (prema engl. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), koja u fiziološkim uvjetima defosforilira PIP₃ i tako koči stanični odgovor na čimbenike rasta.^{61,78} Konstitutivna aktivacija signalnog puta PI3K/Akt/mTOR dokazana je i u leukemijama te se ovaj signalni put smatra jednim od najvažnijih signalnih puteva u proliferaciji i preživljenju leukemijskih stanica.^{67,79}

1.1.4. Inhibitori mTOR-a

Farmakološki inhibitor mTOR-a je rapamicin, poznat i kao sirolimus. Rapamicin je otkriven 1970-tih godina u uzorku tla na Uskršnjim otocima (Rapa-Nui) kao metabolit s potencijalnom antifungalnom aktivnošću kojega proizvodi bakterija *Streptomyces hygroscopicus*. Metabolit je pročišćen, kemijskom analizom utvrđeno je da pripada makrocikličkim laktonima te je dobio ime rapamicin prema mjestu svoga otkrića. Ubrzo je otkriveno da rapamicin ima određena imunosupresivna svojstva te da koči proliferaciju stanica sisavaca. Ciljna molekula rapamicina (TOR, prema engl. *target of rapamycin*) identificirana je 1991. godine u mutantama kvasaca koje su bile neosjetljive na rapamicin, a mutirani geni nazvani su TOR1 i TOR2.⁸⁰ Homolozi TOR-a u sisavaca, mTOR (prema engl. *mammalian target of rapamycin*), otkriveni su 1994. godine.^{81,82} Nakon što uđe u stanicu, rapamicin se veže velikom afinitetom za ubikvitarnu peptidil-prolinsku izomerazu FKBP12 (prema engl. *FK506-binding protein of 12 kDa*), a taj kompleks rapamicin-FKBP12 se veže za domenu FRB (prema engl. *FKBP12-rapamycin binding*) na molekuli mTOR-a što koči aktivnost enzima mehanizmom koji još nije razjašnjen.^{62,83-85}

Rapamicin i njegovi derivati (temsirolimus i everolimus) klinički su najbolje razvijeni inhibitori signalnog puta PI3K/Akt/mTOR, ponajviše stoga što se primjenjuju kao imunosupresivni lijekovi u transplantaciji srca⁸⁶ i bubrega.⁸⁷ Protutumorski učinak derivata rapamicina dokazan je u mnogim malignim bolestima, a trenutno su everolimus i temsirolimus odobreni u liječenju karcinoma bubrega, te u kombinaciji s drugim lijekovima u liječenju nekih uznapredovalih oblika karcinoma dojke i drugih tumora.^{61,88} Pretklinička istraživanja su pokazala citostatske učinke na stanice akutne mijeloične leukemije.⁸⁹⁻⁹¹

Međutim, rezultati kliničkih istraživanja učinaka derivata rapamicina kao jedinog lijeka u liječenju AML-a, pokazala su odgovor u četiri od devet bolesnika tretiranih

sirolimusom,⁹⁰ pet od 23 bolesnika tretiranih deforolimusom⁹² te izostanak odgovara u devet bolesnika tretiranih everolimusom.⁹³

Slabi učinci inhibitora mTOR-a u monoterapiji mogu se dijelom pripisati učincima inhibicije mTOR-a na aktivaciju proksimalnih komponenti signalnog puta mehanizmom povratne sprege budući da se aktivacija i fosforilacija Akt-a često zamjećuje u tumorskim stanicama koje su tretirane rapamicinom.^{94,95} U uzorcima AML-a pokazano je da everolimus aktivira PI3K/Akt tako što pospješuje signaliziranje i izražaj receptora za IGF (prema engl. *insulin-like growth factor*), a istodobna inhibicija PI3K i mTOR-a sprječava povratnu aktivaciju Akt-a potaknutu rapamicinom.^{73,96} I u drugim tumorima pokazano je da se učinkovitost rapamicina *in vitro* povećava istodobnom primjenom LY 294002 kao inhibitora PI3K.^{94,96} S obzirom da je pokazana aktivacija mTOR-a u primarnim uzorcima pacijenata, ali slabi klinički odgovor pri liječenju samo inhibitorom mTOR-a, sve izglednije je da je potrebno kombinirati različite agense kako bi odgovor pacijenata bio što bolji uz što manje nuspojava.^{61,88}

Uloga kinaze mTOR i rapamicina u diferencijaciji leukemijskih stanica je slabije istražena. Iako se aktivacija signalnog puta PI3K/Akt smatra glavnim signalom proliferacije i preživljenja, naša su prethodna istraživanja pokazala da se povećana aktivnost Akt-a može zamijetiti i tijekom diferencijacije stanica leukemijskih linija HL-60 i NB4.⁹⁷ Budući da inhibicija mTOR-a rapamicinom pospješuje aktivaciju Akt-a, rapamicin pospješuje diferencijaciju stanica HL-60 i NB4 u odgovoru na sve-*trans* retinsku kiselinu (ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*).^{98,99} Dodatno, pokazano je da rapamicin pospješuje diferencijaciju stanica monocitne linije U937 u odgovoru na vitamin D₃.¹⁰⁰

1.2. Akutna mijeloična leukemija (AML)

Akutna mijeloična leukemija (AML) je heterogena skupina hematoloških neoplazmi kojima je zajedničko obilježje zastoj u normalnom sazrijevanju mijelopoetskih stanica nastao zbog niza genomskih promjena krvotvorne matične stanice. S obzirom da su stanice zaustavljene u ranom stadiju diferencijacije, a da su sposobnost diobe i preživljenje tumorski promijenjene stanice povećani, sve se više nezrelih blasta nakuplja u koštanoj srži i krvi što ometa rast i razvoj normalnih krvnih stanica.¹⁰¹ Farmakološka terapija AML-a uglavnom uključuje kombinacije citarabina s nekim od antraciklina, ali odgovor na terapiju i ukupno

preživljenje, pogotovo kod starijih pacijenata, za sada nisu zadovoljavajući. S obzirom na opće starenje populacije te najveću incidenciju AML-a kod starijih, AML danas predstavlja sve veći zdravstveni problem.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Akutne mijeloične leukemije se prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, prema engl. *World Health Organization*) dijele s obzirom na citogenetiku, molekularne promjene, morfologiju, imunofenotipizaciju, citokemiju i prognozu,¹⁰⁵ ali još je u upotrebi i stara citomorfološka klasifikacija koju su predložili francusko-američko-britanski autori (FAB) iz 1976. godine.¹⁰⁶ Prema klasifikaciji FAB, leukemije se dijele u 8 podskupina prema vrsti i stupnju zrelosti stanice iz koje je klonalnim umnažanjem nastala leukemija (Tablica 1).

Tablica 1. FAB-klasifikacija akutnih mijeloičnih leukemija (prema Bennetu¹⁰⁶)

Oznaka	Naziv	Osobitost
AML-M0	Minimalno diferencirana AML	Leukemijski blasti bez obilježja mijeloidne loze
AML-M1	AML bez sazrijevanja	Slabo diferencirani blasti
AML-M2	AML sa sazrijevanjem	Sazrijevanje do promijelocita, rijetko zreliji oblici
AML-M3	Akutna promijelocitna leukemija (APL)	Stanice nalik na promijelocite
AML-M4	Akutna mijelomonocitna leukemija	Nalik na nezrele stanice granulocitne i monocitne loze
AML-M5	Akutna monoblastna/monocitna leukemija (AmoL)	Stanice nalik na monoblaste (nezreliji oblik M5a) ili promonocite i monocite (zreliji oblik M5b)
AML-M6	Akutna eritroidna leukemija	>30% eritroblasta u koštanoj srži
AML-M7	Akutna megakariocitna leukemija	Morfološki se ne razlikuje od mijeloblasta (stoga je potrebno dokazati biljeg CD24b)

1.2.1. AML i sve-*trans* retinska kiselina (ATRA)

Najuspješnija farmakološka terapija AML-a je diferencirajuća terapija akutne promijelocitne leukemije (APL) ATRA-om. APL je zasebna podskupina leukemije, AML-M3 prema klasifikaciji FAB, koja sadrži tipičnu translokaciju t(15;17) pa se prema klasifikaciji WHO svrstava u skupinu AML-a s povratnim genetičkim poremećajima.¹⁰⁵ U prošlosti, APL je bila smrtonosna bolest s diseminiranom intravaskularnom koagulacijom kao čestom komplikacijom, ali otkad je ATRA uvedena kao metoda liječenja, APL doseže stope izlječenja od čak 90%.^{107,108} Još 70-tih godina Sachs i sur. su pokazali da se leukemijske stanice mogu potaknuti na diferencijaciju,¹⁰⁹ ali pravi preokret bilo je otkriće iz 1980. godine da leukemijska stanična linija HL-60 diferencira u morfološki i funkcionalno zrelije oblike nakon tretmana ATRA-om.¹¹⁰ Ubrzo je uslijedilo i testiranje na bolesnicima,¹¹¹⁻¹¹³ a ATRA se

pokazala kao „čudotvoran“ lijek koji je uvodio pacijente u kompletnu remisiju. ATRA se danas koristi u liječenju APL-a u kombinaciji s citostaticima kako bi se postigle veće stope uvođenja u remisiju te da se izbjegnu nuspojave liječenja ATRA-om, kao što je sindrom retinske kiseline.¹⁰⁷ Smatra se da je APL selektivno osjetljiva na ATRA-u jer translokacija t(15;17) nosi uputu za sintezu fuzijskog proteina PML/RAR α (prema engl. *promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor α*) koji djeluje kao represor te sprječava normalnu diferencijaciju stanica. Dodavanje farmakoloških koncentracija ATRA-e uklanja inhibicijske učinke fuzijskog proteina i potiče diferencijaciju stanica u granulocitnom smjeru.¹⁰⁸

ATRA je jedan od stereoizomera retinske kiseline koja ima važnu fiziološku ulogu u regulaciji stanične proliferacije i diferencijacije. ATRA se veže za jezgrine receptore, nešto većim afinitetom za receptor retinske kiseline (RAR, prema engl. *retinoic acid receptor*) i manjim afinitetom za retinski X-receptor (RXR, prema engl. *retinoid X receptor*) koji su vezani za specifične sekvence DNA koje nadziru transkripciju (*RARE*, prema engl. *RAR responsive element*, *RXRE*, prema engl. *RXR responsive element*). U fiziološkim uvjetima, kada nema liganda koji bi se vezao za RAR α , RAR α tvori heterodimere s RXR i privlači korepresorske proteine s aktivnošću histonskih deacetilaza (HDAC, prema engl. *histone deacetylase*) koji potiču kondenzaciju kromatina i koče transkripciju. Fiziološke doze ATRA-e uzrokuju otpuštanje tih korepresora s heterodimera, a privlače koaktivatore koji djeluju kao histon-acetiltransferaze (HAC, prema engl. *histone acetyltransferase*) i potiču transkripciju.¹¹⁴⁻¹¹⁶ U APL, translokacija t(15;17) uzrokuje fuziju PML-a s kromosoma 15 koji djeluje kao tumorski supresor¹¹⁷ s izoformom RAR- α s kromosoma 17. Taj fuzijski protein stvara homodimere koji se vežu za sekvence *RARE*, privlače korepresore još jačim afinitetom i tako koče transkripciju. ATRA, dodana u farmakološkim dozama, degradira protein PML-RAR α i uzrokuje disocijaciju korepresora i DNA.^{107,108}

Budući da se glavnim mehanizmom djelovanja ATRA-e smatra učinak na fuzijski protein PML/RAR α , klinička primjena ATRA-e ograničena je na leukemije s dokazanom translokacijom t(15;17). Međutim, zanimljivo je da linija HL-60 u kojoj je po prvi puta opisan diferencirajući učinak ATRA-e¹¹⁰ uopće ne sadrži translokaciju t(15;17) te se svrstava u AML-M2. Očito je da se svi učinci ATRA-e ne mogu pripisati isključivo učincima na fuzijski protein i transkripciju gena,¹¹⁴ a brojne studije pokazale su da ATRA pobuđuje aktivaciju različitih signalnih puteva koji reguliraju proliferaciju i diferencijaciju, kao što su signalni put ERK1/2 (prema engl. *extracellular signal-regulated kinase*) ili MAPK (prema engl. *mitogen-activated protein kinase*),¹¹⁸ PI3K,¹¹⁹ Akt⁹⁷ i mTOR.¹²⁰ Pojedini modulatori signalnih puteva

predloženi su u kombinaciji s ATRA-om kao diferencirajuća terapija onih AML koje nisu APL.¹⁰⁸

1.2.2. Leukemijske linije kao modeli diferencijacije leukemijskih stanica

1.2.2.1. Leukemijska linija HL-60

Leukemijska linija HL-60 jedna je od najčešće korištenih humanih leukemijskih linija za istraživanje mehanizama proliferacije i diferencijacije hematopoetskih stanica. Linija HL-60 izolirana je 1977. godine iz krvi 36-godišnje pacijentice koja je bolovala od akutne promijelocitne leukemije.¹²¹ Stanice rastu u suspenziji u mediju koji sadrži fetusni goveđi serum (FBS, prema engl. *fetal bovine serum*) s vremenom udvostručenja oko 30-40 sati, te nisu ovisne o drugim specifičnim čimbenicima rasta, a na polukrutoj podlozi mogu stvarati kolonije. U staničnoj kulturi stanice izgledaju kao promijelociti i mijeloblasti, a znatno rjeđe kao mijelociti i nešto zrelije stanice nalik granulocitima. Citokemijska obilježja ove linije su pozitivna reakcija na mijeloperoksidazu, kloroacetat esterazu i Sudansko crnilo B, a negativna na alkalnu fosfatazu i nespecifičnu esterazu.¹²¹⁻¹²⁴ Stanice HL-60 na površini izražavaju biljege CD11a, CD13, CD15, CD33, CD117, a ne izražavaju CD9, CD14 i CD56.¹²⁵ Citogenetski, stanice HL-60 nemaju tipičnu translokaciju t(15;17) te se stoga svrstavaju u skupinu mijeloblastičnih AML-M2, a ne promijelocitnih AML-M3.¹⁰⁸ Zanimljivo je da linija HL-60 na kojoj je po prvi puta opisan diferencirajući učinak ATRA-e *in vitro*¹¹⁰ danas uopće ne bi udovoljavala kliničkim kriterijima za primjenu ATRA-e *in vivo*.

Osim ATRA-e, diferencijaciju stanica HL-60 u granulocitnom smjeru potiče još i dimetil-sulfoksid (DMSO)^{126,127} te ciklički AMP.¹²⁸ Čimbenik nekroze tumora α (TNF α , prema engl. *tumor necrosis factor α*), vitamin D₃ i interferon γ potiču diferencijaciju stanica HL-60 u stanice s nekim obilježjima zrelih monocita, a forbolski esteri (PMA, prema engl. *phorbol 12-myristate 13-acetate*) u stanice nalik makrofagima.¹²³

1.2.2.2. Leukemijska linija NB4

Stanice leukemijske linije NB4 su tipične stanice akutne promijelocitne leukemije koje sadrže translokaciju t(15;17) te se svrstavaju u AML-M3 prema FAB-klasifikaciji. Linija je izolirana 1989. godine iz uzorka koštane srži bolesnice s relapsom APL-a.¹²⁹ Stanice NB4 rastu u mediju koji sadrži FBS s vremenom udvostručenja od 36 do 40 sati, morfološki imaju obilježja mijeloblasta, ali ne sadrže zrnca koja su tipična za APL. Citokemijski, stanice su pozitivne na mijeloperoksidazu, a negativne na nespecifičnu esterazu. Imunofenotipski, na

membranama izražavaju mijeloidne biljege CD13, CD15 i CD33, slabo su pozitivne na CD11b, a ne izražavaju CD34, CD64, CD117 i HLA-DR. Stanice izražavaju i neke biljege karakteristične za limfocite T, kao što su CD2 i CD4, te CD9 kao biljeg monocita.^{125,129} Stanice se mogu diferencirati dodatkom ATRA-e^{125,129,130} ili DMSO-a¹³¹ u granulocitnom smjeru, a forbolski esteri i vitamin D₃ potiču diferencijaciju u monocitno/makrofagnom smjeru.¹³²

1.2.2.3. Leukemijska linija U937

Leukemijska linija U937 jedna je od rijetkih linija čije stanice sadrže mnoga obilježja monocita te je zbog toga korisna kao model za proučavanje diferencijacije monocita i makrofaga *in vitro*. Linija je izolirana 1976. godine iz pleuralnog izljeva 37-godišnjeg bolesnika oboljelog od difuznog histiocitnog limfoma.¹³³ Stanice U937 rastu u suspenziji u mediju koji sadrži FBS, neovisne su o specifičnim čimbenicima rasta, vrlo rijetko adheriraju za druge stanice u kulturi te nije primijećen rast u agregatima. U kulturi, stanice U937 rastu s vremenom udvostručenja od 20 do 48 sati te pokazuju morfološka obilježja monoblasta. Citokemijski, stanice su pozitivne na nespecifičnu esterazu, kloroacetat esterazu te Sudansko crnilo B, a negativne na alkalnu fosfatazu, kiselu fosfatazu i peroksidazu.^{122,133}

Imunofenotipski, stanice U937 izražavaju CD4, CD11a, CD18, CD32 i CD64, u malom postotku pozitivne su na CD11b, CD14, CD95 i CD117 (c-kit), a ne izražavaju CD16¹³⁴. Citogenetski, stanice U937 sadrže translokaciju t(10;11) koja nosi uputu za sintezu fuzijskog proteina PICALM (prema engl. *clathrin assembly lymphoid myeloid leukaemia/MLLT10(AF10)* (prema engl. *myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia [trithorax, Drosophila, homolog]; translocated to 10; alias AF10*).¹³⁵

Stanice U937 mogu se diferencirati uz pomoć različitih agensa, kao što su forbolski esteri, retinska kiselina, 1,25-dihidroksivitamin D₃, interferon γ i DMSO u smjeru stanica koje nalikuju monocitima ili makrofagima.^{122,136-138}

1.2.2.4. Leukemijska linija K562

Linija K562 je multipotentna leukemijska linija, a stanice nalikuju ranim mijeloblastima i/ili eritroblastima. Linija je izolirana 1975. godine iz pleuralne tekućine 53-godišnje bolesnice koja je bolovala od kronične mijeloične leukemije u blastnoj krizi.¹³⁹ Stanice K562 rastu u suspenziji u mediju s dodatkom FBS-a, a broj stanica se udvostručuje svakih 12 sati, što je znatno kraće od vremena udvostručenja drugih staničnih linija.^{124,139}

Stanice izgledaju kao nediferencirani blasti, promjera oko 15 μm , bazofilne citoplazme bez granula te s jezgrom koja sadrži dvije ili više jezgrića i nepravilno granulirani kromatin.^{124,139} Citokemijski, stanice su negativne na peroksidazu, Sudansko crnilo B i kloroacetat esterazu, a pozitivne su na kiselu fosfatazu.¹²⁴ Glavno citogenetsko obilježje stanica K562 je translokacija kromosoma 9 i 22, tzv. Philadelphia kromosom, zbog koje nastaje onkogen koji se sastoji od dijela *BCR* (prema engl. *breakpoint cluster region*) s 22. kromosoma i *ABL* (prema engl. *Abelson*) s 9. kromosoma, a fuzijski protein BCR/ABL djeluje kao tirozinska kinaza.^{135,139}

Butirat i hemin potiču diferencijaciju stanica K562 u stanice s obilježjima eritrocita, DMSO smanjuje izražaj eritrocitnih biljega, a forbolski esteri potiču diferencijaciju u smjeru megakariocita.¹⁴⁰ Izražaj biljega CD41 povećava se tijekom diferencijacije u smjeru megakariocita, a izražaj glikoforina ili CD235a tijekom eritroidne diferencijacije.¹⁴¹

1.2.2.5. Leukemijska linija KG-1

Leukemijska linija KG-1 sastoji se uglavnom od vrlo nezrelih mijeloblasta. Linija je izolirana 1978. godine iz koštane srži 59-godišnjeg pacijenta koji je bolovao od eritroleukemije, a koja se razvila u akutnu mijeloičnu leukemiju.¹⁴² Stanice KG-1 rastu u suspenziji u mediju s dodatkom FBS-a i srednjim vremenom udvostručenja od 40 do 50 sati. Citokemijski, stanice su pozitivne na kloroacetat-esterazu.^{142,143} Imunofenotipski, pozitivne su na molekule MHC skupine I i II, CD13, CD33, CD3 i CD45, a negativne na CD1a i CD14.¹⁴⁴

