

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Vilma Dembitz

**Autofagija i metaboličke promjene u
diferencijaciji staničnih linija akutne
mijeloične leukemije**

DISERTACIJA



Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Vilma Dembitz

**Autofagija i metaboličke promjene u
diferencijaciji staničnih linija akutne
mijeloične leukemije**

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za staničnu biologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Dora Višnjic

ZAHVALA

Hvala prof. dr. sc. Srđanu Verstovšku na pruženoj prilici za edukaciju u njegovom laboratoriju u MD Anderson Cancer Centeru, Houston, TX, SAD i dr.sc. Taghiju Manshouriju na svemu što me naučio dok sam bila tamo, prije svega da „*Whatever you start you have to finish.*“

Hvala prof. dr. sc. Dragi Batiniću i gđama Aleksandri Delak Fidri i Gordani Fressl-Juroš iz Zavoda za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb na pomoći oko mjerenja koncentracija glukoze i laktata.

Hvala Petri Prgomet, mag. dizajna na pomoći oko izrade ilustracija za poglavlje Uvod.

Hvala gđi Dunji Tanković što me je naučila svemu što znam o osnovama rada u laboratoriju te što je ostala naša prijateljica i dio naše grupe, iako više ne radi s nama.

Hvala gđi Marijani Andrijašević na velikoj tehničkoj pomoći u istraživačkom radu, ali i na svojoj pruženoj toplini i podršci. Staničnu kulturu bih u protekle dvije godine možda uspjela održavati i bez Marijane. Pozitivan stav kad posao krene krivo i zdravi odmak od poteškoća vjerojatno ne bih.

Hvala dr. sc. Hrvoju Laliću na ogromnom trudu koji ulaže u sva naša istraživanja pa tako i u ovaj doktorat. Hrvoje mi je od početka bio nešto poput starijeg brata na poslu, i kad mi je trebalo „držati leđa“ i kad me je trebalo korigirati. Posljedica tog iskustva je da sam nakon četiri godine rada s Hrvojem ispala bolja čak i u stvarima koje ni s poslom ni s njim nemaju nikakve veze.

Hvala prof. dr. sc. Dori Višnjic koja je počela raditi sa mnom još dok sam bila student druge godine medicine i u proteklih osam godina presudno usmjerila moj profesionalni razvoj. Sretna je okolnost da profesorica baš ne voli ove sentimentalne zahvale jer se sve na čemu sam njoj zahvalna vrlo teško može izreći riječima.

Hvala mojoj obitelji i svima koji su mi bliski na svemu što mi znače i svemu što rade za mene.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Akutna mijeloična leukemija	1
1.1.1. Kliničke i molekularne osobine bolesti	1
1.1.2. Akutna promijelocitna leukemija	3
1.1.3. Stanične linije AML-a kao modeli za istraživanje diferencijacije	4
1.2. Signalni put AMPK-mTOR u regulaciji staničnog metabolizma	5
1.2.1. AMPK-mTOR – uloga u prijenosu signala u stanici	5
1.2.2. Modulatori puta AMPK-mTOR	8
1.2.3. Specifičnosti metaboličke regulacije u tumorskim stanicama	12
1.3. Autofagija.....	14
1.3.1. Regulacija autofagije.....	14
1.3.2. Uloga autofagije u regulaciji diferencijacije leukemijskih stanica	17
2. HIPOTEZA	19
3. CILJEVI.....	19
3.1. Opći cilj.....	19
3.2. Specifični ciljevi.....	19
4. MATERIJALI I METODE	20
4.1. Kemikalije.....	20
4.2. Stanična kultura.....	22
4.3. Određivanje izražaja površinskih biljega protočnom citometrijom	23
4.4. Određivanje koncentracije glukoze i laktata u mediju	24
4.5. Izoliranje ukupnih staničnih lizata i analiza Western blot	24
4.6. Izoliranje kiselih lipida i određivanje razine PtdIns(3)P	25
4.7. Utišavanje proteinske ekspresije metodom RNA-interferencije.....	26
4.8. Umnažanje i izolacija plazmidne DNA.....	27

4.9. Generiranje stabilno transficirane stanične linije U937 koja izražava mRFP-GFP-LC3B	29
4.10. Imunofluorescencijsko obilježavanje i analiza konfokalnom mikroskopijom.....	29
4.11. Statistička analiza.....	30
5. REZULTATI.....	31
5.1. Učinci AICAR-a i specifičnog aktivatora AMPK-a A769662 na stanice leukemijskih linija	31
5.2. Učinci AICAR-a, ATRA-e i metformina na metabolizam glukoze u stanicama U937	32
5.3. AICAR i drugi diferencijacijski agensi povećavaju razinu LC3B-II.....	34
5.4. Djelovanje farmakoloških modulatora autofagije na učinke AICAR-a i drugih diferencijacijskih tvari.....	40
5.5. Djelovanje smanjenog izražaja proteina hVps34, Beclin-1 i Atg7 na učinke AICAR-a i drugih diferencijacijskih tvari	44
6. RASPRAVA	52
6.1. Učinci AICAR-a su neovisni o AMPK-u	52
6.2. Učinci AICAR-a i glikoliza	53
6.3. AICAR potiče autofagiju u stanicama U937	55
6.4. Farmakološki modulatori autofagije nisu specifični za autofagiju	56
6.5. Diferencijacijski učinci AICAR-a ne ovise o količini hVps34 i Beclina-1	57
6.6. Smanjenje količine proteina Atg7 ne inhibira diferencijaciju stanica U937.....	60
6.7. Uloga autofagije u učincima AICAR-a na stanice U937	61
7. ZAKLJUČCI.....	64
8. SAŽETAK.....	65
9. SUMMARY	66
10. LITERATURA.....	67
11. ŽIVOTOPIS	77

POPIS KRATICA

α -KG:	α -ketoglutarat
2-DG:	2-deoksiglukoza
2-HG:	2-hidroksiglutarat
3-MA:	3-metiladenin
4EBP1:	protein 1 koji se veže za 4E (prema engl. <i>4E binding protein 1</i>)
ADP:	5'-adenozin difosfat
AICAR:	5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleozid (prema engl. <i>5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide</i>)
Akt:	proteinska kinaza B
ALL:	akutna limfatična leukemija
AML:	akutna mijeloična leukemija
AMP:	5'-adenozin monofosfat
AMPK:	AMP-ovisna kinaza
APL:	akutna promijelocitna leukemija
Atg:	protein vezan uz autofagiju
ATP:	5'-adenozin trifosfat
ATRA:	sve- <i>trans</i> -retinska kiselina (prema engl. <i>all-trans-retinoic acid</i>)
CD:	biljeg diferencijacije (prema engl. <i>cluster of differentiation</i>)
DMSO:	dimetil-sulfoksid
eIF4E:	eukariotski čimbenik inicijacije translacije 4E (prema engl. <i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i>)
FAB-klasifikacija:	klasifikacija AML-a francuskih, američkih i britanskih patologa

FBS:	fetusni goveđi serum (prema engl. <i>fetal bovine serum</i>)
GFP:	zeleni fluorescentni protein (prema engl. <i>green fluorescent protein</i>)
GM-CSF:	granulocitno-makrofagni čimbenik stimulacije kolonija (prema engl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>); drugi naziv je čimbenik stimulacije kolonija 2 ili CSF-2 (prema engl. <i>colony stimulating factor 2</i>)
hVps34:	homolog Vps34 u stanicama sisavaca; drugi naziv za fosfatidilinozitol 3-kinazu razreda III
IDH:	izocitrat-dehidrogenaza
KLL:	kronična limfatična leukemija
KML:	kronična mijeloična leukemija
LC3:	protein lakog lanca 3 (prema engl. <i>light chain 3</i>)
LIC:	stanice inicijatori leukemije (prema engl. <i>leukemia initiating cells</i>)
LKB1:	jetrena kinaza B1 (prema engl. <i>liver kinase B1</i>)
M-CSF:	makrofagni čimbenik stimulacije kolonija (prema engl. <i>macrophage colony-stimulating factor</i>); drugi naziv je čimbenik stimulacije kolonija 1 ili CSF-1 (prema engl. <i>colony stimulating factor 1</i>)
MFI:	srednji intenzitet fluorescencije (prema engl. <i>mean fluorescence intensity</i>)
mRFP:	monomerni crveni fluorescentni protein (prema engl. <i>monomeric red fluorescent protein</i>)
mTOR:	ciljna molekula rapamicina u sisavaca (prema engl. <i>mammalian target of rapamycin</i>)
mTORC1:	kompleks 1 mTOR-a (prema engl. <i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>)

PBS:	fiziološka otopina puferirana fosfatom (prema engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PE:	fosfatidiletanolamin (prema engl. <i>phosphatidylethanolamine</i>)
PI3K:	fosfatidilinozitol 3-kinaza (prema engl. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PI3KC1:	PI3K razreda I (prema engl. <i>PI3K class I</i>)
PI3KC2:	PI3K razreda II (prema engl. <i>PI3K class II</i>)
PI3KC3:	PI3K razreda III (prema engl. <i>PI3K class III</i>); drugi naziv hVps34
PMA:	forbol 12-miristat 13-acetat (prema engl. <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>)
PML-RAR α :	fuzijski protein tumorskog supresora PML-a i receptora za retinsku kiselinu α (prema engl. PML – <i>promyelocytic leukemia</i> , RAR α – <i>retinoic acid receptor a</i>)
PtdIns(3)P:	fosfatidilinozitol 3-fosfat (prema engl. <i>phosphatidylinositol 3-phosphate</i>)
PTEN:	homolog fosfataze i tenzina (prema engl. <i>phosphatase and tensin homolog</i>),
S6K:	S6 kinaza
SDS-PAGE:	elektroforeza s natrijevim dodecil sulfatom na poliakrilamidnom gelu (prema engl. SDS – <i>sodium dodecyl sulfate</i> , PAGE – <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEM:	standardna pogreška (prema engl. <i>standard error of the mean</i>)
shRNA:	kratka RNA nalik na ukosnicu (prema engl. <i>short hairpin RNA</i>)
siRNA:	mala interferirajuća RNA (prema engl. <i>small interfering RNA</i>)
TSC:	kompleks tuberozne skleroze (prema engl. <i>tuberous sclerosis complex</i>)
ULK1:	kinaza slična unc-51 koja aktivira autofagiju 1 (prema engl. <i>unc-51 like autophagy activating kinase 1</i>)

1. UVOD

1.1. Akutna mijeloična leukemija

1.1.1. Kliničke i molekularne osobine bolesti

Akutna mijeloična leukemija (AML) je vrlo heterogena maligna bolest krvotvornog sustava. Karakterizira ju nakupljanje slabo ili nepravilno diferenciranih stanica podrijetlom iz hematopoetske matične stanice ili prekursora mijeloične loze u koštanoj srži i krvi oboljeloga. Takve promijenjene stanice brzo klonalno proliferiraju i imaju promijenjeno preživljenje pa njihova ekspanzija potiskuje normalnu hematopoezu što dovodi do smanjene proizvodnje zrelih krvnih stanica i kliničkog izražaja bolesti. Izražena heterogenost bolesti uzrokovana je nizom različitih kombinacija genetičkih promjena koje se nakupljaju u stanicama AML-a zbog kojih pacijenti međusobno izrazito variraju u genetskom smislu što se odražava u razlikama u prognozi te odgovoru na liječenje. Varijabilnost je prisutna i unutar samog pacijenta jer je genomskim studijama pokazano da je u većini slučajeva AML-a u trenutku dijagnoze osim osnovnog klona prisutan i barem jedan subklon. Također sve više studija ukazuje na prisutnost klonalne evolucije, kako u početnom mehanizmu nastanka bolesti tako i u pojavi relapsa, što vjerojatno može doprinijeti otpornosti na terapiju (1).

Tablica 1. Funkcionalne kategorije genetskih promjena u AML-u (1, 2)

Funkcionalna kategorija	Primjeri	Biološko djelovanje
Aktiviranje signalnih puteva	<i>FLT3, KIT, KRAS, NRAS</i>	Poticanje proliferacije kroz aktivnost nizvodnih signalnih puteva Ras-Raf, JAK-STAT i PI3K-Akt
Promjene u metilaciji DNA	<i>DNMT3A, TET2, IDH1 i IDH2</i>	Promjene u transkripciji pojedinih gena – hipermetilacija dovodi do utišavanja transkripcije dok hipometilacija uzrokuje pojačanu transkripciju pojedinih gena
Modifikatori kromatina	<i>MLL, ASXL1, EZH2</i>	Poremećena epigenetska homeostaza, ometanje funkcije metiltransferaza
Nukleofosmin	<i>NPM1</i>	Ometanje ispravne lokalizacije proteina između jezgre i citoplazme
Transkripcijski faktori mijeloične loze	<i>RUNX1, RUNX1-RUNX1T1, CEBPA, PML-RARα, MYH11-CBFB</i>	Deregulacija transkripcije i ometanje normalne diferencijacije hematopoetskih stanica
Tumor-supresorski geni	<i>TP53, WT1, PHF6</i>	Deregulacija transkripcije ili smanjena degradacija tumor-supresora
Kompleks spliceosoma	<i>SRSF2, U2AF1</i>	Deregulacija procesiranja RNA
Kompleks kohezina	<i>STAG2, RAD21, SMC1, SMC3</i>	Ometanje ispravne segregacije kromosoma i regulacije transkripcije

Iako je broj gena koji su mutirani u oboljelih od AML-a izrazito visok (> 2000), tek je manji broj (njih dvadesetak) mutiran u nešto većem udjelu pacijenata, a i tada je u pravilu riječ o manje od 10% pacijenata kod kojih je prisutna takva mutacija. Geni koji su češće mutirani kod pacijenata s AML-om mogu se podijeliti u nekoliko funkcionalnih kategorija (Tablica 1.)(2).

Veliki napredak koji se dogodio u razumijevanju molekularnih osobitosti AML-a imao je parcijalni učinak na kliničku praksu. S jedne strane, neosporan je prognostički i dijagnostički značaj nekih molekularnih i citogenetičkih markera (npr. *NPM1*, *CEBPA*, *FLT3-ITD*, inv(16), t(8;21), itd.). Iz tog razloga je i klasifikacija AML-a po Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO, prema engl. *World Health Organization*), koja je naslijedila tradicionalnu citomorfološko-citokemijsku klasifikaciju francuskih, američkih i britanskih patologa (FAB-klasifikaciju), uvelike temeljena na genetskim kriterijima. S druge strane, za sada nije bilo većih uspjeha u razvoju ciljanih terapija za AML (izuzev akutne promijelocitne leukemije). Neki molekularni ciljevi koji su se zbog učestalosti mutacija i povezanosti s lošijom prognozom doimali obećavajuće, poput inhibicije FLT3, u kliničkim studijama su dosad pokazali tek skromni učinak. Isto se može reći i za pokušaje ciljane inhibicije često aktiviranih signalnih puteva Ras-Raf-MEK-ERK (Ras: sarkom štakora, prema engl. *rat sarcoma*; Raf: brzo proliferirajući fibrosarkom, prema engl. *rapidly accelerating fibrosarcoma*; MEK: kinaza kinaze aktivirane mitogenom, drugi naziv MAPKK, prema engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*; ERK: kinaza aktivirana izvanstaničnim signalom, prema engl. *extracellular signal-regulated kinase*) i PI3K-Akt-mTOR (PI3K: fosfatidilinozitol 3-kinaza, prema engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*; Akt: proteinska kinaza B; mTOR: ciljna molekula rapamicina u sisavaca, prema engl. *mammalian target of rapamycin*). U osnovi, terapijska strategija za AML nije se značajnije mijenjala proteklih tridesetak godina i sastoji se od kontinuirane infuzije citarabina i antraciklina te, u pacijenata koji zadovoljavaju kriterije, alogene transplantacije hematopoetskih matičnih stanica. Napredak koji je u tom razdoblju ostvaren u liječenju AML-a više je posljedica bolje suportivne skrbi prilikom intenzivne kemoterapije nego novih terapijskih modaliteta, što može objasniti veliku razliku u uspješnosti liječenja pacijenata mlađih od 60 godina u odnosu na one starije od 60 godina. Naime, pet godina nakon dijagnoze preživljava 35 do 40% pacijenata mlađih od 60 godina i 5 do 15% pacijenata starijih od 60 godina (1, 2).

Ipak, postoje rani obećavajući rezultati za neke molekularne ciljane lijekove. Preliminarni rezultati faze I/II kliničkog pokusa za spoj AG-221 koji je oralni inhibitor izocitrat

dehidrogenaze tipa 2 (IDH2), metaboličkog enzima koji u mitohondrijskom Krebsovom ciklusu pretvara izocitrat u α -ketoglutarat, pokazali su da kod pacijenata s poodmaklim oblicima AML-a primjena tog agensa dovodi do objektivnih trajnijih odgovora na terapiju, uključujući i kompletnu remisiju, potičući diferencijaciju leukemijskih stanica (klinički pokus: NCT01915498) (3).

1.1.2. Akutna promijelocitna leukemija

Akutna promijelocitna leukemija (APL, AML-M3 prema FAB-klasifikaciji) podtip je AML-a koji se zbog različitog pristupa liječenju nerijetko prikazuje kao zaseban entitet. Riječ je o bolesti koja nastupa naglo, praćena je trombozama, diseminiranom intravaskularnom koagulacijom i čestim krvarenjima te, ako nije adekvatno liječena, ubrzo nakon dijagnoze nastupa smrtni ishod. Karakterizira ju stabilna kromosomska translokacija t(15;17)(q22;q12) koja rezultira nastankom fuzijskog proteina PML-RAR α . PML-RAR α sastoji se od receptora za retinsku kiselinu α (RAR α , prema engl. *retinoic acid receptor α*) i proteina promijelocitne leukemije (PML, prema engl. *promyelocytic leukemia*). RAR α u prisutnosti fizioloških koncentracija retinske kiseline potiče transkripciju gena nužnih za diferencijaciju mijeloidne loze, dok PML sudjeluje u formiranju nuklearnih tjelešaca koji, između ostalog, reguliraju aktivnost puta p53. Gubitkom tih aktivnosti prilikom pojave fuzijskog proteina dolazi do bloka u diferencijaciji i do pojačane proliferacije stanica APL.

Terapija APL-a temelji se na korištenju sve-*trans*-retinske kiseline (ATRA, prema engl. *all-trans-retinoic acid*) u kombinaciji s antraciklinom ili arsenovim trioksidom. Uvođenje ATRA-e u liječenje APL-a početkom devedesetih često se navodi kao jedan od prvih primjera molekularno ciljane terapije tumora. Mehanizam djelovanja se uobičajeno tumači vezanjem ATRA-e na podjedinicu RAR α fuzijskog proteina što uzrokuje razgradnju PML-RAR α i poticanje diferencijacije leukemijskih blasta te dovodi do kompletne remisije u više od 90% oboljelih.

ATRA je izrazito uspješna u poticanju diferencijacije i postizanju kompletne remisije i kad se daje kao jedini lijek pacijentima s APL-om, međutim kod tih pacijenata vrlo brzo dolazi do pojave relapsa bolesti. Vjerojatni razlog tome je da kod pacijenata u remisiji ostaje prisutna mala populacija rezistentnih blasta, takozvane stanice inicijatori leukemije (LIC, prema engl. *leukemia initiating cells*), koje dovode do relapsa i zbog kojih samo diferencijacijski pristup

nije dostatan za izlječenje leukemije. Iz tog razloga se terapija uvijek provodi u kombinaciji i s proapoptotičkim agensom, antraciklinom ili arsenovim trioksidom, za kojeg se smatra da djeluje na LIC (4).

Arsenov trioksid je najuspješniji samostalni lijek za APL i može postići dugoročno izlječenje čak i u monoterapijskoj primjeni, ali je često praćen diseminiranom intravaskularnom koagulacijom i posljedičnom hemoragijskom dijatezom. Ti simptomi se mogu izbjeći davanjem ATRA-e koja potičući diferencijaciju sprječava otpuštanje prokoagulacijskih i fibrinolitičkih faktora iz blasta. Sinergijski učinak ta dva spoja postoji i na molekularnoj razini jer se arsenov trioksid veže za PML-podjedinicu PML-RAR α , potiče njegovu razgradnju i uklanjanje LIC (4). Nedavni rezultati pokazuju da je kombinacija ATRA-e i arsenovog trioksida najučinkovitiji terapijski modalitet za APL jer 99,2% pacijenata s APL-om niskog i srednjeg rizika preživljava 50 mjeseci od dijagnoze (u usporedbi s također vrlo visokih 92,6% pacijenata koji su primali ATRA-u u kombinaciji s antraciklinom) (5). Diferencijacijska terapija ATRA-om, a pogotovo u kombinaciji s arsenovim trioksidom, stoga spada u najuspješnije primjere terapije onkoloških oboljenja.

1.1.3. Stanične linije AML-a kao modeli za istraživanje diferencijacije

Među najčešće korištenim ljudskim staničnim linijama za istraživanja biologije AML-a *in vitro* je linija HL-60. Na toj staničnoj liniji je prvi put i opisan diferencirajući učinak ATRA-e (6), premda je tadašnje mišljenje da je riječ o staničnoj liniji akutne promijelocitne leukemije zapravo bilo pogrešno. Ta linija izolirana je iz periferne krvi pacijentice kojoj je početno dijagnosticirana APL. Međutim, stanice nisu sadržavale t(15;17) i sve citološke osobitosti tipične za APL. Nakon što je linija HL-60 uspostavljena i počela se intenzivno koristiti u istraživanju, reevaluacijom početnog biološkog materijala postavljena je točna dijagnoza akutne mijeloične leukemije sa sazrijevanjem (AML-M2 po FAB-klasifikaciji) (7). Dakle, pacijentica na čijim je leukemijskim stanicama otkriven diferencirajući učinak ATRA-e danas ne bi bila kandidat za liječenje ATRA-om.

Osim ATRA-e koja potiče diferencijaciju HL-60 u granulocitnom smjeru (6), još niz agensa može potaknuti diferencijaciju tih stanica *in vitro*. Tako, primjerice, DMSO i aktinomicin D također potiču diferencijaciju stanica HL-60 u smjeru granulocita, dok vitamin

D₃, interferon- γ i forbolski esteri potiču diferencijaciju u monocitno-makrofagnom smjeru, a GM-CSF blago u smjeru eozinofila (8).

Stanice U937 su stanična linija akutne monocitne leukemije (AML-M5 po FAB-klasifikaciji) koja sadrži translokaciju t(10;11). U937 se u prisutnosti ATRA-e i vitamina D₃ diferenciraju u monocitno-makrofagnom smjeru (9). Jaku diferencijaciju u monocitno-makrofagnom smjeru uzrokuje i forbol 12-miristat 13-acetat (PMA, prema engl. *phorbol 12-myristate 13-acetate*) pa se čak stanice U937 diferencirane s PMA koriste kao model za istraživanje funkcija makrofaga (10).

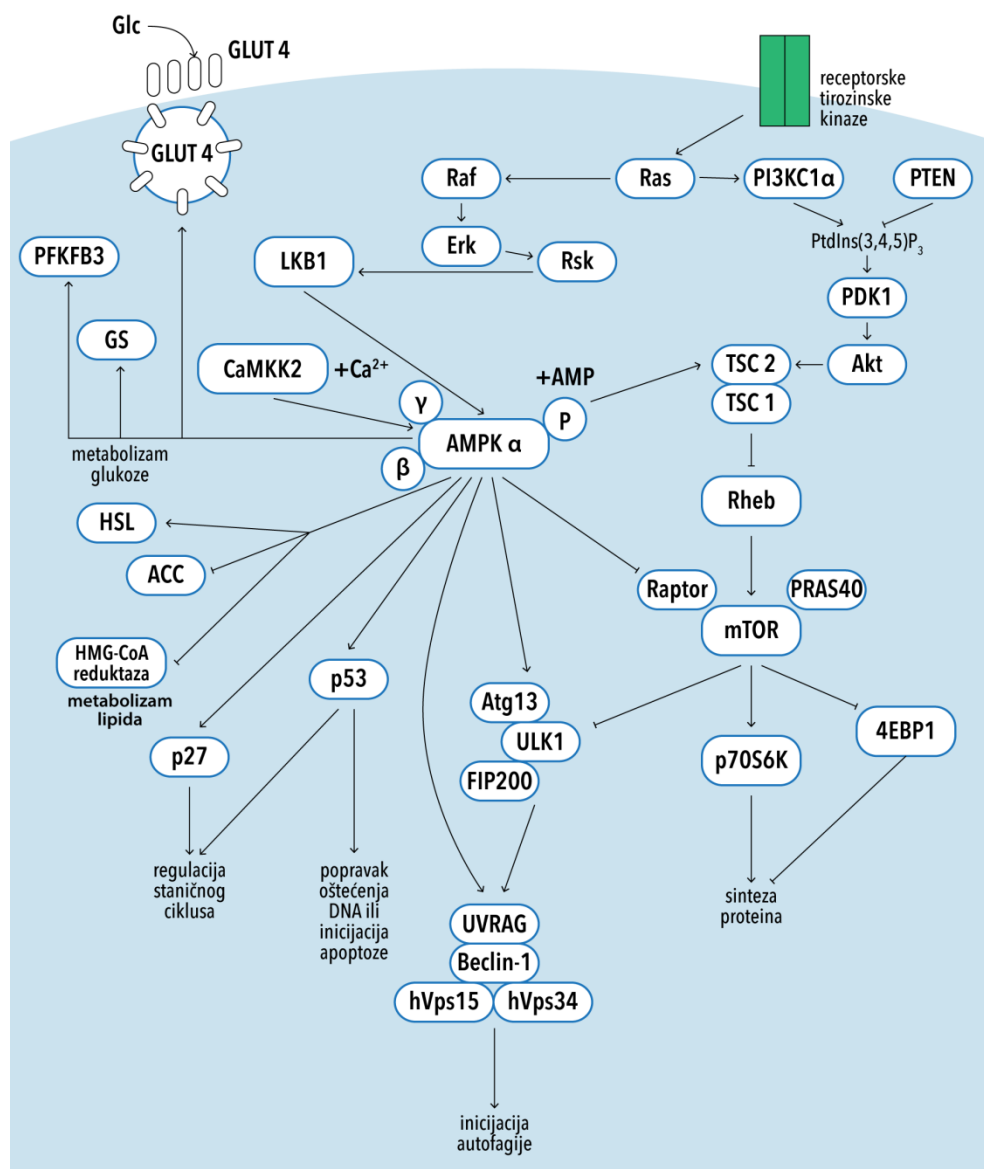
1.2. Signalni put AMPK-mTOR u regulaciji staničnog metabolizma

1.2.1. AMPK-mTOR – uloga u prijenosu signala u stanici

Epidemiološka studija provedena prije petnaestak godina pokazala je da pacijenti koji uzimaju najčešće korišteni oralni antidijabetik metformin imaju niži rizik za obolijevanje od tumorskih bolesti. To je dovedeno u vezu s djelovanjem metformina na aktivaciju signalnog puta LKB1-AMPK (LKB1: jetrena kinaza B1, prema engl. *liver kinase B1*) jer je LKB1 od ranije bio poznat kao tumorski supresor (11). Od tada je puno pozornosti usmjereno na ulogu AMPK-a i regulacije staničnog metabolizma u preživljenju i sudbini tumorskih stanica.

AMPK je evolucijski konzervirana serin/treoninska kinaza. Strukturno, AMPK je heterotrimer koji se sastoji od katalitičke α -podjedinice i regulatornih podjedinica β i γ . U stanicama sisavaca postoje po dvije strukturne izoforme α - i β - podjedinica ($\alpha 1$ i $\alpha 2$ odnosno $\beta 1$ i $\beta 2$), te tri strukturne izoforme γ -podjedinice ($\gamma 1$, $\gamma 2$ i $\gamma 3$). Za aktivaciju AMPK-a potrebna je fosforilacija treonina na položaju 172 (Thr172) u α -podjedinici. Vezanje 5'-adenozin monofosfata (AMP) na γ -podjedinicu dovodi do aktivacije AMPK-a sljedećim mehanizmima:

1. alosteričkom aktivacijom
2. poticanjem fosforilacije Thr172 od strane uzvodnih kinaza - mehanizam tog procesa je još uvijek nejasan, ali jedno od objašnjenja bi moglo biti da promjena konformacije prilikom vezanja AMP-a omogućuje kolokalizaciju s uzvodnom LKB1
3. inhibicijom defosforilacije Thr172.