Forbolski esteri potiču diferencijaciju stanica KG-1 u makrofagnom smjeru, a DMSO ne potiče izražaj granulocitnih biljega.¹⁴³ Stanice KG-1 mogu izražavati i biljege dendritičkih stanica nakon izlaganja forbolskim esterima ili kombinaciji GM-CSF-a (prema engl. *granulocyte monocyte-colony stimulating factor*) i TNF- α .¹⁴⁴

1.2.3. DMSO i diferencija leukemijskih stanica

DMSO je organski sumporni spoj s dvije hidrofobne metilne skupine i jednom hidrofilnom sulfoksidnom skupinom, kemijske formule $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$. Zahvaljujući svojim amfifilnim svojstvima, DMSO povećava propusnost membrana te olakšava njihovu međusobnu fuziju i prilagodbu na osmotski i mehanički stres pa se zbog toga koristi kao dodatak mediju pri zamrzavanju. Dodatno, DMSO je izvrsno otapalo, a s obzirom da prodire kroz membrane bez da ih ošteti, koristi se i kao dodatak mnogim lijekovima za površinsku primjenu.¹⁴⁵ DMSO je stari i dugo proučavani spoj koji ima brojne učinke na upalu, stanični

ciklus, apoptozu ili metabolizam lipida, a iako neke svoje učinke duguje specifičnoj kemijskoj strukturi, točan mehanizam djelovanja DMSO-a u stanicama još nije razjašnjen.¹⁴⁶

Uloga DMSO-a u diferencijaciji prvi puta je pokazana na mišjoj eritroleukemiji,¹⁴⁷ a rezultati su pokazali da učinci na diferencijaciju koreliraju s učincima na staničnu membranu.¹⁴⁸ Potom je opisano da inkubacija stanica HL-60 s 1,25%-tnim DMSO-om potiče morfološko i funkcionalno sazrijevanje stanica u granulocitnom smjeru.¹²⁶ Od tada, opisani su brojni učinci DMSO-a na diferencijaciju ne samo leukemijskih,^{131,149} već i drugih staničnih linija, uključujući i pluripotentne matične stanice.¹⁵⁰ Tanaka i sur. pretpostavili su da DMSO slobodno difundira u stanici do jezgre i tamo mijenja konformacije kompleksa DNA ili DNA i proteina te tako pospješuje transkripciju gena potrebnih za diferencijaciju.¹⁵¹ U pluripotentnim matičnim stanicama, DMSO aktivira protein Rb (retinoblastoma) i zastoj u ranoj G₁-fazi staničnog ciklusa, a to povećava njihovu sposobnost završne diferencijacije.¹⁵⁰

Iako su mehanizmi djelovanja DMSO-a nedovoljno razjašnjeni, može se pretpostaviti da se mehanizam razlikuje od mehanizma djelovanja ATRA-e ili vitamina D₃ koji su tipični ligandi receptora u jezgri. U mijelomonoblastičnoj liniji PLB-985 koja je otporna na diferencirajući učinak ATRA-e, DMSO i dalje potiče granulocitnu diferencijaciju, a ATRA samo pospješuje apoptozu.¹³¹ Nadalje, ATRA smanjuje, a DMSO povećava osjetljivost stanica HL-60 na apoptozu potaknutu s TNF- α .¹²⁷ Naša prethodna istraživanja učinaka diferencirajućih agonista na aktivnost Akt-a u jezgrama stanica HL-60 i NB4 pokazala su da dugotrajna inkubacija stanica s ATRA-om povećava aktivnost Akt-a, ali da se ovi učinci ne zamjećuju u stanicama tretiranim drugim agonistima diferencijacije, kao što je DMSO.⁹⁷ Nedavna istraživanja opisala su povoljan učinak rapamicina na izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama potaknutim ATRA-om^{98,99} i vitaminom D₃,¹⁰⁰ te pokazala da učinci rapamicina ovise o aktivnosti signalnog puta PI3K/Akt.⁹⁸ Mogući učinci inhibicije aktivnosti mTOR-a na diferencijaciju stanica akutnih mijeloičnih linija u odgovoru na druge promicatelje granulocitne diferencijacije još nisu istraženi.

2. HIPOTEZA

Aktivacija AMPK-a i inhibicija mTOR-a pospješuje diferencijaciju stanica APL i stanica AML koje ne sadrže translokaciju t(15;17).

3. CILJEVI

3.1. Opći cilj istraživanja

Odrediti ulogu signalnog puta AMPK/mTOR u diferencijaciji stanica akutne mijeloične leukemije.

3.2. Specifični ciljevi istraživanja

1. ispitati ulogu inhibitora mTOR-a na diferencijaciju stanica APL i AML koje nisu APL u odgovoru na DMSO koji potiče diferencijaciju u granulocitnom smijeru neovisno o fuzijskom proteinu PML/RAR α .
2. ispitati učinke modulatora AMPK-a na proliferaciju i diferencijaciju kontrolnih stanica i stanica koje su diferencirane ATRA-om

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Kemikalije

AICAR (#123040) je kupljen od tvrtke Calbiochem (San Diego, CA) i otopljen u sterilnoj vodi u temeljnu otopinu koncentracije 100 mM. 1,1-dimetilbigvanid hidroklorid (metformin, D150959) je kupljen od tvrtke Sigma (St. Louis, MO) i otopljen u mediju RPMI-1640 u temeljnu otopinu koncentracije 1 M. ATRA (#554720), rapamicin (#553210), PD 98059 (#513000) i tvar C (prema engl. *compound C*) (#171261) kupljeni su od tvrtke Calbiochem i otopljeni u 100%-tnom DMSO-u u temeljne otopine sljedećih koncentracija: 1 mM i 0,1 mM (ATRA), 20 μ M (rapamicin), 50 mM (PD 98059) i 10 mM (tvar C). DMSO (D5879) je kupljen od tvrtke Sigma. Aneksin V-fluorescein izotiocijanat (FITC, prema engl. *fluorescein isothiocyanate*) komplet (IM3546), monoklonska protutijela konjugirana s FITC za CD11b (IM0530) i CD64 (IM1604), FITC-konjugirani mišji IgG1 (IM0639), protutijelo konjugirano s fikoeritriinom (PE, prema engl. *phycoerythrin*) za CD14 (IM0650) i mišji IgG2a konjugiran s PE (A09141) kupljeni su od tvrtke Immunotech Beckman Coulter (Marseille, France). Puffer za lizu stanica (#9803), protutijela protiv ukupne S6K (#9202), fosforilirane (Thr389) S6K (#9205), ukupne p44/42 MAPK (ERK1/2) (#9102), fosforilirane (Thr202/Tyr204) MAPK (ERK1/2) (#9101), ukupne AMPK (#2532), fosforilirane (Thr172) AMPK (#2535), protutijela protiv kunićjeg IgG (#7074) i mišjeg IgG (#7076) koja su konjugirana s peroksidazom iz hrena (HRP, prema engl. *horseradish peroxidase*) kupljeni su od Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Komplet za detekciju kemiluminiscencije (ECL, prema engl. *enhanced chemiluminescence*) nabavljen je od tvrtke Pierce (Rockford, IL), a Bradford-otopina (#500-0006) od Bio-Rad Laboratories (USA). Komplet za transfekcije volumena od 10 μ L (Neon Transfection System, #MPK1025), boja crvene fluorescencije kao indikator učinkovitosti transfekcije [Block-iT Alexa Fluor Red Fluorescent Oligo (#14750100)], kontrolna mala interferirajuća RNA (siRNA, prema engl. *small interfering RNA*) (Silencer Select Negative Control, #4390843), siRNA za AMPK α 1 [Silencer Select s100 (PRKAA1), #4427037] i siRNA za AMPK α 2 [Silencer Select s11056 (PRKAA2), #4427038] kupljeni su od tvrtke Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Monoklonsko protutijelo protiv β -aktina (#A5441), propidijev jodid, RNaza A, Igepal, marker u boji molekularne mase 6,5-205 kDa, albumin goveđeg seruma (BSA, prema engl. *bovine serum albumin*), Triton X-100, natrijev dodecilsulfat (SDS), leupeptin, fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF), 30% akrilamid/bis-akrilamid i N,N,N',N' - tetrametiletilendiamin (TEMED) kupljeni su od tvrtke Sigma, RPMI-1640, fetusni goveđi serum (FBS, prema engl. *fetal bovine serum*),

L-glutamin, penicilin/streptomycin i amonijev persulfat (APS) od tvrtke Gibco/Invitrogen (Grand Island, NY).

4.2. Stanična kultura

Linija HL-60, koja odgovara ljudskoj akutnoj mijeloblastičnoj leukemiji sa sazrijevanjem stanica ili AML-M2 prema klasifikaciji FAB, kupljena je od European Collection of Animal Cell Cultures (ECCACC no. 88112501), Porton, Salisbury, UK. Linija NB4 (akutna promijelocitna leukemija, AML-M3) i U937 (akutna monocitna leukemija, AML-M5) su pokloni dr. sc. M. Golemović, KBC Rebro, Zagreb, a linije KG-1 (nezrela akutna mijeloblastična leukemija, AML-M1) i K562 (eritro-megakariocitna leukemija, AML-M6/M7) su pokloni prof. dr. sc. D. Batinića. Stanice su uzgajane u suspenziji u mediju RPMI-1640 uz dodatak 10%-tnog FBS-a inaktiviranog toplinom, L-glutamina (2 mM), penicilina (50 U/mL) i streptomicina (50 µg/mL) u vlažnom okolišu temperature 37°C uz 5%-tni CO₂.

4.3. Inkubacija stanica s ispitivanim tvarima

U pokusima, stanice su centrifugirane, raspršene u svježem mediju koji sadrži 10%-tni FBS te zasađene u koncentraciji 2×10^5 /mL u pločice sa 6 bunarića (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Stanice su diferencirane u nazočnosti različitih koncentracija DMSO-a (0,6% i 1,25%) ili ATRA-e (1 i 0,1 µM). U pokusima u kojima smo ispitivali učinke modulatora signalnog puta AMPK/mTOR, stanice su inkubirane u nazočnosti AICAR-a (0,1 i 0,5 mM), metformina (5 i 15 mM) i rapamicina (20 nM). U pokusima u kojima su ispitivani učinci inhibitora kinaza AMPK i MEK ili MAPKK (prema engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*), tvar C (10 µM) i PD 98059 (20 µM) dodani su 25 minuta prije dodatka drugih tvari. Nakon 48 sati, 0,3 mL svježeg medija je dodano u svaki bunarić. Koncentracija živih stanica određena je brojanjem u hemocitometru pomoću tripanskog modrila.

4.4. Mjerenje izražaja površinskih biljega

Nakon inkubacija, stanice su prikupljene, centrifugirane, oprane s hladnom otopinom fosfatnog pufera (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*) i resuspendirane u 100 µL PBS-a koji sadrži 0,1%-tni natrijev azid. Uzorcima je dodano monoklonsko protutijelo konjugirano s FITC koje detektira antigene CD11b ili CD64 (izotip IgG1), te monoklonsko protutijelo konjugirano s PE koje detektira antigen CD14 (izotip IgG2a), a kao izotipske kontrole korišteni su FITC-konjugirani mišji IgG1 i PE-konjugirani mišji IgG2a. Nakon inkubacije tijekom 20 minuta u mraku na sobnoj temperaturi, stanice su oprane i raspršene u

200 μL PBS-a koji sadrži natrijev azid. Izražaj površinskih biljega odredio se protočnom citometrijom koristeći uređaj FACSCalibur (Becton Dickinson), a prikupljeni podaci su obrađeni pomoću programa Cell Quest (Becton Dickinson). Područje sa živim stanicama je označeno koristeći raspršenje laserske svjetlosti prema naprijed (FSC, prema engl. *forward scatter*) i u stranu (SSC, prema engl. *side scatter*). Unutar označenog područja prikupljeno je 15 000 događaja za svaki navedeni biljeg. Na histogramu koji pokazuje jednostruku fluorescenciju uzorka obilježenog izotipskom kontrolom (FITC-IgG1 ili PE-IgG2a), pokazivač je postavljen tako da uključuje najviše 1% događaja kao pozitivnih. Da bi se odredio postotak stanica pozitivnih na biljeg, isti položaj pokazivača je zadržan i na uzorku koji je obilježen sa specifičnim protutijelom. Prosječni intenzitet fluorescencije (MFI, prema engl. *mean fluorescence intensity*) je određen tako da su vrijednosti MFI odgovarajućih izotipskih kontrola oduzete od MFI vrijednosti stanica koje su obilježene sa specifičnim protutijelima za CD antigene, kao što je prethodno opisano.^{97,152}

4.5. Analiza staničnog ciklusa

Nakon inkubacije, stanice su dva puta centrifugirane, oprane u hladnom PBS-u te inkubirane u 200 μL Vindelove otopine koja sadrži propidijev jodid (50 $\mu\text{g/ml}$ propidijevog jodida, 10 mM Tris, pH 8, 10 mM NaCl, 10 $\mu\text{g/ml}$ RNaza A, 0,1%-tni Igepal) tijekom 30 minuta. Monoparametarske analize DNA napravile su se na najmanje 10 000 stanica iz svakog uzorka koristeći uređaj FACSCalibur (Becton Dickinson). Postotak stanica u pojedinim fazama ciklusa je određen pomoću računalnih programa CellQuest i ModFit (Becton Dickinson), kao što je prethodno opisano.^{153,154}

4.6. Određivanje apoptoze

Stanice su nakon inkubacije oprane dva puta u PBS-u te obilježene s aneksinom i propidijevim jodidom prema uputi proizvođača. Ukratko, stanice su raspršene u 100 μL otopine pufera koja sadrži 1 μL aneksina V obilježenog FITC-om i 5 μL otopine propidijevog jodida koncentracije 250 $\mu\text{g/mL}$ PBS-a. Nakon 15-minutne inkubacije na ledu u mraku, stanice su raspršene u još 200 μL pufera za vezanje i analizirane pomoću protočnog citometra (FACSCalibur) koristeći program CellQuest (Becton Dickinson).

4.7. Izolacija ukupnih staničnih lizata

Stanice su zasađene u koncentraciji $3 \times 10^5/\text{mL}$ u pljoskice T25 cm^2 . Nakon inkubacije, stanice su centrifugirane, oprane u hladnom PBS-u i raspršene u puferu za lizu stanica koji

sadrži 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM natrijev etilen diamin tetraoctene kiseline (EDTA), 1 mM etilen glikol tetraoctene kiseline (EGTA), 150 mM NaCl, 1%-tni Triton X-100, 2,5 mM natrijev pirofosfat, 1 mM natrijev ortovanadat (Na_3VO_4), 1 mM β -glicerolfosfat i 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 1 μM mikrocistin i 1 mM PMSF. Nakon 10-minutne inkubacije na ledu, stanice su homogenizirane tako da su sedam puta protiskivane kroz iglu promjera 23 G. Nakon inkubacije na ledu tijekom 10 minuta, homogenati su centrifugirani tijekom 10 minuta na 14 000 x g na temperaturi od 4°C. Izdvojeni nadtalog je pospremljen na -80°C.

4.8. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Koncentracije proteina u dobivenom nadtalogu određene su spektrofotometrijski pomoću Bio-Rad reagensa koji sadrži boju Coomassie Brilliant Blue G-250. Bio-Rad reagens je razrijeđen sa sterilnom vodom u omjeru 1:4, 2,5 mL razrijeđenog reagensa dodano je na 2 μL uzorka i 48 μL vode. Apsorbancije uzoraka pri valnoj duljini od 595 nm izmjerene su na spektrofotometru CamSpec M201 (Sawston, Cambridge, UK), a koncentracije proteina izračunate su pomoću baždarne krivulje koja je dobivena mjerenjem apsorbancije niza otopina BSA poznatih koncentracija (0,1-1,0 mg/mL).

4.9. Analiza Western blot

Jednake količine proteina (50-60 μg) u svakom uzorku denaturirane su kuhanjem tijekom 5 minuta u puferu koji sadrži 2 x SDS (125 mM Tris, 4%-tni SDS, 2%-tni β -merkaptoetanol, 40%-tni glicerol i 0,1 mg/mL bromfenol modriilo). Uzorci su naneseni u jažice dvaju paralelnih 8%-tnih SDS-poliakrilamidnih gelova. Elektroforeza je izvršena pomoću sustava Mini-Protean (Bio-Rad), a proteini su preneseni na nitroceluloznu membranu (Whatman, Germany) pomoću sustava mini Trans-Blot (Bio-Rad).

Membrane su najprije inkubirane tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi u puferu TBST (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1%-tni Tween 20, pH 8,0) kojemu je dodano nemasno mlijeko u prahu (5 g/100 mL) kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela. Nakon blokiranja, membrane su oprane tri puta u puferu TBST i inkubirane tijekom noći na 4°C s odgovarajućim primarnim protutijelima razrijeđenim (1:20 000 za aktin i 1:1000 za ostala) u puferu TBST koji sadrži 5%-tni BSA. Nakon inkubacije, membrane su oprane tri puta i inkubirane u sekundarnom protutijelu koje je razrijeđeno (1:2000) u puferu TBST koji sadrži 5%-tno nemasno mlijeko u prahu tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, membrane su oprane tri puta u puferu TBST, a vezanje protutijela za membranu određeno je

pomoću pribora ECL. Kako bismo potvrdili da je u svim uzorcima nanjena jednaka količina proteina, koristili smo protutijela koja prepoznaju ukupnu MAPK ili β -aktin. Intenziteti signala određeni su denzitometrijski pomoću računalnog programa Adobe Photoshop CS 8.0 te izraženi u relativnim jedinicama kao omjer intenziteta signala fosforilirane kinaze prema ukupnoj.

4.10. Inhibiranje izražaja gena pomoću RNA-interferencije

Transfekcija siRNA koje su specifične za dvije izoforme α -podjedinice (AMPK α 1/2) koje kodiraju geni PRKAA1 i PRKAA2 te kontrolne siRNA napravljena je pomoću sustava NeonTM, Invitrogen, a prema uputama proizvođača. Kontrolna siRNA te siRNA za AMPK α 1 i AMPK α 2 otopljene su u vodi bez RNaze u temeljnu otopinu koncentracije 100 μ M. Optimalni uvjeti transfekcije stanica U937 određeni su najprije transfekcijom siRNA koja je obilježena bojom Alexa Block-iT i određivanjem intenziteta fluorescencije protočnom citometrijom. U pokusima, stanice U937 su dan prije transfekcije zasađene u koncentraciji 4×10^5 /mL u pljoskice T25 cm². Sljedeći dan stanice su pokupljene, oprane u 2 mL sterilnog PBS-a bez Ca²⁺ i Mg²⁺, a talog je raspršen u puferu R tako da koncentracija stanica bude 20×10^6 /mL. U kontrolnom uzorku, na 180 μ L stanične suspenzije dodano je 9 μ L kontrolne siRNA (100 μ M) i 9 μ L vode bez RNaze. U drugom uzorku, na 180 μ L stanične suspenzije dodano je 9 μ L siRNA za AMPK α 1 i 9 μ L siRNA za AMPK α 2 (100 μ M). Suspenzije su pokupljene u nastavke za elektroporaciju volumena 10 μ L te izložene jednom udaru struje napona 1050 V tijekom 50 milisekundi. Potom je suspenzija volumena 10 μ L raspršena u 0,5 mL medija RPMI koji sadrži 10%-tni FBS, te zasađene bez antibiotika u koncentraciji 4×10^5 /mL u pločice s 24 bunarića (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Nakon inkubacije tijekom 28 sati, dio stanica je zasađen u koncentraciji 2×10^5 u ploče sa 6 bunarića te inkubiran sa ili bez AICAR-a (0,5 μ M) tijekom 96 sati, a ostatak je iskorišten za pripremu ukupnih staničnih lizata i analizu izražaja AMPK-a pomoću tehnike Western blot.

4.11. Statistička analiza

Prikupljeni podaci prikazani su opisnom statistikom, grafički i tabelarno. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardne pogreške te analizirani pomoću Studentovog t-testa (za usporedbu tretiranih stanica prema kontroli) ili jednosmjerne analize varijance (ANOVA, prema engl. *analysis of variance*) s Tukey-testom (za usporedbu stanica tretiranih kombinacijom spojeva prema stanicama tretiranih istom koncentracijom samo jednog od tih spojeva). Za sve testove uzeta je razina vjerodostojnosti $p < 0,05$.

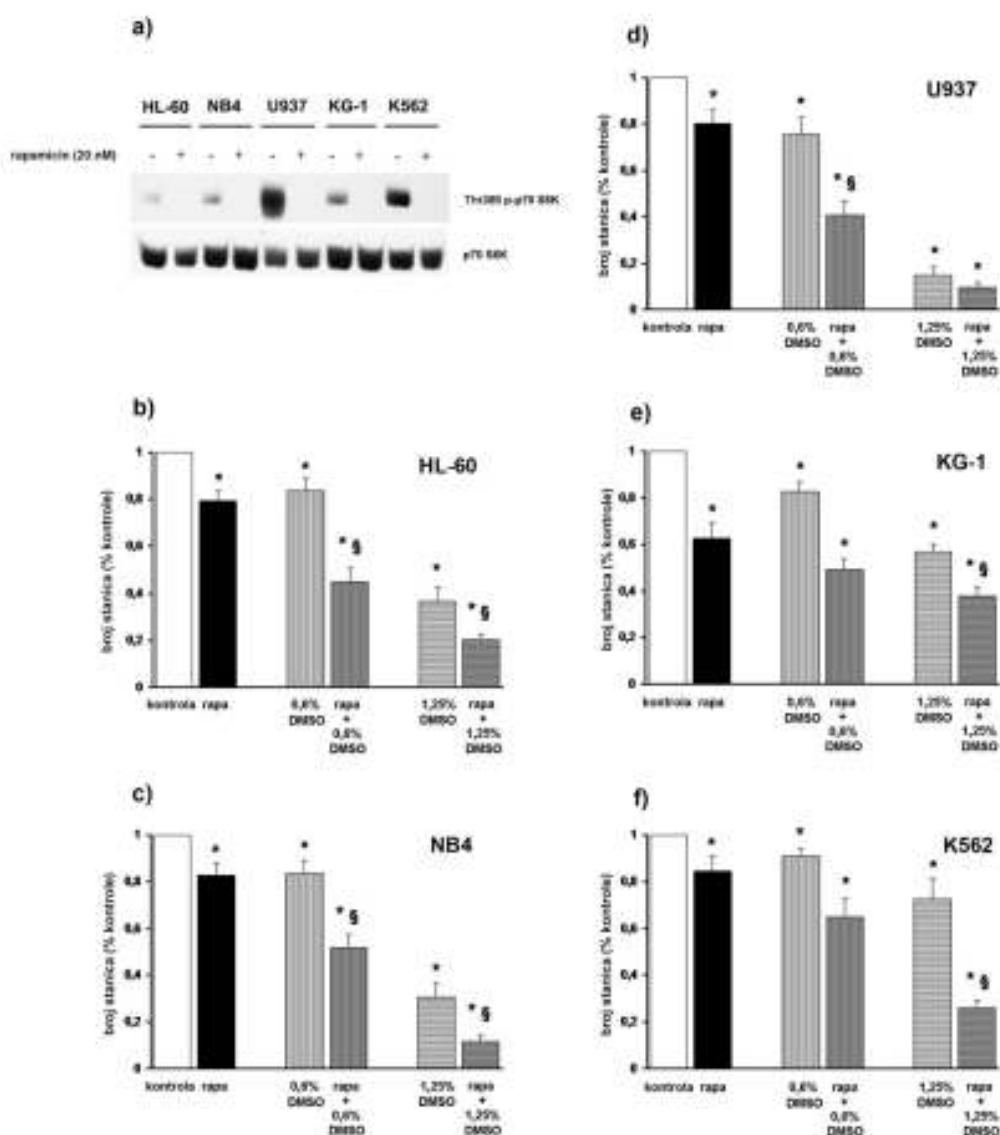
5. REZULTATI

5.1. Učinci mTOR-inhibitora, rapamicina, na stanice leukemijskih linija tretirane DMSO-om

5.1.1. Rapamicin pospješuje učinke DMSO-a na smanjenje broja živih stanica leukemijskih linija

Naše prethodno istraživanje pokazalo je da rapamicin slabo koči proliferaciju stanica linija AML-a u koncentracijama (5-20 nM) koje su unutar terapijskih granica.⁹⁸ Kako bismo provjerili da rapamicin u koncentraciji od 20 nM učinkovito koči aktivnost mTOR-a, odredili smo tehnikom Western blot količinu p70 S6K koja je fosforilirana na treoninskom ostatku (Thr389), budući da je ta fosforilacija posredovana kinazom mTOR te se smatra znakom kinazne aktivnosti. Prikupili smo ukupne stanične lizate iz stanica tipične promijelocitne linije NB4, mijeloblastične HL-60, monocitne U937, nezrele mijeloblastične KG-1 i eritromegakariocitne linije K562 koje su inkubirane tijekom 20 minuta s rapamicinom (20 nM) ili otapalom. Na slici 1a vidi se da je osnovna količina fosforilirane p70 S6K dosta različita u pojedinim staničnim linijama, ali da 20-minutna inkubacija s rapamicinom u potpunosti ukida fosforilaciju enzima u svim ispitanim uzorcima. Stoga je preinkubacija s rapamicinom u koncentraciji od 20 nM tijekom 20 minuta korištena u svim pokusima u kojima smo istraživali ulogu inhibicije mTOR-a na učinke potaknute DMSO-om.

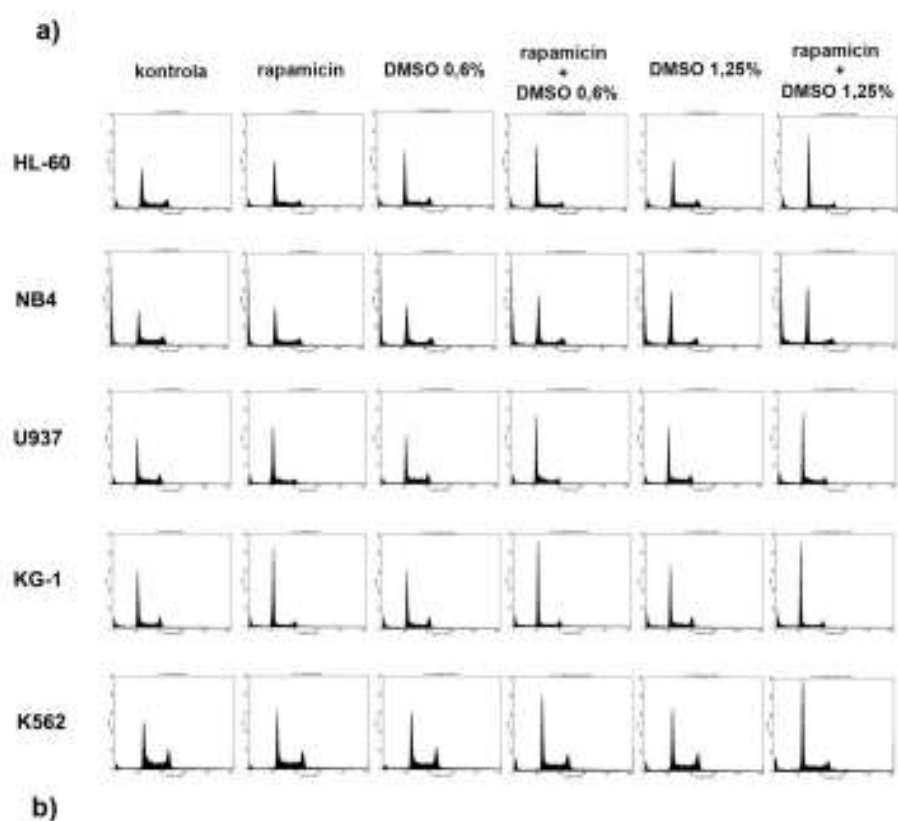
Kako bismo istražili učinke na staničnu proliferaciju, stanice leukemijskih linija zasađene su u pločice sa 6 bunarića u koncentraciji od 2×10^5 /mL, prethodno su inkubirane u nazočnosti 20 nM rapamicina ili otapala tijekom 20 minuta, a zatim su tretirane s dvjema različitim koncentracijama DMSO-a (0,6% i 1,25%). Nakon 96 sati, koncentracija živih stanica je određena brojanjem u hemocitometru pomoću tripanskog modrila. Kao što se vidi na slici 2b-f, rapamicin umjereno, ali značajno smanjuje broj živih stanica, DMSO koči proliferaciju svih linija u ovisnosti o koncentraciji, a broj živih stanica koje su tretirane kombinacijom rapamicina i DMSO-a je statistički značajno manji od broja živih stanica koje su inkubirane u nazočnosti samo jedne od navedenih tvari.



Slika 1. Učinak 20 nM rapamicina na broj živih stanica leukemijskih linija tretiranih s DMSO-om. **a)** Stanice HL-60, NB4, U937, KG1 i K562 su 20 minuta inkubirane u nazočnosti 20 nM rapamicina (+) ili otapala (-). Izražaj fosforilirane i ukupne p70 S6K analiziran je u ukupnim staničnim lizatima (60 µg po uzorku) tehnikom Western blot. **b-f)** Rapamicin (20 nM) ili otapalo (kontrola) dodani su 20 minuta prije DMSO-a (0,6% ili 1,25%). Nakon 96-satne inkubacije, koncentracija živih stanica je određena brojanjem u hemocitometru pomoću tripanskog modrila. Rezultati su srednje vrijednosti ± standardne pogreške iz najmanje tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ (Studentov t-test) prema kontroli, § $p < 0,05$ (ANOVA i Tukey) za usporedbu stanica tretiranih kombinacijom spojeva prema stanicama tretiranim istom koncentracijom samo jednog od tih spojeva.

5.1.2. Rapamicin i DMSO potiču nakupljanje leukemijskih stanica u G₀/G₁-fazi staničnog ciklusa

Prethodna istraživanja pokazala su da je nadzor nad staničnim rastom kojeg posreduje kinaza mTOR ključan za prolazak iz G₁ u S fazu staničnog ciklusa tijekom završne faze mijeloidne diferencijacije.¹⁵⁵ Stoga smo ispitali moguću ulogu zastoja u pojedinoj fazi staničnog ciklusa u učincima rapamicina i DMSO-a na smanjenje broja živih stanica. Nakon 24-satne inkubacije s navedenim spojevima, postotak stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa određen je obilježavanjem s propidijevim jodidom i analizom protočnom citometrijom (slika 2). U skladu s prethodnim istraživanjima, rapamicin je imao slabi učinak na povećanje udjela stanica u G₀/G₁ fazi ciklusa,⁹⁸⁻¹⁰⁰ a učinak je bio statistički značajan u stanicama KG-1 i U937. Statistički značajan učinak DMSO-a u manjoj koncentraciji na zastoj u G₀/G₁ fazi zamijećen je u stanicama NB4. U stanicama HL-60 i K562, kombinacija rapamicina i DMSO-a uzrokovala je statistički značajno povećanje udjela stanica u G₀/G₁ fazi staničnog ciklusa u usporedbi sa stanicama koje su tretirane samo rapamicinom ili DMSO-om. Povećanje udjela stanica u G₀/G₁ fazi bilo je povezano s odgovarajućim smanjenjem stanica u S- ili G₂/M-fazi (podaci nisu pokazani). Kao što se vidi na primjernim histogramima, 24-satna inkubacija s navedenim tvarima nije bitno povećala sub-G₁ populaciju niti jedne od ispitanih linija.



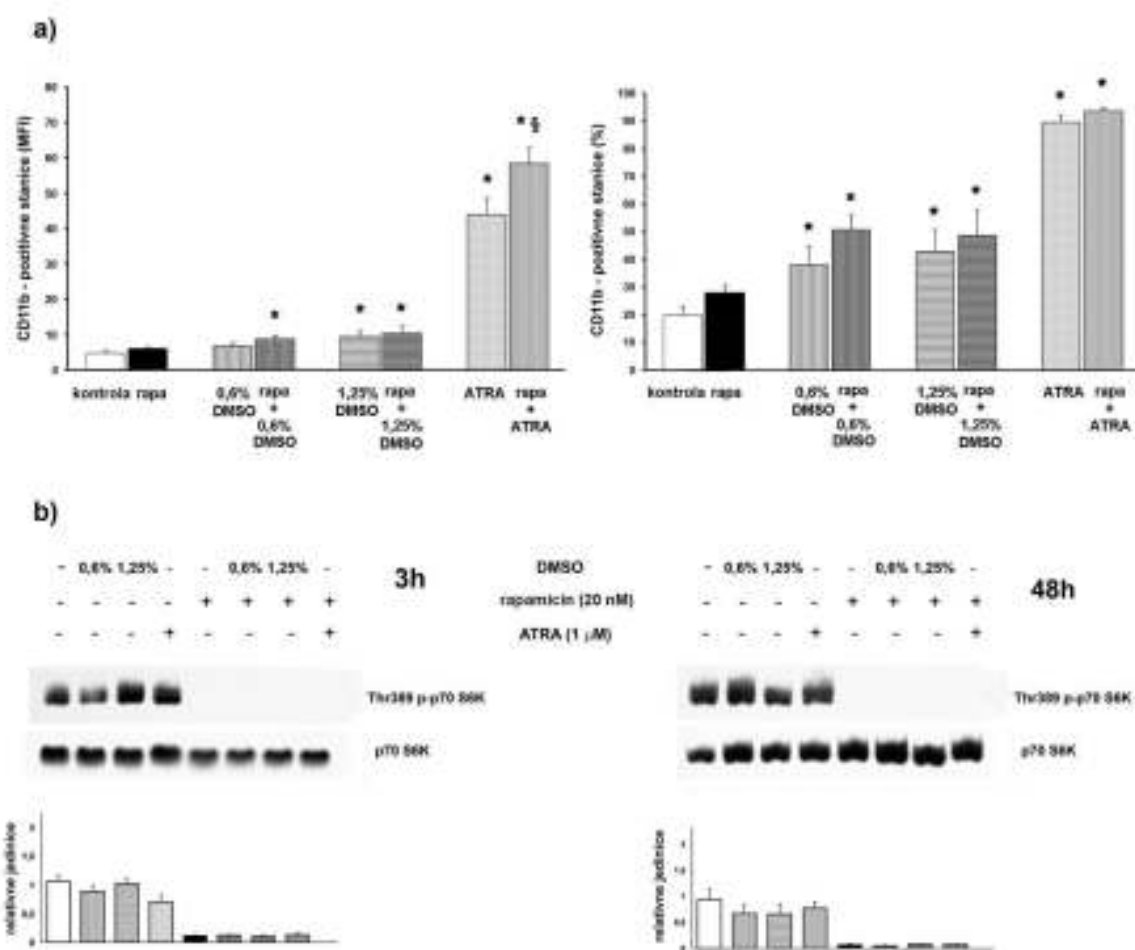
	kontrola	rapamicin	DMSO 0,6%	rapamicin + DMSO 0,6%	DMSO 1,25%	rapamicin + DMSO 1,25%
HL-60	50 ± 3	56 ± 4	56 ± 4	68 ± 3 * §	56 ± 4	71 ± 3 * §
NB4	41 ± 3	49 ± 2	58 ± 4 *	65 ± 3 *	70 ± 3 *	71 ± 3 *
U937	46 ± 3	60 ± 2 *	48 ± 3	58 ± 2 *	54 ± 2	57 ± 2 *
KG-1	50 ± 2	73 ± 1 *	51 ± 1	75 ± 1 *	55 ± 1 *	76 ± 2 *
K562	34 ± 2	39 ± 4	40 ± 4	51 ± 5 *	51 ± 5 *	65 ± 3 * §

Slika 2. Učinci 20 nM rapamicina na udio leukemijskih stanica tretiranih DMSO-om u pojedinim fazama staničnog ciklusa. Rapamicin (20 nM) ili otapalo (kontrola) dodani su leukemijskim stanicama 20 minuta prije DMSO-a (0,6% ili 1,25%). Nakon 24 sata, stanice su pokupljene, obilježene s propidijevim jodidom i analizirane protočnom citometrijom. **a)** Primjerna histograma. **b)** Udio stanica u G₀/G₁ fazi staničnog ciklusa. Rezultati su srednje vrijednosti ± standardne pogreške iz najmanje tri nezavisna pokusa. *p<0,05 (Studentov t-test) prema kontroli, §p<0,05 (ANOVA i Tukey) za usporedbu stanica tretiranih kombinacijom spojeva prema stanicama tretiranim istom koncentracijom samo jednog od tih spojeva.

5.1.3. Rapamicin nema učinka na izražaj diferencijacijskog biljega CD11b u stanicama koje su potaknute DMSO-om

Da bismo dodatno proučili mehanizam međudjelovanja rapamicina i DMSO-a, ispitali smo učinke tvari na izražaj diferencijacijskog biljega CD11b u stanicama linije NB4. Stanična linija NB4 je tipična promijelocitna linija koja sadrži translokaciju t(15;17) s uputom za sintezu fuzijskog proteina PML/RAR α te se diferencira u odgovoru na ATRA-u. Prethodna istraživanja pokazala su da i everolimus (RAD001)⁹⁹ i rapamicin⁹⁸ potiču učinak ATRA-e na zastoj staničnog rasta i diferencijaciju stanica NB4. Stoga su stanice tretirane ATRA-om korištene kao pozitivna kontrola. Kao što se vidi na slici 3a, ATRA u koncentraciji od 1 μ M snažno potiče izražaj biljega CD11b, a stanice tretirane s kombinacijom 20 nM rapamicina i 1 μ M ATRA-e imaju statistički značajno povećan prosječni intenzitet fluorescencije (MFI) u usporedbi sa stanicama koje su tretirane samo s ATRA-om. Inkubacija stanica NB4 s DMSO-om tijekom 48 sati povećala je postotak stanica pozitivnih na CD11b više nego njihov MFI, a nije zamijećena statistički značajna razlika u izražaju diferencijacijskog biljega na stanicama koje su tretirane kombinacijom rapamicina i DMSO-a u usporedbi sa stanicama koje su tretirane samo s DMSO-om (slika 3a). Dodatno, rapamicin nije imao statistički značajnog učinka na izražaj biljega CD11b u stanicama linija HL-60, U937, KG-1 i K562 koje su potaknute s DMSO-om (podaci nisu prikazani).

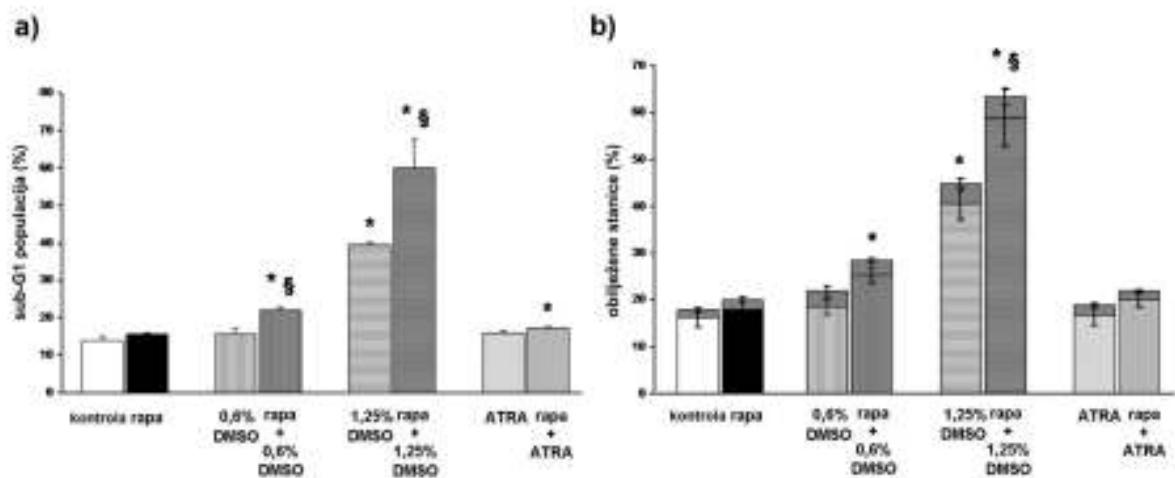
Potom smo ispitali učinke dvaju diferencirajućih agonista na aktivnost mTOR-a u stanicama NB4. Stanice su najprije inkubirane s 20 nM rapamicinom ili otapalom (kontrola), a potom tretirane s DMSO-om (0,6% i 1,25%) ili ATRA-om (1 μ M) tijekom 3 ili 48 sati. Nakon inkubacije, izolirani su ukupni stanični lizati, a jednake količine proteina iz istog uzorka nanijete su na dva paralelna gela, razdvojene s pomoću SDS-PAGE te prenesene na nitroceluloznu membranu i inkubirane s protutijelima koja prepoznaju ukupnu p70 S6K i p70 S6K fosforiliranu na treoninskom ostatku (Thr389). Kao što je pokazano na slici 3b, nismo zamijetili značajnu razliku u omjerima fosforilirane i ukupne p70 S6K u uzorcima koji su izolirani iz stanica tretiranih s DMSO-om ili ATRA-om. Rapamicin je u potpunosti zakočio fosforilaciju p70 S6K već u ranoj fazi nakon dodavanja DMSO-a ili ATRA-e (3h), a fosforilacija se ne zamjećuje niti nakon 48 sati.