Slika 1. Signalni put AMP-ovisne kinaze (AMPK). PI3KC1 α – PI3K razreda I α (prema engl. *PI3K class 1 α*), PTEN – homolog fosfataze i tenzina (prema engl. *phosphatase and tensin homolog*), PDK1 – kinaza ovisna o fosfoinozotidima (prema engl. *phosphoinositide dependent kinase*), TSC – kompleks tuberozne skleroze (prema engl. *tuberous sclerosis complex*), mTOR – ciljna molekula rapamicina u sisavaca (prema engl. *mammalian target of rapamycin*), 4EBP1 – protein 1 koji se veže za 4E (prema engl. *4E binding protein 1*), LKB1 – jetrena kinaza B1 (prema engl. *liver kinase B1*), CAMKK2 – kinaza proteinske kinaze ovisne o kalciju i kalmodulinu (prema engl. *calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2*), PFKFB3 – 6-fosfofrukto-2-kinaza/fruktoza-2,6-bisfosfataza 3 (prema engl. *6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3*), GS – glikogenska sintaza (prema engl. *glycogen synthase*), HSL – lipaza osjetljiva na hormone (prema engl. *hormone sensitive lipase*), ACC – acetil-koenzim A-karboksilaza (prema engl. *acetyl-CoA carboxylase*), HMG-CoA reduktaza – 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A-reduktaza

Osim AMP-a, i 5'-adenozin difosfat (ADP) vezanjem za AMPK može potaknuti fosforilaciju i inhibirati defosforilaciju Thr172, no samo vezanje AMP-a dovodi do alosteričke aktivacije enzima. S druge strane, 5'-adenozin trifosfat (ATP) se suprotstavlja aktivaciji AMPK-a pa je zbog toga AMPK vrlo osjetljivi senzor za promjene u odnosu AMP-a i ATP-a, a preko njega i za ukupni energetska status stanice (12).

Jednom aktiviran, AMPK potiče kataboličke puteve koji omogućuju stvaranje ATP-a, a inhibira anaboličke puteve koji troše stanične energetske zalihe za izgradnju makromolekula. AMPK tako potiče translokaciju transportera za glukozu GLUT4 na staničnu membranu čime se olakšava ulazak molekula glukoze u stanicu, potiče glikolizu djelujući na fosfofruktokinazu 2, olakšava razgradnju glikogena inhibicijom sintetaze glikogena i aktivacijom glikogenfosforilaze. Budući da je riječ o unutarstaničnom energetska senzoru koji reagira dominantno na omjer AMP-a i ATP-a u stanici, AMPK koji se nalazi u hepatocitima inhibira glukoneogenezu. Zanimljivo je, međutim, da aktiviranje AMPK-a u stanicama osjetljivim na glukozu u ventralnom medijalnom hipotalamusu dovodi do povećanja glukoneogeneze u hepatocitima.

Osim na metabolizam glukoze, AMPK djeluje i na metabolizam lipida. Fosforilirajući i inaktivirajući acetil-koenzim A-karboksilazu AMPK onemogućuje karboksilaciju acetil-koenzima A u malonil-koenzim A, što je ključni korak u sintezi masnih kiselina, te tako pomiče ravnotežu prema razgradnji, a ne sintezi masnih kiselina. Sličan učinak ima i na 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A-reduktazu (HMG-CoA reduktazu) koja je ključna u sintezi sterola, a koju AMPK fosforilira i inhibira. Sistemski učinak na metabolizam lipida AMPK ostvaruje djelujući na lipazu osjetljivu na hormone i lipazu triglicerida u adipocitima, međutim nije još posve jasno koliki je stvarni značaj signaliziranja putem AMPK-a u regulaciji ovih enzima (13).

U uvjetima niske dostupnosti hranjivih tvari i smanjenih staničnih energetska zaliha, AMPK kao energetska senzor stanice mora spriječiti stanični rast i diobu. Glavni nizvodni cilj pri tome je kompleks 1 mTOR-a (mTORC1, prema engl. *mTOR complex 1*), dio signalnog puta PI3K-Akt-mTOR. Kada je stanica stimulirana čimbenicima rasta, dolazi do aktivacije signalnog puta PI3K-Akt-mTOR. Aktivirani mTORC1 je tada zadužen za fosforilaciju ribosomske S6-kinaze (S6K) i proteina 1 koji se veže za 4E (4EBP1, prema engl. *4E binding protein 1*). Fosforilirani 4EBP1 potom aktivira eukariotski čimbenik inicijacije translacije 4E (eIF4E, prema engl. *eukaryotic translation initiation factor 4E*). Djelujući na ta dva puta mTORC1 regulira translaciju mRNA i sintezu proteina, a potom posredno stanični rast i

preživljenje te stanični ciklus. AMPK, koji se aktivira prilikom nedovoljne energetske opskrbe stanice, inhibira mTORC1 što će dalje spriječiti sintezu proteina, stanični rast i diobu (14).

Osim putem mTORC1, AMPK inhibira stanični rast i diobu djelujući na tumorski supresor p53 te na protein p27 koji sudjeluje u reguliranju staničnog ciklusa inhibicijom kinaza ovisnih o ciklinima (CDK, prema engl. *cyclin-dependent kinase*) (15).

Odnosi uzvodnih regulacijskih proteina i nizvodnih ciljeva AMPK-a prikazani su na slici 1. Uloga autofagije u staničnom metabolizmu i preživljenju te reguliranje autofagije putem AMPK-a i mTORC1 bit će detaljnije opisani u potpoglavlju 1.3.

1.2.2. Modulatori puta AMPK-mTOR

Aktivatori AMPK-a mogu se podijeliti u skupine prema svom mehanizmu djelovanja (Tablica 2.). Detaljnije će se opisati metformin, 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleozid (AICAR, prema engl. *5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide*, drugi naziv je akadezin) i A769662 kao najčešće korišteni predstavnici skupina.

Tablica 2. Podjela aktivatora AMPK-a prema mehanizmu djelovanja (12)

Skupina	Mehanizam	Predstavnici
Indirektni aktivatori AMPK-a (smanjena proizvodnja ATP-a)	a) Inhibitori glikolize	2-deoksiglukoza (2-DG)
	b) Inhibitori sinteze ATP-a u mitohondriju	Metformin , fenformin, resveratrol
Antifolati (inhibicija sinteze purina)	Nakupljanje ZMP-a (analoga AMP-a)	Pemetreksed, metotreksat
Analozi AMP-a	Unutarstanična konverzija u molekule nalik AMP-u koje se mogu vezati za njegovo vezno mjesto na AMPK-u (npr. ZMP).	AICAR , C13
Direktni aktivatori AMPK-a	Vezanje za AMPK između α - i β - podjedinice i alosterička aktivacija	A769662 , 991, salicilat

a) Metformin

Metformin je prva linija terapije za dijabetes melitus tipa II i najčešće je propisivani oralni antidijabetik. Procjenjuje se da ga u svijetu trenutno koristi oko 150 milijuna oboljelih te se nalazi na listi nužnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije. Po svojoj kemijskoj građi metformin je derivat gvanidina, spoja koji se može izolirati iz biljke *Galega officinalis* (narodni

naziv: orlovac) koja se u srednjovjekovnoj Europi koristila za liječenje stanja koja danas prepoznajemo kao simptome dijabetesa melitusa. Manje toksični derivati gvanidina, bigvanidi, kojima pripada i metformin, uvedeni su u terapiju dijabetesa melitusa tipa II u pedesetim godinama dvadesetog stoljeća, a budući da je metformin siguran lijek s malim rizikom nuspojava, ostao je u kliničkoj uporabi i nakon povlačenja potentnijih bigvanida poput fenformina i buformina koje prati veći rizik fatalne laktacidoze.

Točan mehanizam djelovanja metformina nije poznat. Smatra se da su njegovi učinci smanjenja koncentracije glukoze u krvi većim dijelom posredovani smanjenjem glukoneogeneze u jetri. Molekularni mehanizmi djelovanja metformina obično se pripisuju inhibiciji kompleksa I respiracijskog lanca mitohondrija što potom dovodi do smanjene proizvodnje ATP-a i povećanja omjera AMP-a i ATP-a (16). Prema uobičajenom modelu, povećanje stanične koncentracije AMP-a u odnosu na ATP aktivira AMPK te se stoga metformin smatra modulatorom aktivnosti AMPK-a. Ipak još nije sasvim jasno u kojoj je mjeri aktivnost AMPK-a nužna za farmakološke učinke metformina. S jedne strane, u modelu stanične linije hepatoma HepG2 učinci metformina ovise o AMPK-u jer metformin u tim stanicama aktivira AMPK α i smanjuje koncentraciju kolesterola i triglicerida, a ti učinci izostaju u stanicama koje izražavaju konstitutivno neaktivni oblik AMPK α (17). S druge strane, u staničnoj liniji mioblasta L6 diferenciranoj do mišićnog vlakna metformin potiče ulazak glukoze u stanice, a taj se učinak ne može u potpunosti ukloniti niti izražajem dominantno negativnih katalitičkih podjedinica AMPK α 1/ α 2, niti utišavanjem AMPK α 1 pomoću kratke RNA nalik na ukosnicu (shRNA, prema engl. *short hairpin RNA*). Isti učinak zamjećuje se i u mišićnim stanicama izoliranim iz miševa s izbačenim genom ili *knock-out* miševa za AMPK α 1 i α 2 (18). Nadalje, metformin podjednako inhibira glukoneogenezu u jetri miševa divljeg tipa i onih koji ne izražavaju AMPK i LKB1 (19). Također, usprkos uobičajenom modelu u kojemu je učinak metformina na inhibiciju mTOR-a posredovan AMPK-om, čini se da metformin može inhibirati mTORC1 preko aktivnosti Rag GTPaza neovisno i o AMPK-u i o kompleksu tuberozne skleroze 1/2 (TSC1/2, prema engl. *tuberous sclerosis complex 1/2*) (20).

Osim zbog općeg značaja u kontekstu liječenja dijabetesa melitusa, metformin je zanimljiv za istraživanja i zbog svojih protutumorskih učinaka. U nekoliko epidemioloških studija pronađena je povezanost između uzimanja metformina i smanjenog rizika od obolijevanja od karcinoma prostate, gušterače i debelog crijeva. Ta epidemiološka pojava dobiva dodatno na značaju zbog niza eksperimentalnih radova u kojima je metformin *in vitro* pokazao antiproliferativne i proapoptotičke učinke na stanične linije karcinoma prostate, dojke,

gušterače, debelog crijeva, pluća i jajnika (21). Prema nedavno objavljenim rezultatima, učinak metformina na inhibiciju kompleksa I respiracijskog lanca mitohondrija izravno je vezan uz njegovo djelovanje na smanjenje stanične proliferacije i poticanje smrti stanica u tumorskim staničnim linijama (22). U modelima zloćudnih hematoloških bolesti metformin je usporio proliferaciju i potaknuo apoptozu u primarnim stanicama AML-a (23), a slični učinci su zamijećeni i na staničnim linijama i primarnim kulturama stanica kronične mijeloične leukemije (KML) u kojima je inkubacija s metforminom uzrokovala smanjenu vijabilnost i proliferaciju stanica (24). Učinci metformina na inhibiciju proliferacije i smanjeno preživljavanje staničnih linija AML-a ne ovise o AMPK-u jer se zamjećuju i u stanicama u kojima je izražaj AMPK-a utišan pomoću male interferirajuće RNA (siRNA, prema engl. *small interfering RNA*), ali ovise o aktivnosti signalnog puta PI3K-Akt i glikolizi (25). I u našem prethodnom istraživanju inkubacija s metforminom smanjila je broj živih stanica staničnih linija AML-a, ali pri tome nije poticala izražaj diferencijacijskih biljega (26). Štoviše, metformin može i kočiti diferencijaciju kao što je nedavno opisano u modelu stanične linije akutne monocitne leukemije THP-1 u kojemu dodavanje metformina smanjuje učinak PMA na diferencijaciju u smjeru makrofaga (27).

b) AICAR

AICAR je derivat adenzina koji se u stanicama fosforilira u ribonukleotid ZMP. ZMP je intermedijarni metabolit u sintezi purina, a strukturni je analog AMP-a (28). Prva istraživanja farmakoloških učinaka AICAR-a rađena su na modelima infarkta miokarda u kojima je ispitivano u kojoj mjeri analozi adenzina mogu pomoći u nadoknađivanju unutarstaničnog ATP-a prilikom ishemije (29). U ranim devedesetima istraživanja farmakološkog djelovanja AICAR-a uglavnom se prebacuju s kardiovaskularnih na metaboličke učinke jer je pokazano da u izoliranim hepatocitima štakora AICAR inhibira glukoneogenezu (30) i glikolizu (31), a u izoliranim adipocitima štakora lipogenezu (32). Kako je otprilike u isto vrijeme otkriveno da AMP i njegovi analozi, među kojima je i ZMP, aktiviraju AMPK (33) te da AICAR istodobno djeluje na stanični metabolizam i aktivira AMPK (32), AICAR se počeo učestalo koristiti kao farmakološki aktivator AMPK-a. Također, nedavno je opisano da AICAR oponaša učinke tjelesne aktivnosti u skeletnim mišićima miša te da djeluje kao „tjelovježba u tableti“ (34).

Iako se AICAR koristi kao modulator AMPK-a, sve je više radova koji pokazuju da su njegovi učinci neovisni o AMPK-u. Tako je i u modelima transgeničnih miševa kojima AMPK nedostaje isključivo u mišićnim stanicama i dalje očuvan učinak AICAR-a na mišićnu

kontrakciju i oksidaciju masnih kiselina (35) te pozitivan učinak AICAR-a na sprječavanje iznenadne smrti uzrokovane vrućicom (36). Nadalje, u primarnim hepatocitima koji su izolirani iz miša koji ne izražava $\alpha 1$ - i $\alpha 2$ -katalitične podjedinice AMPK-a u jetri i AICAR i metformin i dalje koče fosforilaciju glukoze i glikolizu (37). Ključni učinak AMPK-a na transport glukoze u mišićne stanice i adipocite zakočen je pomoću prekomjernog izražaja dominantno negativnog AMPK samo u mišićnim stanicama, a nema učinaka na AICAR-om posredovani ulaz glukoze u adipocite (38). Također, u miševima kojima nedostaju katalitičke podjedinice AMPK-a specifično u jetri, očuvani su učinci AICAR-a na smanjeno stvaranje glukoze i povećano stvaranje laktata, ali izostaje smanjenje triglicerida i povećanje glikogena u jetri. U istom modelu ipak je potvrđeno da je AMPK ključan za održavanje energetske ravnoteže stanice u vidu omjera AMP-a, ADP-a i ATP-a te za regulaciju aktivnosti mitohondrija (39).

Osim učinka na regulaciju klasičnih metaboličkih puteva u jetri, mišićnim stanicama i adipocitima, AICAR utječe na proliferaciju i diferencijaciju i drugih stanica ovisno i neovisno o AMPK-u. Tako učinci koji su neovisni o AMPK-u uključuju nastanak astroglije u neuralnim matičnim stanicama u kojima je prekomjerno izražena dominantno negativna mutanta AMPK-a (40) ili pospješene fagocitne sposobnosti makrofaga u staničnoj liniji RAW 264.7 u kojoj je AMPK $\alpha 1$ utišana pomoću siRNA (41). Međutim, učinci AICAR-a na kočenje proliferacije tumorskih stanica mogu ovisiti o tipu tumora pa su tako opisani zastoji u staničnom rastu koji izostaju u stanicama u kojima je izražen dominantno negativni AMPK (42), a u stanicama glioma u kojima su pomoću shRNA utišane sve podjedinice $\alpha 1$, $\alpha 2$ te $\beta 1$ i $\beta 2$, i dalje su prisutni učinci AICAR-a i metformina na kočenje proliferacije (43).

U modelima hematoloških zloćudnih bolesti opisano je da AICAR potiče apoptozu u stanicama B-stanične kronične limfatične leukemije (B-KLL) (44, 45), u staničnim linijama i primarnim stanicama T-stanične akutne limfatične leukemije (T-ALL) (46), nizu staničnih linija koje odgovaraju ALL-u u djece (47) te u leukemijskim staničnim linijama koje izražavaju fuzijski protein Bcr-Abl i primarnim stanicama izoliranima od oboljelih od KML-a (48). Za sada je završena samo jedna klinička studija u kojoj je istraživani učinak AICAR-a na ishod oboljelih od refrakterne B-KLL u kojoj je AICAR pokazao prihvatljivi sigurnosni profil te povoljne učinke u vidu smanjenja broja cirkulirajućih leukemijskih stanica te smanjenje veličine perifernih limfnih čvorova oboljelih (49). U našem prethodnom radu AICAR je pokazao antiproliferativne i citotoksične učinke na stanice leukemijskih staničnih linija te je potaknuo diferencijaciju stanica stanične linije akutne monocitne leukemije U937 (26).

c) A769662

A769662 se smatra direktnim aktivatorom AMPK-a jer može izravno potaknuti aktivaciju enzima koji je izoliran iz stanice, iako točan biokemijski mehanizam tog učinka nije poznat. Različito od A769662, ostali farmakološki aktivatori AMPK-a djeluju samo u intaktnim stanicama jer posredno aktiviraju AMPK tako što mijenjaju unutarstanični omjer AMP-a i ATP-a (50). Zbog toga se A769662 sve češće koristi kao specifični farmakološki agonist AMPK-a (43, 51).

1.2.3. Specifičnosti metaboličke regulacije u tumorskim stanicama

U novije vrijeme posvećuje se više pozornosti činjenici da brojni onkogeni i tumorski supresori koji sudjeluju u signalnom putu PI3K-Akt-mTOR i AMPK djeluju na aktivnost enzima koji reguliraju klasične biokemijske puteve energetskeg metabolizma u stanici poput fosfofruktokinaze, laktat-dehidrogenaze i drugih. Klasična biokemija ne bavi se metabolizmom tumorskih stanica, već se temelji na istraživanjima metaboličkih puteva u diferenciranim tkivima s vrlo niskom stopom proliferacije. Tako se definiraju dva osnovna mehanizma metaboliziranja glukoze: glikoliza u anaerobnim uvjetima i oksidativna fosforilacija u aerobnim uvjetima. Oksidativna fosforilacija je u energetskeg smislu puno efikasnija jer u njoj dolazi do potpune oksidacije molekule glukoze do ugljikova dioksida i vode pri čemu nastaje 36 molekula ATP-a. Glikolizom se molekula glukoze oksidira samo do laktata i pri tome nastaju 2 molekule ATP-a. Za tumorske je stanice pak tipično da i u aerobnim uvjetima energiju dobivaju procesom glikolize. Kako je tu pojavu 1924. opisao njemački biokemičar Otto Warburg, aerobna glikoliza se u literaturi često zove Warburgovim efektom. Nije sasvim jasno koje su prednosti glikolize za proliferirajuća tkiva. Trenutno je u najvećoj mjeri prihvaćena hipoteza da glikoliza omogućuje nastanak više organskih međuprodukata razgradnje glukoze koji se mogu koristiti u sintezi aminokiselina, nukleinskih kiselina i lipida potrebnih u staničnoj diobi. Tako je glukoza-6-fosfat preko pentoza-fosfatnog puta izvor za sintezu riboza-5-fosfata potrebnog za nastanak nukleotida, piruvat je izvor za sintezu acetil-koenzima A iz kojeg nastaju masne kiseline, a iz piruvata nastaju i svi prekursori neesencijalnih aminokiselina. U stanicama koje se dijele izmjeren je visoki omjer ATP-a i ADP-a pa se stoga smatra vjerojatnijim da je biokemijsko „usko grlo“ stanične diobe sinteza potrebnih makromolekula, a ne nedostatna količina ATP-a. Drugo moguće obrazloženje preferiranja glikolize je izbjegavanje oksidativnog stresa koji je nužna posljedica oksidacije u mitohondriju, a koji može dovesti do daljnjih

oštećenja DNA i stanične smrti. Tako je primjerice zamijećeno da kvasci prelaze s puta oksidativne fosforilacije na glikolizu prilikom ulaska u S-fazu staničnog ciklusa što se tumači potrebom za smanjenim nastankom reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, prema engl. *reactive oxygen species*) kako bi se izbjeglo oštećivanje DNA prilikom njene replikacije. Također postoje mišljenja da je sklonost tumorskih stanica aerobnoj glikolizi samo posljedica njihove selekcije u uvjetima hipoksije unutar solidnih tumora. To mišljenje doduše ne objašnjava zašto bi aerobna glikoliza bila preferirani metabolički put i u leukemijskim stanicama koje se nalaze u krvi gdje je dostatna opskrba kisikom ili u stanicama tumora dišnih puteva (52).

Geni za metaboličke enzime često su mutirani u tumorima. Tako je opisano da su mutacije u fumarat hidratazi, jednom od enzima Krebsova ciklusa, povezane s nasljednim oblicima lejomiomatoze kože i maternice te s karcinomom bubrega u finskoj populaciji (53). Genomske analize pokazale su i da 12% oboljelih od glioblastoma multiforme ima mutaciju IDH1 (54). IDH1 je mutiran i u čak 70% astrocitoma, oligodendroglioma i sekundarnih glioblastoma (55). Mutacije jedne od izoformi IDH prisutne su i u značajnom broju oboljelih od AML-a: IDH1 mutiran je u 6-8% oboljelih, a IDH2 u 9-11% (56). Mutacije IDH specifične su po tome što ne uzrokuju gubitak enzimske aktivnosti već je mijenjaju tako da iz izocitrata nastaje 2-hidroksiglutarat (2-HG) umjesto α -ketoglutarata (α -KG) (57, 58).

U kontekstu učestalosti mutacija IDH, pozornost su privukla istraživanja koja su pokazala da farmakološka inhibicija IDH1 u glioblastomu, odnosno IDH2 u stanicama AML-a koči rast i potiče diferencijaciju (59, 60). Ti rezultati *in vitro* potvrđeni su i na modelu u kojem je ljudska AML s mutacijom za IDH2 transplantirana u imunodeficijentnog miša. Kada su takve životinje tretirane inhibitorom IDH2, opaženo je produljenje preživljenja, snižavanje koncentracija 2-HG u serumu, koštanoj srži i urinu, a leukemijske stanice su povećale izražaj diferencijacijskih biljega CD11b, CD14, CD15 i CD24 i morfološki se izmijenile u više diferencirane oblike (61, 62). Zbog toga je započet već spomenuti klinički pokus s inhibitorom IDH2 u AML-u koji u ovom trenutku ima obećavajuće rezultate i mogao bi dovesti do nove diferencijacijske terapije za AML (3).

Iako još nije u potpunosti razjašnjen mehanizam kojim promjene u staničnom metabolizmu potiču diferencijaciju, uloga mutiranog IDH u diferencijaciji maligno promijenjenih stanica uglavnom se tumači njegovim djelovanjem na epigenetsku kontrolu izražaja gena nužnih za diferencijaciju. Tako je opisano da mutacije IDH1/2 koče aktivnost enzima ovisnih o α -KG, što uključuje i niz enzima vezanih uz demetilaciju DNA, pa zato stanice s mutacijom pokazuju opću i specifičnu hipermetilaciju DNA u odnosu na normalne stanice koštane srži. Jedna od demetilaza DNA koja ovisi o α -KG je enzim TET2 koji je i sam često

mutiran u AML-u, a djeluje na metil-citozin. Promijenjena metilacija gena u hematopoetskim stanicama koči mijeloidnu diferencijaciju (63). Promijenjena metilacija DNA i histona zamijećena je i u modelu *knock-in* miševa u kojima je mutacija IDH1 ubačena u sve hematopoetske ili samo mijeloidne stanice. Iako mutacija nije u potpunosti spriječila diferencijaciju u miševima, uzrokovala je znatno povećanje nezrelih hematopoetskih preteča praćenu splenomegalijom i anemijom (64).

Povezanost metabolizma i diferencijacije u leukemijskim stanicama ne iznenađuje kad se uzme u obzir da je i u fiziološkim uvjetima sazrijevanje iz matične stanice u diferenciranu stanicu praćeno prelaskom metabolizma glukoze iz aerobne glikolize u oksidativnu fosforilaciju (65). Usmjeravanje hematopoetske matične stanice u eritroidnom smjeru ovisi o metabolizmu glukoze i glutamina, jer stanice u kojima je zakočen njihov prijenos kroz membranu diferenciraju u mijeloidnom smjeru u odgovoru na eritropoetin (66). Također, omjer koncentracija α -KG i sukcinata regulira metilaciju DNA u embrionalnim matičnim stanicama što je bitno za njihovo održavanje u nediferenciranom stanju (67).

I u modelima AML-a koji nemaju mutaciju enzima IDH, izmjene u staničnom metabolizmu su usko povezane s preživljavanjem stanice. Tako je nedavno otkriveno da tvari koje koče mitohondrijsku translaciju i oksidativnu fosforilaciju (68), oksidaciju masnih kiselina (69) ili glutaminolizu (70) snažno koče proliferaciju stanica AML-a, a nemaju učinaka na normalnu hematopoezu. U stanicama leukemijskih staničnih linija Scotland i sur. (25) su nedavno opisali da proapoptotički učinci metformina ovise o povećanoj potrošnji glukoze i nastanku laktata, ali učinci AICAR-a i drugih agonista AMPK-a nisu ispitani.

1.3. Autofagija

1.3.1. Regulacija autofagije

Autofagija je konzervirani stanični katabolički proces u sklopu kojeg se elementi citoplazme razgrađuju pomoću lizosoma. Dijeli se u nekoliko podskupina:

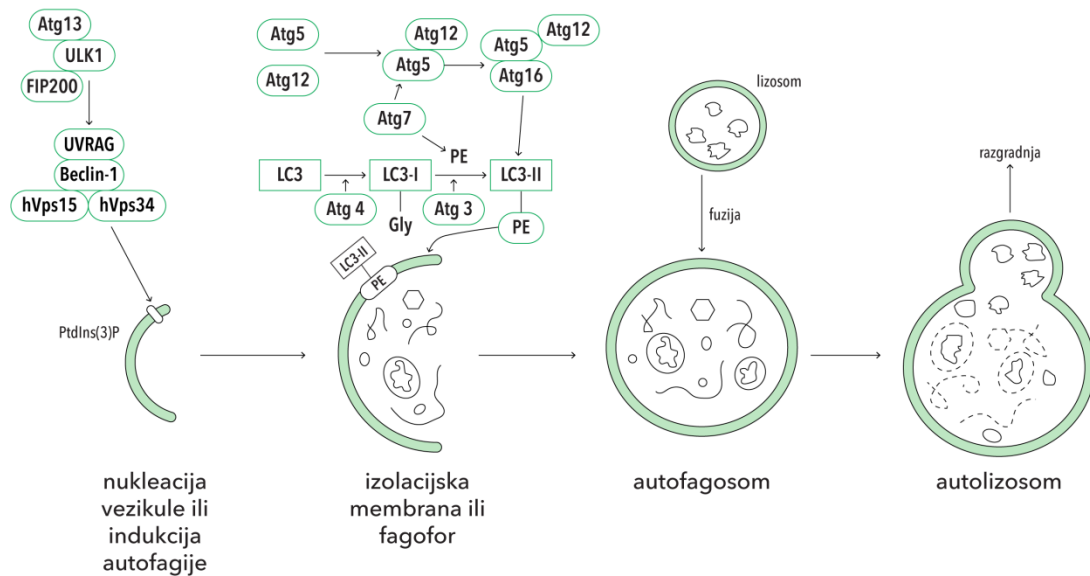
1. **Makroautofagija** (ili autofagija u užem smislu) – proces u kojem se stanične komponente sekvstriraju u organelu s dvostrukom membranom koja se zove autofagosom. Autofagosom se potom spaja s lizosomom što omogućuje razgradnju citoplazmatskog materijala. Po tipu staničnog materijala koji se razgrađuje, može se uže govoriti o mitofagiji (razgradnji disfunkcionalnih i oštećenih mitohondrija), agrefagiji (razgradnji proteinskih agregata), ksenofagiji (razgradnji unutarstaničnih patogena),

lipofagiji, glikofagiji itd. Obično se pod pojmom „autofagija“ zapravo podrazumijeva makroautofagija pa se taj princip koristi i u ovom radu.

2. **Mikroautofagija** – izravni unos materijala koji će se razgraditi u lizosom putem invaginacije u membranu lizosoma.
3. **Autofagija vođena šaperonom (CMA, prema engl. *chaperone-mediated autophagy*)** – proces u kojem proteini-pratilice koji se zovu molekularni šaperoni olakšavaju transport u lizosom proteina kojeg treba razgraditi.

Sama autofagija sastoji se od nekoliko faza. Na početku se formira mala dvostruka izolacijska membrana koja se zove fagofor. Elongacijom te membrane oko staničnog sadržaja koji se treba razgraditi nastaje vezikula koja u potpunosti obuhvaća dio citoplazme. Vezikula sazrijeva u organelu koja se naziva autofagosom. Autofagosom se potom spaja s lizosomom u strukturu pod nazivom autolizosom. U autolizosomu djelovanjem lizosomskih kiselih hidrolaza dolazi do razgradnje sekvestriranog staničnog sadržaja, a produkti te razgradnje se potom otpuštaju natrag u citoplazmu ili recikliraju (71).