Slika 3. Učinak 20 nM rapamicina na izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama koje su diferencirane DMSO-om ili ATRA-om. Rapamicin (20 nM) ili otapalo (kontrola) dodani su leukemijskim stanicama NB4 20 minuta prije DMSO-a (0,6% ili 1,25%) ili ATRA-e (1 μ M). **a)** Prosječni intenzitet fluorescencije (MFI) i postotak CD11b-pozitivnih stanica nakon 48 sati izlaganja ispitivanim tvarima. Rezultati su srednje vrijednosti \pm standardne pogreške iz najmanje tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ (Studentov t-test) prema kontroli, $\$p < 0,05$ (ANOVA i Tukey) za usporedbu stanica tretiranih kombinacijom spojeva prema stanicama tretiranih istom koncentracijom samo jednog od tih spojeva. **b)** Analiza Western blot izražaja fosforilirane (Thr389) i ukupne p70 S6K u stanicama NB4. Densitometrijom je utvrđen omjer intenziteta signala fosforilirane i ukupne p70 S6K te je izražen u relativnim jedinicama. Grafovi su srednje vrijednosti \pm standardne pogreške srednje vrijednosti omjera Thr389 p-p70 S6K i p70 S6K iz najmanje tri nezavisna pokusa.

5.1.4. Rapamicin pospješuje učinke DMSO-a na poticanje apoptoze

Učinci tvari na apoptozu ispitani su tako da su stanice NB4 prethodno tretirane s rapamicinom (20 nM) tijekom 20 minuta, a potom inkubirane s diferencirajućim tvarima tijekom 48 sati. Nakon inkubacije, stanice su obilježene s propidijevim jodidom, a udio sub-G₁ populacije je određen protočnom citometrijom. Kao što se vidi na slici 4a, DMSO (1,25%) je nakon 48 sati značajno povećao postotak stanica NB4 koje imaju <2N DNA, a sub-G₁ populacija je statistički značajno veća u uzorcima koji su tretirani kombinacijom rapamicina i DMSO-a u usporedbi s uzorcima koji su tretirani samo s DMSO-om. Stanice NB4 su dodatno obilježene s FITC-konjugiranim aneksinom V te analizirane protočnom citometrijom. Analiza je pokazala da inkubacija stanica s 1,25%-tnim DMSO-om tijekom 48 sati povećava postotak stanica koje su pozitivne na aneksin V-FITC, a dodatak rapamicina pospješuje učinke DMSO-a (slika 4b). Nasuprot tomu, inkubacija stanica s ATRA-om, samom ili u kombinaciji s rapamicinom, nije uzrokovala povećanje udjela stanica pozitivnih na aneksin V-FITC, kao što smo i prije zamijetili.⁹⁸

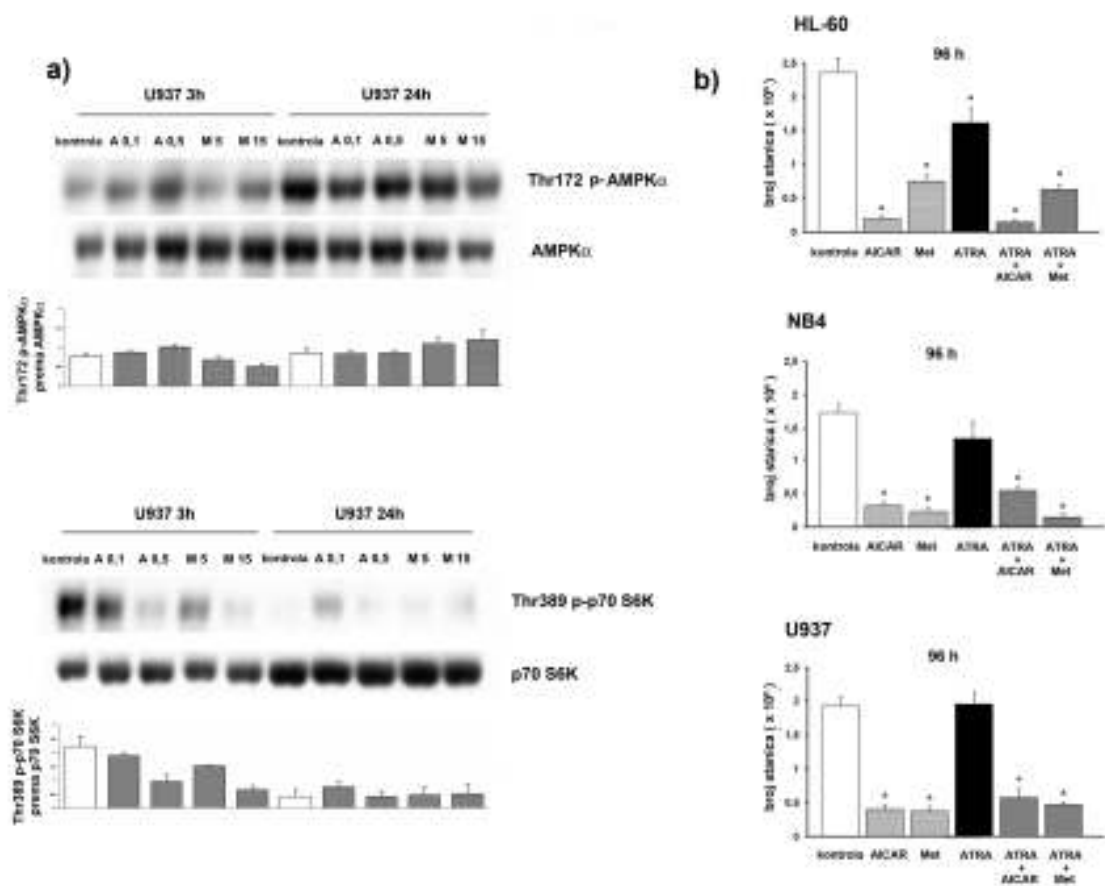


Slika 4. Učinak 20 nM rapamicina na apoptozu stanica NB4 koje su tretirane DMSO-om ili ATRA-om. Rapamicin (20 nM) ili otapalo (kontrola) dodani su leukemijskim stanicama 20 minuta prije DMSO-a (0,6% ili 1,25%) ili ATRA-e (1 μ M). **a)** Postotak populacije stanica NB4 obilježenih propidijevim jodidom koje sadrže manje od 2N DNA (sub-G₁) nakon 48 sati. **b)** Postotak stanica NB4 obilježenih s FITC-konjugiranim aneksinom V (donji stupići, aneksin+/PI+ ; gornji stupići, aneksin+/PI-) nakon 48 sati. Rezultati su srednje vrijednosti \pm standardne pogreške iz najmanje tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ (Studentov t-test) prema kontroli, § $p < 0,05$ (ANOVA i Tukey) za usporedbu stanica tretiranih kombinacijom spojeva prema stanicama tretiranim istom koncentracijom samo jednog od tih spojeva.

5.2. Učinci modulatora AMPK-a na proliferaciju i diferencijaciju kontrolnih stanica i stanica diferenciranih ATRA-om

5.2.1. AMPK-aktivatori, AICAR i metformin, smanjuju broj živih stanica leukemijskih linija

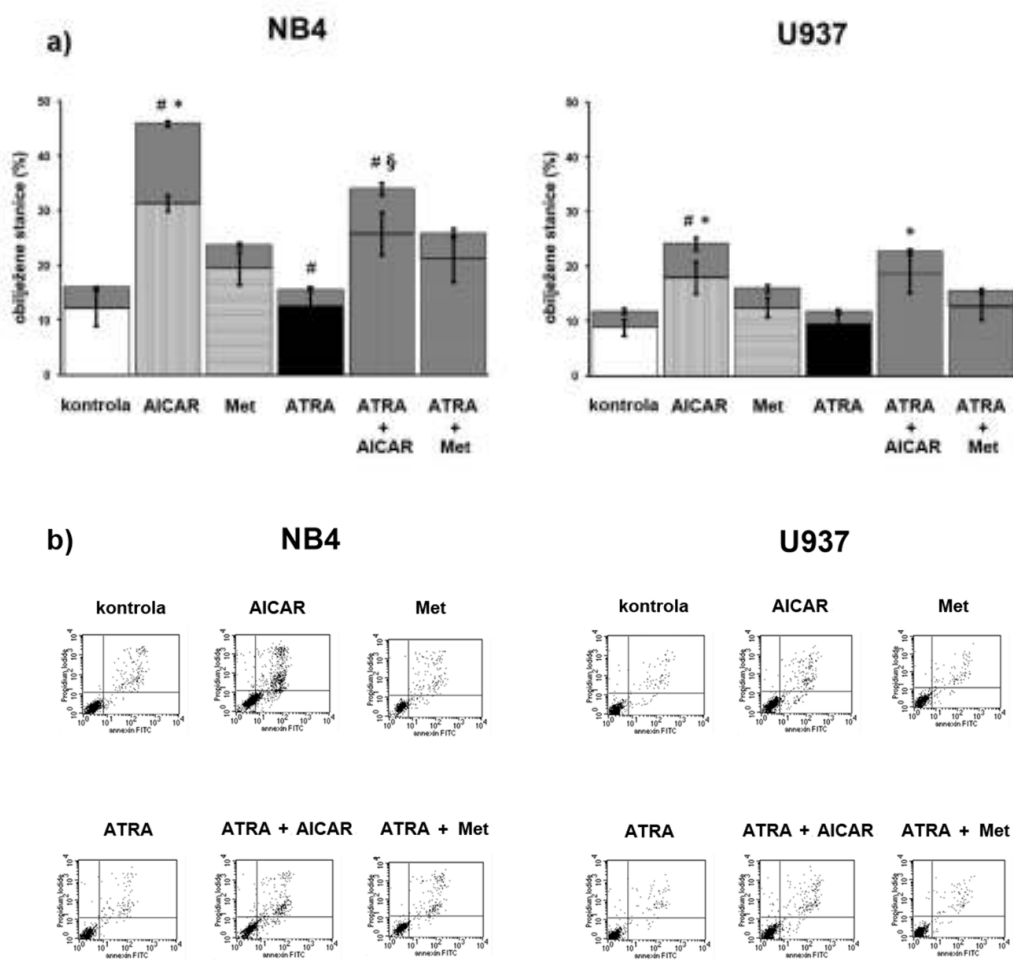
Nedavna istraživanja pokazala su aktivnost signalnog puta LKB1/AMPK/mTOR u stanicama akutne mijelocitne linije MV4-11 i akutne mijeloične linije OCI-AML3.⁴⁵ Kako bismo istražili učinke modulatora AMPK-a na proliferaciju stanica i diferencijaciju potaknutu ATRA-om, ispitali smo učinke AICAR-a i metformina na stanice tipične promijelocitne linije NB4, mijeloblastične HL-60 i monocitne linije U937, za koje smo prethodno pokazali da su osjetljive na rapamicin.⁹⁸ Prethodna istraživanja pokazala su da metformin koči proliferaciju primarnih stanica AML-a u koncentracijama od 5, 10 ili 15 mM,⁴⁵ te da su mnogobrojne hematološke i nehematološke neoplastične stanice osjetljive na AICAR u koncentracijama od 0,2 do 2 mM.^{46,48,59,60} Stoga smo najprije provjerili učinke 5 i 15 mM metformina te 0,5 mM AICAR-a na aktivnost signalnog puta AMPK/mTOR u stanicama U937. Na slici 5 vidimo da su 15 mM metformin i 0,5 mM AICAR podjednako smanjili količinu p70 S6K koja je fosforilirana na treoninskom ostatku (Thr389), što upućuje na podjednake učinke oba modulatora na aktivnost mTOR-a. Stoga smo učinke agonista AMPK-a na proliferaciju stanica ispitali tako da smo stanice zasadili u koncentraciji od 2×10^5 /mL, prethodno inkubirali s 15 mM metforminom i 0,5 mM AICAR-om tijekom 20 minuta, a potom dodali 1 μ M ATRA-u ili otapalo. Nakon 96 sati, broj živih stanica određen je pomoću tripanskog modrila i brojanjem u hemocitometru. Kao što se vidi na slici 5b, AICAR i metformin su statistički značajno smanjili koncentraciju živih stanica, sama ATRA umjereno koči proliferaciju, a nije zamijećena statistički značajna razlika u broju živih stanica koje su tretirane kombinacijama ATRA-e i modulatora AMPK-a u usporedbi s brojem živih stanica tretiranih samo metforminom ili AICAR-om.



Slika 5. Učinak AICAR-a i metformina na broj živih stanica leukemijskih linija koje su tretirane s ATRA-om. a) Stanice U937 su inkubirane s AICAR-om (0,1 i 0,5 mM) i metforminom (5 i 15 mM). Nakon 3 ili 24 sata, stanice su pokupljene, priređeni su stanični lizati te je metodom Western blot analiziran izražaj fosforiliranih i ukupnih AMPK α i p70 S6K. Denzitometrijom je utvrđen omjer intenziteta signala fosforiliranih i ukupnih AMPK α i p70 S6K. Grafovi su srednje vrijednosti \pm standardne pogreške omjera Thr172 p-AMPK α /AMPK α i Thr389 p-p70 S6K/p70 S6K iz najmanje tri nezavisna pokusa. b) Stanice HL-60, NB4 i U937 inkubirane su s otapalom (kontrola), AICAR-om (0,5 mM), metforminom (15 mM), ATRA-om (0,1 μ M) ili njihovim kombinacijama. Nakon 96 sati, koncentracija živih stanica je određena brojanjem u hemocitometru pomoću tripanskog modrila. Rezultati su srednje vrijednosti \pm standardne pogreške iz najmanje tri nezavisna pokusa. *p<0,05 (Studentov t-test) prema kontroli.

5.2.2. AICAR potiče apoptozu u stanicama NB4 i U937

Kako bismo podrobnije razjasnili mehanizam koji je odgovoran za učinke agonista AMPK-a na smanjenje broja živih stanica, odredili smo učinke AICAR-a i metformina na poticanje apoptoze u stanicama NB4 i U937 koje su inkubirane s ATRA-om ili otapalom. Nakon 48 sati inkubacije, NB4 i U937 stanice su obilježene FITC-konjugiranim aneksinom V i propidijevim jodidom te analizirane protočnom citometrijom. Kao što se vidi na slici 6, 0,5 mM AICAR je statistički značajno povećao postotak stanica NB4 i U937 koje su pozitivne na aneksin V-FITC, a što uključuje i ranu apoptozu, tj. stanice koje su pozitivne na aneksin i negativne na propidij jodid (aneksin+/PI-) te kasne apoptotičke stanice (aneksin+/PI+), dok su učinci 15 mM metformina bili nešto manje izraženi. U stanicama NB4, dodatak ATRA-e je smanjio učinak AICAR-a na postotak stanica koje su pozitivne na aneksin V, ali je postotak apoptotičkih stanica tretiranih ovom kombinacijom i dalje bio statistički značajno veći u odnosu na kontrolu.



Slika 6. Učinci AICAR-a i metformina na poticanje apoptoze u stanicama NB4 i U937 koje su tretirane s ATRA-om. Stanice NB4 i U937 su inkubirane s otapalom (kontrola), AICAR-om (0,5 mM), metforminom (15 mM), ATRA-om (0,1 μ M) ili njihovim kombinacijama tijekom 48 sati. **a)** Postotak stanica obilježenih s FITC-konjugiranim aneksinom V (donji stupići, aneksin+/PI+; gornji stupići, aneksin+/PI-). **b)** Primjermi histogrami. Rezultati su srednje vrijednosti \pm standardne pogreške iz najmanje tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ (Studentov t-test) prema kontrolu za aneksin+/PI+ stanice. # $p < 0,05$ (Studentov t-test) prema kontrolu za aneksin+/PI- stanice. § $p < 0,05$ (ANOVA i Tukey) za usporedbu stanica tretiranih kombinacijom spojeva prema stanicama tretiranih istom koncentracijom samo jednog od tih spojeva za aneksin+/PI- stanice.

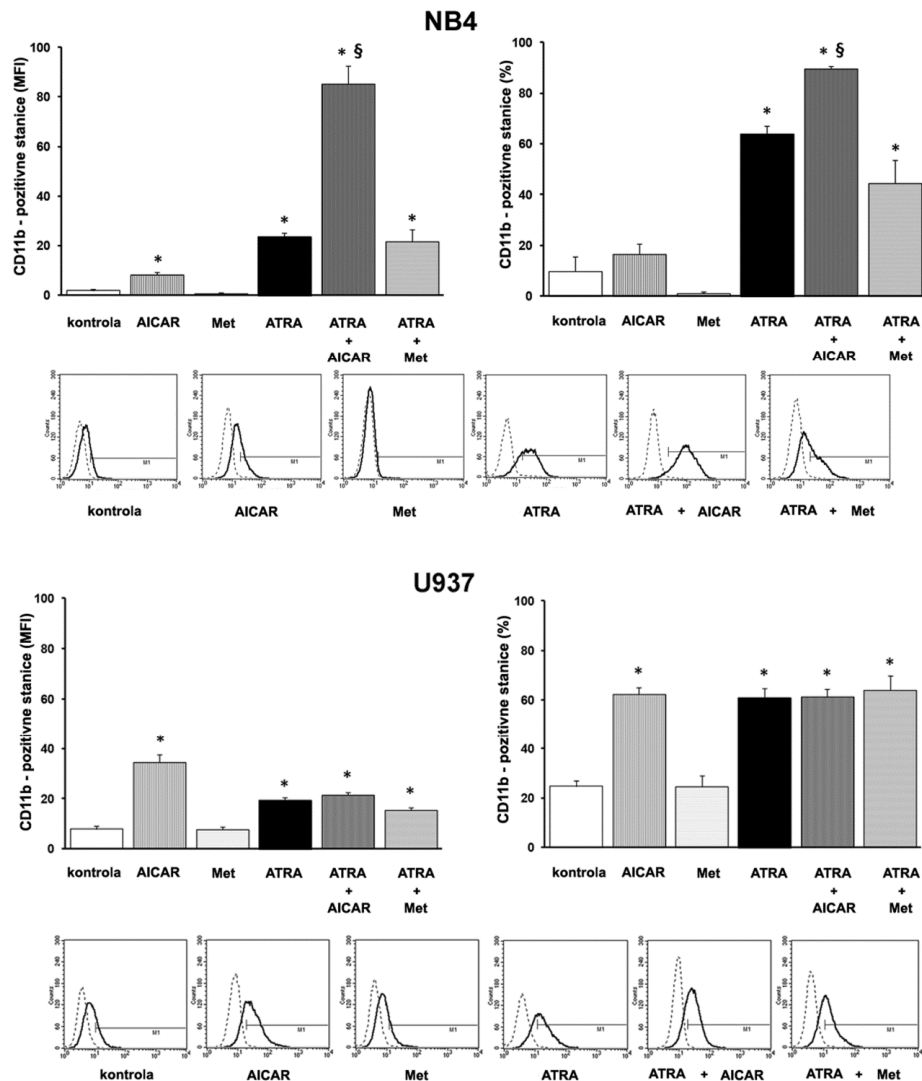
5.2.3. AICAR pospješuje izražaj diferencijacijskih biljega

Kako bismo ispitali mogući učinak AICAR-a na diferencijaciju, odredili smo izražaj biljega CD11b u stanicama NB4 i U937 koje su tretirane s ATRA-om ili otapalom tijekom 96 sati. Kao što se vidi na slici 7, ATRA statistički značajno povećava prosječni intenzitet fluorescencije (MFI) i postotak pozitivnih stanica u obje stanične linije. U stanicama NB4, dodatak AICAR-a (0,5 mM) statistički značajno povećava izražaj biljega CD11b na stanicama koje su tretirane ATRA-om. U stanicama U937, AICAR povećava izražaj diferencijacijskog biljega u stanicama i bez dodatka ATRA-e, što se moglo vidjeti i povećanjem postotka CD11b-pozitivnih stanica i njihovog MFI.

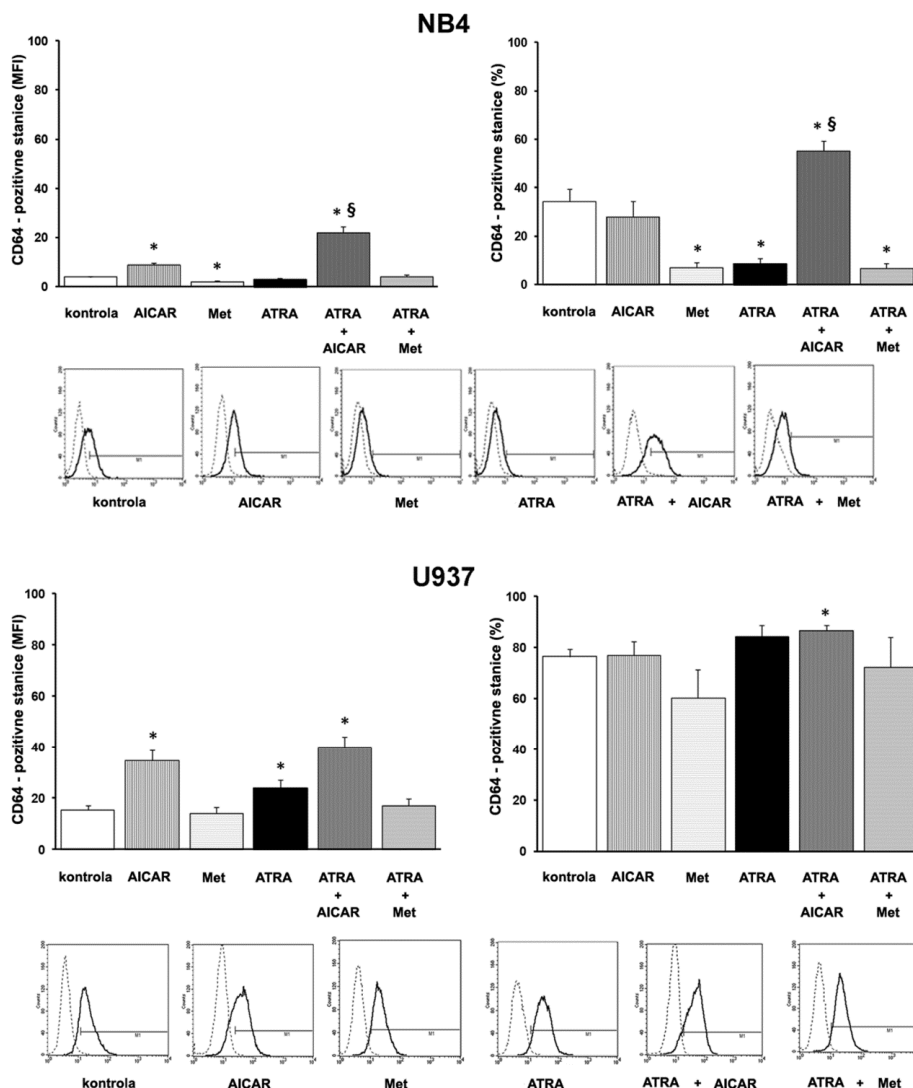
Dodatno, zamijećeno je da inkubacija stanica s 0,5 mM AICAR-om tijekom 96 sati potiče vezanje mišjeg IgG2a. Budući da su naša prethodna istraživanja na stanicama HL-60 pokazala da vezanje mišjeg IgG2a može biti posredovano povećanim izražajem receptora FcγRI (CD64)¹⁵², dodatno smo ispitali učinke AICAR-a na izražaj monocitnih biljega.

Na slici 8 vidi se da su učinci AICAR-a na izražaj monocitnog biljega CD64 u promijelocitnoj liniji NB4 bili podjednaki učincima na izražaj biljega CD11b. U monocitnoj liniji U937, postotak stanica koje su pozitivne na CD64 biljeg bio je visok već i u netretiranim stanicama, ali se dodatno povećava tretiranjem stanica kombinacijom ATRA-e i AICAR-a. I bez ATRA-e, 0,5 mM AICAR statistički značajno povećava MFI stanica U937 koje su obilježene s CD64-FITC.

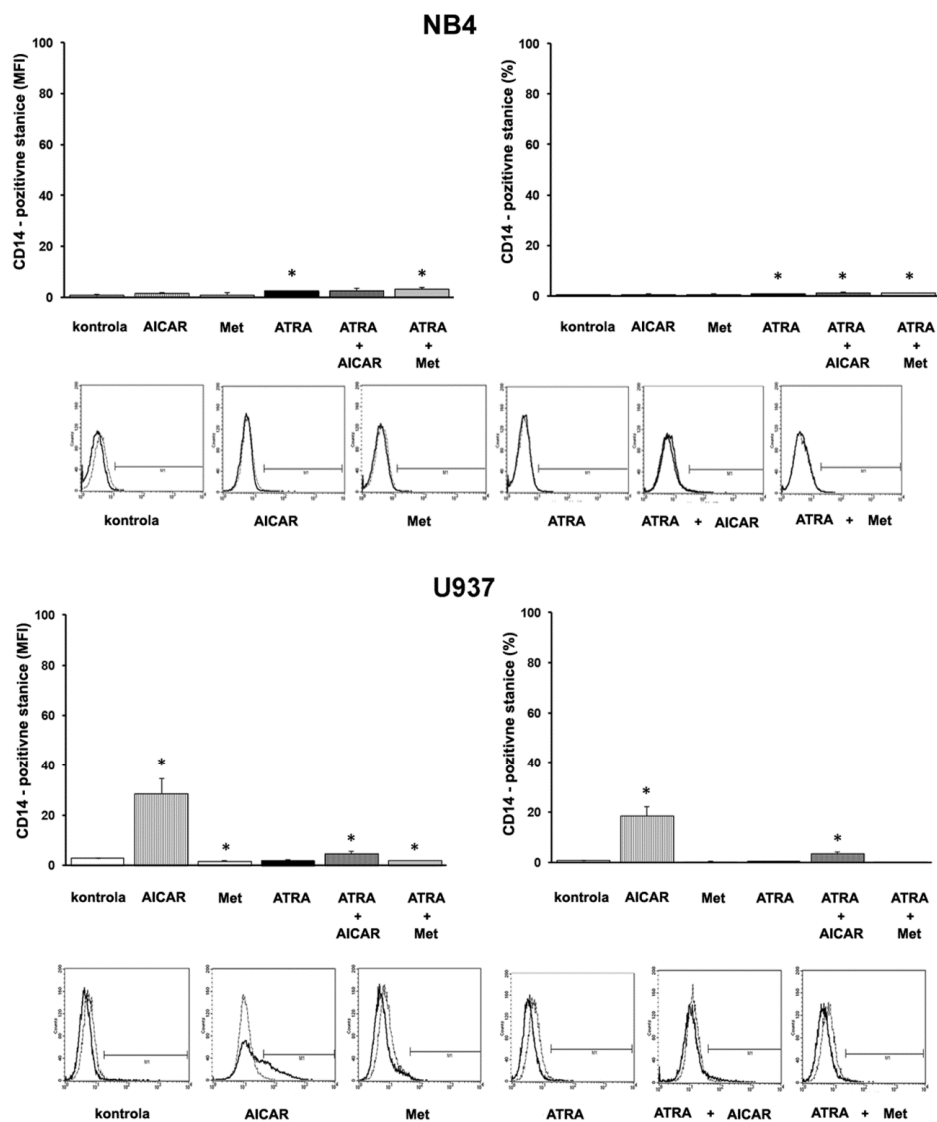
CD64 je receptor visokog afiniteta za fragment Fc imunoglobulina G koji je izražen na monocitima, makrofagima, pretečama mijeloidnih stanica i folikularnim dendritičkim stanicama. Molekula CD14 je specifičniji biljeg zrelih monocita i makrofaga. Kako bismo utvrdili mogući učinak AICAR-a na izražaj biljega CD14, stanice NB4 i U937 su inkubirane tijekom 96 sati, prikupljene i analizirane protočnom citometrijom. Kao što je prikazano na slici 9, u promijelocitnoj liniji NB4, AICAR nije imao utjecaja na izražaj biljega CD14. U monocitnoj liniji U937, AICAR je statistički značajno povećao MFI i postotak stanica tretiranih s ATRA-om koje izražavaju CD14, a taj je učinak bio još jače izražen u kontrolnim stanicama.



Slika 7. Učinci AICAR-a i metformina na izražaj biljega CD11b na stanicama NB4 i U937 koje su tretirane s ATRA-om. Stanice su inkubirane s otapalom (kontrola), AICAR-om (0,5 mM), metforminom (15mM), ATRA-om (0,1 μ M) ili njihovim kombinacijama tijekom 96 sati. Rezultati su prikazani kao prosječni intenzitet fluorescencije (MFI) ili postotak CD11b-pozitivnih stanica, te kao primjerni histogrami. Rezultati su srednje vrijednosti \pm standardne pogreške iz najmanje tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ (Studentov t-test) prema kontrolu. § $p < 0,05$ (ANOVA i Tukey) za usporedbu stanica tretiranih kombinacijom spojeva prema stanicama tretiranih istom koncentracijom samo jednog od tih spojeva.



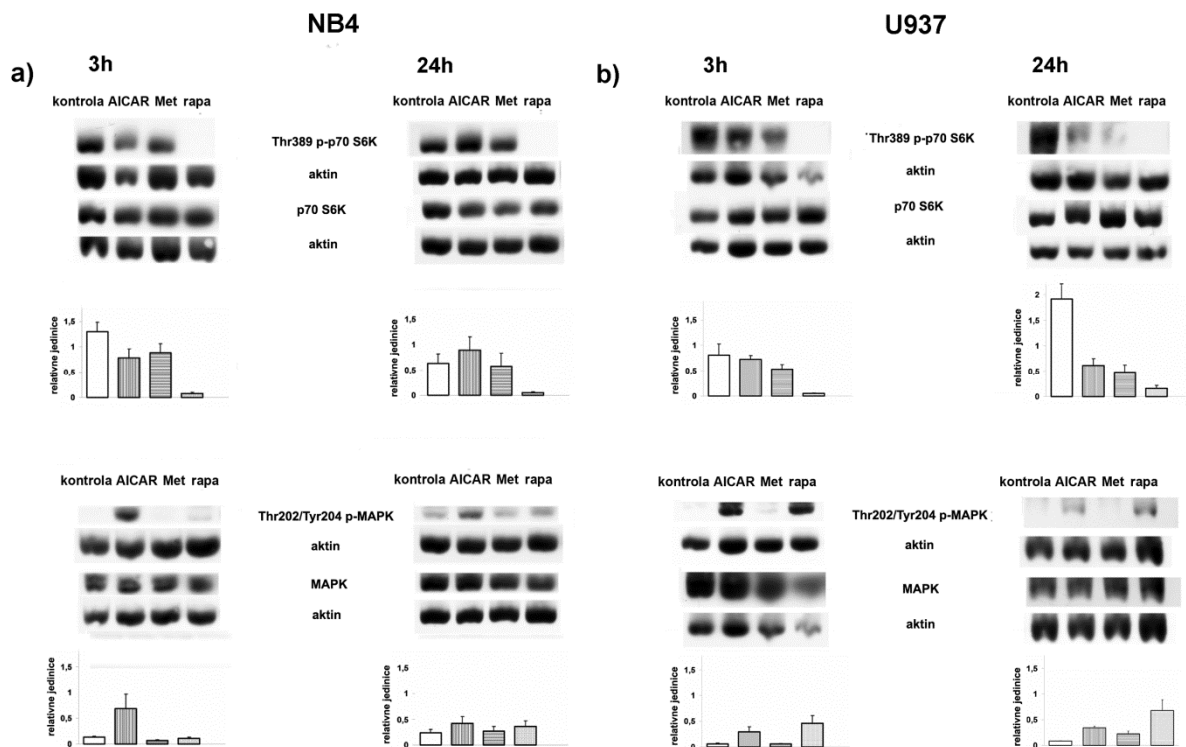
Slika 8. Učinci AICAR-a i metformina na izražaj biljega CD64 na stanicama NB4 i U937 koje su tretirane s ATRA-om. Stanice su inkubirane s otapalom (kontrola), AICAR-om (0,5 mM), metforminom (15mM), ATRA-om (0,1 μ M) ili njihovim kombinacijama tijekom 96 sati. Rezultati su prikazani kao prosječni intenzitet fluorescencije (MFI) ili postotak CD64-pozitivnih stanica, te kao primjerni histogrami. Rezultati su srednje vrijednosti \pm standardne pogreške iz najmanje tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ (Studentov t-test) prema kontroli. § $p < 0,05$ (ANOVA i Tukey) za usporedbu stanica tretiranih kombinacijom spojeva prema stanicama tretiranih istom koncentracijom samo jednog od tih spojeva.



Slika 9. Učinci AICAR-a i metformina na izražaj biljega CD14 na stanicama NB4 i U937 koje su tretirane ATRA-om. Stanice su inkubirane s otapalom (kontrola), AICAR-om (0,5 mM), metforminom (15mM), ATRA-om (0,1 μ M) ili njihovim kombinacijama tijekom 96 sati. Rezultati su prikazani kao prosječni intenzitet fluorescencije (MFI) ili postotak CD14-positivnih stanica, te kao primjerni histogrami. Rezultati su srednje vrijednosti \pm standardne pogreške iz najmanje tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ (Studentov t-test) prema kontroli.

5.2.4. AICAR potiče aktivnost MAPK-a u stanicama NB4 i U937

Kako bismo dodatno razjasnili mehanizam djelovanja AICAR-a, najprije smo usporedili učinke na aktivnost signalnog puta AMPK/mTOR u stanicama NB4 i U937 i to istraživanjem fosforilacije AMPK-a, mTOR-a i njihovih supstrata. Prethodna istraživanja pokazala su da je razina fosforilirane p70 S6K na Thr389 smanjena djelovanjem metformina na primarne stanice AML i stanične linije⁴⁵ te djelovanjem AICAR-a i metformina na stanice koje su pozitivne na BCR-ABL.⁴⁶ Stoga smo prvo istražili aktivnost p70 S6K u stanicama NB4 i U937 koje su potaknute agonistima AMPK-a. Rapamicin (20 nM), za kojeg je prethodno pokazano da u potpunosti inhibira fosforilaciju p70 S6K⁹⁸ korišten je kao kontrola. Ukupni stanični lizati izolirani su iz stanica koje su inkubirane s 0,5 mM AICAR-om, 15 mM metforminom ili 20 nM rapamicinom tijekom 3 ili 24 sata. Podjednake količine proteina istog uzorka nanijete su na dva paralelna gela, razdvojene s pomoću SDS-PAGE, prenesene na nitrocelulozne membrane i inkubirane s protutijelima koja prepoznaju ukupnu ili p70 S6K fosforiliranu na treoninu 389. Na slici 10 vidi se da je rapamicin (20 nM) u potpunosti spriječio fosforilaciju p70 S6K na Thr389 u obje stanične linije, a nije imao utjecaja na količinu ukupnog proteina. U stanicama NB4, količina fosforilirane p70 S6K je smanjena 3 sata nakon dodavanja agonista AMPK-a, dok je nakon 24 sata razina bila slična kontroli. U stanicama U937, razina fosforilacije p70 S6K na Thr389 bila je smanjena i nakon 3 i nakon 24 sata. Membrane su potom inkubirane s protutijelima koja prepoznaju ukupnu MAPK i MAPK koja je fosforilirana na treoninskom ostatku 202 i tirozinskom ostatku 204 (Thr202/Tyr204 p-MAPK). Kao što se vidi na slici 10, metformin nije imao učinaka na količinu fosforilirane MAPK u obje stanične linije, kao što je i prethodno opisano na drugim stanicama AML-a.⁴⁵ Međutim, AICAR je povećao fosforilaciju MAPK-a u obje stanične linije, što je bilo jače izraženo 3 sata nakon dodavanja agonista, ali i dalje zamjetno nakon 24-satne inkubacije. Inkubacija stanica s rapamicinom pospješila je fosforilaciju MAPK-a u stanicama U937, a nije imala učinaka na stanice NB4, kao što je i ranije opisano.⁹⁸

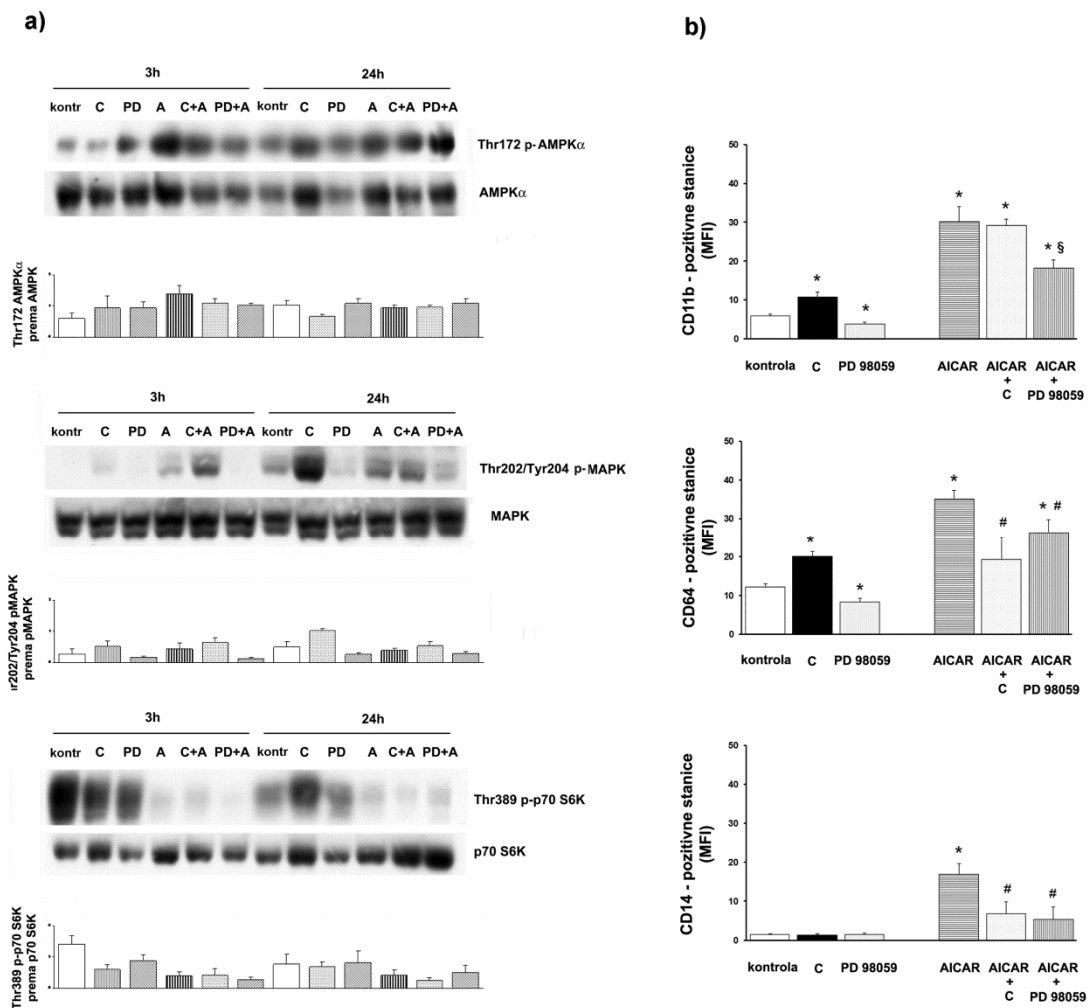


Slika 10. Učinci AICAR-a i metformina na količinu fosforilirane p70 S6K i fosforilirane MAPK u stanicama NB4 (a) i U937 (b). Stanice su inkubirane s AICAR-om (0,5 mM), metforminom (15 mM), rapamicinom (20 nM) ili otapalom (kontrola). Nakon 3 ili 24 sata, stanice su pokupljene, priređeni su stanični lizati, jednake količine proteina su nanijete na dva paralelna gela te je izražaj fosforiliranih i ukupnih p70 S6K i MAPK analiziran metodom Western blot. Kako bismo potvrdili da je u svim uzorcima nanjena jednaka količina proteina, sve membrane su naknadno inkubirane s protutijelom za β -aktin. Densitometrijom je utvrđen omjer intenziteta signala fosforiliranih i ukupnih proteina te je izražen u relativnim jedinicama. Grafovi su srednje vrijednosti \pm standardne pogreške omjera Thr389 p-p70 S6K/p70 S6K (gornja polovica slike) i Thr202/Tyr204 p-MAPK/MAPK (donja polovica slike) iz najmanje tri nezavisnih pokusa.