Budući da aktivacijom autofagije dolazi do stanične samorazgradnje, jasno je da taj proces mora biti strogo reguliran (slika 2.). Proteinski kompleks koji se obično označava kao početak signalnog puta klasične ili kanonske autofagije je kompleks koji sadrži ULK1 (prema engl. *unc-51 like autophagy activating kinase 1*). ULK1 omogućuje lokaliziranje kompleksa Beclin-1/Atg14/Vps34 (prema engl. *vacuolar protein sorting 34*, u stanicama sisavaca koristi se još homolog Vps34 ili hVps34, drugi naziv je PI3K razreda III ili PI3KC3, prema engl. *PI3K class III*) na membranu fagofora. Vps34 proizvodi lipid PtdIns(3)P (fosfatidilinozitol-3-fosfat, prema engl. *phosphatidylinositol-3-phosphate*) koji svojim biofizičkim osobinama vjerojatno doprinosi savijanju i oblikovanju membrane fagofora, no još značajnija je njegova uloga „sidrišne točke“ na koju se vežu proteini nužni za elongaciju membrane fagofora i nastanak autofagosoma. Pri tome su posebno značajni kompleks Atg5-Atg12 te enzim Atg7 koji omogućavaju konjugaciju proteina LC3-I s fosfatidiletanolaminom (PE) u LC3-II koji potom svojim lipidnim dijelom ulazi u rastuću membranu fagofora i predstavlja jednu od ključnih točaka u sazrijevanju autofagosoma (72).



Slika 2. Shematski prikaz klasičnog ili kanonskog puta autofagije i proteinskih kompleksa koji sudjeluju u njezinoj regulaciji. PtdIns(3)P – fosfatidilinozitol-3-fosfat (prema engl. *phosphatidylinositol-3-phosphate*), Gly – glicin, PE – fosfatidiletanolamin (prema engl. *phosphatidylethanolamine*). Proteini vezani uz regulaciju autofagije prvo su opisani na modelu kvasca i svi su dobili oznake Atg i odgovarajući broj. Za neke od strukturnih homologa tih proteina u stanicama sisavaca je zadržan naziv Atg s odgovarajućim brojem (npr. Atg5, Atg7...), a neki koji su bili identificirani ranije su zadržali drugo nazivlje, pa tako primjerice Atg1 odgovara proteinu ULK1, Atg6 proteinu Beclin-1, a Atg8 proteinu LC3.

U kanonskom putu autofagije, glavni uzvodni regulatori procesa su mTORC1 i AMPK koji djeluju na ULK1 (slika 1.). U uvjetima dostatne energetske opskrbe, aktivirani mTORC1 fosforilira ULK1 i koči aktivaciju autofagije. S druge strane, kad stanica gladuje, aktivira se AMPK koji aktivira ULK1 izravno i neizravno kočenjem aktivnosti mTORC1 čime se omogućuje započinjanje procesa autofagije (73). Isti signalni put sudjeluje u koordinaciji aktivnosti i drugih proteina vezanih za autofagiju. Tako primjerice Akt, protein uzvodno od mTORC1 u signalnom putu PI3K-Akt-mTOR, u prisutnosti inzulina koči autofagiju, najvjerojatnije putem fosforilacije ULK1 (74), a isti, konstitutivno aktivni protein, inhibira autofagiju fosforilirajući i inaktivirajući Beclin-1 (75). mTORC1, osim u regulaciji inicijacije autofagije, inhibitorno djeluje i na funkciju lizosoma prije spajanja s autofagosomom (76). AMPK pak aktivira i kompleks Beclin-1/Vps34 izravnom aktivacijom Beclina-1 te inhibicijom svih onih Vps34 koje se nalaze u kompleksima s proteinima koji nisu uključeni u autofagiju (77). Međutim, i takvi kompleksi Vps34 i proteina mogu neizravno djelovati na autofagiju jer je opisano da zamjećuju povećanje koncentracije aminokiselina i aktiviraju mTOR, a time koče autofagiju (78). Tako se dijelom objašnjava složena mreža signalnih puteva koji povezuju

AMPK, Vps34, mTOR i autofagiju, a koja bi mogla predstavljati integrativni mehanizam stanične obrane od stresa uzrokovanog nedostatkom hranjivih tvari.

Sve dosad navedeno odnosi se na klasični ili kanonski put autofagije koji se mahom zasniva na istraživanjima uloge pojedinih proteina na modelu staničnog gladovanja (75, 78). Međutim, u novije vrijeme sve više se opisuje aktivacija autofagije koja zaobilazi navedene proteine. Među primjerima takozvane nekanonske autofagije trenutno je najviše radova objavljeno o autofagiji koja je neovisna o Beclinu-1. Tako u modelima u kojima su stanice inkubirane s proapoptotičkim i citotoksičnim tvarima poput obatoklaksa (79), staurosporina (80), resveratrola (81) ili arsenova trioksida (82) autofagija se odvijala i bez prisutnosti Beclina-1. Slični rezultati su dobiveni i na modelima *knock-out* miševa gdje je pokazano da je autofagija prisutna i u stanicama koje ne izražavaju protein hVps34 (83), Atg5 ili Atg7 (84). Premda su u svim tim radovima korišteni različiti stanični modeli počevši od tumorskih staničnih linija, mišjih embrionalnih fibroblasta do primarnih neurona, zajedničko im je bilo da su stanice uzgajane u kompletnom mediju s dostatnom količinom hranjivih tvari i čimbenika rasta. Stoga ne bi bilo nevjerojatno da je tzv. kanonska autofagija zapravo signalni put staničnog odgovora na nedostatak nutrijenata, koji se može dijelom zaobići aktivacijom alternativnih signalnih puteva kad je stanica izložena drugim stresorima (72).

1.3.2. Uloga autofagije u regulaciji diferencijacije leukemijskih stanica

U dosad najuspješnijem primjeru diferencijacijske terapije AML-a, diferencijaciji APL-a ATRA-om, ključna je razgradnja fuzijskog proteina PML-RAR α koja omogućuje uklanjanje blokade transkripcije i uspostavu normalnih mehanizama staničnog sazrijevanja. Oba osnovna puta razgradnje proteina, ubikvitinsko-proteasomski put i put autofagije, sudjeluju u razgradnji PML-RAR α . U staničnoj liniji akutne promijelocitne leukemije NB4 inhibicija autofagije, bilo farmakološki bilo RNA-interferencijom, značajno povišuje razinu PML-RAR α i suprotstavlja se učinku ATRA-e i arsenovog trioksida na njegovu razgradnju. Također, inhibitori autofagije 3-metiladenin i bafilomicin smanjuju izražaj diferencijacijskih biljega u odgovoru na ATRA-u dok rapamicin, koji bi trebao djelovati kao aktivator autofagije inhibicijom njenog regulatora mTORC1, pojačava diferencijaciju uzrokovanu ATRA-om (85). Dodatno, utišavanjem proteina Atg1, Atg5 i Vps34 pomoću siRNA inhibira se i diferencirajući učinak ATRA-e na stanice NB4 i HL60, dok utišavanje Atg5 smanjuje izražaj diferencijacijskog biljega CD11b i prilikom tretiranja stanica HL60 uobičajenim diferencijacijskim agensima PMA-om,

vitaminom D₃ i arsenovim trioksidom (86). Vitamin D₃ potiče i izražaj CD14 u ovisnosti o Beclinu-1 na stanicama HL60, ali je zanimljivo da paralelno izlaganje stanica inhibitoru autofagije bafilomicinu A1 ne inhibira diferencirajući učinak vitamina D₃ (87). O Beclinu-1 ovisi i megakariocitna diferencijacija stanične linije kronične mijeloidne leukemije K562 u odgovoru na PMA (88).

Osim u primjerima leukemijskih stanica, pokazalo se da autofagija ima važnu ulogu i u diferencijaciji ljudskih primarnih monocita u monocitno-makrofagnom smjeru u odgovoru na GM-CSF i M-CSF (89). Miševi kojima u hematopoetskom sustavu nedostaje Atg7 su anemični i limfopenični te im nedostaju brojni progenitori i u limfoidnoj liniji, ali zamijećeno je bujanje mijeloidnih stanica koje podsjeća na akutnu leukemiju (90).

Osim uobičajenih induktora diferencijacije, i neki drugi agensi koji potiču staničnu diferencijaciju istovremeno aktiviraju i put autofagije, mada nije uvijek uspostavljena uzročno-posljedična veza između tih dvaju njihovih učinaka. Tako primjerice inhibitor tirozinske kinaze lapatinib potiče megakariocitnu diferencijaciju Bcr-Abl-pozitivnih stanica linije K562 koja je izolirana iz oboljelog od KML u transformaciji. Uz diferencijaciju, lapatinib potiče i apoptozu i autofagiju u tim stanicama (91). Citokin M-CSF (makrofagni čimbenik stimulacije kolonija, prema engl. *macrophage colony stimulating factor*; drugi naziv za isti citokin je CSF-1) koji potiče diferencijaciju humanih i mišjih monocita prema makrofagima te diferencijaciju stanica kronične mijelomonocitne leukemije također inducira autofagiju aktivacijom puta AMPK α 1 (92). S obzirom na naše prethodno objavljene rezultate da AICAR potiče diferencijaciju stanica U937 u monocitno-makrofagnom smjeru neovisno o AMPK-u, posebno su nam bili zanimljivi rezultati da AICAR djeluje citotoksično na stanice KML induciranjem autofagije, a ne apoptoze te da su ti učinci neovisni o AMPK-u (93). Moguće je stoga da je autofagija jedan od mehanizama koji posreduje diferencirajuće učinke AICAR-a na U937.

2. HIPOTEZA

AICAR i drugi induktori diferencijacije stanica U937 potiču autofagiju koja ovisi o aktivnosti hVps34 te smanjuju glikolizu.

3. CILJEVI

3.1. Opći cilj

Odrediti signalne mehanizme i metaboličke promjene u diferencijaciji staničnih linija akutne mijeloične leukemije.

3.2. Specifični ciljevi

1. Odrediti ulogu i mehanizme autofagije u diferencijaciji stanica U937.
2. Odrediti ulogu AMPK-a i glikolize u učincima AICAR-a.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Kemikalije

Za potrebe ovog istraživanja korišteni su reagensi, male interferirajuće RNA, protutijela i restrikcijski enzimi navedeni u tablicama 3., 4., 5. i 6.

Tablica 3. Korišteni reagensi

Reagens	Proizvođač	Serijski broj	Otapalo	Koncentracija temeljne otopine
5-aminoimidazol-4-karboksamid (AICAR)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD)	A9978	sterilna voda	100 mM
1,1-dimetilbigvanid hidroklorid (metformin)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD)	D150959	RPMI-1640	1 M
A769662	Tocris Biosciences (Bristol, UK)	3336	dimetil-sulfoksid (DMSO)	200 mM
Sve-trans-retinska kiselina (ATRA)	Calbiochem (San Diego, CA, SAD)	#554720	dimetil-sulfoksid (DMSO)	1 mM
Forbol miristat acetat (PMA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD)	P8139	dimetil-sulfoksid (DMSO)	50 μ M
Bafilomicin A1	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD)	B1793	etanol	100 μ M
3-metiladenin (3-MA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD)	M9281	sterilna voda	200 mM
Rapamicin	Calbiochem (San Diego, CA, SAD)	#553210	dimetil-sulfoksid (DMSO)	20 μ M
Klorokin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD)	C6628	sterilna voda	50 mM
Kanamycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD)	K1377	sterilna voda	50 mg/mL
G418 (Geneticin)	Roche (Basel, Švicarska)	04727878001	već otopljeno	50 mg/mL, aktivna masa > 700 μ g/mg

Tablica 4. Korištene male interferirajuće RNA (siRNA)

siRNA	Proizvođač	Serijski broj	Tip
Beclin-1 I	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, SAD)	#6222	Pojedinačna sekvenca, otopljeno u sterilnoj vodi bez RNaze
Beclin-1 II	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, SAD)	#6246	Pojedinačna sekvenca, otopljeno u sterilnoj vodi bez RNaze
Atg7	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, SAD)	#6604	Pojedinačna sekvenca, otopljeno u sterilnoj vodi bez RNaze
Atg7	Dharmacon (Lafayette, CO, SAD)	L-020112-00	Kombinacija 4 sekvence (SMARTpool ON-TARGETplus)
hVps34 (PI3KC3)	Dharmacon (Lafayette, CO, SAD)	L-005250-00	Kombinacija 4 sekvence (SMARTpool ON-TARGETplus)
negativna kontrola	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, SAD)	#6568	Pojedinačna sekvenca, otopljeno u sterilnoj vodi bez RNaze
negativna kontrola	Dharmacon (Lafayette, CO, SAD)	D-001810-10	Kombinacija 4 sekvence (SMARTpool ON-TARGETplus)

Tablica 5. Korištena protutijela

Specifičnost	Proizvođač	Serijski broj	Tip	Razrjedenje
CD11b	Immunotech Beckman Coulter (Marseille, Francuska).	IM0530	Monoklonsko, mišji IgG1, anti-ljudsko, primarno konjugirano s FITC	7:100
CD64	Immunotech Beckman Coulter (Marseille, Francuska).	IM1604	Monoklonsko, mišji IgG1 anti-ljudsko, primarno konjugirano s FITC	7:100
nespecifično, izotipska kontrola IgG1	Immunotech Beckman Coulter (Marseille, Francuska).	IM0639	Mišji IgG1, primarno konjugirano s FITC	7:100
LC3B	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, SAD)	#3868	Monoklonsko, kunićji IgG, primarno	1:1000 (WB) 1:200 (IF)
fosforilirani p70S6 (Thr389)	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, SAD)	#9205	Monoklonsko, kunićji IgG, primarno	1:1000
Beclin-1	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, SAD)	#3495	Monoklonsko, kunićji IgG, primarno	1:1000
hVps34 (PI3KC3)	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, SAD)	#4263	Monoklonsko, kunićji IgG, primarno	1:1000
Atg7	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, SAD)	#8558	Monoklonsko, kunićji IgG, primarno	1:1000
β-aktin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD)	A5441	Monoklonsko, mišji IgG1, primarno	1:20 000
kunićji IgG	Invitrogen (Carlsbad, CA, SAD)	A11034	kozji IgG, sekundarno, konjugirano s Alexa Fluor 488	1:600 (IF)
kunićji IgG	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, SAD)	#7074	Mišji IgG, sekundarno, konjugirano s HRP	1:2000 (WB)
mišji IgG	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, SAD)	#7076	Konjski IgG, sekundarno, konjugirano s HRP	1:2000 (WB)

Tablica 6. Korišteni restrikcijski enzimi

siRNA	Proizvođač	Serijski broj	aktivnost	Odgovarajući pufer
EcoRI	Promega (Madison, WI, SAD)	R6011	12 000 jedinica/mL	H, MultiCore (Promega)
NheI	Promega (Madison, WI, SAD)	R6501	10 000 jedinica/mL	B, MultiCore (Promega)
ApaLI	New England Biolabs (Ipswich, MA, SAD)	R0507S	10 000 jedinica/mL	CutSmart® (NEB)

Set ELISA za detekciju PtdIns(3)P (K3300) kupljen je od tvrtke Echelon Biosciences (Salt Lake City, UT, SAD). Set za transfekcije volumena od 100 µL (Neon Transfection System

#MPK10025) kupljen je od tvrtke Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SAD). Set za izolaciju plazmidne DNA bez endotoksina (Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit, #12362) kupljen je od tvrtke Qiagen (Hilden, Njemačka).

Set za detekciju kemiluminiscencije (ECL, prema engl. *enhanced chemiluminescence*) nabavljen je od tvrtke Pierce (Rockford, IL), a otopina po Bradfordu od tvrtke Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, SAD) (#500-0006) ili Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD) (B6916). Medij za uklapanje (Antifade Mounting Medium) kupljen je od tvrtke Vectashield (Burlingame, CA, SAD).

Propidijev jodid, DNaza I, 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, prema engl. *sodium dodecyl sulfate*), leupeptin, fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF), amonijev persulfat (APS), 30% akrilamid/bis-akrilamid, N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) i puferirana otopina fenola kupljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD).

Medij RPMI-1640, fetusni goveđi serum (FBS, prema engl. *fetal bovine serum*), L-glutamin, penicilin/streptomycin kupljeni su od tvrtke Thermo Fisher Scientific – Gibco (Waltham, MA, SAD). Millerova modifikacija medija za uzgoj bakterija LB (prema engl. *lysogeny broth, Luria broth*) u prahu i agar kupljeni su od tvrtke Carl Roth (Karlsruhe, Njemačka). Tekući medij LB pripremljen je otapanjem 12,5 g praha LB u 500 mL dvostruko destilirane vode. Ploče koje sadrže agar LB i kanamicin pripremljene su dodavanjem 7,5 g agara u 500 mL tekućeg medija LB. Kanamicin (50 µg/mL) je dodan u agar nakon autoklaviranja pri temperaturi od približno 55°C.

4.2. Stanična kultura

Linija U937 (akutna monocitna leukemija, AML-M5) nabavljena je iz dva izvora: jedan uzorak je bio poklon dr. sc. Mirne Golemović (KBC Zagreb, Zagreb), a drugi je kupljen od European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC no. 88112501, Porton, Salisbury, UK). Linija HL-60 (akutna mijeloična leukemija sa sazrijevanjem, AML-M2) kupljena je od European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC no. 88112501, Porton, Salisbury, UK).

Stanice su uzgajane u suspenziji u mediju RPMI-1640 uz dodatak 10% 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% CO₂.

U pokusima, stanice su oprane, resuspendirane u svježem mediju uz dodatak FBS-a, L-glutamina, penicilina i streptomicina te zasađene u gustoći 2-3x10⁵ stanica/mL. Nakon bojanja mrtvih stanica tripanskim modrilom, udio živih stanica određen je brojanjem hemocitometrom. Stanice su tretirane s AICAR-om (0,5 mM), ATRA-om (1 µM), metforminom (15 mM) i PMA-om (50 nM) u različitim vremenskim intervalima. Prilikom dulje inkubacije stanica u pločicama s bunarićima, nakon 48 h u bunariće je dodano još po 300 µL medija. 3-MA i rapamicin su dodavani 15 minuta prije ostalih korištenih tvari, a bafilomicin zadnja tri sata inkubacije s ispitivanim tvarima.

4.3. Određivanje izražaja površinskih biljega protočnom citometrijom

Nakon inkubacije, stanice su pokupljene i određen je broj živih stanica. Uzorak je opran u hladnoj puferiranoj fiziološkoj otopini (PBS, prema engl. *phosphate-buffered saline*) te su dodana protutijela anti-CD11b, anti-CD64 ili izotipska kontrola IgG1 koja su razrijeđena u PBS-u s azidom. Stanice su inkubirane s protutijelima u tami na sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta. Nakon inkubacije uzorci su oprani u PBS-u te su obilježene stanice raspršene u 200 µL PBS-a s azidom i signal je očitao protočnom citometrijom (uređaj FACSCalibur, Becton Dickinson). 15 000 živih stanica analizirano je koristeći program CellQuest (Becton Dickinson).

Stanice su označene kao žive koristeći njihove osobine raspršenja laserske svjetlosti prema naprijed (FSC, prema engl. *forward scatter*) i u stranu (SSC, prema engl. *side scatter*). Izotipska kontrola je korištena na sljedeći način: pokazivač koji na histogramu označava pozitivne događaje postavljen je tako da je manje od 1% događaja označeno pozitivnima u uzorku izotipske kontrole, a potom je isti pokazivač prenesen na uzorke obilježene specifičnim protutijelom kako bi se odredio udio pozitivnih događaja. Za određivanje srednjeg intenziteta fluorescencije (MFI, prema engl. *mean fluorescence intensity*), MFI izotipske kontrole je oduzet od MFI-ja uzorka obilježenog specifičnim protutijelom.

4.4. Određivanje koncentracije glukoze i laktata u mediju

Stanice su zasađene u gustoći 2×10^5 /mL u prisutnosti AICAR-a (0,5 mM), ATRA-e (1 μ M) i metformina (15 mM). U definiranoj vremenskoj točki (24 h, 48 h, 72 h) broj živih stanica u uzorku određen je pomoću tripanskog modrila i brojanjem hemocitometrom. Stanična suspenzija je centrifugirana na 750 x g tijekom 3 minute, a koncentracija glukoze u nadtalogu određena je uz pomoć glukometra za dijabetičare (Contour XT, Bayer, Leverkusen, Njemačka). U nadtalozima uzoraka sakupljenih nakon 72 h od inkubacije koncentracija glukoze i laktata određena je enzimskom kolorimetrijskom metodom pomoću uređaja Cobas C5001 (Roche, Basel, Švicarska). Za određivanje koncentracije glukoze korišten je enzim heksokinaza, a za određivanje koncentracije laktata enzim laktat oksidaza.

4.5. Izoliranje ukupnih staničnih lizata i analiza Western blot

Nakon inkubacije s ispitivanim tvarima, stanice su oprane u hladnom PBS-u i raspršene u puferu za lizu stanica [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% Triton X-100, 2,5 mM natrijev pirofosfat, 1 mM natrijev ortovanadat (Na_3VO_4), 1 mM β -glicerol fosfat, 1 μ g/mL leupeptin, 1 μ M mikrocistin i 1 mM PMSF] te inkubirane na ledu 10 minuta. Potom su homogenizirane protiskivanjem kroz iglu promjera 23 G sedam puta i ponovno inkubirane na ledu 10 minuta. Tako dobiveni homogenat prebačen je u epruvete volumena 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) i centrifugiran tijekom 10 minuta na 14 000 x g na temperaturi od 4°C. Izdvojeni nadtalog čuvao se na -80°C. Koncentracija proteina u lizatu izmjerena je spektrofotometrijski korištenjem otopine po Bradfordu koja sadrži Coomassie Brilliant Blue G-250. Na 2 μ L uzorka i 48 μ L vode dodano je 2,5 mL Bio-Rad reagensa razrijeđenog sterilnom vodom u omjeru 1:4 ili 1,5 mL nerazrijeđenog Sigminog reagensa (prema uputi proizvođača). Apsorbancije uzoraka pri valnoj duljini od 595 nm izmjerene su na spektrofotometru CamSpec M201 (Sawston, Cambridge, UK), a koncentracije proteina usporedbom vrijednosti s baždarnom krivuljom dobivenom mjerenjem apsorbancije poznatih koncentracija BSA (0,1-1,0 mg/mL).

Jednake količine proteina (35-40 μ g) u svakom uzorku denaturirane su kuhanjem tijekom 5 minuta u puferu koji sadrži 2 x SDS (125 mM Tris, 4% SDS, 2% β -merkaptetanol, 40% glicerol i 0,1 mg/mL bromfenol modrilo). Uzorci su nanoseni u jažice dvaju paralelnih 8% ili

12% SDS-poliakrilamidnih gelova. Za elektroforezu je korišten sustav Mini-Protean (Bio-Rad), a za prijenos proteina iz gela na nitroceluloznu membranu (Whatman, Njemačka) korišten je sustav mini Trans-Blot (Bio-Rad). Prijenos proteina proveden je preko noći uz jakost struje od 20 mA.

Nitrocelulozna membrana je potom inkubirana na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta u otopini za blokiranje koja sadrži 5% bezmasnog mlijeka u prahu otopljenog u puferu TBS-Tween (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 8,0) kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela na membranu. Nakon blokiranja membrane su oprane tri puta u TBS-Tweenu te tijekom noći inkubirane s primarnim protutijelom razrijeđenim u TBS-Tweenu s 5% BSA na 4°C. Idući dan membrane su oprane tri puta od primarnog protutijela i inkubirane dva sata na sobnoj temperaturi u sekundarnom protutijelu koje je razrijeđeno u otopini za blokiranje. Nakon trostrukog pranja od sekundarnog protutijela, kemiluminiscencijski signal je potaknut setom ECL i zabilježen na radiografskom filmu. Kao kontrola jednakog unosa proteina u sve jažice koristio se signal β -aktina. Intenzitet signala pojedinog proteina izražen je semikvantitativno u omjeru prema signalu β -aktina, a određen je denzitometrijski pomoću programa Adobe Photoshop CS6 (Adobe, San Jose, CA, SAD).

4.6. Izoliranje kiselih lipida i određivanje razine PtdIns(3)P

Nakon inkubacije s ispitivanim tvarima stanice su pokupljene, centrifugirane i raspršene u 10 mL svježeg medija. Brojanjem na hemocitometru određena je gustoća stanica u uzorku te je jednaki broj stanica u svakom uzorku odvojen za izolaciju (13 ili 15×10^6). Stanice su potom oprane i inkubirane tijekom pet minuta na ledu u hladnoj 0,5 M otopini trikloroctene kiseline (TCA). Potom su stanice centrifugirane i raspršene u otopini 5% TCA koja sadrži 1 mM EDTA. Nakon ponovnog centrifugiranja, stanice su za ekstrakciju neutralnih lipida resuspendirane u smjesi metanola i kloroforma u omjeru 2:1 te vorteksirane 10 minuta na sobnoj temperaturi. Suspenzija je centrifugirana i na talog je dodana smjesa metanola, kloroforma i koncentrirane klorovodične kiseline (HCl) u omjeru 80:40:1 te je sve vorteksirano 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja, nadtalog koji sadrži tako izolirane kisele lipide prebačen je u čistu epruvetu, dodano je 0,75 mL kloroforma i 1,35 mL 0,1 N HCl te je uzorak vorteksiran tijekom 30 sekundi. Organska i vodena faza su razdvojene centrifugiranjem, a organska faza je potom pokupljena u čistu epruvetu od 1,5 mL i osušena u uređaju Concentrator 5301

(Eppendorf, Hamburg, Njemačka) u trajanju od 60-90 minuta. Nakon sušenja lipidi su pohranjeni na -20°C .

Razina PtdIns(3)P određena je koristeći set masene ELISA-e (Echelon Biosciences). Lipidi su otopljeni u PBS-u koji sadrži 3% stabilizatora proteina iz komercijalnog seta te su inkubirani u ultrazvučnoj kupelji tijekom 30 minuta kako bi se u potpunosti otopili. Kolorimetrijski ELISA test je potom proveden prema uputama proizvođača. Ukratko, uzorci lipida najprije su inkubirani s detektorom PtdIns(3)P tijekom 60 minuta te su potom nanoseni na ELISA pločicu za detekciju koja je prekrivena slojem PtdIns(3)P kako bi se ostvarilo kompetitivno vezanje. Nakon 60 minuta inkubacije pločica je isprana, na nju je dodan sekundarni detektor vezan za peroksidazu, a potom i otopina kolorimetrijskog supstrata. Apsorbancija je očitana na 450 nm, a intenzitet signala je obrnuto proporcionalan količini PtdIns(3)P koji je izoliran iz staničnog uzorka.

Množine PtdIns(3)P u uzorcima određene su interpolacijom u krivulju standarda [0,39-400 pmol PtdIns(3)P] metodom nelinearne regresije pomoću programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, SAD) te su standardizirane na 10 milijuna stanica. Rezultati su relativne vrijednosti količine PtdIns(3)P u pojedinim uzorcima u omjeru prema kontroli.

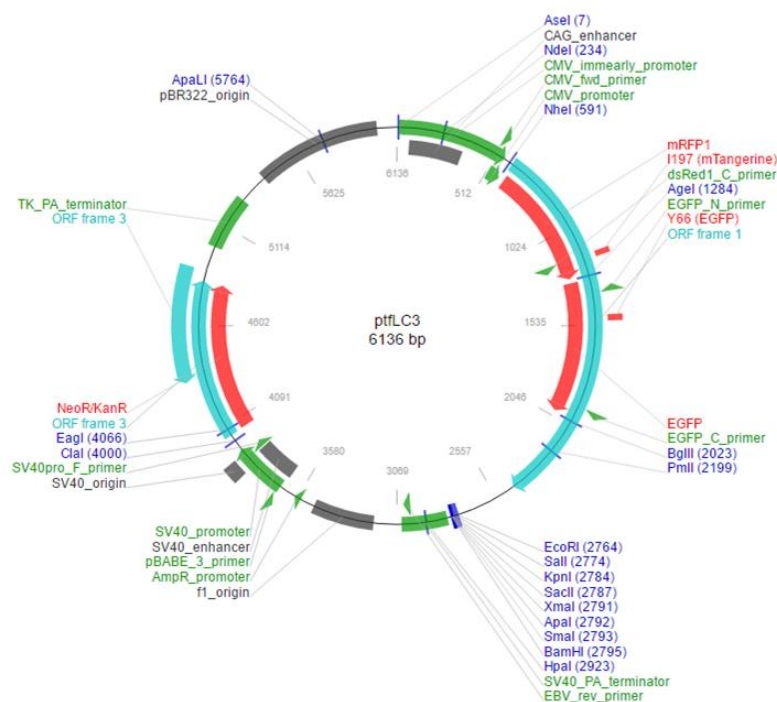
4.7. Utišavanje proteinske ekspresije metodom RNA-interferencije

Kako bi se osiguralo da prilikom transfekcije stanice budu u eksponencijalnoj fazi rasta, stanice U937 su dan prije samog postupka transfekcije oprane u svježem mediju te zasađene u gustoći od 4×10^5 stanica/mL. Na dan transfekcije, stanice su oprane u sterilnom PBS-u bez Ca^{2+} i Mg^{2+} i resuspendirane u transfekcijskom puferu R (dio seta za transfekciju Neon) u gustoći od 22×10^6 stanica/mL. Takva stanična suspenzija je pomiješana s kontrolnom siRNA ili siRNA za ciljani protein tako da otopina RNA sačinjava 13-14% ukupnog volumena. Potom su stanice elektroporirane pomoću uređaja Neon koristeći odgovarajuće elektrodne nastavke volumena 100 μL jednim udarom napona 1050 V i u trajanju od 50 ms. Nakon elektroporacije 100 μL stanične suspenzije preneseno je u 200 μL medija RPMI-1640 s dodatkom 10% FBS i 2 mM glutamina bez antibiotika, inkubirano tijekom 15 minuta na 37°C te potom razrijeđeno u ukupnom volumenu od 5 mL medija bez antibiotika. Nakon 24 do 48 sati, stanice su pokupljene

te su dijelom zasađene u pokusima u kojima se ispitaio učinak na diferencijaciju, apoptozu i stanični ciklus, a dijelom iskorištene za priprevu ukupnih staničnih lizata i analizu Western blot.