5.2.5. Farmakološki inhibitor MAPK koči učinke AICAR-a na izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama U937

Nekoliko istraživanja opisalo je produženu aktivaciju ERK-a ili MAPK-a u staničnim linijama AML-a koje su potaknute na diferencijaciju u monocitnom ili granulocitnom smjeru nakon izlaganja tvarima poput ATRA-e, PMA, vitamina D₃ ili drugih spojeva.^{118,156,157} Kako bismo odredili ulogu aktivacije ERK-a u odgovoru na AICAR, stanice su najprije tretirane s farmakološkim inhibitorom MAPK (PD 98059) u koncentracijama za koje smo prethodno pokazali da učinkovito koče aktivnost ERK-a u staničnim linijama AML-a.^{97,158} Kao što se vidi na slici 11a, inkubacija stanica U937 s 20 μ M PD98059 značajno smanjuje količinu fosforilirane MAPK u kontrolnim stanicama i stanicama koje su inkubirane s AICAR-om tijekom 3 i 24 sata. Prethodna inkubacija s PD 98059 u istoj koncentraciji statistički značajno smanjuje izražaj biljega CD11b, CD64 i CD14 u stanicama koje su tretirane AICAR-om tijekom 96 sati (slika 11 b).

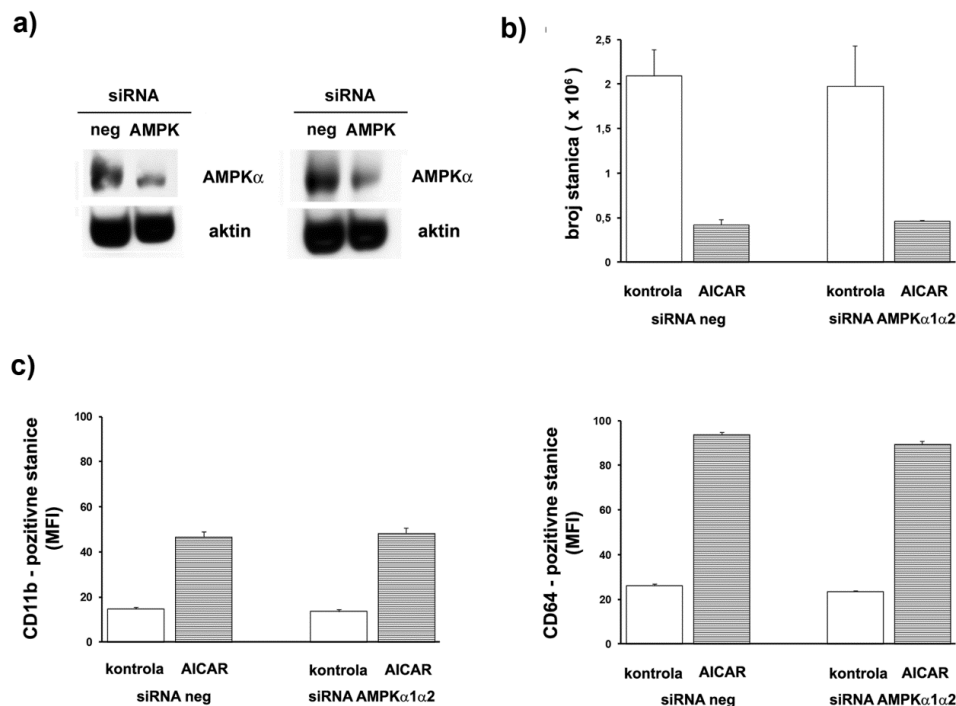
Da bismo dodatno ispitali ulogu aktivacije AMPK-a u učincima koji su potaknuti AICAR-om, upotrijebili smo tvar C, 6-[4-(2-Piperidin-1-iletoksi)fenil]-3-piridin-4-ilpirazolo[1,5-a]pirimidin, koja se učestalo koristi kao farmakološki inhibitor AMPK-a.¹⁵⁹ Tvar C koristili smo u koncentraciji (10 μ M) koja se prethodno pokazala učinkovitom u kočenju aktivnosti AMPK-a u stanicama AML-a.⁴⁵ Kao što se vidi na slici 11a, inkubacija stanica U937 s 10 μ M tvari C nije značajno smanjila količinu fosforilirane AMPK. Nadalje, prethodna inkubacija stanica U937 s 10 μ M tvari C nije utjecala na povećani izražaj biljega CD11b u stanicama koje su potaknute AICAR-om, ali je smanjila izražaj biljega CD64 i CD14. Međutim, tvar C je statistički značajno povećala izražaj biljega CD11b i CD64 u kontrolnim stanicama, a to je koreliralo s poticajnim učinkom inhibitora na količinu fosforilirane MAPK nakon 3- ili 24-satne inkubacije.



Slika 11. Uloga signalnih puteva MAPK i AMPK/mTOR u učincima AICAR-a na stanice U937. Stanice su prethodno inkubirane s inhibitorom AMPK-a (tvar C, 10 μ M) ili inhibitorom MEK-a (PD 98059, 20 μ M) tijekom 25 minuta, a potom su tretirane s 0,5 mM AICAR-om. **a)** Analiza Western blot izražaja fosforiliranih i ukupnih AMPK α , MAPK i p70 S6K iz staničnih lizata izoliranih nakon 3 ili 24 sata. Densitometrijom je utvrđen omjer intenziteta signala fosforiliranih i ukupnih proteina. Rezultati su srednje vrijednosti \pm standardne pogreške omjera fosforiliranih i ukupnih AMPK α , MAPK i p70 S6 iz najmanje tri nezavisna pokusa. **b)** Prosječni intenzitet fluorescencije (MFI) stanica U937 nakon 96 sati inkubacije i obilježavanja s protutijelima za CD11b, CD64 i CD14. Rezultati su srednje vrijednosti \pm standardne pogreške iz najmanje tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ (Studentov t-test) prema kontroli. # $p < 0,05$ (Studentov t-test) prema AICAR-u. § $p < 0,05$ (ANOVA i Tukey) za usporedbu stanica tretiranih kombinacijom spojeva prema stanicama tretiranim istom koncentracijom samo jednog od tih spojeva.

5.2.6. Učinci AICAR-a na broj živih stanica U937 i izražaj diferencijacijskih biljega su neovisni o količini AMPK-a

Budući da su naši rezultati ukazali na nespecifične učinke tvari C kao farmakološkog inhibitora AMPK-a, ulogu AMPK-a u učincima AICAR-a dodatno smo ispitali primjenom komercijalno dostupnih siRNA sekvenci koje koče izražaj obje katalitičke podjedinice ($\alpha 1$ i $\alpha 2$) AMPK-a. Kontrolne siRNA te siRNA za AMPK $\alpha 1$ i AMPK $\alpha 2$ ubacili smo u stanice U937 elektroporacijom, stanice smo inkubirali tijekom 28 sati te potom zasadili u koncentraciji 2×10^5 /mL u ploče sa 6 bunarića sa ili bez AICAR-a ($0,5 \mu\text{M}$) tijekom 96 sati. Ostatak uzorka iskorišten je za pripremu ukupnih staničnih lizata i analizu izražaja AMPK-a pomoću tehnike Western blot. Kao što se vidi na primjernoj analizi Western blot, količina AMPK-a je znatno smanjena u stanicama koje su transficirane sa siRNA za AMPK $\alpha 1$ i AMPK $\alpha 2$ u usporedbi s kontrolnom siRNA (slika 12a). Usprkos tome, učinci AICAR-a na broj živih stanica nakon 96 sati (slika 12b) bili su podjednaki u stanicama s normalnom i znatno smanjenom količinom AMPK-a. Dodatno, nije bilo statistički značajne razlike u učincima AICAR-a na izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD64 u stanicama koje su transficirane sa siRNA za AMPK u odnosu na kontrolu (slika 12c).



Slika 12. Učinci AICAR-a na broj živih stanica i izražaj diferencijacijskih biljega na stanicama sa smanjenim izražajem AMPK-a. Stanice U937 su transficirane s kontrolnom siRNA (neg) te siRNA za AMPK α 1 i AMPK α 2 te inkubirane tijekom 28 sati. a) Analiza Western blot izražaja ukupne količine AMPK-a u stanicama 28 h nakon transfekcije. b) Broj živih transficiranih stanica U937 96 sati nakon inkubacije sa ili bez AICAR-a (0,5 μ M). c) Prosječni intenzitet fluorescencije (MFI) transficiranih stanica U937 koje su obilježene s protutijelima za CD11b i CD64 nakon inkubacije sa ili bez AICAR-a (0,5 μ M) tijekom 96 sati. Prikazani su primjerni rezultati dvaju nezavisnih pokusa, od kojih je svaki napravljen u duplikatu.

6. RASPRAVA

6.1. Rapamicin pospješuje učinke DMSO-a na smanjenje broja živih stanica leukemijskih linija

Rapamicin je 1999. godine odobren od Američke agencije za hranu i lijekove kao imunosupresiv kako bi se spriječilo odbacivanje bubrežnog alografta. Temsirolimus i everolimus su analozi rapamicina ili rapalozi bolje farmakokinetike koji su odobreni 2007. i 2009. godine za liječenje uznapredovalog karcinoma bubrega. Everolimus je 2011. godine odobren za liječenje neuroendokrinih tumora podrijetlom iz gušterače, a 2012. godine za liječenje astrocitoma u sindromu tuberozne skleroze.^{61,88} Ipak, monoterapija tumora rapamicinom je u velikoj mjeri ograničena njegovim prvenstveno citostatskim, a ne citotoksičnim svojstvima. Nadalje, rapamicin ne koči u potpunosti sve „nizvodne“ supstrate mTOR-a pa slabo potiče autofagiju i nedostatno koči sintezu proteina. Sljedeći razlog slaboj učinkovitosti je postojanje različitih mehanizama povratne sprege zbog kojih inhibicija mTOR-a rapamicinom povećava aktivnost proksimalnih komponenti signalnog puta kao što su PI3K i Akt, a aktivacija PI3K/Akt pospješuje proliferaciju. Zbog navedenih je razloga sve više istraživanja usmjereno ka terapiji koja kombinira rapamicin s nekim spojem koji pospješuje njegovo djelovanje.^{61,88}

Rezultati ovog istraživanja slažu se s prethodnim istraživanjima koja su pokazala da rapamicin ima uglavnom citostatska svojstva te da nema značajnih učinaka na preživljenje i diferencijaciju leukemijskih staničnih linija. Ranija istraživanja pokazala su da rapamicin i sam može potaknuti redukciju boje NBT (prema engl. *nitroblue tetrazolium*) i diferencijaciju stanica HL-60 i K562, a da nema učinaka na diferencijaciju stanica U937 i NB4.¹⁶⁰ Međutim, u tom je istraživanju rapamicin korišten u koncentracijama koje su veće od 2 μM , a te su koncentracije i stotinu puta veće od koncentracija koje se mogu postići terapijskom primjenom. Od tada, brojna istraživanja pokazala su da rapamicin u nižim koncentracijama (od 20 do 200 nM) ima slab¹⁶¹ ili nikakav učinak^{98,162,163} na izražaj diferencijacijskih biljega.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da rapamicin slabo koči proliferaciju stanica HL-60, U937, KG-1 ili K562.^{90,98-100} Nadalje, rapamicin nije imao značajnih učinaka na preživljenje leukemijskih staničnih linija ili primarnih stanica AML-a tijekom uzgoja u tekućem mediju.^{79,90} Međutim, rapamicin je značajno zakočio sposobnost primarnih stanica AML-a da stvaraju kolonije, a bez da je utjecao na rast normalnih hematopoetskih preteča, što je bio jedan od razloga za postupno uvođenje rapamicina u klinička istraživanja.⁹⁰

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da rapamicin pospješuje učinak DMSO-a na smanjenje broja živih stanica u svim testiranim staničnim linijama. Ovi se učinci, bar dijelom, mogu pripisati učincima obaju spojeva na zastoj u G₀/G₁-fazi staničnog ciklusa. Uloga rapamicina u prijelazu iz G₁- u S-fazu staničnog ciklusa je već dobro opisana.^{84,98-100,155,164} Ukratko, danas se smatra da se prolaz kroz G₁-fazu staničnog ciklusa u sisavaca nadzire u dvije kontrolne točke. Prva kontrolna točka nalazi se u ranoj fazi G₁ te ovisi o nazočnosti čimbenika rasta; čimbenici rasta potiču sintezu ciklina D i prolazak kroz G₁-fazu, a u njihovoj odsutnosti stanica prelazi u fazu G₀. Druga kontrolna ili restriksijska točka, koja odgovara onoj START u kvasaca, nalazi se u kasnijoj fazi G₁, neposredno prije početka S-faze, a regulirana je količinom hranjivih tvari (primjerice aminokiselina) koje aktiviraju kinazu mTOR. Aktivirana mTOR fosforilira p70 S6K, aktivirana p70 S6K potiče transkripciju onkogen a-c-myc koji aktivira kompleks ciklina E i kinaze 2 ovisne o ciklinu (CDK2, prema engl. *cyclin-dependent kinase 2*) te pospješuje ulazak u S-fazu ciklusa.¹⁶⁴ DMSO potiče reverzibilni zastoj u G₁-fazi tako što koči sintezu ciklina D i inaktivira CDK4^{165,166} te smanjuje izražaj c-myc.¹⁴⁶

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da nema stroge korelacije između osjetljivosti stanica pojedinih linija na 20 nM rapamicin i stupnja fosforilacije p70 S6K kao „nizvodnog“ supstrata mTOR-a, što je slično rezultatima prethodnih istraživanja na leukemijskim linijama i primarnim stanicama AML-a.⁹⁰ Nadalje, nismo primijetili značajne promjene u omjeru p70 S6K koja je fosforilirana na ostatku Thr389 i ukupne p70 S6K u stanicama NB4 koje su tretirane s DMSO-om ili ATRA-om tijekom 3 ili 48 sati. Prijašnje istraživanje pokazalo je povećanje količine p70 S6K koja je fosforilirana na treoninskom ostatku 421 i serinskom ostatku 424 u stanicama HL-60 koje su diferencirane s 1,25%-tnim DMSO-om tijekom 80 sati.¹⁶⁷ Rezultati prijašnjih istraživanja pokazali su različite učinke ATRA-e na količinu fosforilirane p70 S6K, što je vjerojatno posljedica analize fosforilacija na različitim aminokiselinskim ostacima, kao što je opisano u stanicama MCF-7.^{120,168} Tako je u stanicama NB4 zamijećena povećana fosforilacija p70 S6K na Thr 421 i Ser 424¹²⁰, a smanjena fosforilacija p70 S6K na treoninskom ostatku Thr 389 u stanicama HL-60 nakon inkubacije s ATRA-om.⁹⁹ Naši rezultati pokazuju da je 20 nM rapamicin značajno inhibirao fosforilaciju enzima i nakon 48 sati. Kao što su prethodne studije pokazale, zanimljivo je da rapamicin pospješuje učinke različitih spojeva na kočenje proliferacije leukemijskih stanica, pa čak i kad ti spojevi djeluju različito na aktivaciju signalnog puta mTOR/p70 S6K; u stanicama KT-1 koje sadrže onkogen *BCR/ABL*, interferon α povećava, a imatinib mesilat smanjuje

fosforilaciju p70 S6K na Thr421/Ser424, ali dodatak rapamicina podjednako pospješuje kočenje proliferacije leukemijskih stanica u odgovoru na oba spoja.¹⁶⁹

Nekoliko je mogućih objašnjenja za učinke rapamicina na pospješene diferencijacije leukemijskih stanica u odgovoru na agoniste. U stanicama NB4, poticajni učinak 100 nM rapamicina na izražaj diferencijacijskog biljega CD11b pripisuje se učinku rapamicina na indukciju autofagije koja razgrađuje protein PML/RAR α .¹⁶¹ Međutim, ovo objašnjenje se ne može primijeniti na linije AML-a koje nisu APL. Dugo se zna da spojevi koji potiču zastoj u staničnom ciklusu obično čine stanice osjetljivijima na poticanje diferencijacije u odgovoru na agoniste.¹⁷⁰ Iako su stanični mehanizmi koji su odgovorni za diferencijaciju potaknutu DMSO-om slabo objašnjeni, učinci rapamicina na zastoj u G₁-fazi su detaljno opisani,^{84,98-100,155,164} a rezultati ovog istraživanja pokazuju da kombinacija spojeva koji ciljano djeluje na signale povezane sa zastojem u diferencijaciji i spojeva koji djeluju na signal proliferacije u tumorskim stanicama mogu zajednički djelovati na smanjenje broja živih stanica AML-a.

Naše prijašnje istraživanje pokazalo je da ATRA i DMSO nemaju jednaki učinak na signalni put Akt u stanicama HL-60, iako oba spoja podjednako potiču diferencijaciju stanica u granulocitnom smjeru. Dok je ATRA progresivno povećavala aktivnost proteinske kinaze B/Akt u jezgrama diferenciranih stanica HL-60 i NB4, nije opažen značajni porast aktivnosti kinaze Akt u jezgrama stanica HL-60 koje su inkubirane s DMSO-om tijekom pet dana.⁹⁷ Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da rapamicin pospješuje učinak ATRA-e na povećani izražaj diferencijacijskog biljega CD11b,^{98,99} ali pokazuju da dodatak rapamicina stanicama NB4 nema statistički značajnog učinka na povećanje izražaja biljega CD11b u odgovoru na DMSO. Međutim, analiza stanica protočnom citometrijom pokazuje da bi učinak kombinacije rapamicina i DMSO-a na smanjenje broja živih leukemijskih stanica mogao nastati i zbog učinka rapamicina na poticanje apoptoze u stanicama koje su tretirane DMSO-om.

Dakle, rapamicin pospješuje učinke ATRA-e i DMSO-a na smanjenje broja živih leukemijskih stanica, ali se mehanizmi razlikuju jer u stanicama tretiranim ATRA-om rapamicin pospješuje diferencijaciju, a u stanicama tretiranim DMSO-om pospješuje apoptozu. I prethodna istraživanja pokazala su da su stanice HL-60 koje su diferencirane DMSO-om osjetljivije na apoptozu potaknutu TNF-om i drugim agonistima od stanica tretiranih ATRA-om.¹²⁷ Iako to nismo istražili, moguće je da su ovi različiti učinci na apoptozu povezani s različitim učincima ATRA-e i DMSO-a na aktivnost Akt u jezgri, budući da je jedna od najbolje opisanih uloga jezgrine Akt poticanje preživljenja stanice.¹⁷¹ DMSO

ne povećava aktivnost Akt u jezgri⁹⁷ pa je smanjena otpornost stanica na apoptozu. Suprotno, ATRA povećava aktivnost PI3K i Akt u jezgri⁹⁷ što smanjuje osjetljivost na apoptozu i pospješuje izražaj diferencijacijskih biljega. Ako rapamicin pospješuje aktivnost PI3K i Akt, a povećana aktivnost PI3K i Akt u jezgri pospješuje diferencijaciju, onda rapamicin u stanicama tretiranim ATRA-om pospješuje i diferencijaciju. U prilog tomu govore i rezultati koji pokazuju da vitamin D₃, još jedan ligand obitelji jezgrinih receptora, ima slične učinke na pospješene diferencijacije stanica U937 u kombinaciji s rapamicinom,¹⁰⁰ a istodobno povećava aktivnost PI3K u jezgrama diferenciranih stanica.¹⁷²

Iako je DMSO jedna od prvih tvari za koju je dokazano da potiče diferencijaciju leukemijskih stanica *in vitro*, učinkovitost i sigurnost DMSO-a pri intravenskoj primjeni u koncentracijama koje se koriste *in vitro* nije nikada određena. Međutim, inkubacija stanica s DMSO-om *in vitro* i dalje predstavlja često korišten model za proučavanje granulocitne diferencijacije leukemijskih stanica. Naši rezultati pokazuju da rapamicin pospješuje učinke DMSO-a na smanjenje broja živih leukemijskih stanica i pospješene apoptoze, a ti rezultati potvrđuju hipotezu da rapamicin ima korisne učinke u diferencirajućoj terapiji AML-a.

6.2. AICAR pospješuje izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama leukemijskih linija

Budući da smo pokazali da inhibicija mTOR-a pospješuje učinke ATRA-e na diferencijaciju, a znano je da aktivacija AMPK-a koči aktivnost mTOR-a, pretpostavili smo da aktivatori AMPK-a pospješuju diferencijaciju stanica leukemijskih linija. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da AICAR koči proliferaciju, pospješuje apoptozu i potiče izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama promonocitne linije U937, a pospješuje učinke ATRA-e na izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama tipične promijelocitne linije NB4. I druga su istraživanja pokazala da AICAR potiče apoptozu leukemijskih staničnih linija i primarnih stanica AML-a i limfoma.^{46,48,59,60} Međutim, rezultati našeg istraživanja po prvi puta su pokazali da AICAR ima diferencirajuća svojstva u leukemijskim stanicama.