4.8. Umnažanje i izolacija plazmidne DNA

Plazmid ptfLC3 (plazmid #21074) poklon je dr. Tamotsua Yoshimoriya preko baze Addgene (Cambridge, MA, SAD). Gen za protein LC3B (naziv gena: *Map1lc3b* prema engl. *microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta*) iz štakora sa sposobnošću ekspresije u stanicama sisavaca kloniran je u okvir koji se sastoji od plazmida C1 s genima za monomerni crveni fluorescentni protein (mRFP prema engl. *monomeric red fluorescent protein*) i zeleni fluorescentni protein (GFP prema engl. *green fluorescent protein*). Preporuka je da se takav plazmid umnaža u bakteriji *E. coli*, soj DH5 α . Plazmid omogućuje selekciju antibioticima jer nosi gene za rezistenciju na kanamicin za selekciju transformiranih bakterijskih stanica i gen za rezistenciju na neomicin koji kodira aminoglikozid 3-fosfotransferazu. Eukariotske stanice koje ugrade genetski materijal iz plazmida u vlastitu DNA i počnu izražavati aminoglikozid 3-fosfotransferazu postaju rezistentne na neomicin i Geneticin (G418).



Mapa sekvence plazmida, preuzeto s Addgene.com 25. listopada 2016.

Bakterije transformirane plazmidom ptfLC3 uzgojene su preko noći na 37°C na pločama koje sadrže agar LB i 50 µg/mL kanamicina. Pojedinačne kolonije bakterija dalje su umnožene u 3 mL tekućeg medija LB s 50 µg/mL kanamicina inkubacijom na 37 °C tijekom 16-18 sati. Za dobivanje veće količine plazmidne DNA nastavljeno je umnožavanje 200 µL tako dobivene tekuće kulture u 100 mL medija LB s 50 µg/mL kanamicina preko noći u istim uvjetima, a ostatak bakterijske kulture pohranjen je u mediju s 25% glicerola na -80°C. Plazmidna DNA izolirana je korištenjem seta Qiagen EndoFree Plasmid Maxi prema uputama proizvođača. Ukratko, bakterijska kultura je pokupljena i centrifugirana na 6 000 x g 15 minuta na 4°C. Potom je talog inkubiran s odgovarajućim puferima za lizu stanica i filtriran kroz QIAfilter, a filtrat je inkubiran s puferom za uklanjanje endotoksina tijekom 30 minuta na ledu. Plazmidna DNA izolirana je iz filtrata vezanjem za Qiagenov polimer i ispiranjem odgovarajućim puferom. Otopina DNA sedimentirana je u 70-postotnom izopropanolu centrifugiranjem na 15 000 x g tijekom 30 minuta na 4°C i isprana u 70-postotnom etanolu bez endotoksina centrifugiranjem na 15 000 x g tijekom 10 minuta na 4°C. Dobiveni talog DNA otopljen je u sterilnom puferu TE bez endotoksina. Koncentracija i čistoća DNA određeni su spektrofotometrijski pomoću uređaja NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). DNA se smatrala čistom ako je izmjereni omjer apsorbancija na 260 nm i 280 nm (A260/280) bio veći ili jednak 1,80.

Provjerili smo je li u bakterijama doista umnožen odgovarajući plazmid dijagnostičkom restrikcijom s restrikcijskim enzimima EcoRI i NheI koji lineariziraju plazmid u odsječak duljine približno 6 000 parova baza, a ako se koriste istovremeno, stvaraju dva odsječka DNA duljine oko 4 000 i 2 000 parova baza. Približno 1,5 µg plazmidne DNA pomiješan je s po 1 µL restrikcijskog enzima, odgovarajućim puferom i BSA-om te inkubirano tijekom tri sata na 37°C. Enzimi su zatim inaktivirani toplinom inkubacijom tijekom 15 minuta na 65°C. Prisutnost odsječaka odgovarajuće duljine utvrđena je elektroforezom na agaroznom gelu uz dodatak etidijevog bromida.

Za potrebe proizvodnje stabilno transficirane linije plazmid ptfLC3 je lineariziran pomoću restrikcijskog enzima ApaLI, a linearizirana DNA je pročišćena metodom ekstrakcije fenolom i kloroformom. Otopini DNA dodan je jednaki volumen smjese fenola, kloroforma i izopentanol (izoamil-alkohola) u omjerima 25:24:1, smjesa je vorteksirana tijekom 10 sekundi, organska i vodena faza su razdvojene centrifugiranjem na 14 000 x g i vodena faza je pokupljena u čistu epruvetu. Otopina natrijevog acetata (3M, pH=5,2) dodana je na vodenu fazu u omjeru 1:10 i kratko vorteksirana. Ledeni 100-postotni etanol dodan je na smjesu u omjeru

2:1, dobivena smjesa je nakon kratkog vorteksiranja inkubirana tijekom 30 minuta na -20°C . Talog je izoliran centrifugiranjem na $14\ 000 \times g$ tijekom pet minuta i opran u 70-postotnom etanolu. Nakon pranja u etanolu talog DNA osušen je na zraku i resuspendiran u sterilnom puferu TE bez endotoksina. Čistoća i koncentracija izolirane DNA određena je spektrofotometrijski i elektroforezom na agaroznom gelu.

4.9. Generiranje stabilno transficirane stanične linije U937 koja izražava mRFP-GFP-LC3B

Najprije smo utvrdili minimalnu toksičnu koncentraciju G418 od $400 \mu\text{g/mL}$ tako da smo stanice U937 inkubirali u rastućim koncentracijama antibiotika ($50 \mu\text{g/mL}$ do 1 mg/mL) tijekom dva tjedna. Za potrebe generiranja stanične linije U937 koja izražava mRFP-GFP-LC3B (U937-mRFP-GFP-LC3B) korištene su stanice U937 koje su pasažirane 10 do 20 puta, a stanice su transficirane pomoću sustava Neon (Thermo Fisher Scientific) prema uputama proizvođača kako je već opisano. Nakon dva tjedna stanice koje su preživjele selekciju antibiotikom su pokupljene, ekspanzirane u mediju koji je sadržavao $250 \mu\text{g/mL}$ G418 te smo provjerili je jesu li pozitivne na fluorescenciju u zelenom i crvenom kanalu pomoću konfokalne mikroskopije (LSM 510 Meta) i protočne citometrije (FACSCalibur). Specifični obrazac točkastog nakupljanja zelenog i crvenog signala tipičan za izražaj ovog plazmida provjeren je nakon 24 h inkubacije stanica s klorokinom ($50 \mu\text{M}$) pomoću konfokalne mikroskopije (LSM 510 Meta). Alikvoti stabilno transficiranih stanica U937 odmah po verifikaciji linije zamrznuti su na -196°C u tekućem dušiku za daljnju upotrebu.

4.10. Imunofluorescencijsko obilježavanje i analiza konfokalnom mikroskopijom

Stanice su pokupljene nakon odgovarajućeg vremena inkubacije, oprane u hladnom PBS-u i fiksirane ledenim 100-postotnim metanolom tijekom 15 minuta na -20°C . Nakon fiksacije stanice su oprane tri puta u PBS-u, a pri zadnjem pranju dodana je DNaza I ($200 \text{ Kunitzovih jedinica/mL}$) kako bi se spriječilo nakupljanje stanica u grudice. Potom su stanice sat vremena inkubirane na sobnoj temperaturi u otopini za blokiranje (PBS koji sadrži 5% kozjeg seruma i 0,3% otopine Tritona X-100, $\text{pH}=8,0$). Nakon pranja, stanice su inkubirane tijekom noći na 4°C

s primarnim protutijelom u puferu za razrjeđenje (PBS koji sadrži 1% BSA i 0,3% Triton X-100). Sutradan su stanice oprane tri puta od primarnog protutijela i inkubirane dva sata na sobnoj temperaturi sa sekundarnim protutijelom u puferu za razrjeđenje. Nakon trostrukog pranja, talog obilježenih stanica je raspršen u mediju za uklapanje (Vectashield Antifade Mounting Medium) i 10 μ L tako dobivene suspenzije je nanoseno na stakalce za mikroskopiranje i hermetički zatvoreno.

Signali su analizirani konfokalnom mikroskopijom (LSM 510 Meta, Zeiss, Oberkochen, Njemačka) pri povećanju 63x, uz 1,4 NA. Sve slike su dobivene kao srednji presjek kroz volumen jednog sloja stanica i predstavljaju presjek najvećeg intenziteta fluorescencije u stanici. Kako bismo provjerili distribuciju signala u stanici, snimljeni su i serijski presjeci kroz punu debljinu stanice (engl. *stack*). Slike su obrađene programima LSM i Zen (Zeiss, Oberkochen, Njemačka).

Za potrebe snimanja živih stabilno transficiranih stanica U937, stanice su zasađene na pokrovna stakla s komoricama (Lab-Tek II, Thermo Fisher Scientific – Nunc, Waltham, MA, SAD) u gustoći 2×10^5 /mL i volumenu 1 mL te inkubirane tijekom 48 h s AICAR-om (0,5 mM), metforminom (15 mM) i 3-MA (5 mM). U jedan uzorak kontrolnih stanica dodan je bafilomicin (50 nM) zadnja tri sata inkubacije. Signali su analizirani konfokalnom mikroskopijom (Leica TCS SP2 AOBS, Wetzlar, Njemačka) pri povećanju 63x, uz 1,4 NA i digitalno uvećanje 4x. Fluorescencija je stimulirana laserskom svjetlošću valne duljine 488 i 543 nm simultano i sekvencijalno uz očitavanje signala u zelenom i crvenom kanalu dobivenima sustavom spektralne difrakcije na prizmi. U svim slikama intenzitet signala je podjednako pojačan koristeći program Adobe Photoshop CS6, a odgovarajuće slike iz zelenog i crvenog kanala su preklopljene koristeći programe Adobe Photoshop CS6 i ImageJ (NIH, Bethesda, MD, SAD).

4.11. Statistička analiza

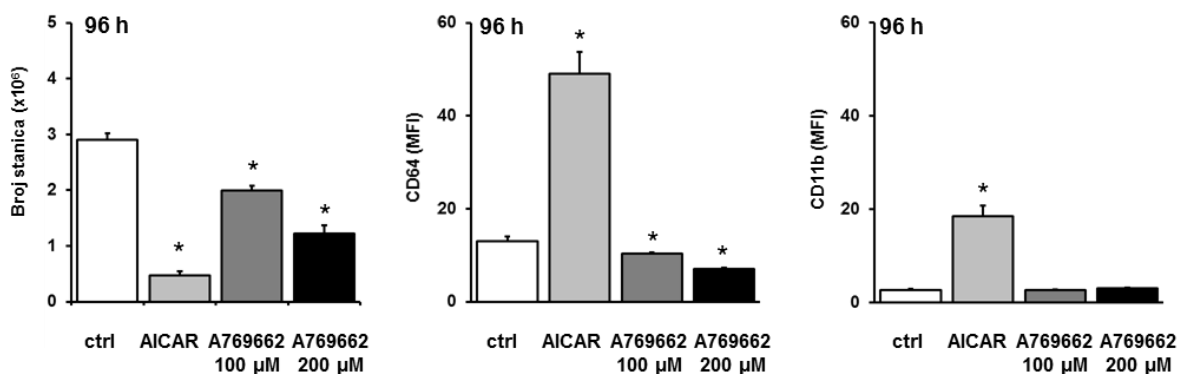
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardne pogreške (SEM, prema engl. *standard error of the mean*) te analizirani pomoću Studentovog t-testa. Značajnima su smatrane vrijednosti $p < 0,05$. U statističkoj obradi korišteni su programi Microsoft Excel i GraphPad Prism.

5. REZULTATI

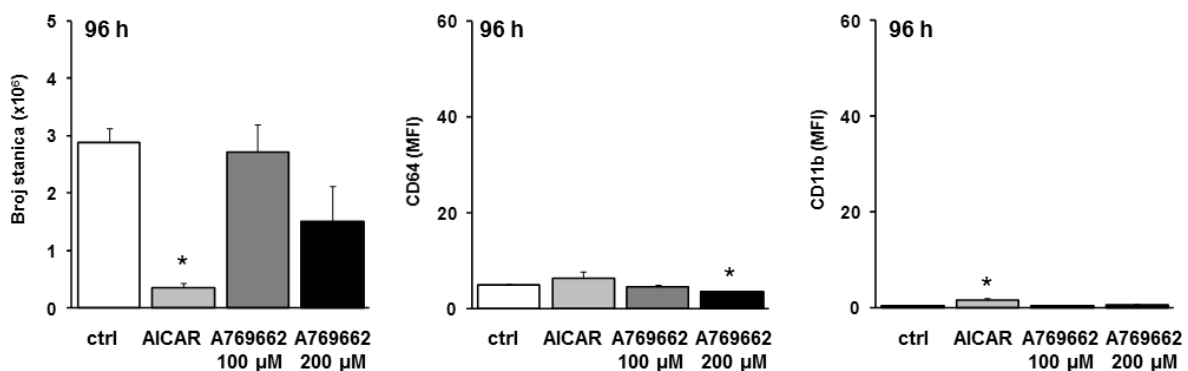
5.1. Učinci AICAR-a i specifičnog aktivatora AMPK-a A769662 na stanice leukemijskih linija

U prethodnom istraživanju pokazali smo da smanjenje količine AMPK-a pomoću siRNA ne utječe na broj živih stanica i izražaj diferencijacijskih biljega CD64 i CD11b u stanicama U937 koje su potaknute AICAR-om (26). Nedavna istraživanja pokazala su da od svih tvari koje se uobičajeno koriste kao aktivatori AMPK-a (metformin, fenformin, AICAR, 2-DG, salicilati), samo direktni aktivator AMPK-a, A769662, ima učinke na metabolizam i proliferaciju koji zaista ovise o AMPK-u (51).

a) U937



b) HL-60



Slika 1. Učinak AICAR-a i specifičnog aktivatora AMPK-a A769662 na broj i diferencijaciju stanica U937 i HL-60. Stanice U937 (a) i stanice HL-60 (b) inkubirane su tijekom 96 sati u nazočnosti AICAR-a (0,5 mM) i A769662 (100 μM i 200 μM). Broj živih stanica određen je brojanjem u hemocitometru pomoću tripanskog modrila, a izražaj diferencijacijskih biljega određen je protočnom citometrijom i prikazan je kao srednji intenzitet fluorescencije (MFI). Rezultati su srednje vrijednosti ± SEM iz tri nezavisna pokusa. * p < 0,05 (Studentov t-test).

Stoga smo ispitali učinke dviju koncentracija A769662 (100 μ M i 200 μ M) na broj i diferencijaciju stanica linija U937 i HL-60 te usporedili rezultate s učincima AICAR-a (0,5 mM) (slika 1.). Kao što je prethodno opisano (26), inkubacija stanica U937 s AICAR-om tijekom 96 h statistički značajno smanjuje broj živih stanica te povećava MFI stanica obilježenih fluorescentnim protutijelima koja prepoznaju CD64 i CD11b. Iako A769662 u obje koncentracije statistički značajno smanjuje broj živih stanica U937, A769662 ne oponaša učinke AICAR-a na MFI CD64 i CD11b. Dapače, u obje korištene koncentracije specifični agonist AMPK-a neznatno smanjuje izražaj CD64.

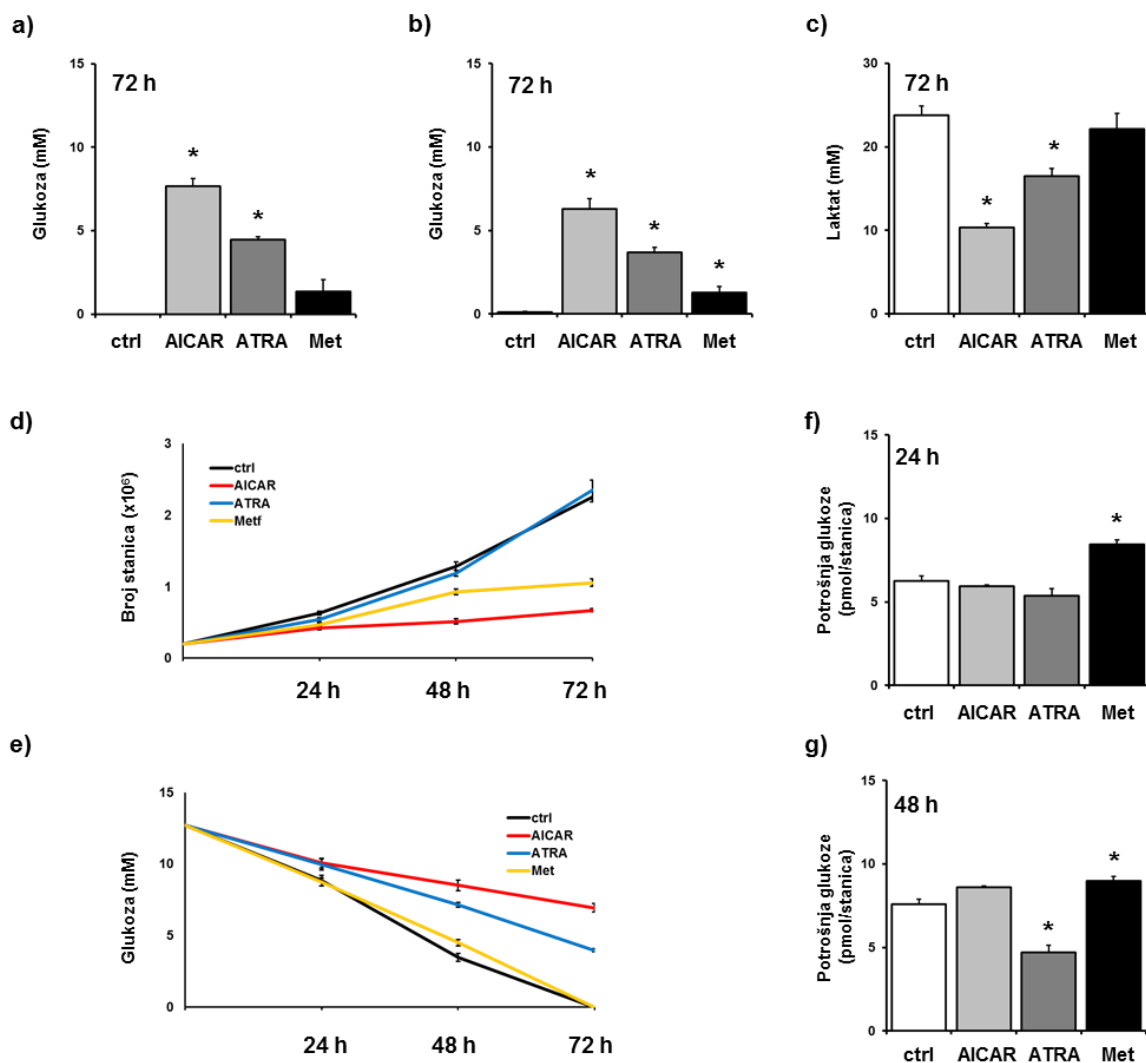
Kao što smo prethodno opisali (26), AICAR podjednako smanjuje broj živih stanica linija U937 i HL-60, ali nema znatnog učinka na izražaj diferencijacijskih biljega u mijeloblastičnim stanicama HL-60 (slika 1.b). Međutim, učinci direktnog aktivatora AMPK-a na broj i izražaj diferencijacijskih biljega podjednaki su i u mijeloblastičnoj liniji HL-60 i u monocitnoj liniji U937.

5.2. Učinci AICAR-a, ATRA-e i metformina na metabolizam glukoze u stanicama U937

Proapoptotički učinci metformina u stanicama HL60 i MOLM-4 pripisuju se skretanju metabolizma s oksidativne fosforilacije na aerobnu glikolizu (25), a opisano je i da ATRA u stanicama HL60 smanjuje ulazak glukoze i glikolizu tijekom diferencijacije (94). Stoga smo ispitali mogući učinak AICAR-a na metabolizam glukoze u stanicama U937 tijekom diferencijacije. Stanice smo inkubirali s navedenim tvarima tijekom 24 do 72 sata te smo potom izmjerili vrijednosti glukoze u nadtalogu nakon centrifugiranja. Kao što se vidi na slici 2., vrijednosti glukoze izmjerene pomoću glukometra za dijabetičare (2.a) i vrijednosti izmjerene kolorimetrijskom metodom (2.b) nisu se razlikovale te su bile obrnuto razmjerne vrijednostima laktata u nadtalogu (2.c). Budući da AICAR i metformin znatno utječu na proliferaciju stanica (slika 2.d) te da su vrijednosti glukoze u mediju kontrolnih stanica i stanica tretiranih metforminom nemjerljivo niske nakon 72 sata inkubacije (slika 2.e), potrošnju glukoze izračunali smo prema broju stanica nakon 24 (slika 2.f) i 48 sati (slika 2.g) inkubacije.

Kao što je i prethodno opisano, metformin statistički značajno povećava potrošnju glukoze već nakon 24 sata inkubacije (25), a ATRA statistički značajno smanjuje nakon 48 sati

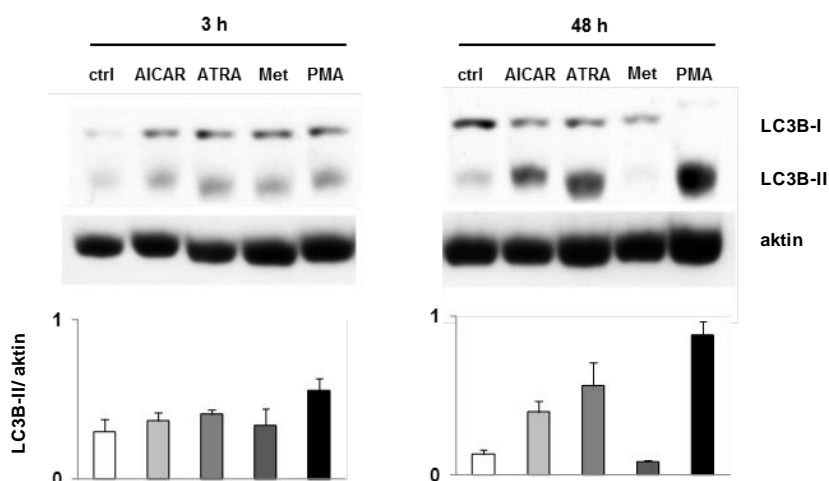
(94). Međutim, prosječna potrošnja glukoze u stanicama U937 koje su tretirane AICAR-om nije se značajno razlikovala od prosječne potrošnje izmjerene u kontrolnim stanicama.



Slika 2. Utjecaj AICAR-a, ATRA-e i metformina na potrošnju glukoze i proizvodnju laktata. Stanice U937 inkubirane su u nazočnosti AICAR-a (0,5 mM), ATRA-e (1 μ M) i metformina (15 mM) u odgovarajućim vremenskim razmacima. Nakon 72 h inkubacije koncentracija glukoze u nadtalogu izmjerena je pomoću glukometra za dijabetičare (a) i enzimске kolorimetrijske metode uz korištenje enzima heksokinaze (b), a koncentracija laktata određena je pomoću enzimске kolorimetrijske metode uz korištenje enzima laktat-oksidge (c). d) Krivulja rasta stanica U937 inkubiranih s ispitivanim agensima u razdoblju od 24 do 72 sata. Broj živih stanica određen je brojanjem u hemocitometru pomoću tripanskog modrila. e) Krivulja koncentracija glukoze u razdoblju od 24 do 72 sata. f) Potrošnja glukoze standardizirana prema broju živih stanica u uzorku nakon 24 sata inkubacije. g) Potrošnja glukoze standardizirana prema broju živih stanica u uzorku nakon 48 sati inkubacije. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SEM iz najmanje tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ (Studentov t-test).

5.3. AICAR i drugi diferencijacijski agensi povećavaju razinu LC3B-II

Autofagija je opisana kao jedan od mehanizama djelovanja AICAR-a u stanicama K562 u kojima AICAR smanjuje broj živih stanica neovisno o AMPK-u (93). Kako bismo ispitali moguće učinke AICAR-a na autofagiju u našem modelu, najprije smo odredili količine proteina LC3 (prema engl. *light chain 3*) koji se koristi kao marker stvaranja autofagosoma. LC3 je u stanicama sisavaca homolog proteina Atg8 u kvascima koji se specifično cijepa na C-kraju u LC3-I. Time se na C-kraju izlaže glicin što omogućuje konjugiranje s fosfatidil-etanolaminom (PE) i nastanak LC3-II koji se čvrsto veže za membrane autofagosoma. Zbog toga se analizom Western blot zamjećuju dvije trake: LC3-I (približno 16-18 kDa) i PE-LC3-II (približno 14-16 kDa). Premda je molekularna masa PE-LC3-II veća od mase citosolnog LC3-I, LC3-II se na blotu zamjećuje kao traka manje molekularne mase jer zbog svoje hidrofobnosti migrira dalje od LC3-I u SDS-PAGE (95).



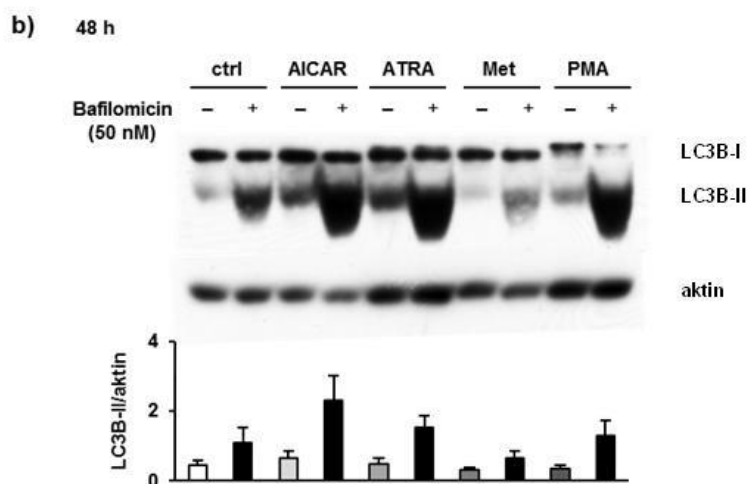
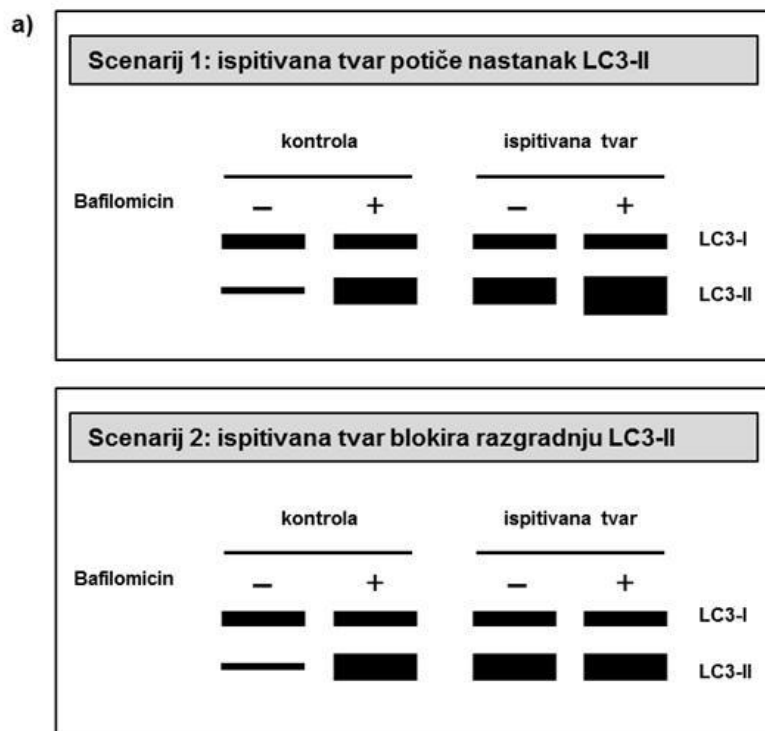
Slika 3. Učinak AICAR-a i drugih diferencijacijskih agensa na količinu LC3B-II. Stanice U937 inkubirane su tijekom 3 i 48 h s AICAR-om (0,5 mM), ATRA-om (1 μ M), metforminom (15 mM) i PMA-om (50 nM). Nakon inkubacije, prikupljeni su ukupni stanični lizati, jednaka količina proteina razdvojena je elektroforezom te je izražaj autofagijskog biljega LC3B analiziran metodom Western blot. Densitometrijom je utvrđen omjer intenziteta signala LC3B-II i aktina te je izražen u relativnim jedinicama. Grafovi su srednje vrijednosti \pm standardne pogreške omjera LC3B-II/aktin iz najmanje tri nezavisna pokusa.