Diferencijacija AICAR-om opisana je u drugim modelima. U mišjim embrionalnim matičnim stanicama AICAR koči proliferaciju te povećava izražaj biljega karakterističnih za eritroidnu liniju.¹⁷³ U osteoblastičnim stanicama MC3T3-E1 AICAR povećava izražaj diferencijacijskih biljega i potiče mineralizaciju¹⁷⁴, a uočena je i diferencijacija astroglije u

primarnim živčanim matičnim stanicama koje su tretirane AICAR-om.¹⁷⁵ U stanicama U937 prethodna istraživanja pokazala su da AICAR smanjuje kemotaksiju, ali učinak na izražaj površinskih biljega nije istražen.¹⁷⁶ U početku se smatralo da AICAR djeluje protuupalno, ali nedavno istraživanje pokazalo je da AICAR potiče fagocitozu zrelih mišjih makrofaga i neutrofila *in vitro* i *in vivo*.¹⁷⁷

Kao što je već prije navedeno, AICAR je nukleozid sličan adenzinu koji se u stanici fosforilira u AICA-ribotid ili ZMP djelovanjem adenzinske kinaze, a ZMP zatim alosterički aktivira AMPK.⁵³ Metformin aktivira AMPK neizravno tako što koči respiracijski lanac, smanjuje proizvodnju ATP-a i povećava omjer AMP-a i ATP-a.³⁸ Stoga, iako se oba spoja koriste kao aktivatori AMPK-a, AICAR i metformin aktiviraju AMPK različitim mehanizmima, AICAR kao mimetik AMP-a, a metformin složenim mehanizmom koji uključuje ne samo metabolizam mitohondrija, već i reaktivne spojeve dušika, c-Src i PI3K¹⁷⁸ te fosforilaciju LKB1 pomoću proteinske kinaze C- ζ .⁴¹ Tako je aktivacija AMPK-a zamijećena u živčanim matičnim stanicama u odgovoru na oba spoja, ali samo AICAR u tim stanicama potiče diferencijaciju u astrogliju, a taj mehanizam uključuje povećanu aktivnost signalnog puta JAK/STAT (prema engl. *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*).¹⁷⁵ Nedavno istraživanje pokazalo je da metformin u određenim koncentracijama može pospješiti diferencijaciju u odgovoru na ATRA-u, ali taj se učinak zamjećivao samo u stanicama APL-a, dok su u ostalim linijama zamijećeni samo proapoptotički učinci,¹⁷⁹ slično rezultatima našeg istraživanja. Iako smo u istraživanju pokazali da i AICAR i metformin imaju sličan učinak na proliferaciju stanica APL i linija AML koje nisu APL, te iako oba spoja podjednako smanjuju fosforilaciju p70 S6K, u stanicama U937 nismo izmjerili statistički značajno povećanje izražaja diferencijacijskih biljega u odgovoru na metformin. Još jedna razlika u učincima AICAR-a i metformina u našem istraživanju je to što nismo zamijetili povećanje fosforilacije ERK-a u linijama NB4 i U937 nakon inkubacije s metforminom, a to je slično rezultatima na drugim linijama i primarnim stanicama AML-a.⁴⁵

Aktivacija ERK-a se smatra bitnom u granulocitnoj i monocitnoj diferencijaciji stanica HL-60,^{118,157} diferencijaciji stanica U937 potaknutoj s PMA^{118,156} te diferencijaciji stanica U937 u smjeru dendritičkih stanica u odgovoru na SET.¹⁸⁰ U našem istraživanju pokazali smo da aktivacija ERK-a ima ulogu u učincima AICAR-a u stanicama U937 jer je prethodna inkubacija stanica s PD 98059 koji koči ERK spriječila povećanje izražaja diferencijacijskih biljega u odgovoru na AICAR.

Ulogu kinaze AMPK u učincima AICAR-a ispitali smo inkubirajući stanice U937 s tvari C u koncentraciji u kojoj se koristi kao farmakološki inhibitor AMPK-a.⁴⁵ Međutim, tvar C nije značajno smanjila količinu fosforilirane AMPK, osobito nakon 24 sata, ali je zato, umjesto očekivane inhibicije učinaka AICAR-a na aktivaciju MAPK, povećala količinu fosforilirane MAPK slično učincima AICAR-a. Iako se tvar C, poznatija kao dorzomorfin ili BMP-inhibitor I, široko rabi kao specifični farmakološki inhibitor AMPK-a, nedavno istraživanje Baina i sur.¹⁵⁹ pokazalo je da u uobičajenim koncentracijama tvar C koči i druge proteinske kinaze te da je potrebna mnogo veća koncentracija tvari C (40 μ M) kako bi se u stanicama u potpunosti zakočila AMPK. Od osobitog značaja za naše istraživanje su rezultati Baina i sur. koji pokazuju da tvar C u koncentraciji od 1 μ M značajno povećava aktivnost ERK-a *in vitro*, a to je slično rezultatima našeg istraživanja u kojemu smo zamijetili povećanje aktivnosti ERK-a u stanicama U937 koje su tretirane s tvari C u koncentraciji od 10 μ M. Ako je aktivacija ERK-a bitna za diferencijaciju stanica U937, a AICAR i tvar C povećavaju aktivnost ERK-a, onda to može objasniti poticajni učinak obje tvari na izražaj biljega CD11b i CD64.

Nadalje, naši rezultati dobiveni u stanicama U937 koje su transficirane sa siRNA za AMPK pokazuju da su učinci AICAR-a na smanjenje broja živih stanica i izražaj biljega CD11b neovisni o količini AMPK-a u stanici. Sve je više radova koji opisuju učinke AICAR-a u različitim modelima koji su neovisni o AMPK-u.^{175,181-184} U stanicama kronične limfocitne leukemije, AICAR potiče apoptozu neovisno o AMPK-u i p53, a apoptoza izostaje u odgovoru na fenformin i spoj A-769662 koji izravno aktivira AMPK.¹⁸² U stanicama glioma, AICAR i metformin koče proliferaciju neovisno o AMPK-u, a izravni aktivator AMPK-a nema učinka.¹⁸³ U stanicama CML koje su tretirane AICAR-om (akadezinom), Robert i sur.¹⁸¹ su pokazali da učinci AICAR-a na poticanje autofagije ne ovise o AMPK-u već o proteinskoj kinazi C (PKC). U našem istraživanju nismo ispitali moguće učinke izravnog aktivatora AMPK-a na diferencijaciju stanica U937 ili učinke AICAR-a na autofagiju i aktivnost PKC.

Mnogo je drugih mogućih mehanizama koji bi mogli posredovati diferencijaciju stanica U937 u stanice s obilježjima zrelih monocita, budući da AICAR ima snažni učinak na stanični metabolizam i mnoge supstrate koji su ovisni ili neovisni o AMPK-u. Zanimljivo je novije istraživanje koje pokazuje da sam manjak ATP-a može potaknuti diferencijaciju stanica AML-a tako što aktivira signalni put koji se inače aktivira pri oštećenju DNA, a koji uključuje ATR (prema engl. *ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) i neovisan je o

p53.¹⁸⁵ Nadalje, nekoliko je istraživanja ukazalo na ulogu metabolizma u proliferaciji leukemijskih stanica. Skrtić i sur.¹⁸⁶ su dokazali ovisnost stanica AML o mitohondrijskoj translaciji i oksidativnoj fosforilaciji, a Samudio i sur.¹⁸⁷ pokazali da inhibitori oksidacije masnih kiselina koče proliferaciju i pospješuju apoptozu leukemijskih stanica. Prije 80 godina, Otto Warburg je prvi pretpostavio da se tumorske stanice bitno razlikuju u metabolizmu od normalnih stanica te da u aerobnim uvjetima „fermentiraju“ glukozu u laktat (tzv. „aerobna glikoliza“) zbog poremećene funkcije mitohondrija.¹⁸⁸ Nedavno istraživanje funkcije mitohondrija i općeg metabolizma u stanicama HL-60 i U937 u odgovoru na metformin pokazalo je da apoptotički učinci metformina ne ovise o AMPK-u već o skretanju metabolizma na glikolizu i proizvodnju laktata. Stanice U937 koje imaju bazalno povećanu aktivnost Akt-a, prijenos glukoze kroz membranu i povećanu glikolizu zbog toga su manje osjetljive na učinke metformina.¹⁸⁹ U našem istraživanju nismo ispitali metaboličke promjene u stanicama U937 i HL-60 tretiranim s AICAR-om, ali možemo pretpostaviti da se različiti učinci metformina i AICAR-a na diferencijaciju mogu dijelom pripisati i različitim učincima na pojedine metaboličke putove.

Zaključno, rezultati našeg istraživanja pokazuju da AICAR potiče diferencijaciju stanica AML koje nisu APL. Najnoviji rezultati s farmakološkim inhibitorima mutirane izocitrat dehidrogenaze 2 (IDH2/R140Q) pokazuju da se inhibitori koji djeluju na „onkometabolite“ mogu primijeniti u diferencirajućoj terapiji AML-a. Somatske mutacije u genima IDH1 i IDH2 odgovorne su za poticanje redukcije α -ketoglutarata u D-2-hidroksiglutarat koji djeluje kao onkometabolit i potiče epigenetsko reprogramiranje i leukemogenezu, a dodatak inhibitora mutiranog IDH2 potiče diferencijaciju primarnih stanica AML-a *in vitro*.¹⁹⁰

7. ZAKLJUČCI

1. Rapamicin pospješuje učinke DMSO-a na smanjenje broja živih stanica leukemijskih linija.
2. Rapamicin pospješuje izražaj diferencijacijskog biljega CD11b u stanicama potaknutim ATRA-om, a nema učinka u stanicama potaknutim DMSO-om.
3. Rapamicin pospješuje učinke DMSO-a na poticanje apoptoze i nakupljanje leukemijskih stanica u G₀/G₁-fazi staničnog ciklusa.
4. AMPK-aktivatori, AICAR i metformin, koče aktivnost mTOR-a i smanjuju broj živih stanica leukemijskih linija.
5. AICAR i metformin potiču apoptozu stanica NB4 i U937.
6. AICAR pospješuje izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama NB4 koje su tretirane ATRA-om te potiče izražaj biljega zrelih monocita i makrofaga u stanicama U937.
7. AICAR potiče aktivnost MAPK-a u stanicama NB4 i U937, a farmakološki inhibitor MAPK-a koči učinke AICAR-a na izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama U937.
8. Učinci AICAR-a na broj živih stanica U937 i izražaj diferencijacijskih biljega su neovisni o količini AMPK-a.

8. SAŽETAK

Prethodna istraživanja pokazala su da farmakološki modulatori signalnog puta adenozin-monofosfat (AMP)-aktivirane kinaze (AMPK)/mTOR (prema engl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin*) koče proliferaciju stanica akutne mijeloične leukemije (AML), ali njihova uloga u diferencijaciji je manje istražena. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti ulogu signalnog puta AMPK/mTOR u diferencijaciji staničnih linija AML-a. Rezultati su pokazali da rapamicin, inhibitor mTOR-a, pospješuje učinke dvaju promicatelja granulocitne diferencijacije, sve-*trans* retinske kiseline (ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*) i dimetil-sulfoksida (DMSO), na smanjenje broja živih stanica AML-a. Rapamicin je pospješio izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama NB4 koje su tretirane ATRA-om te povećao apoptozu u stanicama NB4 koje su diferencirane DMSO-om. 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleozid (AICAR) i metformin, oba modulatori AMPK-a, zakočili su aktivnost mTOR-a i smanjili proliferaciju stanica AML-a. AICAR je pospješio izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama NB4 koje su tretirane ATRA-om te potaknuo izražaj biljega zrelih monocita i makrofaga u stanicama U937. Učinci AICAR-a nisu ovisni o AMPK-u, a povezani su s povećanjem aktivnosti mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAPK). Ovi rezultati pokazuju povoljne učinke inhibitora mTOR-a i agonista AMPK-a na diferencijaciju staničnih linija AML-a.

9. SUMMARY

The role of AMPK/mTOR signaling pathway in differentiation of leukemia cells

Hrvoje Lalić

Zagreb, 2014

Pharmacological modulators of adenosine monophosphate (AMP)-activated kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway have been shown to exert antiproliferative effects but their role in the differentiation of acute myeloid leukemia (AML) is less explored. The aim of this study was to determine the role of AMPK/mTOR pathway in differentiation of AML cell lines. The results showed that rapamycin, an mTOR inhibitor, enhanced the inhibitory effects of two granulocytic inducers, all-trans retinoic acid (ATRA) and dimethyl-sulphoxide (DMSO), on the number of viable AML cells. Rapamycin enhanced the expression of differentiation markers in ATRA-treated NB4 cells, and increased apoptosis in NB4 cells differentiated with DMSO. Two AMPK modulators, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) and metformin, were shown to inhibit the activity of mTOR and reduce the proliferation of AML cells. AICAR enhanced the expression of differentiation markers in ATRA-treated NB4 cells and induced the expression of markers associated with mature monocytes and macrophages in U937 cells. AICAR-mediated effects were independent of AMPK and associated with an increase in the activity of mitogen-activated protein kinase (MAPK). These results reveal beneficial effects of an mTOR inhibitor and an AMPK agonist in differentiation of AML cell lines.

10. LITERATURA

1. Hardie DG, Carling D, Sim ATR. The AMP-activated protein kinase: a multisubstrate regulator of lipid metabolism. *Trends Biochem Sci* 1989;14:20-23.
2. Ingebritsen TS, Lee HS, Parker RA, Gibson DM. Reversible modulation of the activities of both liver microsomal hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and its inactivating enzyme. Evidence for regulation by phosphorylation-dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;81:1268-77.
3. Yeh LA, Lee KH, Kim KH. Regulation of rat liver acetyl-CoA carboxylase. Regulation of phosphorylation and inactivation of acetyl-CoA carboxylase by the adenylate energy charge. *J Biol Chem* 1980;255:2308-14.
4. Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev* 2011;25:1895-908.
5. Hedbacker K, Carlson M. SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci* 2008;13:2408-20.
6. Russell RC, Yuan HX, Guan KL. Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res* 2014;24:42-57.
7. Mihaylova MM1, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* 2011;13:1016-23.
8. Nakano A, Takashima S. LKB1 and AMP-activated protein kinase: regulators of cell polarity. *Genes Cells* 2012;17:737-47.
9. Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 2011;472:230-3.
10. Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev* 2009;89:1025-78.
11. Xiao B, Heath R, Saiu P, et al. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* 2007;449:496-500.
12. Hawley SA, Ross FA, Chevtzoff C, et al. Use of cells expressing γ subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab* 2010;11:554-65.

13. Machovic M, Janecek S. The evolution of putative starch-binding domains. *FEBS Lett* 2006;580:6349-56.
14. McBride A, Ghilagaber S, Nikolaev A, Hardie DG. The glycogen-binding domain on the AMPK β subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metab* 2009;9:23-34.
15. Warden SM, Richardson C, O'Donnell J Jr, Stapleton D, Kemp BE, Witters LA. Post-translational modifications of the β -1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *Biochem J* 2001;354:275-83.
16. Oakhill JS, Chen ZP, Scott JW, i sur. β -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:19237-41.
17. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, i sur. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* 2003;2:28.
18. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, i sur. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 2003;13:2004-8.
19. Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, i sur. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:3329-35.
20. Jenne DE, Reimann H, Nezu J. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet* 1998;18:38-43.
21. Shackelford DB. Unravelling the connection between metabolism and tumorigenesis through studies of the liver kinase B1 tumour suppressor. *J Carcinog* 2013;12:16.
22. Zeqiraj E, Filippi BM, Deak M, Alessi DR, van Aalten DM. Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science* 2009;326:1707-11.
23. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, i sur. Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2005;2:9-19.

24. Woods A, Dickerson K, Heath R, i sur. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase- β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2005;2:21-33.
25. Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM, Kemp BE, Means AR, Witters LA. The Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* 2005;280:29060-6.
26. Suter M, Riek U, Tuerk R, Schlattner U, Wallimann T, Neumann D. Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2006;281:32207-16.
27. Gowans GJ, Hawley SA, Ross FA, Hardie DG. AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab* 2013;18:556-66.
28. Hardie DG, Alessi DR. LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after. *BMC Biol* 2013;11:36.
29. Oakhill JS, Scott JW, Kemp BE. AMPK functions as an adenylate charge-regulated protein kinase. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:125-32.
30. Hardie DG. AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer. *Diabetes* 2013;62:2164-72.
31. Russo GL, Russo M, Ungaro P. AMP-activated protein kinase: a target for old drugs against diabetes and cancer. *Biochem Pharmacol* 2013;86:339-50.
32. Zhang BB, Zhou G, Li C. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 2009;9:407-16.
33. Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest* 2006;116:1776-83.
34. Salminen A, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Res Rev* 2012;11:230-41.
35. Jones G, Plas DR, Kubek S i sur. AMP-activates protein kinase induces a p53-dependent checkpoint. *Mol Cell* 2005;18:283-93.

36. Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001;108:1167-74.
37. Rena G, Pearson ER, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia* 2013;56:1898-906.
38. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)* 2012;122:253-70.
39. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Avéret N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 2000;275:223-8.
40. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 2000;348:607-14.
41. Xie Z, Dong Y, Scholz R, Neumann D, Zou MH. Phosphorylation of LKB1 at serine 428 by protein kinase C- ξ is required for metformin-enhanced activation of the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation* 2008;117:952-62.
42. Zhang J, Xie Z, Dong Y, Wang S, Liu C, Zou MH. Identification of nitric oxide as an endogenous activator of the AMP-activated protein kinase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2008;283:27452-61.
43. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 2005;330:1304-5.
44. Ben Sahra I, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Bost F. Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug? *Mol Cancer Ther* 2010;9:1092-9.
45. Green AS, Chapuis N, Maciel TT, et al. The LKB1/AMPK signaling pathway has tumor suppressor activity in acute myeloid leukemia through the repression of mTOR-dependent oncogenic mRNA translation. *Blood* 2010;116:4262-73.
46. Vakana E, Altman JK, Glaser H, Donato NJ, Plataniias LC. Antileukemic effects of AMPK activators on BCR-ABL-expressing cells. *Blood* 2011;118:6399-402.

47. Grimaldi C, Chiarini F, Tabellini G, i sur. AMP-dependent kinase/mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia: therapeutic implications. *Leukemia* 2012;26:91-100.
48. Rosilio C, Lounnas N, Nebout M, i sur. The metabolic perturbators metformin, phenformin and AICAR interfere with the growth and survival of murine PTEN-deficient T cell lymphomas and human T-ALL/T-LL cancer cells. *Cancer Lett* 2013;336:114-26.
49. Shi WY, Xiao D, Wang L, i sur. Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell Death Dis* 2012;3:e275.
50. Sullivan JE, Carey F, Carling D, Beri RK. Characterisation of 5'-AMP-activated protein kinase in human liver using specific peptide substrates and the effects of 5'-AMP analogues on enzyme activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200:1551-6.
51. Sullivan JE, Brocklehurst KJ, Marley AE, Carey F, Carling D, Beri RK. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett* 1994;353:33-6.
52. Ceschin J, Saint-Marc C, Laporte J, i sur. Identification of Yeast and Human 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) Transporters. *J Biol Chem* 2014;289:16844-54.
53. Hürlimann HC, Laloo B, Simon-Kayser B, i sur. Physiological and toxic effects of purine intermediate 5-amino-4-imidazolecarboxamide ribonucleotide (AICAR) in yeast. *J Biol Chem* 2011;286:30994-1002.
54. Daignan-Fornier B, Pinson B. 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranosyl 5'-monophosphate (AICAR), a highly conserved purine intermediate with multiple effects. *Metabolites* 2012;2:292-302.
55. Mangano DT. Effects of acadesine on myocardial infarction, stroke, and death following surgery. A meta-analysis of the 5 international randomized trials. The Multicenter Study of Perioperative Ischemia (McSPI) Research Group. *JAMA* 1997;277:325-32.
56. Vincent MF, Erion MD, Gruber HE, Van den Berghe G. Hypoglycaemic effect of AICARiboside in mice. *Diabetologia* 1996;39:1148-55.

57. Narkar VA, Downes M, Yu RT, i sur. AMPK and PPAR δ agonists are exercise mimetics. *Cell* 2008;134:405-15.
58. Green AS, Chapuis N, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D, Tamburini J. LKB1/AMPK/mTOR signaling pathway in hematological malignancies: from metabolism to cancer cell biology. *Cell Cycle* 2011;10:2115-20.
59. Campàs C, Lopez JM, Santidrián AF, i sur. Acadesine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes. *Blood* 2003;101:3674-80.
60. Campàs C, Santidrián AF, Domingo A, Gil J. Acadesine induces apoptosis in B cells from mantle cell lymphoma and splenic marginal zone lymphoma. *Leukemia* 2005;19:292-4.
61. Beauchamp EM, Platanias LC. The evolution of the TOR pathway and its role in cancer. *Oncogene* 2013;32:3923-32.
62. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012;149:274-93.
63. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:21-35.
64. Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* 2010;40:310-22.
65. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003;115:577-90.
66. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, i sur. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2008;30:214-26.
67. Polak R, Buitenhuis M. The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: implications for therapeutic strategies in leukemia. *Blood* 2012;119:911-23.
68. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008;27:5497-510.
69. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:627-44.

70. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front Oncol* 2014;4:64.
71. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006;7:606-19.
72. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009;9:550-62.
73. Martelli AM, Chiarini F, Evangelisti C, i sur. Two hits are better than one: targeting both phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy for acute leukemia treatment. *Oncotarget* 2012;3:371-94.
74. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, i sur. Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. *Oncotarget* 2012;3:954-87.
75. Potter CJ, Huang H, Xu T. Drosophila Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. *Cell* 2001;105:357-68.
76. Tapon N, Ito N, Dickson BJ, Treisman JE, Hariharan IK. The Drosophila tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation. *Cell* 2001;105:345-55.
77. Blagosklonny MV. TOR-centric view on insulin resistance and diabetic complications: perspective for endocrinologists and gerontologists. *Cell Death Dis* 2013;4:e964.
78. Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 2008;27:5527-41.
79. Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, Bagg A, Carroll M. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood* 2003;102:972-80.
80. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 1991;253:905-9.
81. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 1994;78:35-43.

82. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, i sur. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 1994;369:756-8.
83. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Tranplant Proc* 2003 35(3 Suppl):7S-14S.
84. Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 2004;23:3151-71.
85. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:596-603.
86. Raichlin E, Bae JH, Khalpey Z, i sur. Conversion to sirolimus as primary immunosuppression attenuates the progression of allograft vasculopathy after cardiac transplantation. *Circulation* 2007;116:2726-33.
87. Hernández D, Martínez D, Gutiérrez E, i sur. Clinical evidence on the use of anti-mTOR drugs in renal transplantation. *Nefrologia* 2011;31:27-34.
88. Li Y, Kim SG, Blennis J. Rapamycin:one drug, many effects. *Cell Metab* 2014;19:373-379.
89. Altman JK, Plataniias LC. Exploiting the mammalian target of rapamycin pathway in hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol* 2008;15:88-94.
90. Récher C, Beyne-Rauzy O, Demur C i sur. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005;105:2527-34.
91. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Koeffler HP, Yokoyama A. Blockade of mTOR signaling potentiates the ability of histone deacetylase inhibitor to induce growth arrest and differentiation of acute myelogenous leukemia cells. *Leukemia* 2008;22:2159-68.
92. Rizzieri DA, Feldman E, Dipersio JF i sur. A phase 2 clinical trial of deforolimus (AP23573, MK-8669), a novel mammalian target of rapamycin inhibitor, in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 2008;14:2756-62.

93. Yee KW, Zeng Z, Konopleva M i sur. Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 2006;12:5165-73.
94. Kharas MG, Janes MR, Scarfone VM i sur. Ablation of PI3K blocks BCR-ABL leukemogenesis in mice, and a dual PI3K/mTOR inhibitor prevents expansion of human BCR-ABL+ leukemia cells. *J Clin Invest* 2008;118:3038-50.
95. Sun SY1, Rosenberg LM, Wang X, i sur. Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res* 2005;65:7052-8.
96. Tamburini J, Chapuis N, Bardet V, i sur. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood* 2008;111:379-82.
97. Matkovic K, Brugnoli F, Bertagnolo V, Banfic H, Visnjic D. The role of the nuclear Akt activation and Akt inhibitors in all-trans-retinoic acid-differentiated HL-60 cells. *Leukemia* 2006;20:941-51.
98. Mise J, Dembitz V, Banfic H, Visnjic D. Combined inhibition of PI3K and mTOR exerts synergistic antiproliferative effect, but diminishes differentiative properties of rapamycin in acute myeloid leukemia cells. *Pathol Oncol Res* 2011;17:645-56.
99. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Gery S, Koeffler HP, Yokoyama A. Inhibition of mammalian target of rapamycin signaling potentiates the effects of all-trans retinoic acid to induce growth arrest and differentiation of human acute myelogenous leukemia cells. *Int J Cancer* 2009;125:1710-20.
100. Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Ni L, Koeffler HP, Yokoyama A. Inhibition of mTORC1 by RAD001 (everolimus) potentiates the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ to induce growth arrest and differentiation of AML cells in vitro and in vivo. *Exp Hematol* 2010;38:666-76.
101. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukemia. *Lancet* 2006;368:1894-907.

102. Peloquin GL, Chen YB, Fathi AT. The evolving landscape in the therapy of acute myeloid leukemia. *Protein Cell* 2013;4:735-46.
103. Lengfelder E, Hofmann WK, Nolte F. Management of elderly patients with acute promyelocytic leukemia: progress and problems. *Ann Hematol* 2013;92:1181-8.
104. Mi JQ, Li JM, Shen ZX, Chen SJ, Chen Z. How to manage acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 2012;26:1743-51.
105. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114:937-51.
106. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group". *Br J Haematol* 1976;33:451-8.
107. Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 2008;111:2505-15.
108. Petrie K, Zelent A, Waxman S. Differentiation therapy of acute myeloid leukemia: past, present and future. *Curr Opin Hematol* 2009;16:84-91.
109. Sachs. Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukaemia. *Nature* 1978;274:535-9.
110. Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:2936-40.
111. Huang ME, Ye YC, Chen SR, et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1988;72:567-72.
112. Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, et al. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. *Blood* 1990;76:1704-9.
113. Warrell RP Jr, Frankel SR, Miller WH Jr, et al. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid). *N Engl J Med* 1991;324:1385-93.

114. Al Tanoury Z, Piskunov A, Rochette-Egly C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *J Lipid Res* 2013;54:1761-75.
115. Altucci L, Leibowitz MD, Ogilvie KM, de Lera AR, Gronemeyer H. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:793-810.
116. Lo-Coco F, Ammatuna E. The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006;156-61, 514.
117. Bernardi R, Pandolfi PP. A dialog on the first 20 years of PML research and the next 20 ahead. *Front Oncol* 2014;4:23.
118. Miranda MB, McGuire TF, Johnson DE. Importance of MEK-1/-2 signaling in monocytic and granulocytic differentiation of myeloid cell lines. *Leukemia* 2002;16:683-692.
119. Bertagnolo V, Neri LM, Marchisio M, Mischiati C, Capitani S. Phosphoinositide 3-kinase activity is essential for all-trans-retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Cancer Res* 1999;59:542-6.
120. Lal L, Li Y, Smith J, i sur. Activation of the p70 S6 kinase by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 2005;105:1669-77.
121. Gallagher R, Collins S, Trujillo J, i sur. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1979;54:713-33.
122. Harris P, Ralph P. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukoc Biol* 1985;37:407-22.
123. Collins SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 1987;70:1233-44.
124. Koefler HP, Golde DW. Human myeloid cell lines: a review. *Blood* 1980;56:344-350.
125. Barber N, Belov L, Christopherson RI. All-trans retinoic acid induces different immunophenotypic changes on human HL60 and NB4 myeloid leukaemias. *Leuk Res* 2008;32:315-22.

126. Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75:2458-62.
127. Vondráček J, Sheard MA, Krejčí P, Minksová K, Hofmanová J, Kozubík A. Modulation of death receptor-mediated apoptosis in differentiating human myeloid leukemia HL-60 cells. *J Leukoc Biol* 2001;69:794-802.
128. Chaplinski TJ, Nidel JE. Cyclic nucleotide-induced maturation of human promyelocytic leukemia cells. *J Clin Invest* 1982;7:953-64.
129. Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, Berger R. NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* 1991;77:1080-6.
130. Roussel MJ, Lanotte M. Maturation sensitive and resistant t(15;17) NB4 cell lines as tools for APL physiopathology: nomenclature of cells and repertory of their known genetic alterations and phenotypes. *Oncogene* 2001;20:7287-91.
131. Monczak Y, Trudel M, Lamph WW, Miller WH Jr. Induction of apoptosis without differentiation by retinoic acid in PLB-985 cells requires the activation of both RAR and RXR. *Blood* 1997;90:3345-55.
132. Bhatia M, Kirkland JB, Meckling-Gill KA. M-CSF and 1,25 dihydroxy vitamin D3 synergize with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate to induce macrophage differentiation in acute promyelocytic leukemia NB4 cells. *Leukemia* 1994;8:1744-9.
133. Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 1976;17:565-77.
134. Agis H, Füreder W, Bankl HC. Comparative immunophenotypic analysis of human mast cells, blood basophils and monocytes. *Immunology* 1996;87:535-43.
135. Andersson A, Edén P, Lindgren D, i sur. Gene expression profiling of leukemic cell lines reveals conserved molecular signatures among subtypes with specific genetic aberrations. *Leukemia* 2005;19:1042-50.

136. Olsson IL, Breitman TR. Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by retinoic acid and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-inducing agents. *Cancer Res* 1982;42:3924-7.
137. Dodd RC, Cohen MS, Newman SL, Gray TK. Vitamin D metabolites change the phenotype of monoclastic U937 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:7538-41.
138. Ralph P, Harris PE, Punjabi CJ, i sur. Lymphokine inducing "terminal differentiation" of the human monoblast leukemia line U937: a role for gamma interferon. *Blood* 1983;62:1169-75.
139. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975;45:321-34.
140. Sutherland JA, Turner AR, Mannoni P, McGann LE, Turc JM. Differentiation of K562 leukemia cells along erythroid, macrophage, and megakaryocyte lineages. *J Biol Response Mod* 1986;5:250-62.
141. Kong XZ, Yin RH, Ning HM, i sur. Effects of THAP11 on erythroid differentiation and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *PLoS One* 2014 17;9(3):e91557.
142. Koefler HP, Golde DW. Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science* 1978;200:1153-4.
143. Koefler HP, Billing R, Lusic AJ, Sparkes R, Golde DW. An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1). *Blood* 1980;56:265-73.
144. St Louis DC, Woodcock JB, Franzoso G, i sur. Evidence for distinct intracellular signaling pathways in CD34+ progenitor to dendritic cell differentiation from a human cell line model. *J Immunol* 1999;162:3237-48.
145. Gurtovenko AA, Anwar J. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. *J Phys Chem B* 2007;111:10453-60.
146. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* 2003;65:1035-41.

147. Friend C, Scher W, Holland JG, Sato T. Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:378-82.
148. Lyman GH, Preisler HD, Papahadjopoulos D. Membrane action of DMSO and other chemical inducers of Friend leukaemic cell differentiation. *Nature* 1976;262:361-3.
149. Vondráček J, Soucek K, Sheard MA, i sur. Dimethyl sulfoxide potentiates death receptor-mediated apoptosis in the human myeloid leukemia U937 cell line through enhancement of mitochondrial membrane depolarization. *Leuk Res* 2006;30:81-9.
150. Chetty S, Pagliuca FW, Honore C, Kweudjeu A, Rezanian A, Melton DA. A simple tool to improve pluripotent stem cell differentiation. *Nat Methods* 2013;10:553-6.
151. Tanaka M, Levy J, Terada M, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA. Induction of erythroid differentiation in murine virus infected eythroleukemia cells by highly polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:1003-6.
152. Višnjić D, Batinić D, Banfić H. Arachidonic acid mediates interferon- γ -induced sphingomyelin hydrolysis and monocytic marker expression in HL-60 cell line. *Blood* 1997; 89:81-91.
153. Lukinovic-Skudar V, Matkovic K, Banfic H, Visnjic D. Two waves of the nuclear phospholipase C activity in serum-stimulated HL-60 cells during G(1) phase of the cell cycle. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771:514-21.
154. Višnjić D, Čurić J, Crljen V, Batinić D, Volinia S, Banfić H. Nuclear phosphoinositide 3-kinase C2 β activation during G₂/M phase of the cell cycle in HL-60 cells. *Biochim Biophys Acta* 2003;1631:61-71.
155. Wall M, Poortinga G, Hannan KM, Pearson RB, Hannan RD, McArthur GA. Translational control of c-MYC by rapamycin promotes terminal myeloid differentiation. *Blood* 2008;112:2305-17.
156. Ajenjo N, Aaronson DS, Ceballos E, Richard C, León J, Crespo P. Myeloid leukemia cell growth and differentiation are independent of mitogen-activated protein kinase ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 2000;275:7189-97.

157. Wang X, Studzinski GP. Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) defines the first phase of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced differentiation of HL60 cells. *J Cell Biochem.* 2001;80(4):471-82.
158. Matkovic K, Lukinovic-Skudar V, Banfic H, Visnjic D. The activity of extracellular signal-regulated kinase is required during G₂/M phase before metaphase-anaphase transition in synchronized leukemia cell lines. *Int J Hematol* 2009;89:159-66.
159. Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J.* 2007;408:297-315.
160. Yamamoto-Yamaguchi Y, Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y. Induction of differentiation of human myeloid leukemia cells by immunosuppressant macrolides (rapamycin and FK506) and calcium/calmodulin-dependent kinase inhibitors. *Exp Hematol* 2001;29:582-8.
161. Isakson P, Bjørås M, Bøe SO, Simonsen A. Autophagy contributes to therapy-induced degradation of the PML/RARA oncoprotein. *Blood* 2010;116:2324-31.
162. Billottet C, Banerjee L, Vanhaesebroeck B, Khwaja A. Inhibition of class I phosphoinositide 3-kinase activity impairs proliferation and triggers apoptosis in acute promyelocytic leukemia without affecting atra-induced differentiation. *Cancer Res* 2009;69:1027-36.
163. Xie N, Zhong L, Liu L, i sur. Autophagy contributes to dasatinib-induced myeloid differentiation of human acute myeloid leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 2014;89:74-85.
164. Foster DA, Yellen P, Xu L, Saqcena M. Regulation of G₁ Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). *Genes Cancer* 2010;1:1124-31.
165. Ponzio G, Loubat A, Rochet N, i sur. Early G₁ growth arrest of hybridoma B cells by DMSO involves cyclin D2 inhibition and p21^[CIP1] induction.
166. Bürger C, Wick M, Müller R. Lineage-specific regulation of cell cycle gene expression in differentiating myeloid cells. *J Cell Sci* 1994;107:2047-54.

167. Gomez-Cambronero J, Frye T, Baumann M. Ribosomal p70S6K basal activity increases upon induction of differentiation of myelomonocytic leukemic cell lines HL60, AML14 and MPD. *Leuk Res* 2004;28:755-62.
168. Clarke CJ, Mediwala K, Jenkins RW, Sutton CA, Tholanikunnel BG, Hannun YA. Neutral sphingomyelinase-2 mediates growth arrest by retinoic acid through modulation of ribosomal S6 kinase. *J Biol Chem* 2011;286:21565-76.
169. Parmar S, Smith J, Sassano A, et al. Differential regulation of the p70 S6 kinase pathway by interferon α (IFN α) and imatinib mesylate (STI571) in chronic myelogenous leukemia cells. *Blood* 2005;106:2436-43.
170. Zhu Q, Zhang JW, Zhu HQ, et al. Synergic effects of arsenic trioxide and cAMP during acute promyelocytic leukemia cell maturation subtends a novel signaling cross-talk. *Blood* 2002;99:1014-22.
171. Hu Y, Yao J, Liu Z, Liu X, Fu H, Ye K. Akt phosphorylates acinus and inhibits its proteolytic cleavage, preventing chromatin condensation. *EMBO J* 2005;24:3543-54.
172. Neri LM, Marchisio M, Colamussi ML, Bertagnolo V. Monocytic differentiation of HL-60 cells is characterized by the nuclear translocation of phosphatidylinositol 3-kinase and of definite phosphatidylinositol-specific phospholipase C isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:314-20.
173. Chae HD, Lee MR, Broxmeyer HE. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside induces G(1)/S arrest and Nanog downregulation via p53 and enhances erythroid differentiation. *Stem Cells* 2012;30:140-9.
174. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Sugimoto T. Activation of AMP kinase and inhibition of Rho kinase induce the mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells through endothelial NOS and BMP-2 expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E139-46.
175. Zang Y, Yu LF, Pang T, et al. AICAR induces astroglial differentiation of neural stem cells via activating the JAK/STAT3 pathway independently of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2008;283:6201-8.

176. Kanellis J, Kandane RK, Etemadmoghadam D, i sur. Activators of the energy sensing kinase AMPK inhibit random cell movement and chemotaxis in U937 cells. *Immunol Cell Biol* 2006;84:6-12.
177. Bae HB, Zmijewski JW, Deshane JS, i sur. AMP-activated protein kinase enhances the phagocytic ability of macrophages and neutrophils. *FASEB J* 2011;25:4358-68.
178. Zou MH, Hou XY, Shi CM, i sur. Activation of 5'-AMP-activated kinase is mediated through c-Src and phosphoinositide 3-kinase activity during hypoxia-reoxygenation of bovine aortic endothelial cells. Role of peroxynitrite. *J Biol Chem* 2003;278:34003-10.
179. Huai L, Wang C, Zhang C, i sur. Metformin induces differentiation in acute promyelocytic leukemia by activating the MEK/ERK signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;422:398-404.
180. Kandilci A, Grosveld GC. SET-induced calcium signaling and MAPK/ERK pathway activation mediate dendritic cell-like differentiation of U937 cells. *Leukemia* 2005;19:1439-45.
181. Robert G, Ben Sahra I, Puissant A, i sur. Acadesine kills chronic myelogenous leukemia (CML) cells through PKC-dependent induction of autophagic cell death. *PLoS One* 2009;4:e7889.
182. Santidrián AF, González-Gironès DM, Iglesias-Serret D, i sur. AICAR induces apoptosis independently of AMPK and p53 through up-regulation of the BH3-only proteins BIM and NOXA in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2010;116:3023-32.
183. Liu X, Chhipa RR, Pooya S, i sur. Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:E435-44.
184. Vincent EE, Coelho PP1, Blagih J, Griss T, Viollet B, Jones RG. Differential effects of AMPK agonists on cell growth and metabolism. *Oncogene* 2014; doi: 10.1038/onc.2014.301.
185. Chakrabarti A, Gupta K, Sharma JP, i sur. ATP depletion triggers acute myeloid leukemia differentiation through an ATR/Chk1 protein-dependent and p53 protein-independent pathway. *J Biol Chem* 2012;287:23635-43.

186. Skrtić M, Sriskanthadevan S, Jhas B, i sur. Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2011;20:674-88.
187. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, i sur. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest* 2010;120:142-56.
188. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956;123:309-14.
189. Scotland S, Saland E, Skuli N, i sur. Mitochondrial energetic and AKT status mediate metabolic effects and apoptosis of metformin in human leukemic cells. *Leukemia* 2013;27:2129-38.
190. Wang F, Travins J, DeLaBarre B, i sur. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science* 2013;340:622-6.

11. ŽIVOTOPIS

Hrvoje Lalić rođen je 1984. godine u Makarskoj. Osnovnu školu završio je u Tučepima 1998. godine, a srednjoškolsko obrazovanje 2003. godine u općoj gimnaziji fra Andrije Kačića Miošića u Makarskoj kada i upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. 2005. godine dobiva Dekanovu nagradu za najboljeg studenta 2. godine. Diplomirao je 2009. sa zvanjem doktor medicine (dr.med) te je iste godine u listopadu počeo s odrađivanjem pripravničkog staža na KB Merkur u trajanju od godinu dana. 2010. godine položio je državni ispit te stekao odobrenje za samostalan rad. Od ožujka 2011. godine zaposlen je kao asistent na Zavodu za fiziologiju i imunologiju gdje aktivno sudjeluje u izvođenju nastavnog programa seminara i vježbi, a sudjeluje i u nastavi fiziologije i imunologije na studiju medicine na engleskom jeziku. Istodobno, radi i na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, u Laboratoriju za druge glasnike, na projektima pod mentorstvom prof. dr. sc. Dore Višnjic (Potpora Sveučilišta u Zagrebu 2013-ZUID-02; MZOS 108-1081347-1448). U listopadu 2011. godine upisuje poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Prvi je autor na dva znanstvena rada publicirana u časopisima koji su indeksirani u Current Contents-u, a koautor je na jednom radu publiciranom u međunarodno indeksiranom časopisu.

Publikacije:

1. Lalic H, Lukinovic-Skudar V, Banfic H, Visnjic D. Rapamycin enhances dimethyl sulfoxide-mediated growth arrest in human myelogenous leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 2012;53:2253-61.
2. Lalic H, Dembitz V, Lukinovic-Skudar V, Banfic H, Visnjic D. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside induces differentiation of acute myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 2014;55:2375-83.
3. Visnjic D, Lalic H, Dembitz V, Banfic H. Metabolism and differentiation. *Period Biol* 2014;116:37-43.