Stanice U937 zasadili smo u uobičajenoj koncentraciji u nazočnosti AICAR-a, drugih diferencijacijskih agensa (ATRA, PMA) i metformina, agonista AMPK-a za kojeg smo

prethodno pokazali da nema učinaka na diferencijaciju. Nakon 3 i 48 sati inkubacije izolirali smo ukupne stanične lizate te smo jednake količine proteina razdvojili pomoću SDS-PAGE i analizirali količine proteina koje prepoznaje protutijelo specifično za LC3B tako što smo količine LC3B-II usporedili s količinom aktina (95). Kao što se vidi na slici 3., svi ispitivani agensi neznatno povećavaju količinu LC3B-II tijekom kratkotrajne inkubacije (3 h). Međutim, nakon 48 h omjer LC3-II/aktin je izrazito povećan u stanicama koje su tretirane AICAR-om i drugim diferencijacijskim agensima, a smanjen u stanicama tretiranim metforminom.

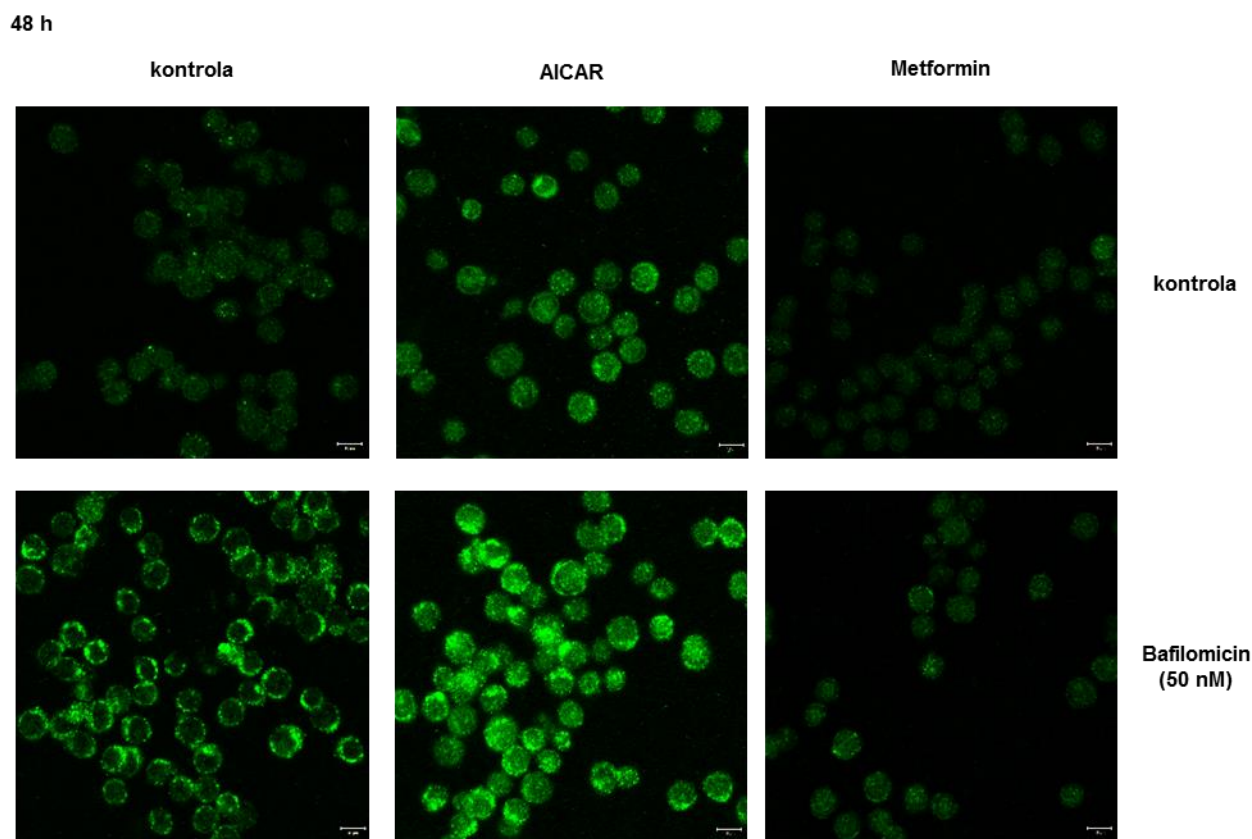
Povećani omjer LC3-II i aktina u stanicama može nastati zbog povećanog stvaranja LC3-II ili zbog njegove smanjene razgradnje, kao što je shematski prikazano na slici 4.a. Kako bi se razlikovala ta dva procesa, količina LC3-II može se mjeriti u stanicama koje su tretirane nekim inhibitorom lizosomske razgradnje, kao što je bafilomicin A1. Bafilomicin koči H^+ -ATPazu u lizosomu pa sprječava smanjenje lizosomskog pH te tako smanjuje i lizosomsku razgradnju LC3-II (slika 4.a, stupac 2). Ako ispitivani agens povećava nastanak LC3-II, istodobna inkubacija s bafilomicinom tijekom zadnja 3 sata dodatno će povećati količinu LC3-II (slika 4.a, stupac 4, scenarij 1). Nasuprot tome, ako agens smanjuje razgradnju, dodatak bafilomicina neće dodatno povećati količinu LC3-II (slika 4.a, stupac 4, scenarij 2).

Kako bismo ispitali protok autofagije u našem modelu, stanice U937 inkubirali smo tijekom 48 h s AICAR-om (0,5 mM), ATRA-om (1 μ M), metforminom (15 mM) i PMA-om (50 nM), a dijelu stanica dodali smo bafilomicin A1 (50 nM) tijekom zadnja tri sata inkubacije. Prikupljene stanične lizate analizirali smo metodom Western blot, a primjerni rezultati prikazani su na slici 4.b. Kao što je vidljivo, bafilomicin je izrazito povećao količinu LC3B-II u kontrolnim stanicama te u stanicama tretiranim spojevima koji potiču diferencijaciju (AICAR, ATRA, PMA). Omjer LC3B-II/aktin u stanicama koje su tretirane kombinacijom metformina i bafilomicina veći je od onih tretiranih samo metforminom, ali manji od omjera u kontrolnim stanicama koje su tretirane bafilomicinom tijekom 3 sata. Stoga smo zaključili da je povećanje količine LC3B-II prilikom izlaganja diferencijacijskim tvarima posljedica indukcije autofagije, a ne blokade njegove razgradnje.



Slika 4. Određivanje učinka AICAR-a na protok autofagije. a) Shematski prikaz djelovanja bafilomicina i agonista na količinu LC3-II kao markera autofagije. Prilagođeno prema Rubinszteinu (96). b) Stanice U937 inkubirane su s ispitivanim tvarima 48 h, a bafilomicin A1 (50 nM) je dodan zadnja 3 h inkubacije. Jednaka količina proteina iz ukupnih staničnih lizata razdvojena je elektroforezom te je izražaj autofagijskog biljega LC3B analiziran metodom Western blot. Densitometrijom je utvrđen omjer intenziteta signala LC3B-II i aktina te je izražen u relativnim jedinicama. Grafovi su srednje vrijednosti \pm standardne pogreške omjera LC3B-II/aktin iz najmanje tri nezavisna pokusa.

Dodatno smo provjerili učinak AICAR-a i metformina na indukciju autofagije pomoću istog protutijela metodom indirektno imunofluorescencije (slika 5.). Analiza preparata konfokalnom mikroskopijom pokazala je da AICAR potiče promjenu raspodjele proteina LC3B iz difuzne u tipično točkasto nakupljanje te da su te promjene još jače izražene nakon dodatka bafilomicina. Nasuprot tome, metformin smanjuje intenzitet fluorescencije, a fluorescencija stanica izloženih kombinaciji metformina tijekom 48 h i bafilomicina tijekom zadnja 3 h manja je od stanica koje su tretirane samo bafilomicinom.



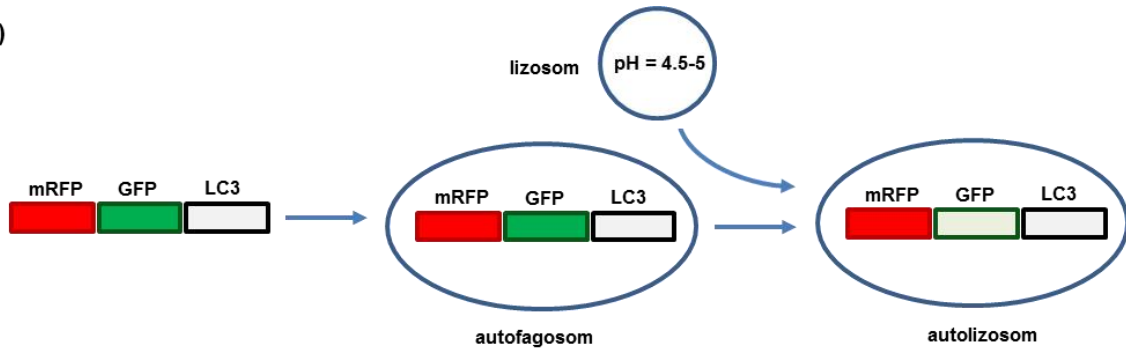
Slika 5. Učinak AICAR-a na točkasto nakupljanje LC3B. Stanice U937 inkubirane su s AICAR-om (0,5 mM) i metforminom (15 mM) tijekom 48 h, a bafilomicin A1 (50 nM) dodan je 3 h pred kraj inkubacije. Stanice su obilježene metodom indirektno imunofluorescencije i analizirane konfokalnom mikroskopijom (Zeiss LSM 510). Prikazani su rezultati reprezentativnog od najmanje tri nezavisna pokusa. Snimljeni su u razini najvećeg intenziteta fluorescencije, pri povećanju 63x, a crta mjerila odgovara 10 μ m.

Protok autofagije može se odrediti i koristeći stanice transficirane plazmidom u kojemu je gen za protein LC3 vezan s genima za mRFP i GFP. Princip takvog obilježavanja temelji se na različitoj osjetljivosti proteina GFP i mRFP na promjenu pH. Zelena fluorescencija GFP brzo nestaje u kiseljoj sredini, a fluorescencija mRFP se ne mijenja značajno u kiselim odjeljcima stanice (pKa GFP = 6,0, pKa mRFP = 4,5, uobičajeni pH lizosoma u stanicama sisavaca = 4,8). Stoga u stanicama koje izražavaju mRFP-GFP-LC3 protein LC3 fluorescira i zeleno i crveno (dakle žuto u spojenoj slici) kada se nalazi u citoplazmi ili odjeljku u kojem je $\text{pH} > 6$. S druge strane, kada uđe u odjeljak u kojem je $\text{pH} < 6$, zelena fluorescencija nestaje i ostaje prisutna samo crvena fluorescencija (slika 6.a).

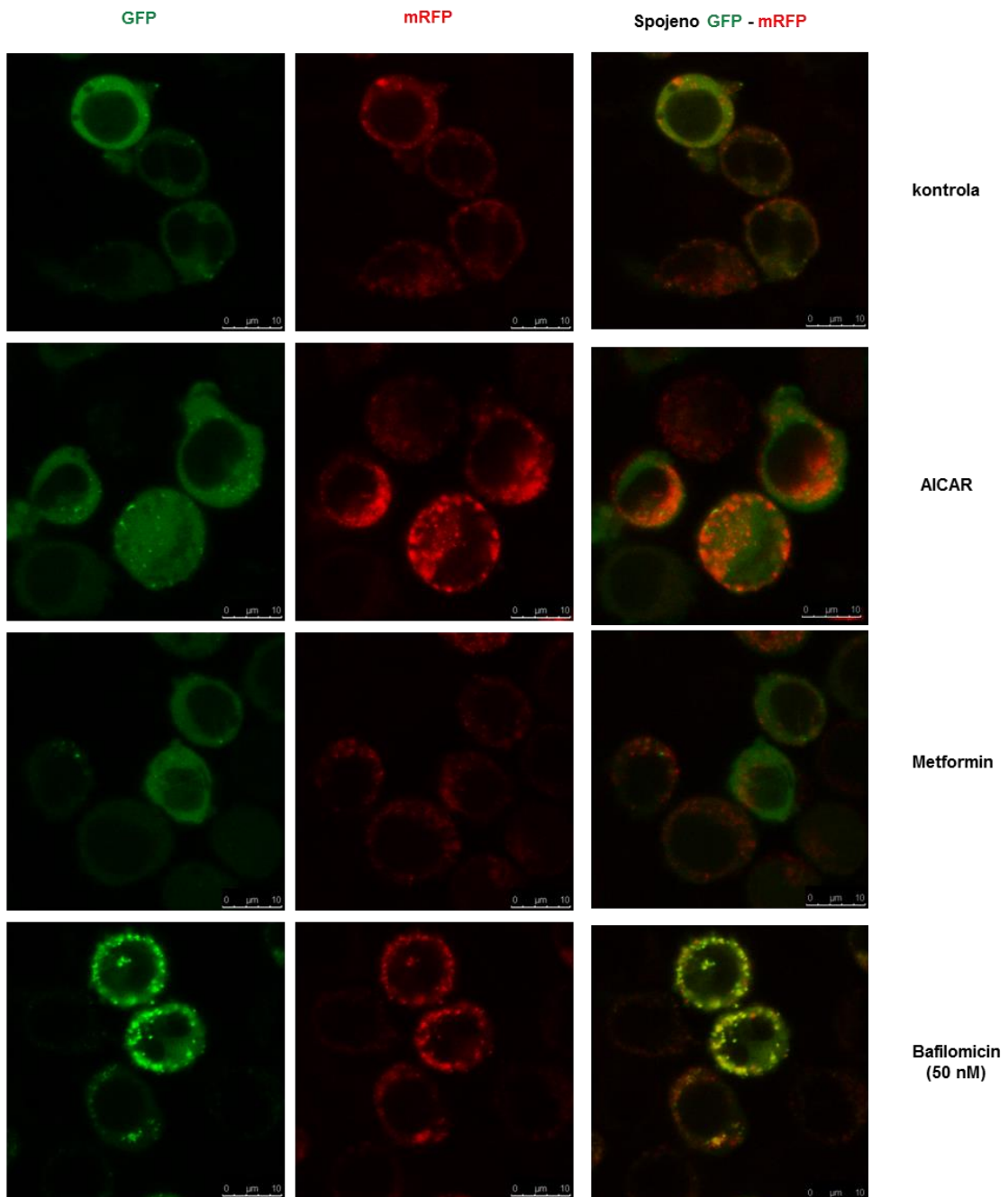
Kada se u stanici potiče autofagija, pospješuje se i transkripcija gena za LC3, pa tako i za mRFP-GFP-LC3, što bi trebalo povećati intenzitet fluorescencije i u zelenom i u crvenom kanalu. Međutim, nakon spajanja autofagosoma i lizosoma zbog promjene pH nestaje zelena fluorescencija dok je i dalje prisutna crvena fluorescencija i to u obliku točkastog nakupljanja. Prilikom blokade u procesu autofagije izostaje spajanje autofagosoma s lizosomom i zakiseljavanje autofagosoma pa se nakuplja LC3 uz koji je aktivna i zelena i crvena fluorescencija što se na slici na kojoj su preklapljeni signali iz zelenog i crvenog kanala vidi kao uzorak žutih točkica (97).

U našem eksperimentalnom modelu (slika 6.b) može se zamijetiti da je u stanicama U937-mRFP-GFP-LC3B prisutna bazalna autofagija u kontrolnim stanicama, dok inkubacija s AICAR-om povećava protok autofagije jer dolazi do povećanja broja i intenziteta crvenih točkica u stanicama koje su inkubirane s AICAR-om. Taj učinak izostaje u stanicama tretiranim metforminom. Bafilomicin je korišten kao pozitivna kontrola budući da koči H^+ -ATPazu i razgradnju LC3B u autolizosomu. Zbog toga izostaje smanjenje pH nužno za nestanak zelene fluorescencije pa se u stanicama zamjećuje povećanje broja i intenziteta i zelenih i crvenih točkica koje na preklapljenoj slici kolokaliziraju i fluoresciraju žuto.

a)



b)



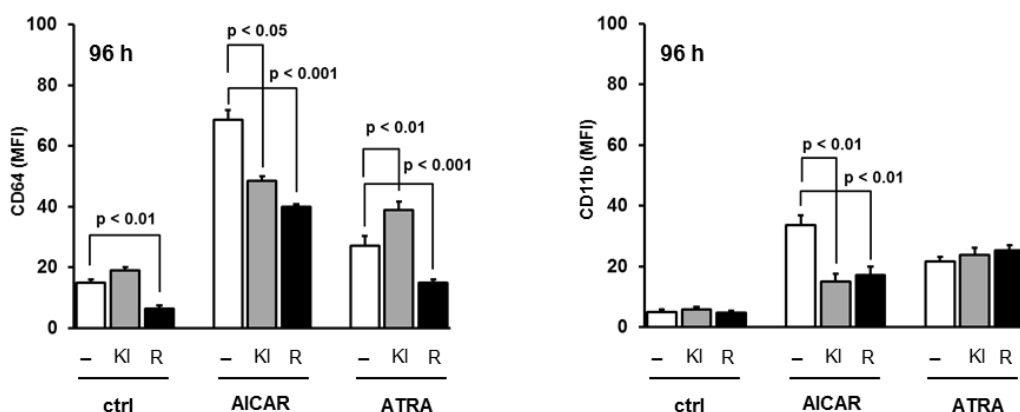
Slika 6. Učinak AICAR-a na protok autofagije u stanicama U937-mRFP-GFP-LC3B (prethodna stranica).

a) Princip praćenja protoka autofagije pomoću mRFP-GFP-LC3. Kada se mRFP-GFP-LC3 nalazi u okolini u kojoj je $\text{pH} > 6$ zamjećuje se crvena fluorescencija koja potječe od mRFP i zelena fluorescencija koja potječe od GFP. Nakon spajanja s lizosomom, smanjuje se pH u autolizosomu na približno 4,8. Budući da je GFP nestabilan u kiseloj sredini smanjuje se zelena fluorescencija, a zadržava se crvena fluorescencija stabilnijeg mRFP. **b)** Stanice U937-mRFP-GFP-LC3B inkubirane su tijekom 48 h s AICAR-om (0,5 mM) i metforminom (15 mM), a bafilomicin A1 (50 nM) je dodan tijekom zadnja 3 h inkubacije. Žive stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom (Leica TCS SP2 AOBS), pri povećanju 63x uz digitalno uvećanje slike 4x, a crta mjerila odgovara 10 μm . Prikazani su rezultati reprezentativnog od dva nezavisna pokusa u duplikatu.

5.4. Djelovanje farmakoloških modulatora autofagije na učinke AICAR-a i drugih diferencijacijskih tvari

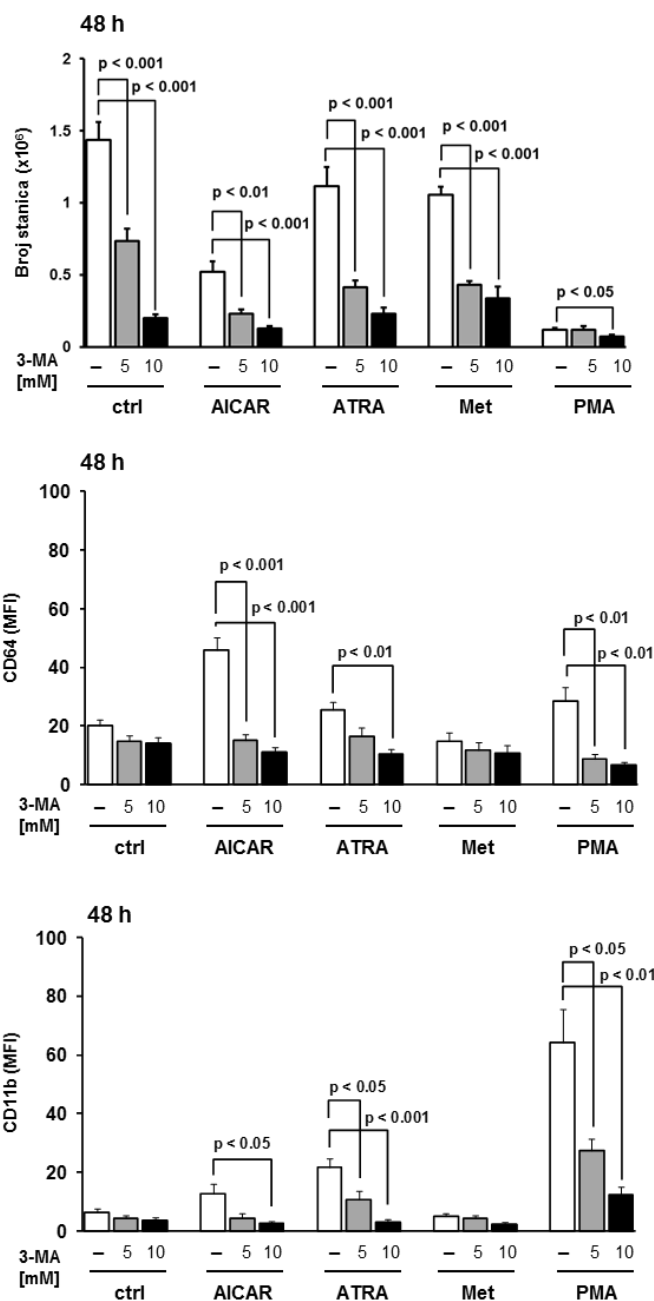
Klorokin je protumalarijski lijek koji se koristi kao modulator autofagije zbog učinka na pH lizosoma. Naime, ulaskom u kiseli lizosom klorokin se protonira te djeluje kao baza što uzrokuje povišenje unutar-lizosomskog pH i otežava lizosomsku razgradnju. Tako klorokin inhibira završne stadije procesa autofagije (98). U ranijim istraživanjima klorokin se koristio u modelima primarnih monocita (89), stanica K562 (99), NB4 (100) i blastnih stanica dobivenih od oboljelih od AML-a (101) u koncentracijama od 2,5 do 50 μM . U ovom istraživanju klorokin je korišten u koncentraciji 25 μM u kojoj ima samo blage citotoksične učinke na stanice U937 i samostalno ne potiče izražaj diferencijacijskih biljega. Kao što se vidi na slici 7., klorokin inhibira učinke AICAR-a na porast diferencijacijskih biljega CD64 i CD11b. Međutim, u stanicama inkubiranim s ATRA-om dodatak klorokina nema učinka na njihov izražaj CD11b, a čak dodatno povisuje izražaj CD64.

Modulator koji bi trebao poticati autofagiju je rapamicin. Rapamicin je alosterički inhibitor kinaze mTORC1 koja, između ostalih funkcija, djeluje i kao jedan od glavnih uzvodnih inhibitora autofagije. Eksperimentalno, pokazano je da rapamicin potiče autofagiju i u uvjetima obilja hranjivih tvari na modelu kvasca i nekih tumorskih staničnih linija (102). U kontekstu diferencijacije leukemijskih stanica, opisani su različiti učinci inhibitora mTOR-a na izražaj diferencijacijskih biljega (103, 104, 105, 106). U ovom ispitivanju, rapamicin je zakočio učinak AICAR-a na povećanje izražaja biljega CD64 i CD11b u stanicama U937. Potvrđeno je i naše prethodno opažanje (106) da rapamicin smanjuje izražaj CD64 i samostalno i u stanicama diferenciranim ATRA-om (slika 7.).



Slika 7. Učinak modulatora autofagije klorokina i rapamicina na diferencijaciju posredovanu AICAR-om i ATRA-om. Stanice U937 inkubirane su tijekom 96 sati u nazočnosti AICAR-a (0,5 mM) i ATRA-e (1 μ M), a klorokin (25 μ M, oznaka KI) i rapamicin (20 nM, oznaka R) dodani su 15 minuta prije dodavanja diferencirajućih agensa. Izražaj diferencijacijskih biljega određen je protočnom citometrijom i prikazan je kao srednji intenzitet fluorescencije (MFI). Rezultati su srednje vrijednosti \pm SEM iz najmanje tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ (Studentov t-test).

3-metiladenin (3-MA) je najčešće rabljeni farmakološki inhibitor autofagije. 3-MA sprječava autofagiju tako što koči hVps34 koja regulira početak autofagije. Prethodna istraživanja koja su proučavala ulogu autofagije u leukemijskim stanicama diferenciranim pomoću ATRA-e (100) ili u primarnim monocitima koji se diferenciraju u makrofage u odgovoru na GM-CSF (89), koristila su 3-MA u koncentracijama 5 i 10 mM. Stoga smo ispitali učinke istih koncentracija 3-MA u našem modelu diferencijacije. Kao što se vidi na slici 8., 3-MA smanjuje broj živih stanica te poništava diferencijacijske učinke AICAR-a, ATRA-e i PMA.

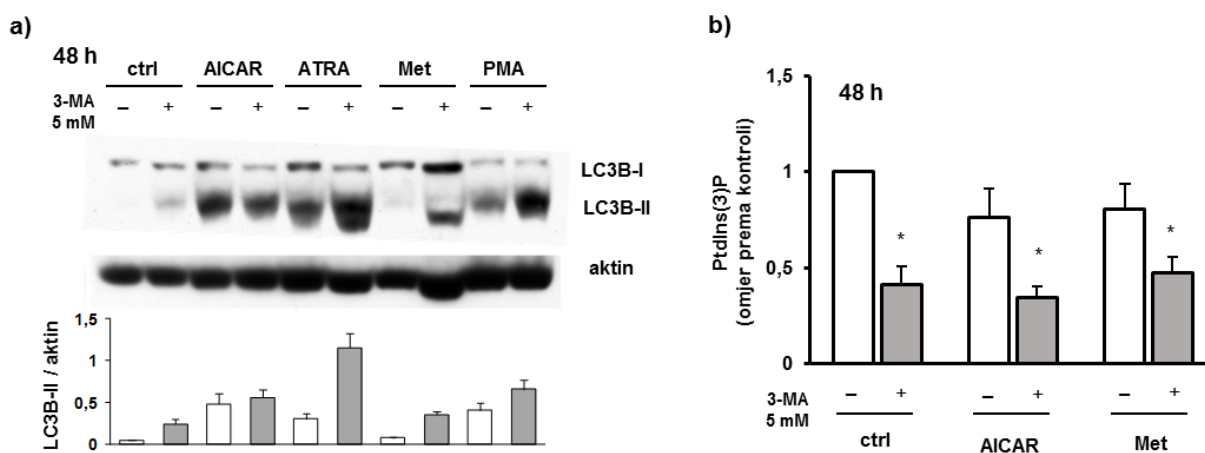


Slika 8. Djelovanje inhibitora hVps34 3-metiladenina (3-MA) na učinke ispitivanih agensa. Stanice U937 inkubirane su tijekom 48 sati u nazočnosti AICAR-a (0,5 mM), ATRA-e (1 μ M), metformina (15 mM) i PMA (50 nM), a 3-MA (5 i 10 mM) dodan je 15 minuta prije dodavanja ispitivanih agensa. Broj živih stanica određen je brojanjem u hemocitometru pomoću tripanskog modrila, a izražaj diferencijacijskih biljega određen je protočnom citometrijom i prikazan je kao srednji intenzitet fluorescencije (MFI). Rezultati su srednje vrijednosti \pm SEM iz najmanje tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ (Studentov t-test).

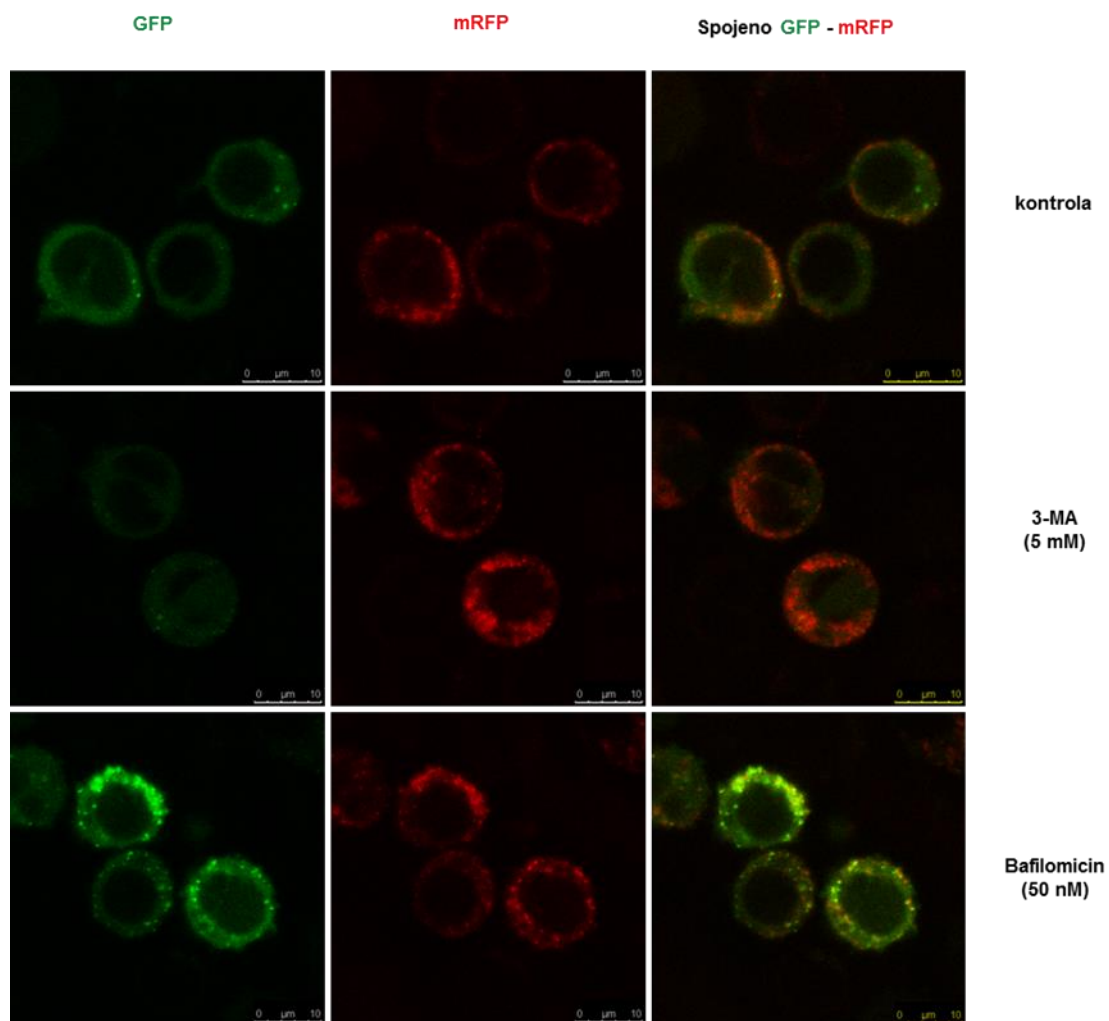
Iako se zbog djelovanja na hVps34 3-MA koristi za inhibiciju autofagije, taj spoj nije u potpunosti specifičan inhibitor jer koči i PI3K razreda I (PI3KC1, prema engl. *PI3K class I*).

Različito od hVps34 koja potiče autofagiju, aktivacija PI3KC1, uz brojne druge učinke, koči autofagiju. Tako je nedavno opisano da 3-MA ustvari potiče autofagiju u stanicama koje se produljeno inkubiraju u potpunom mediju jer je učinak inhibicije hVps34 kraćeg trajanja od učinka inhibicije PI3KC1 (107).

Analiza Western blot kojom smo ispitali količinu markera autofagije LC3B-II u stanicama inkubiranim s 3-MA pokazala je da u našem modelu 3-MA nakon 48 h potiče nakupljanje LC3B-II i samostalno i u kombinaciji s drugim ispitivanim tvarima (slika 9.a). Dodatno smo ipak provjerili je li primjena 3-MA smanjila količinu PtdIns(3)P, produkta aktivirane hVps34 koji ne nastaje aktivacijom PI3KC1. Kao što se vidi na slici 9.b, količina PtdIns(3)P mjerena masenim ELISA esejem bila je značajno smanjena u svim uzorcima inkubiranim s 3-MA. Nakupljanje LC3B-II nakon inkubacije s 3-MA posljedica je poticanja protoka autofagije, a ne blokade njegove razgradnje jer obrazac točkastog nakupljanja u stanicama U937-mRFP-GFP-LC3B nakon inkubacije s 3-MA ne oponaša obrazac u istim stanicama inkubiranim s bafilomicinom (slika 10.).



Slika 9. Učinci 3-metiladenina na količinu LC3B-II i PtdIns(3)P pri dugotrajnoj inkubaciji tijekom 48 sati. Stanice U937 inkubirane su tijekom 48 h s AICAR-om (0,5 mM), ATRA-om (1 μ M), metforminom (15 mM), PMA-om (50 nM) i 3-MA (5 mM) te kombinacijom ispitivanih tvari i 3-MA. **a)** Izražaj autofagijskog biljega LC3B-II analiziran je metodom Western blot. Prikazani su rezultati reprezentativnog od najmanje tri nezavisna pokusa za koje su denzitometrijom određeni omjeri intenziteta signala LC3B-II prema aktinu te prikazani u relativnim jedinicama u obliku srednje vrijednosti \pm SEM. **b)** Nakon izolacije kiselih lipida, količina PtdIns(3)P određena je pomoću masenog ELISA esej i standardizirana na 10×10^6 stanica. Rezultati su relativne vrijednosti količine PtdIns(3)P prema kontroli te su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SEM iz najmanje tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ (Studentov t-test).



Slika 10. Učinci 3-metiladenina na protok autofagije. Stanice U937-mRFP-GFP-LC3B inkubirane su tijekom 48 h s 3-MA (5 mM) i bafilomicinom A1 (50 nM) koji je dodan zadnja 3 h inkubacije. Žive stanice su analizirane konfokalnom mikroskopijom (Leica TCS SP2 AOBS) pri povećanju 63x uz digitalno uvećanje slike 4x, a crta mjerila odgovara 10 µm. Prikazani su rezultati reprezentativnog od dva nezavisna pokusa u duplikatu.

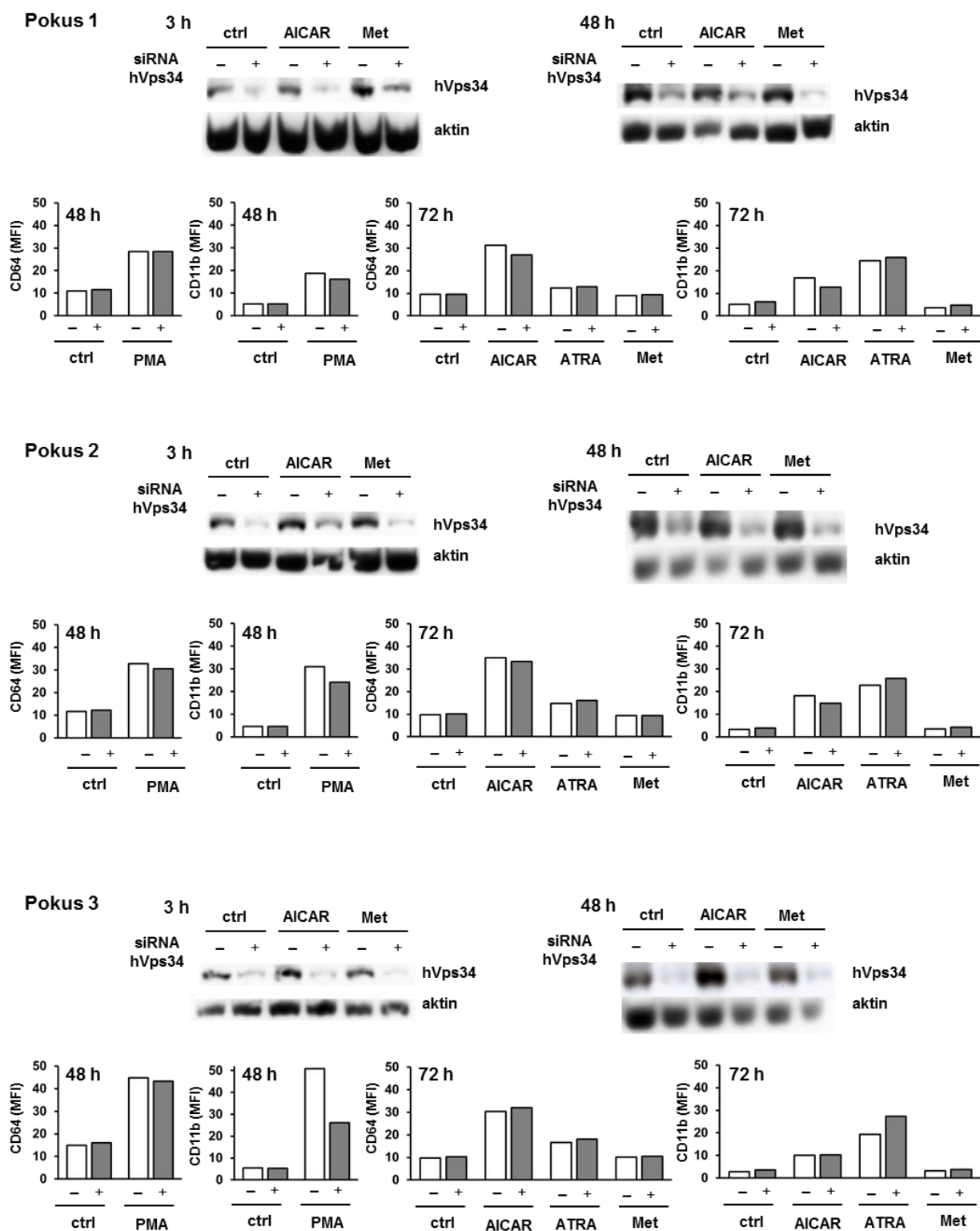
5.5. Djelovanje smanjenog izražaja proteina hVps34, Beclin-1 i Atg7 na učinke AICAR-a i drugih diferencijacijskih tvari

Budući da se 3-MA pokazao kao nedovoljno specifični farmakološki inhibitor autofagije, pokušali smo dodatno istražiti ulogu hVps34 u diferencijaciji stanica U937 tako što smo smanjili izražaj enzima pomoću siRNA. Na slici 11. prikazani su rezultati triju nezavisna pokusa u kojima smo stanice u ekspanzijskoj fazi rasta transficirali pomoću sustava Neon te zasadili 24 sata nakon transfekcije u nazočnosti AICAR-a, ATRA-e, metformina i PMA. Učinkovitost smanjenja količine proteina provjerili smo 3 i 48 h nakon dodatka tvari koristeći metodu Western blot. Istodobno, izražaj biljega CD64 i CD11b odredili smo 48 do 72 sata

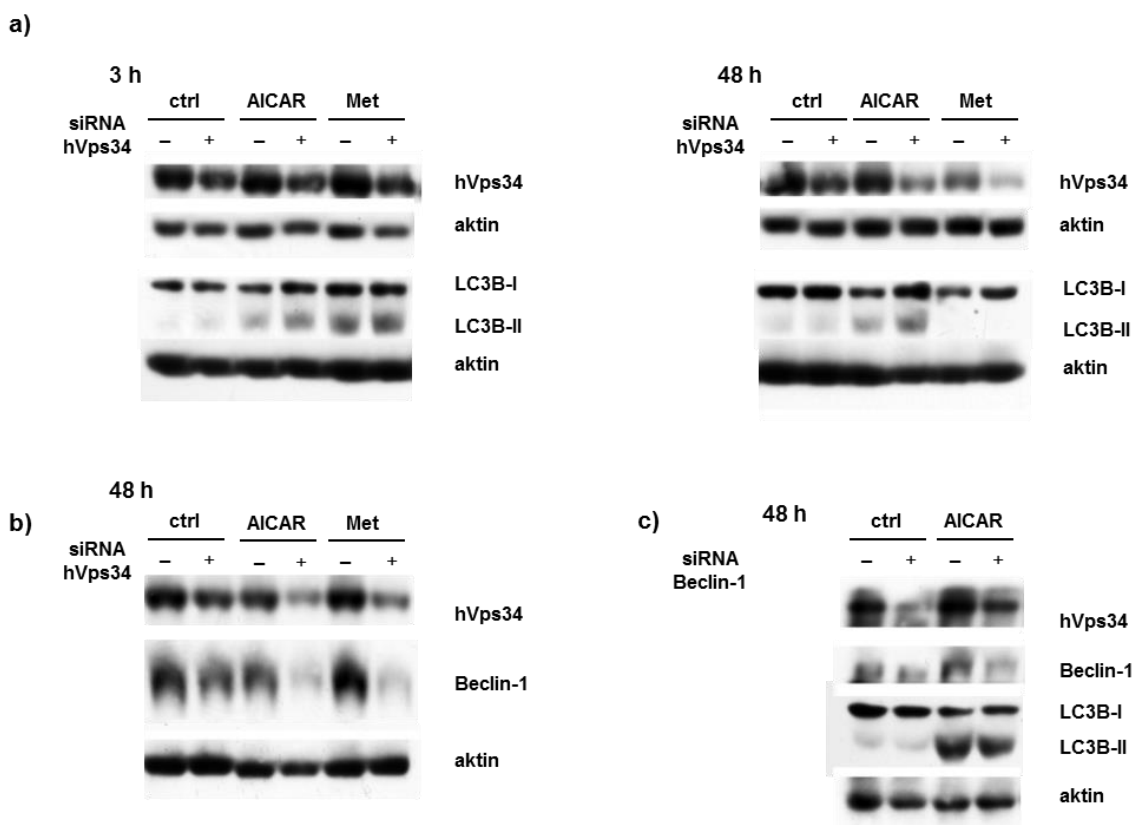
nakon dodavanja tvari. Kao što se vidi na slici 11., u tri nezavisna pokusa u kojima smo smanjili izražaj hVps34, količina navedenog proteina nije utjecala na izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama tretiranim AICAR-om i ATRA-om, a u nekim pokusima smo zamijetili smanjeni izražaj CD11b 48 sati nakon dodatka PMA.

Dva su moguća objašnjenja za izostanak učinka smanjenja hVps34 na izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama tretiranim s AICAR-om i ATRA-om. Jedno je da su učinci tvari neovisni o autofagiji, a drugo da znatno smanjenje hVps34 nije bilo dostatno za kočenje autofagije. Ako se kao marker autofagije koristi LC3B, onda su podaci u literaturi o učincima smanjenja hVps34 na izražaj LC3B različiti (83, 86, 108, 109). Stoga smo u našem modelu provjerili učinak smanjenog izražaja hVps34 na omjer LC3B-II i aktina. Kao što se vidi na slici 12.a, smanjenje hVps34 nije praćeno smanjenjem LC3B-II.

U stanicama hVps34 stvara kompleks s Beclinom-1 koji se smatra nužnim u inicijaciji stvaranja autofagosoma tijekom takozvanog kanonskog puta autofagije ili puta ovisnog o Beclinu-1 koji se tipično aktivira tijekom gladovanja, ali koji nema ulogu u diferencijaciji stanica NB4 u odgovoru na ATRA-u (110, 111). Stoga smo najprije provjerili količinu Beclina-1 u stanicama u kojima smo učinkovito smanjili izražaj hVps34. Kao što se vidi na slici 12.b, u stanicama transficiranim sa specifičnom siRNA za hVps34 količina Beclina-1 smanjuje se razmjerno količini hVps34. Potom smo u stanicama U937 smanjili izražaj Beclina-1 pomoću siRNA specifične za Beclin-1. Na slici 12.c prikazan je primjermi pokus u kojem se vidi da je smanjenje količine Beclina-1 praćeno smanjenjem količine hVps34, ali da je količina LC3B-II nakon inkubacije s AICAR-om pritom smanjena. Međutim, i u tim pokusima pokazali smo da smanjenje količine oba proteina nema učinka na izražaj diferencijacijskih biljega CD64 i CD11b potaknutih AICAR-om i ATRA-om (rezultati nisu prikazani).



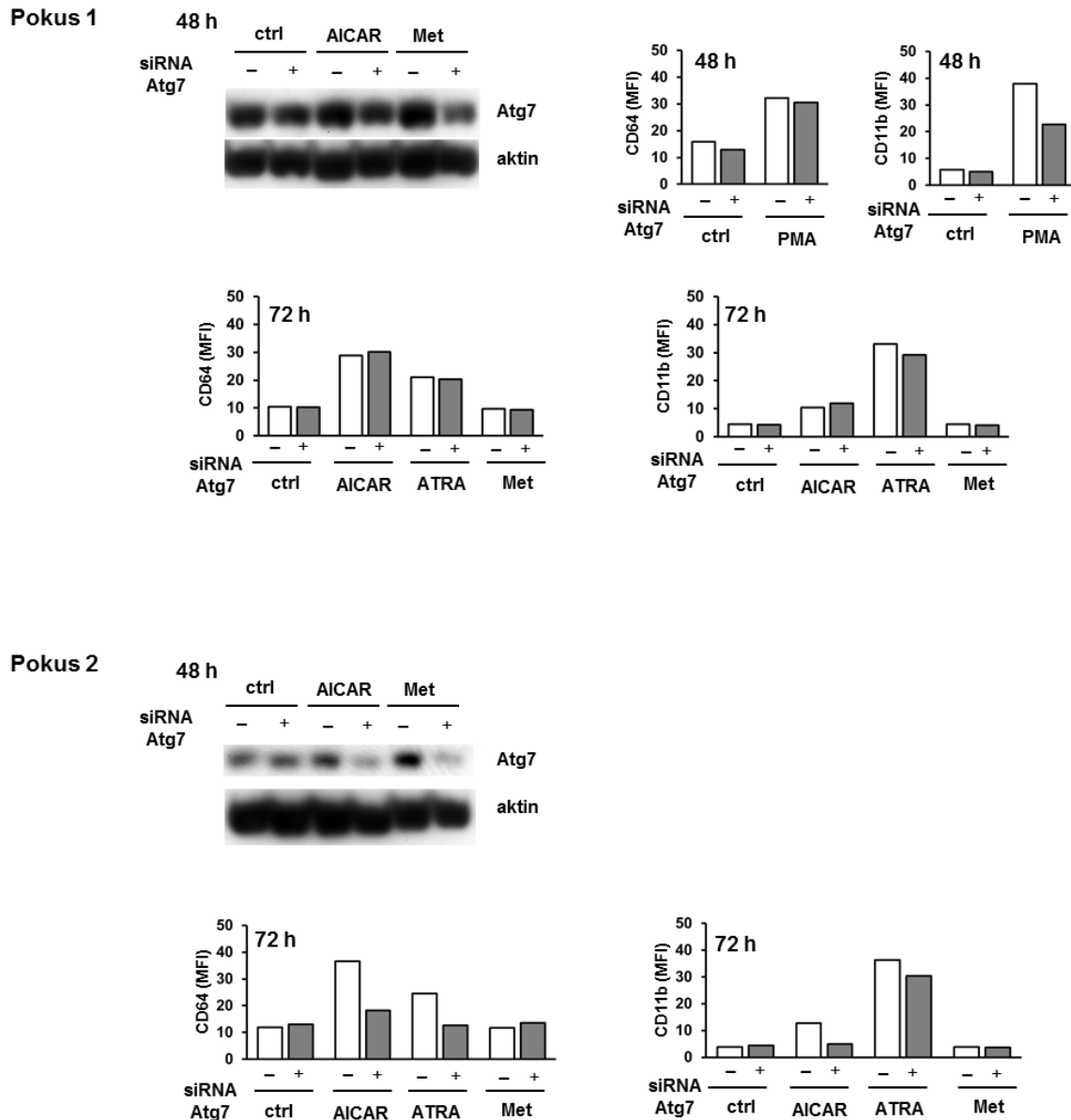
Slika 11. Učinak smanjenja količine hVps34 na izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama U937 koje su transficirane sa specifičnom siRNA. Stanice U937 su transficirane s kontrolnom siRNA i siRNA za hVps34. Nakon 24 sata od transfekcije stanice su zasađene u nazočnosti AICAR-a (0,5 mM), ATRA-e (1 μ M), metformina (15 mM) i PMA (50 nM). Ukupni stanični lizati izolirani su 3 h ili 48 h nakon dodatka tvari, a izražaj CD64 i CD11b određen je 48 h nakon dodatka PMA ili 72 h nakon dodatka drugih tvari. Prikazani su rezultati tri nezavisna pokusa u kojima je smanjena količina hVps34.



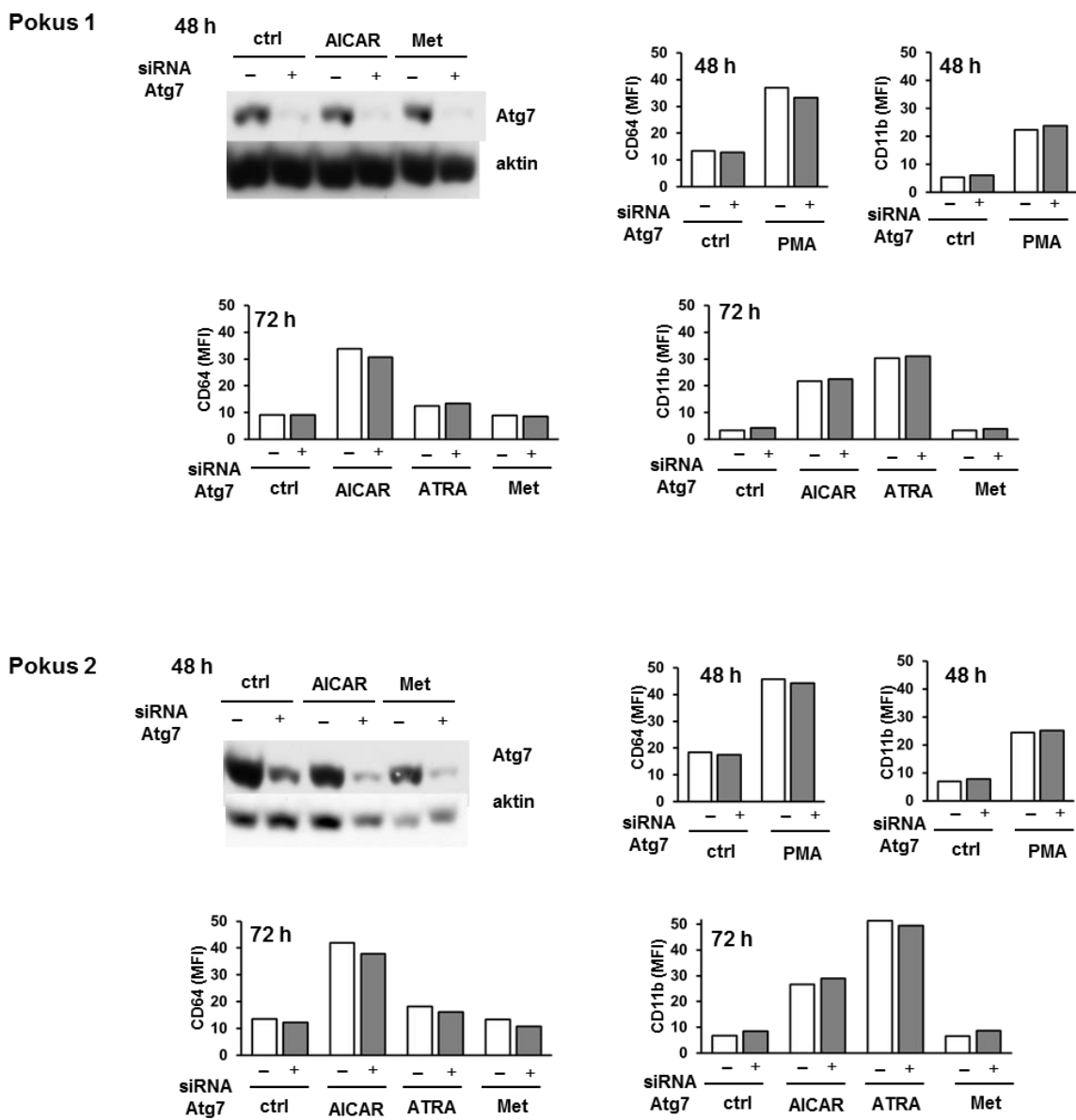
Slika 12. Utjecaj smanjenja količine hVps34 i Beclina-1 u stanicama koje su transficirane specifičnom siRNA na količinu proteina LC3B-II. Stanice U937 su transficirane s odgovarajućom kontrolnom siRNA i siRNA specifičnom za hVps34 ili Beclin-1. Nakon 48 h od transfekcije stanice su zasađene u prisutnosti AICAR-a (0,5 mM) i metformina (15 mM). **a)** Izražaj autofagijskog biljega LC3B-II u stanicama transficiranim sa siRNA za hVps34 analiziran je metodom Western blot. Ukupni stanični lizati izolirani su nakon 3 i 48 h inkubacije s AICAR-om i metforminom. **b)** Analiza količine proteina Beclin-1 u stanicama u kojima je smanjena količina hVps34. Ukupni stanični lizati izolirani su nakon 48 h inkubacije s AICAR-om i metforminom. **c)** Analiza količine proteina hVps34 i LC3B-II u stanicama transficiranim sa siRNA za Beclin-1 nakon 48 h inkubacije s AICAR-om.

Prema trenutnim smjernicama za istraživanje autofagije, preporučljivo je pokusima smanjivanja količine proteina vezanih uz autofagiju pristupiti oprezno i pokušati smanjiti izražaj nekoliko neovisnih proteina. Naime, postoji mogućnost da specifični produkti gena *Atg* imaju uloge koje su neovisne o autofagiji, kao i mogućnost da određeni proteini *Atg* nisu nužni u svim različitim putevima aktivacije autofagije (95, 108). U drugim modelima u kojima je konjugacija LC3B neovisna o Beclinu-u, količina LC3-II ovisi o normalnom izražaju gena *Atg7* (79). *Atg7* je enzim nalik konjugazi ubikvitina E1 koji je bitan za elongaciju autofagosoma te se smatra ključnim u autofagiji (71). Stoga smo stanice U937 transficirali sa siRNA za *Atg7*

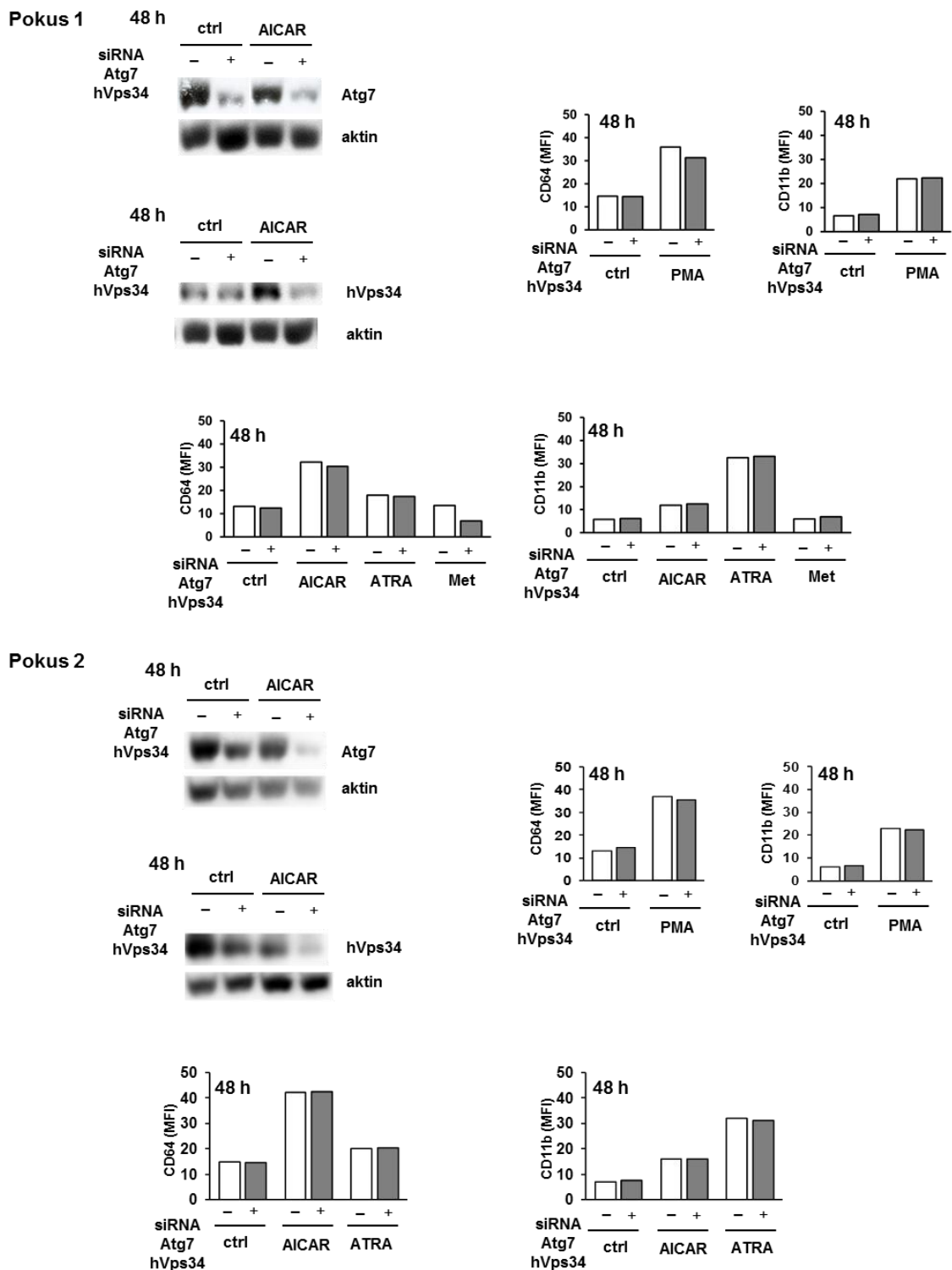
nabavljenim od tvrtke Cell Signaling Technology (CST), a koristili smo ga u konačnoj koncentraciji od 28 nM. Kao što se vidi na slici 13. u pokusu u kojem smo znatno smanjili izražaj Atg7 zamijetili smo i smanjenje izražaja diferencijacijskih biljega u stanicama tretiranim AICAR-om i ATRA-om.



Slika 13. Utjecaj smanjenja količine proteina Atg7 na izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama koje su transficirane specifičnom siRNA (Cell Signaling Technology). Stanice U937 transficirane su odgovarajućom kontrolnom siRNA i siRNA specifičnom za Atg7 u konačnoj koncentraciji od 28 nM. Nakon 24 sata od transfekcije stanice su zasađene u nazočnosti AICAR-a (0,5 mM), ATRA-e (1 μM), metformina (15 mM) i PMA (50 nM). Ukupni stanični lizati izolirani su 3 h ili 48 h nakon dodatka tvari, a izražaj CD64 i CD11b određen je 48 h nakon dodatka PMA ili 72 h nakon dodatka drugih tvari. Prikazani su rezultati dva nezavisna pokusa u kojima je smanjena količina Atg7.



Slika 14. Utjecaj smanjenja količine proteina Atg7 na izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama koje su transficirane specifičnom siRNA (Dharmacon). Stanice U937 transficirane su odgovarajućom kontrolnom siRNA i siRNA specifičnom za Atg7 u konačnoj koncentraciji od 140 nM. Nakon 24 sata od transfekcije stanice su zasađene u nazočnosti AICAR-a (0,5 mM), ATRA-e (1 μM), metformina (15 mM) i PMA (50 nM). Ukupni stanični lizati izolirani su 3 h ili 48 h nakon dodatka tvari, a izražaj CD64 i CD11b određen je 48 h nakon dodatka PMA ili 72 h nakon dodatka drugih tvari. Prikazani su rezultati dva nezavisna pokusa u kojima je smanjena količina Atg7.



Slika 15. Utjecaj istovremenog smanjenja količine proteina hVps34 i Atg7 izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama koje su transficirane specifičnom siRNA. Stanice U937 transficirane su odgovarajućom kontrolnom siRNA odnosno dvjema kombinacijama siRNA specifičnima za hVps34 i Atg7 u konačnoj koncentraciji od 45 nM po vrsti RNA (proizvođač obje vrste je Dharmacon). Nakon 24 sata od transfekcije stanice su zasađene u nazočnosti AICAR-a (0,5 mM), ATRA-e (1 μM), metformina (15 mM) i PMA (50 nM). Prikazani su rezultati dva nezavisna pokusa u kojima je smanjena količina hVps34 i Atg7.

Kako bismo isključili mogućnost nespecifičnog učinka (prema engl. *off-target*) pokušali smo ponoviti rezultate koristeći različite siRNA za inhibiciju istoga gena nabavljene od tvrtke Dharmacon. Naime, siRNA tvrtke CST sadrži samo jednu sekvencu siRNA što povećava mogućnost nespecifičnog djelovanja, a siRNA tvrtke Dharmacon sastoji se od kombinacije četiri sekvence. Kao što se vidi na slici 14., koristeći siRNA tvrtke Dharmacon postigli smo znatno veće smanjenje količine proteina Atg7 u oba nezavisna pokusa, ali to nije imalo utjecaja na izražaj biljega u odgovoru na diferencirajuće tvari.

U konačnici smo stanice U937 istodobno transficirali sa siRNA specifičnima za hVps34 i Atg7 kako bismo povećali učinkovitost inhibicije klasičnog puta autofagije. Nakon 24 h od transfekcije stanicama smo dodali agoniste u odgovarajućim koncentracijama. Kao što se vidi na slici 15., iako su količine Atg7 i hVps34 smanjene u lizatima 48 h nakon dodatka tvari, nismo zamijetili smanjenje izražaja biljega u odgovoru na diferencijacijske tvari.

6. RASPRAVA

6.1. Učinci AICAR-a su neovisni o AMPK-u

U našem prethodnom radu pokazali smo da ribonukleotid AICAR potiče diferencijaciju stanica U937 u monocitnom smjeru te da su učinci AICAR-a na diferencijaciju održani i u stanicama u kojima smo pomoću siRNA smanjili količinu AMPK-a. I AICAR i metformin su u stanicama U937 povećavali fosforilaciju AMPK-a na Thr172, što se koristi kao marker njezine aktivacije, te smanjili fosforilaciju p70 S6 kinaze, što se smatra markerom inhibicije mTOR-a, ali metformin nije poticao diferencijaciju leukemijskih stanica (26). U sadašnjem istraživanju pokazali smo da A769662, specifični aktivator AMPK-a, ne oponaša učinke AICAR-a na izražaj diferencijacijskih biljega, što dodatno potvrđuje hipotezu da su učinci AICAR-a na diferencijaciju stanica U937 neovisni o AMPK-u.

Neovisnost diferencirajućeg djelovanja AICAR-a o AMPK-u ne čudi jer sve veći broj radova ukazuje da brojni učinci AICAR-a nisu posredovani putem AMPK-a (36, 39, 40, 43, 45). Štoviše, u sustavnoj analizi farmakoloških spojeva koji se najčešće koriste kao aktivatori AMPK-a (metformin, fenformin, AICAR, 2-DG, salicilat i A769662) pokazalo se da su jedino učinci A769662 zaista ovisni o AMPK-u, a i ti učinci uključuju samo kočenje proliferacije, inhibiciju mTOR-a i smanjenje potrošnje kisika, a ne i učinke na apoptozu, glikolizu i mitohondrijsku respiraciju (51). U našem istraživanju, i AICAR i A769662 koče proliferaciju stanica, ali naši prethodni rezultati na stanicama u kojima smo smanjili količinu AMPK-a pokazali su da je taj učinak AICAR-a neovisan o AMPK-u (26).

I u drugim modelima opisani su učinci AICAR-a na diferencijaciju, kao što su diferencijacija neuralnih matičnih stanica u astrogliju (40), izražaj diferencijacijskih biljega i mineralizacija u osteoblastnoj liniji MC3T3-E1 (112) ili diferencijacija mišjih embrionalnih matičnih stanica u eritroidnom smjeru (113). Uloga AMPK-a ispitana je samo u modelu diferencijacije neuralnih matičnih stanica u astrogliju, a i u tom modelu je pokazano da su učinci AICAR-a neovisni o AMPK-u (40). Postoje brojni radovi koji opisuju antiproliferacijske i proapoptotičke učinke AICAR-a u leukemijskim stanicama (44-49, 93), ali uloga AMPK-a je ispitana samo u učincima AICAR-a na stanice B-CLL (45) i CML (93). U oba istraživanja učinci AICAR-a na apoptozu i smanjenje broja živih stanica nisu ovisili o količini AMPK-a.

6.2. Učinci AICAR-a i glikoliza

U odnosu na ostale linije AML-a, stanice U937 imaju znatno povećanu glikolizu, što se dijelom pripisuje mutaciji fosfataze PTEN te zbog toga prekomjernoj aktivaciji signalnog puta PI3K-Akt koji pospješuje aktivnost ključnih enzima u glikolizi kao što je fosfofruktokinaza (25). U skladu s time, i naša prethodna istraživanja pokazala su povećanu aktivnost signalnog puta PI3K-Akt-mTOR jer je fosforilacija p70 S6K, glavnog supstrata mTOR-a, bila uvijek znatno veća u stanicama U937 nego u stanicama HL-60, NB4, KG-1 ili K562 (114). U sadašnjem istraživanju pokazali smo da metformin statistički značajno pospješuje prosječnu potrošnju glukoze, ATRA statistički značajno smanjuje, a AICAR nema značajnog učinka. Budući da je prosječna potrošnja glukoze obrnuto razmjerna stvaranju laktata, možemo zaključiti da ispitani učinci tvari odgovaraju njihovom djelovanju na aerobnu glikolizu, a ne na kočenje ulaska piruvata u Krebsov ciklus (115).

Pojačana glikoliza u aerobnim uvjetima osobitost je tumorskih stanica u kojima se smatra nužnom za osiguravanje dostatne količine prekursora sinteze makromolekula potrebnih za staničnu diobu. Međutim, u našem modelu, aerobna glikoliza ne korelira sa stupnjem proliferacije jer metformin i AICAR podjednako koče proliferaciju, a nemaju jednak učinak na prosječnu potrošnju glukoze. Učinci metformina na glikolizu u našem modelu jednaki su učincima koje opisuju Scotland i sur (25). U tom istraživanju metformin je povećao potrošnju glukoze i proizvodnju laktata u stanicama U937 neovisno o AMPK-u te zakočio oksidacijsku fosforilaciju i potaknuo glikolizu i u drugim staničnim linijama, a proapoptični učinci metformina ovisni su o stupnju aerobne glikolize (25). Učinci AICAR-a na glikolizu u stanicama U937 prethodno nisu opisani, a učinci u drugim modelima ovise o vrsti stanica. Tako u stanicama koje su klasični model za metabolička istraživanja kao što su adipociti ili stanice skeletnog mišića AICAR povećava unos glukoze (38). Slične učinke AICAR ima i na kardiomiocite u kojima potiče translokaciju transportera GLUT4 na staničnu membranu i povećava transport glukoze u stanicu (116), kao i na Sertolijeve stanice štakora u kojima također povećava unos glukoze praćen povećanom ekspresijom GLUT1 te proizvodnju laktata (117). S druge strane, u modelu humanih endotelnih stanica umbilikalne vene (118) ili stanica linije HEK293 (51) inkubacija s AICAR-om smanjila je potrošnju glukoze i glikolizu. U našem modelu, potrošnja glukoze u stanicama U937 nije se značajno razlikovala u uzorku koji je inkubiran s AICAR-om u trajanju 24 ili 48 sati u usporedbi s kontrolnim stanicama. Razlika u djelovanju AICAR-a i metformina na potrošnju glukoze u stanicama U937 ne čudi jer se i u nekim drugim modelima razlikuju metabolički učinci ta dva spoja. Tako u modelu izoliranih

hepatocita štakora AICAR inhibira glikolizu smanjujući proizvodnju laktata, koncentraciju glukoza-6-fosfata, fruktoza-6-fosfata i fruktoza-2,6-fosfata te aktivnost 6-fosfofrukto-2-kinaze (31), a metformin, s druge strane, inhibira kompleks I respiracijskog lanca mitohondrija i smanjuje staničnu potrošnju kisika potičući glikolizu (119). To upućuje da se njihova aktivnost na metabolizam u stanici ne može objasniti isključivo aktivacijom AMPK-a. Tako bi i izostanak diferencijacije stanica U937 u odgovoru na metformin mogao dijelom izostati zbog različitog metaboličkog odgovora stanica na inkubaciju s tim tvarima.

U našem modelu inkubacija stanica s ATRA-om nema učinaka na broj živih stanica, povećava izražaj diferencijacijskih biljega te statistički značajno smanjuje prosječnu potrošnju glukoze, što je slično opisanim učincima ATRA-e na potrošnju glukoze i nastanak laktata u stanicama HL-60 (94). Međutim, opisani su različiti učinci drugih diferencirajućih tvari na metabolizam stanica AML-a, pa je tako zamijećeno da dimetil-sulfoksid smanjuje (94) ili ne mijenja (120) intenzitet aerobne glikolize tijekom diferencijacije stanica HL-60. Iako leukemijske stanice više ovise o funkcionalnim enzimima za glikolizu, kao što je piruvat-kinaza 2, od zdravih hematopoetskih preteča (121), a inhibitori glikolize kao 2-DG potiču apoptozu u leukemijskim stanicama, aerobna glikoliza nije isključivo obilježje neoplastičnih stanica. Tako sve više radova opisuje ulogu prekapćanja na aerobnu glikolizu normalnih imunoloških stanica tijekom imunološkog odgovora pa je tako opisana aktivacija aerobne glikolize tijekom sazrijevanja monocita u makrofage vrste M1 (122) ili dendritičkih stanica u odgovoru na proupalne tvari (123), a budući da tijekom sazrijevanja nema diobe, uloga aerobne glikolize ne može se pripisati potrebi za sintezom makromolekula nužnih za diobu.

U našem eseju na stanicama U937 potrošnja glukoze je korelirala s proizvodnjom laktata te smo je smatrali jednostavnim indirektnim pokazateljem aktivnosti glikolitičkog puta. I dok je zaista zamijećena smanjena potrošnja glukoze u stanicama diferenciranim ATRA-om u suprotnosti s povećanom potrošnjom glukoze u stanicama tretiranim metforminom, AICAR nije imao značajnije učinke na potrošnju glukoze. Postoji više mogućih obrazloženja. Prvo, koristili smo vrlo robusni metabolički test u trajanju od samo 48 sati i za potpuni uvid u metaboličke promjene stanica U937 u odgovoru na AICAR sigurno su potrebne puno osjetljivije i specifičnije metode. Drugo, ako je diferencirajući učinak AICAR-a zaista dominantno posljedica promjene u nekom od puteva energetskog metabolizma u stanici, pitanje je može li se to zamijetiti samo na razini grubog prekapćanja metabolizma glukoze s glikolize na oksidativnu fosforilaciju. Napokon, moguće je da su diferencirajuće djelovanje AICAR-a i njegovi eventualni metabolički učinci povezani s nekim drugim AMPK-neovisnim putem u stanici.

6.3. AICAR potiče autofagiju u stanicama U937

U klasičnom prikazu signalnih mehanizama koji reguliraju autofagiju AMPK je jedan od glavnih regulatora inicijacije autofagije i djeluje preko aktivacije ULK1 (73) i hVps34 (77). Ipak, čini se da aktivnost AMPK-a nije nužna za aktivaciju autofagije jer su inicijacija i normalni protok autofagije opaženi i u mišjim embrionalnim fibroblastima koji ne izražavaju katalitičke podjedinice AMPK $\alpha 1$ i $\alpha 2$ (124). Farmakološki aktivatori AMPK-a također mogu aktivirati autofagiju neovisno o AMPK-u. Metformin tako u mišjem modelu pretilosti i dijabetesa melitusa tipa II smanjuje hepatosteatozu i potiče autofagiju neovisno o prisutnosti AMPK-a, a ovisno o SIRT1 (125). AICAR u staničnoj liniji KML potiče staničnu smrt i autofagiju, a taj učinak je očuvan i u stanicama u kojima je količina AMPK-a smanjena pomoću shRNA (93). Budući da smo prethodno pokazali da su učinci AICAR-a na diferencijaciju stanica U937 neovisni o AMPK-u (26), a kako je autofagija opisana tijekom diferencijacije stanica AML-a i normalnih hematopoetskih stanica (85-92), ispitali smo moguću aktivaciju autofagije u stanicama U937 tijekom diferencijacije potaknute AICAR-om.

Među najčešće korištenim biljezima aktivacije autofagije je konjugacija proteina LC3-I s fosfatidiletanolaminom u LC3-II (95). U ovom istraživanju usporedili smo učinke AICAR-a na nastanak LC3B-II s učincima metformina, ATRA-e i PMA. Metformin je odabran zato što, kao i AICAR, u stanicama U937 povećava aktivnost AMPK-a, a smanjuje aktivnost mTOR-a (26) što su dva najvažnija signalna puta u klasičnoj regulaciji autofagije (71). No, različito od AICAR-a, metformin ne potiče izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama U937. ATRA i PMA su odabrani jer su to često korištene diferencijacijske tvari za koje je u drugim leukemijskim staničnim linijama pokazano da induciraju i autofagiju (86, 88, 110, 111). Ovim smo htjeli provjeriti jesu li eventualni farmakološki učinci AICAR-a na poticanje autofagije sličniji učincima agonista AMPK-a ili diferencijacijskih tvari.

U našem modelu, sve ispitivane tvari su malo povećale količinu LC3B-II nakon kratkotrajne inkubacije u trajanju od 3 h, a učinci AICAR-a i metformin-a u skladu su s našim prethodnim opažanjem da oba spoja značajno snižavaju količinu fosforilirane p70 S6K u istoj vremenskoj točki, a AICAR nakon 3 sata aktivira i AMPK (26). U literaturi nema puno podataka o količini LC3B u leukemijskim linijama nakon kraće inkubacije s istim tvarima, ali opisano je da AICAR u dvostruko većoj koncentraciji (1 mM) povećava izražaj LC3B-II u stanicama K562 nakon 6 sati inkubacije (93).

Međutim, značajne razlike u učincima AICAR-a i metformina zamijećene su nakon dugotrajne inkubacije od 48 sati, a učinci ATRA-e i PMA slični su prethodno opisanima u linijama NB4 (85), HL60 (86) i K562 (88). Dosad su opisani različiti učinci metformina na količinu LC3B-II pa je tako opisano da se količina LC3B-II povećava u linijama T-ALL (126) i K562 (127) ili da metformin nema učinka na stanice AML-a i multiplog mijeloma (128, 129). Međutim, niti u jednom od navedenih istraživanja nisu ispitani učinci na protok autofagije, već je aktivnost autofagije procijenjena mjereći količinu LC3B-II u jednoj vremenskoj točki bez dodatka bafilomicina. U našem modelu metformin smanjuje količinu LC3B-II pa možemo zaključiti da u modelu diferencijacije stanica U937 količina LC3B-II u odgovoru na ispitivane tvari najbolje korelira s diferencijacijom, a ne s brojem živih stanica ili aktivnošću signalnih puteva mTOR i AMPK.

6.4. Farmakološki modulatori autofagije nisu specifični za autofagiju

Kako bismo provjerili postoji li uzročna veza između indukcije autofagije i diferencijacije leukemijskih stanica, pokušali smo inhibirati ili potaknuti autofagiju pomoću često korištenih farmakoloških modulatora klorokina i rapamicina. Prethodna istraživanja pokazala su različite učinke klorokina na diferencijaciju stanica hematopoetskog porijekla. Tako je opisano da u koncentraciji 50 μ M klorokin koči izražaj CD11b i CD14 tijekom monocitno-makrofagne diferencijacije primarnih monocita u odgovoru na GM-CSF (89) ili diferencijacije stanica akutne promijelocitne leukemijske linije NB4 u odgovoru na ATRA-u (100). S druge strane, klorokin u koncentraciji 10 μ M potiče izražaj glikoforina i receptora za transferin, biljega diferencijacije u eritroidnom smjeru, u stanicama K562 (99). Nadalje, iako se rapamicin smatra jednim od glavnih aktivatora autofagije, postoje podaci da inhibicija samo mTORC1 nije dostatna za aktivaciju autofagije u stanicama U937 (130), a naša prethodna istraživanja su pokazala da rapamicin pospješuje diferencijaciju stanica NB4 u odgovoru na ATRA-u, ali da koči izražaj CD11b u istim stanicama u odgovoru na PMA (105). U ovom istraživanju pokazali smo da i klorokin, koji se zbog svog djelovanja na lizosomsku razgradnju koristi kao inhibitor autofagije, i rapamicin, koji inhibicijom signalnog puta mTOR aktivira autofagiju, inhibiraju diferencijaciju posredovanu AICAR-om upućujući da je spektar njihovih molekularnih mehanizama u stanici širi i da u ovom modelu ne djeluju dominantno modulacijom aktivacije autofagije. U uzorcima stanica diferenciranim ATRA-om klorokin je pojačao diferencirajuće djelovanje ATRA-e na izražaj CD64, dok ga je rapamicin smanjio, a oba inhibitora nisu imala

učinka na izražaj CD11b u stanicama U937 diferenciranima ATRA-om. Stoga je upitno mogu li se donositi ikakvi zaključci o povezanosti diferencijacije i autofagije u stanicama U937 koristeći samo ova dva uobičajena modulatora.

Specifičniji inhibitor autofagije trebao bi biti 3-MA koji inhibira kinazu hVps34. Međutim, rezultati našeg istraživanja su definitivno potvrdili da se 3-MA ne može koristiti kao specifični inhibitor autofagije, barem ne u uvjetima u kojima se stanice uzgajaju u punom mediju uz prisutnost seruma, što je u skladu s rezultatima Wu i sur (107). Naše istraživanje je pokazalo da 3-MA, u koncentraciji u kojoj učinkovito smanjuje količinu PtdIns(3)P kao očekivanog produkta aktivirane hVps34, povećava količinu LC3B-II kao markera autofagije, a naši pokusi na stanicama U937 mRFP-GFP-LC3 pokazuju da je to povećanje LC3B-II posljedica povećanog protoka autofagije. Nekoliko je mogućih uzroka za povećanje LC3B-II u stanicama tretiranim s 3-MA. Jedno od mogućih obrazloženja je da 3-MA nespecifično koči i aktivnost PI3KC1 čiju aktivnost mjereno nastankom fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfata (PtdIns(3,4,5)P₃) nismo određivali, a kao što je već navedeno, zna se da je inhibicija razreda I jedan od poticatelja autofagije (71). Druga moguća obrazloženja uključuju opet različite ciljeve 3-MA kao nedovoljno specifičnog inhibitora, a moguće je da je neki od tih odgovoran za inhibiciju diferencijacije koju smo zamijetili ne samo u stanicama tretiranim AICAR-om, već i u stanicama tretiranim drugim agonistima diferencijacije.

6.5. Diferencijacijski učinci AICAR-a ne ovise o količini hVps34 i Beclina-1

Ranije objavljeni radovi ukazali su da smanjenje količine proteina hVps34 pomoću RNA-interferencije inhibira izražaj diferencijacijskog biljega CD11b u staničnim linijama NB4 (110) i HL60 (86) u odgovoru na ATRA-u. Međutim, mi to opažanje nismo ponovili na staničnoj liniji U937, a jednako tome, smanjenje količine hVps34 nije imalo učinka na izražaj diferencijacijskih biljega u odgovoru na AICAR. Prvo pitanje koje se postavlja je jesmo li mi u našem modelu uspjeli postići dostatno utišavanje proteina da uopće možemo očekivati nekakvu fenotipsku razliku. U oba navedena rada za utišavanje je korištena shRNA koja je u stanicu unesena pomoću lentiviralnih vektora. Mi smo pak koristili siRNA unesenu elektroporacijom, što je metoda koju karakterizira nešto brža razgradnja i kraće trajanje utišavajućeg učinka, pogotovo u staničnim linijama koje se brzo dijele. Ipak, ako se usporede rezultati naše analize

količine proteina hVps34 metodom Western blot 72 sata nakon transfekcije s reprezentativnim rezultatom Wang i sur. (86) 48 sati nakon transfekcije, može se zamijetiti da je u obje metode količina ostatnog proteina hVps34 otprilike podjednaka, ako ne i nešto manja u našem modelu. Stoga možemo zaključiti da je ishod utišavanja proteina RNA-interferencijom u ovim eksperimentalnim uvjetima vrlo sličan bez obzira koristi li se siRNA ili shRNA te da izostanak učinka utišavanja hVps34 na izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama U937 nije posljedica nedovoljnog smanjenja količine proteina.

Vjerojatnije obrazloženje opažene razlike u učinku hVps34 na diferencijaciju stanica U937 naprama HL60 i NB4 vezano je za specifičnosti svake pojedine stanične linije. Za linije HL60 i NB4 već je ranije opisano da farmakološka modulacija puta PI3K-Akt-mTOR pomoću analoga rapamicina pospješuje diferencijaciju u odgovoru na ATRA-u (103, 114). Kao što se može vidjeti na slici 6. i kao što smo ranije opisali (106), u staničnoj liniji U937 rapamicin ne pospješuje diferencijacijsko djelovanje ATRA-e, dapače smanjuje izražaj biljega CD64. Također, i u staničnoj liniji HL60 i u staničnoj liniji NB4 opisano je da inhibitor 3-MA smanjuje nakupljanje LC3B-II (86), što je u suprotnosti s ovim što opažamo na stanicama U937. Za stanice U937 tipična je pojačana aktivnost puta PI3K-Akt-mTOR (114), što je posljedica mutacije gena za fosfatazu PTEN (131) koja negativno regulira navedeni put. Zbog izraženog međudjelovanja puta PI3K-Akt-mTOR i aktivnosti hVps34 (132-134), moguće je da ta razlika u bazalnoj aktivnosti signalnih puteva u stanicama U937, HL60 i NB4 nekim još nerazjašnjenim mehanizmom utječe i na učinke utišavanja hVps34.

Također, smanjenje količine hVps34 ne jamči inhibiciju autofagije. Iako je u nekoliko eksperimentalnih modela pokazano da je prilikom utišavanja hVps34 smanjena i količina LC3B-II (86, 87), većina autora zaključuje da količina LC3B-II nije korisna u praćenju inhibicije autofagije u stanicama u kojima je korištena RNA-interferencija za smanjenje hVps34 jer u njima smanjenje hVps34 ne sprječava nakupljanje LC3B-II (108). Štoviše, u mišjim embrionalnim fibroblastima, srcu i jetrima (109) te u senzoričkim neuronima miševa kojima nedostaje Vps34 (83) LC3B-II je povećan zbog smanjene razgradnje autofagijom. Također, smanjenje izražaja hVps34 ne smanjuje nakupljanje LC3B-II u staničnoj liniji karcinoma dojke MCF-7 u odgovoru na proapoptotički agens gosipol (135), niti protok autofagije u stanicama NB4 u odgovoru na ATRA-u (110). Naši rezultati su u skladu s tim navodima iz literature, jer u uzorcima stanica u kojima smo smanjili izražaj hVps34 količina LC3B-II u odgovoru na stimulaciju AICAR-om ili metforminom bila je jednaka ili veća od količine izmjerene u odgovarajućem uzorku s normalnim izražajem hVps34. Izostanak

zmanjenja LC3B-II pri tome može zaista biti posljedica njegove smanjene razgradnje u autolizosomima, ali je moguće i da dolazi do aktivacije autofagije putem djelovanja drugih enzima. Naime, u pokusnim modelima u kojima se iz stanice uklanja neki protein ne treba zanemariti mogućnost funkcionalne redundancije sa srodnim proteinima koji potom mogu preuzeti njegovu ulogu. Primjerice, zabilježeno je da u uvjetima u kojima u stanici u potpunosti nedostaje hVps34, PI3K razreda II (PI3KC2, prema engl. *PI3K class II*) proizvodi PtdIns(3)P nužan za odvijanje autofagije (136). Dodatno, ako se iz stanica u potpunosti ukloni PtdIns(3)P, njemu strukturno srodni lipid fosfatidilinozitol-5-fosfat (PtdIns(5)P) može vezati iste efektorske proteine WIPI2 i DFCP1 koji potom reguliraju nastanak autofagosoma (137). U našem modelu u stanicama u kojima je izražaj hVps34 smanjen RNA-interferencijom usporedno se smanjila i količina njegovog suradnog proteina Beclina-1 što je u skladu s ranijim izvještajima da smanjivanje količine jednog proteina u kompleksu hVps34-Beclin-1 dovodi do smanjivanja količine i drugih sastavnica kompleksa (138). Isto tako, stanice u kojima smo smanjili količinu Beclina-1 pomoću siRNA izražavale su smanjenu količinu hVps34. No ni tada nije došlo do znatnije razlike u izražaju CD64 i CD11b, što upućuje da u stanicama U937 izražaj diferencijacijskih biljega u odgovoru na AICAR i ATRA-u ne ovisi o aktivnosti inicijacijskog kompleksa kanonske autofagije.

Izostanak odgovora na smanjenje količine Beclina-1 u našem modelu ne iznenađuje jer veliki broj radova ukazuje da inicijacija autofagije ovisi o Beclinu-1 samo u uvjetima gladovanja. Ako je stanica izložena nekom drugom obliku podražaja za aktivaciju autofagije, primjerice proapoptotičkom agensu, poticanju stanične diferencijacije ili bakterijskom toksinu, autofagija se može odvijati neovisno o Beclinu-1 (139). U kontekstu diferencijacije leukemijskih stanica, postoje različiti izvještaji o ulozi Beclina-1. Uzročno-posljedična veza između količine hVps34 i Beclina-1, aktivnosti autofagije i stanične diferencijacije opisana je dosad samo u stanicama HL60 koje se diferenciraju u odgovoru na ATRA-u (86) i vitamin D₃ (87). Međutim, u stanicama K562 koje se diferenciraju u megakariocitnom smjeru u odgovoru na PMA utišavanje Beclina-1 pomoću siRNA inhibira diferencijaciju, ali bez većeg učinka na konjugaciju LC3B-I u LC3B-II (88), a više radova opisuje da smanjenje količine Beclina-1 ne utječe na diferencijaciju stanica NB4 niti na aktivnost autofagije u odgovoru na ATRA-u (110, 111). To je u skladu i s našim rezultatima u kojima je smanjenje količine hVps34 smanjilo izražaj CD11b u odgovoru na PMA, a nije imalo učinke na stanice tretirane ATRA-om. Stoga možemo pretpostaviti da su stanice HL60 specifično osjetljive na aktivnost inicijacijskog

kompleksa kanonske autofagije, ali da to nije nužno slučaj u svim drugim modelima diferencijacije leukemijskih staničnih linija.

6.6. Smanjenje količine proteina Atg7 ne inhibira diferencijaciju stanica U937

U radovima u kojima aktivnost autofagije nije ovisila o Beclinu-1 (79) ili hVps34 (83) normalno odvijanje autofagije ovisilo je o prisutnosti proteina Atg7 koji je odgovoran za lipidaciju LC3B-I u LC3B-II (72). Također, budući da je opisano da je Atg7 nužan za diferencijaciju primarnih monocita u makrofage u odgovoru na M-CSF (140) te za normalno sazrijevanje eritrocita (141) pretpostavili smo da bi smanjivanje izražaja tog proteina moglo imati najveći učinak na naš diferencijacijski model. Kada smo uspjeli znatnije smanjiti količinu proteina Atg7 koristeći jednu sekvencu siRNA, zamijetili smo smanjenje i izražaja diferencijacijskih biljega CD64 i CD11b u odgovoru na AICAR, ATRA-u i PMA. Međutim, poznato je da se primjenom jedne siRNA u većim koncentracijama povećava mogućnost nespecifičnog učinka na izražaj niza drugih nasumičnih proteina. Ta pojava, koja se na engleskom jeziku naziva *off-target* učinak, onemogućuje da sa sigurnošću pripišete opaženo djelovanje funkciji specifičnog proteina kojeg ste utišavali. Najlakši način za izbjegavanje *off-target* učinka je smanjivanje koncentracije siRNA, međutim to je najčešće praćeno smanjenom učinkovitošću utišavanja proteina od interesa. Kako su *off-target* učinci specifično vezani za pojedinu sekvencu siRNA, mogu se zaobići tako da se koristi nekoliko neidentičnih sekvenci usmjerenih prema istoj mRNA pri čemu je svaka pojedina u niskoj koncentraciji, ali je kumulativno njihova koncentracija visoka. Tim pristupom se učinkovito utišava protein od interesa, a smanjuje intenzitet *off-target* učinaka specifičnih za pojedinu sekvencu (142). Kako bismo provjerili je li možda inhibicija diferencijacije koju smo zapazili prilikom smanjivanja količine Atg7 posljedica *off-target* učinaka, a ne djelovanja na protein Atg7, ponovili smo pokuse koristeći smjesu četiri sekvence siRNA, što je isti pristup koji smo koristili prilikom utišavanja hVps34. U tim pokusima izostala je inhibicija diferencijacije, iako je količina Atg7 još učinkovitije smanjena pa možemo zaključiti da diferencijacija stanica U937 vjerojatno ne ovisi o količini proteina Atg7.

Opisani su različiti učinci smanjenja Atg7 u leukemijskim linijama pa tako utišavanje Atg7 u NB4 pomoću siRNA koči diferencijaciju jer smanjuje izražaj CD11b u odgovoru na

ATRA-u, a u liniji K562 pospješuje diferencijaciju jer smanjenje Atg7 pomoću shRNA pospješuje izražaj biljega CD71 i CD163 koji su tipični za diferencijaciju u eritroidnom smjeru (99). Stoga se postavlja pitanje je li neovisnost diferencijacije stanica U937 o izražaju Atg7 ponovno učinak koji možemo nazvati specifičnim za ovu staničnu liniju. Trenutne smjernice za istraživanje autofagije smatraju da se najrelevantniji podaci o ulozi autofagije mogu dobiti na modelima *in vivo* (143). Kad se prouče rezultati dobiveni na miševima koji ne izražavaju Atg7 u hematopoetskim stanicama, vidljiva je inhibicija razvoja svih loza, osim mijeloidne. Ti miševi su anemični i limfopenični, ali imaju povišeni broj mijeloidnih stanica koje izražavaju CD11b u perifernoj krvi, koštanoj srži i slezeni te zapravo imitiraju kliničku sliku mijeloproliferativne bolesti (90). U takvim životinjama ne izostaje normalno *in vivo* sazrijevanje monocita i makrofaga praćeno izražajem biljega CD11b i F4/80 (140, 144), a razlike prema divljem tipu zamjećuju se tek u *in vitro* odgovoru primarnih monocita na M-CSF (140) ili LPS i IFN- γ (144). Stoga, ako manjak Atg7 u hematopoetskim stanicama ne utječe na sazrijevanje monocita i makrofaga *in vivo*, upitno je je li normalna količina Atg7 nužna u diferencijaciji stanica akutne monocitne leukemije prema zrelijim oblicima.

Dodatno, utišavanjem proteina Atg7 ne inhibira se nužno proces autofagije. Kada se gen za Atg7 ukloni u hematopoetskim matičnim stanicama miša, onemogućeno je i normalno sazrijevanje i aktivacija autofagije u takvim stanicama. Međutim, ako se gen za Atg7 selektivno ukloni samo u stanicama mijeloidne loze, miševi ne pokazuju razlike u fenotipu, a u mijeloidnim stanicama aktivan je alternativni put aktivacije autofagije koji ne ovisi o Atg7, već o normalnoj funkciji proteina Rab9 (145).

6.7. Uloga autofagije u učincima AICAR-a na stanice U937

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da AICAR i druge tvari koje potiču diferencijaciju stanica U937 povećavaju količinu LC3B-II kao markera autofagije. Svi naši rezultati dobiveni na stanicama U937 tretiranim bafilomicinom i analizirani metodama Western blot i imunofluorescencijom te stabilno transficiranim stanicama U937-mRFP-GFP-LC3 dokazuju da su učinci AICAR-a na količinu LC3B-II posljedica povećanog protoka autofagije, a ne smanjene razgradnje u lizosomima (95). Dodatno, sve navedene metode pokazale su da su učinci metformina na autofagijski protok u potpunosti suprotni učincima AICAR-a i drugih diferencijacijskih tvari.

Klorokin i 3-metiladenin kao farmakološki inhibitori autofagije u potpunosti su zakočili izražaj diferencijacijskih biljega u odgovoru na AICAR pa bismo mogli zaključiti da autofagija ima ključnu ulogu u učincima AICAR-a, slično kao što su Isakson i sur. (85) zaključili uporabom 3-MA da je autofagija bitna za učinke ATRA-e u stanicama NB4, ali su naša dodatna istraživanja još jednom pokazala da se uloga nekog signalnog puta u učincima tvari nikako ne može sa sigurnošću odrediti uporabom samo farmakoloških modulatora.

Izražaj diferencijacijskih biljega u odgovoru na AICAR ne ovisi o AMPK-u ili količini kompleksa hVps34/Beclin-1 i proteinu Atg7 koji su dijelovi klasičnog ili kanonskog puta autofagije. Iako ne možemo sa sigurnošću isključiti mogućnost da su i minimalne količine Atg7, hVps34 ili Beclina-1 koje ostaju u stanicama nakon transfekcije sa specifičnim siRNA i dalje dostatne za odvijanje diferencijacije, možemo pretpostaviti da učinci AICAR-a na diferencijaciju u stanicama U937 ne ovise o klasičnom putu autofagije. Postoji mogućnost da AICAR potiče alternativni put autofagije koji je opisan u modelu diferencijacije mijeloidnih stanica *in vivo* (145) pa bismo trebali ispitati moguću ulogu puta koji uključuje protein Rab9.

Drugo moguće objašnjenje naših rezultata jest da je opaženi porast količine proteina LC3B i njegove lizosomalne razgradnje u odgovoru na diferencijacijske tvari zapravo još samo jedan biljeg diferencijacije koji se javlja paralelno s povećanim izražajem CD11b ili CD64, a nije dio signalnog mehanizma koji uzrokuje diferencijaciju, posebice stoga što se pojačani autofagijski protok selektivno zamjećuje u odgovoru na diferencirajuće tvari nakon dugotrajne inkubacije. Naime, nedavno je opisano da proteini iz obitelji LC3 imaju i niz funkcija neovisnih o autofagiji, poput fagocitoze koja ovisi o LC3B-u i prezentacije antigena u sklopu MHC-II, a to su procesi koji su sigurno povezani s funkcijama zrelih monocita i makrofaga (146).

Sve je više istraživanja koja pokazuju da mnoge tvari koje potiču autofagijski protok ne ovise o kompleksu hVps34-Beclin-1, a osobito one tvari koje su povezane s apoptozom ili diferencijacijom (79-82, 110, 111). Treba zamijetiti da su ključni članovi kanonskog ili klasičnog puta autofagije, kao što su Beclin-1, hVps34 ili Atg7, opisani po prvi puta u jednostavnom modelu stanica kvasaca koje gladuju, a takve stanice izravno zamjećuju manjak hranjivih tvari i nemaju PI3KC1 i mnoge druge komponente signalnih puteva koji se inače aktiviraju nizvodno od membranskih receptora za čimbenike rasta. Dakle, model kvasca koji gladuje je očito različit od modela stanica i tkiva sisavaca koji se uzgajaju u uvjetima obilja hranjivih tvari i koji se pri tome izlažu različitim čimbenicima rasta i tvarima koje utječu na kompleksnu mrežu raznih signalnih puteva. Međutim, neosporno je da je signalni put koji se

uobičajeno definira kao makroautofagija aktiviran prilikom sazrijevanja stanične linije akutne monocitne leukemije u monocitno-makrofagnom smjeru te bi bilo vrijedno dodatno istražiti u kojim drugim funkcijama tih stanica on sudjeluje te koji alternativni signalni putevi reguliraju njegovu aktivaciju.

7. ZAKLJUČCI

1. Učinci AICAR-a na diferencijaciju stanica U937 ne ovise o AMPK-u.
2. ATRA značajno smanjuje glikolizu u stanicama U937, metformin je povećava, a AICAR nema značajnog učinka.
3. Dugotrajna inkubacija stanica U937 s AICAR-om i drugim diferencirajućim tvarima povećava količinu LC3B-II kao markera autofagije. Metformin smanjuje izražaj LC3B-II i ne potiče izražaj diferencijacijskih biljega.
4. LC3B-II je povećan tijekom diferencijacije zbog povećanog autofagijskog protoka.
5. Farmakološki inhibitor autofagije 3-metiladenin koči učinak diferencirajućih tvari, smanjuje količinu PtdIns(3)P i povećava količinu LC3B-II.
6. Učinci AICAR-a i ATRA-e na diferencijaciju su neovisni o količini Beclina-1, hVps34 i Atg7.
7. AICAR i druge diferencirajuće tvari potiču autofagijski protok u stanicama U937, a diferencijacija ne ovisi o klasičnom ili kanonskom putu autofagije.

8. SAŽETAK

Farmakološki modulatori metabolizma i AMP-ovisne kinaze (AMPK) koče proliferaciju tumorskih stanica. U prethodnom radu pokazali smo da 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleotid (AICAR), spoj koji se često rabi kao agonist AMPK-a, potiče diferencijaciju stanica U937 neovisno o AMPK-u. Autofagija je opisana kao jedan od AMPK-neovisnih učinaka AICAR-a u drugim stanicama. Stoga je cilj ovog istraživanja bio odrediti ulogu autofagije i metabolizma u diferencijaciji stanica U937. Rezultati su pokazali da specifični aktivator AMPK-a ne oponaša učinke AICAR-a te da AICAR nema značajno djelovanje na aerobnu glikolizu. Dugotrajna inkubacija stanica U937 s AICAR-om i drugim diferencirajućim tvarima, *sve-trans*-retinskom kiselinom (ATRA-om) i forbol 12-miristatom 13-acetatom (PMA-om), povećala je izražaj biljega autofagije LC3B-II, a takvi učinci nisu zamijećeni u stanicama koje su inkubirane s metforminom, agonistom AMPK-a koji ne potiče diferencijaciju. Povećanje LC3B-II posljedica je povećanog protoka autofagije, a inhibitor autofagije 3-metiladenin je u potpunosti zakočio diferencijaciju u odgovoru na sve korištene diferencirajuće tvari. Učinci AICAR-a i ATRA-e na izražaj diferencijacijskih biljega ne ovise o količini Beclina-1, hVps34 i Atg7. Ovi rezultati pokazuju da AICAR i druge diferencirajuće tvari potiču autofagijski protok u stanicama U937 te da diferencijacija ne ovisi o klasičnom ili kanonskom putu autofagije.

9. SUMMARY

Autophagy and metabolic changes in differentiation of acute myeloid leukemia cell lines

Vilma Dembitz

Zagreb, 2017

Pharmacological modulators of metabolism and AMP-dependent kinase (AMPK) inhibit proliferation of tumor cells. Our previous study demonstrated that 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR), a compound commonly used as an AMPK-modulator, induced AMPK-independent differentiation of U937 cells. Autophagy has been described as an AMPK-independent effect of AICAR in other cells. Therefore, the aim of this study was to determine the role of autophagy and metabolism in differentiation of U937 cells. The results showed that AICAR-mediated effects were not mimicked by specific AMPK agonist and that AICAR had no significant effects on aerobic glycolysis. Long-term incubation of U937 cells with AICAR and other differentiation agents, all-*trans*-retinoic acid (ATRA) and phorbol 12-myristate 13-acetate, increased the expression of the autophagy marker LC3B-II. These effects were not observed in response to metformin, an AMPK agonist without differentiative properties. The increase in LC3B-II was due to the increase in autophagy flux and the autophagy inhibitor 3-methyladenine inhibited differentiation in response to all inducers. The effects of AICAR and ATRA on differentiation markers did not depend on Beclin-1, hVps34 and Atg7. These results show that AICAR and other differentiation agents induce autophagy flux in U937 cells and that differentiation does not depend on the classical or canonical autophagy pathway.

10. LITERATURA

1. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2015;373:1136-52.
2. Khwaja A, Bjorkholm M, Gale RE, Levine RL, Jordan CT, Ehninger G i sur. Acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16010.
3. Stein EM, DiNardo C, Altman JK, Collins R, DeAngelo DJ, Kantarjian HM i sur. Safety and efficacy of AG-221, a potent inhibitor of mutant IDH2 that promotes differentiation of myeloid cells in patients with advanced hematologic malignancies: Results of a phase 1/2 trial. *Blood.* 2015;126:323. (sažetak)
4. Dos Santos GA, Kats L, Pandolfi PP. Synergy against PML-RAR α : targeting transcription, proteolysis, differentiation, and self-renewal in acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med.* 2013;210:2793-802.
5. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S i sur. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2013;369:111-21.
6. 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.
7. Dalton WT, Ahearn MJ, McCredie KB, Freireich EJ, Stass SA, Trujillo JM. HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood.* 1988;71:242-7.
8. Collins SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation and cellular oncogene expression. *Blood.* 1987;70:1233-44.
9. Jensen HA, Yourish HB, Bunaciu RP, Varner JD, Yen A. Induced myelomonocytic differentiation in leukemia cells is accompanied by noncanonical transcription factor expression. *FEBS Open Bio.* 2015;5:789-800.
10. Puerta-Guardo H, Raya-Sandino A, González-Mariscal L, Rosales VH, Ayala-Dávila J, Chávez-Mungía B i sur. The cytokine response of U937-derived macrophages infected through antibody-dependent enhancement of dengue virus disrupts cell apical-junction complexes and increases vascular permeability. *J Virol.* 2013;87:7486-501.
11. 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.
12. Hardie DG, Schaffer BE, Brunet A. AMPK: An energy-sensing pathway with multiple inputs and outputs. *Trends Cell Biol.* 2016;26:190-201.
13. Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in health and disease. *Physiol Rev.* 2009;89:1025-78.
14. Inoki K, Kim J, Guan KL. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012;52:381-400.
15. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol.* 2011;13:1016-23.
16. Pryor R, Cabreiro F. Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochem J.* 2015;471:307-22.
17. Zang M, Zuccollo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H i sur. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *J Biol Chem.* 2004;279:47898-905.

18. Turban S, Stretton C, Drouin O, Green CJ, Watson ML, Gray A i sur. Defining the contribution of AMP-activated protein kinase (AMPK) and protein kinase C (PKC) in regulation of glucose uptake by metformin in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 2012;287:20088-99.
19. Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G i sur. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest.* 2010;120:2355-69.
20. Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, Gulati P, Brûlé S, Viollet B i sur. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a Rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab.* 2010;11:390-401.
21. 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.
22. Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, Soberanes S, Sullivan LB, Anso E i sur. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife.* 2014;3:e02242.
23. Green AS, Chapuis N, Maciel TT, Willems L, Lambert M, Arnoult C i sur. 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.
24. Vakana E1, Altman JK, Glaser H, Donato NJ, Plataniias LC. Antileukemic effects of AMPK activators on BCR-ABL-expressing cells. *Blood.* 2011;118:6399-402.
25. Scotland S, Saland E, Skuli N, de Toni F, Boutzen H, Micklow E i sur. Mitochondrial energetic and AKT status mediate metabolic effects and apoptosis of metformin in human leukemic cells. *Leukemia.* 2013;27:2129-38.
26. 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.
27. Vasamsetti SB, Karnewar S, Kanugula AK, Thatipalli AR, Kumar JM, Kotamraju S. Metformin inhibits monocyte-to-macrophage differentiation via AMPK-mediated inhibition of STAT3 activation: potential role in atherosclerosis. *Diabetes.* 2015;64:2028-41.
28. Sabina RL, Patterson D, Holmes EW. 5-Amino-4-imidazolecarboxamide riboside (Z-ribose) metabolism in eukaryotic cells. *J Biol Chem.* 1985;260:6107-14.
29. Mauser M, Hoffmeister HM, Nienaber C, Schaper W. Influence of ribose, adenosine, and "AICAR" on the rate of myocardial adenosine triphosphate synthesis during reperfusion after coronary artery occlusion in the dog. *Circ Res.* 1985;56:220-30.
30. Vincent MF, Marangos PJ, Gruber HE, Van den Berghe G. Inhibition by AICA riboside of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. *Diabetes.* 1991;40:1259-66.
31. Vincent MF, Bontemps F, Van den Berghe G. Inhibition of glycolysis by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside in isolated rat hepatocytes. *Biochem J.* 1992;281:267-72.
32. 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.

33. 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.
34. Narkar VA, Downes M, Yu RT, Embler E, Wang YX, Banayo E i sur. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell.* 2008;134:405-15.
35. Dzamko N, Schertzer JD, Ryall JG, Steel R, Macaulay SL, Wee S i sur. AMPK-independent pathways regulate skeletal muscle fatty acid oxidation. *J Physiol.* 2008;586:5819-31.
36. Lanner JT, Georgiou DK, Dagnino-Acosta A, Ainbinder A, Cheng Q, Joshi AD i sur. AICAR prevents heat-induced sudden death in RyR1 mutant mice independent of AMPK activation. *Nat Med.* 2012;18:244-51.
37. Guigas B, Bertrand L, Taleux N, Foretz M, Wiernsperger N, Vertommen D i sur. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside and metformin inhibit hepatic glucose phosphorylation by an AMP-activated protein kinase-independent effect on glucokinase translocation. *Diabetes.* 2006;55:865-74.
38. Sakoda H, Ogihara T, Anai M, Fujishiro M, Ono H, Onishi Y i sur. Activation of AMPK is essential for AICAR-induced glucose uptake by skeletal muscle but not adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:E1239-44.
39. Hasenour CM, Ridley DE, Hughey CC, James FD, Donahue EP, Shearer J i sur. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) effect on glucose production, but not energy metabolism, is independent of hepatic AMPK in vivo. *J Biol Chem.* 2014;289:5950-9.
40. Zang Y, Yu LF, Pang T, Fang LP, Feng X, Wen TQ i sur. 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.
41. Quan H, Kim JM, Lee HJ, Lee SH, Choi JI, Bae HB. AICAR enhances the phagocytic ability of macrophages towards apoptotic cells through P38 mitogen activated protein kinase activation independent of AMP-activated protein kinase. *PLoS One.* 2015;10:e0127885.
42. Rattan R, Giri S, Singh AK, Singh I. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2005;280:39582-93.
43. Liu X, Chhipa RR, Pooya S, Wortman M, Yachyshin S, Chow LM 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.
44. Campàs C, Lopez JM, Santidrián AF, Barragán M, Bellosillo B, Colomer D 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.
45. Santidrián AF, González-Gironès DM, Iglesias-Serret D, Coll-Mulet L, Cosiàlls AM, de Frias M 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.
46. Rosilio C, Lounnas N, Nebout M, Imbert V, Hagenbeek T, Spits H 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.
47. Sengupta TK, Leclerc GM, Hsieh-Kinser TT, Leclerc GJ, Singh I, Barredo JC. Cytotoxic effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside (AICAR) on childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells: implication for targeted therapy. *Mol Cancer.* 2007;6:46.
 48. 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.
 49. Van Den Neste E, Cazin B, Janssens A, González-Barca E, Terol MJ, Levy V i sur. Acadesine for patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): a multicenter phase I/II study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013;71:581-91.
 50. Göransson O, McBride A, Hawley SA, Ross FA, Shpiro N, Foretz M i sur. Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2007;282:32549-60.
 51. Vincent EE, Coelho PP, Blagih J, Griss T, Viollet B, Jones RG. Differential effects of AMPK agonists on cell growth and metabolism. *Oncogene.* 2015;34:3627-39.
 52. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009;324:1029-33.
 53. Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EE, Kelsell D i sur. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet.* 2002;30:406-10.
 54. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P i sur. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321:1807-12.
 55. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W i sur. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360:765-73.
 56. Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, Schelen A, Koenders JE, Zeilemaker A i sur. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood.* 2010;116:2122-6.
 57. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM i sur. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 2009;462:739-44.
 58. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA i sur. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell.* 2010;17:225-34.
 59. Wang F, Travins J, DeLaBarre B, Penard-Lacronique V, Schalm S, Hansen E i sur. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science.* 2013;340:622-6.
 60. Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, Campos C i sur. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science.* 2013;340:626-30.
 61. Yen K, Wang F, Travins J, Chen Y, Yang H, Straley K i sur. AG-221 Offers a Survival Advantage In a Primary Human IDH2 Mutant AML Xenograft Model. *Blood* 2013;122:240. (sažetak)

62. Quivoron C, David M, Straley K, Travins J, Kim H, Chen Y i sur. AG-221, an oral, selective, first-in-class, potent IDH2-R140Q mutant inhibitor, induces differentiation in a xenotransplant model. *Blood*. 2014;124:3735. (sažetak)
63. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A i sur. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010;18:553-67.
64. Sasaki M, Knobbe CB, Munger JC, Lind EF, Brenner D, Brüstle A i sur. IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. *Nature*. 2012;488:656-9.
65. Folmes CD, Dzeja PP, Nelson TJ, Terzic A. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell*. 2012;11:596-606.
66. Oburoglu L, Tardito S, Fritz V, de Barros SC, Merida P, Craveiro M i sur. Glucose and glutamine metabolism regulate human hematopoietic stem cell lineage specification. *Cell Stem Cell*. 2014;15:169-84.
67. Carey BW, Finley LW, Cross JR, Allis CD, Thompson CB. Intracellular α -ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*. 2015;518:413-6.
68. Skrtic M, Sriskanthadevan S, Jhas B, Gebbia M, Wang X, Wang Z i sur. Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2011;20:674-88.
69. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, Kantarjian H, Konopleva M, Korchin B i sur. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest*. 2010;120:142-56.
70. Jacque N, Ronchetti AM, Larrue C, Meunier G, Birsén R, Willems L i sur. Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. *Blood*. 2015;126:1346-56.
71. Choi AMK, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med*. 2013;368:651-62.
72. Bento CF, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M i sur. Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu Rev Biochem*. 2016;85:685-713.
73. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011;13:132-41.
74. Bach M, Larance M, James DE, Ramm G. The serine/threonine kinase ULK1 is a target of multiple phosphorylation events. *Biochem J*. 2011;440:283-91.
75. Wang RC, Wei Y, An Z, Zou Z, Xiao G, Bhagat G i sur. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science*. 2012;338:956-9.
76. Zhou J, Tan SH, Nicolas V, Bauvy C, Yang ND, Zhang J i sur. Activation of lysosomal function in the course of autophagy via mTORC1 suppression and autophagosome-lysosome fusion. *Cell Res*. 2013;23:508-23.
77. Kim J, Kim YC, Fang C, Russell RC, Kim JH, Fan W i sur. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell*. 2013;152:290-303.

78. Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P i sur. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:14238-43.
79. McCoy F, Hurwitz J, McTavish N, Paul I, Barnes C, O'Hagan B i sur. Obatoclox induces Atg7-dependent autophagy independent of beclin-1 and BAX/BAK. *Cell Death Dis*. 2010;1:e108.
80. Grishchuk Y, Ginet V, Truttmann AC, Clarke PG, Puyal J. Beclin 1-independent autophagy contributes to apoptosis in cortical neurons. *Autophagy*. 2011;7:1115-31.
81. Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ*. 2008;15:1318-29.
82. Smith DM, Patel S, Raffoul F, Haller E, Mills GB, Nanjundan M. Arsenic trioxide induces a beclin-1-independent autophagic pathway via modulation of SnoN/SkiL expression in ovarian carcinoma cells. *Cell Death Differ*. 2010;17:1867-81.
83. Zhou X, Wang L, Hasegawa H, Amin P, Han BX, Kaneko S i sur. Deletion of PIK3C3/Vps34 in sensory neurons causes rapid neurodegeneration by disrupting the endosomal but not the autophagic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:9424-9.
84. Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T i sur. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*. 2009;461:654-8.
85. Isakson P, Bjørås M, Bøe SO, Simonsen A. Autophagy contributes to therapy-induced degradation of the PML/RAR α oncoprotein. *Blood*. 2010;116:2324-31.
86. Wang Z, Cao L, Kang R, Yang M, Liu L, Zhao Y i sur. Autophagy regulates myeloid cell differentiation by p62/SQSTM1-mediated degradation of PML-RAR α oncoprotein. *Autophagy*. 2011;7:401-11.
87. Wang J, Lian H, Zhao Y, Kauss MA, Spindel S. Vitamin D3 induces autophagy of human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem*. 2008;283:25596-605.
88. Colosetti P, Puissant A, Robert G, Luciano F, Jacquelin A, Gounon P i sur. Autophagy is an important event for megakaryocytic differentiation of the chronic myelogenous leukemia K562 cell line. *Autophagy*. 2009;5:1092-8.
89. Zhang Y, Morgan MJ, Chen K, Choksi S, Liu ZG. Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation. *Blood*. 2012;119:2895-905.
90. Mortensen M, Soilleux EJ, Djordjevic G, Tripp R, Lutteropp M, Sadighi-Akha E i sur. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med*. 2011;208:455-67.
91. Huang HL, Chen YC, Huang YC, Yang KC, Pan Hy, Shih SP i sur. Lapatinib induces autophagy, apoptosis and megakaryocytic differentiation in chronic myelogenous leukemia K562 cells. *PLoS One*. 2011;6:e29014.
92. Obba S, Hizir Z, Boyer L, Selimoglu-Buet D, Pfeifer A, Michel G i sur. The PRKAA1/AMPK α 1 pathway triggers autophagy during CSF1-induced human monocyte differentiation and is a potential target in CMML. *Autophagy*. 2015;11:1114-29.
93. Robert G, Ben Sahra I, Puissant A, Colosetti P, Belhacene N, Gounon P i sur. Acadesine kills chronic myelogenous leukemia (CML) cells through PKC-dependent induction of autophagic cell death. *PLoS One*. 2009;4:e7889.

94. Wu H, Scher BM, Chu CL, Leonard M, Olmedo R, Scher GS i sur. Reduction in lactate accumulation correlates with differentiation-induced terminal cell division of leukemia cells. *Differentiation*. 1991;48:51-8.
95. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A i sur. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12:1-222.
96. Rubinsztein DC, Cuervo AM, Ravikumar B, Sarkar S, Korolchuk V, Kaushik S i sur. In search of an “autophagometer”. *Autophagy*. 2009;5:585-9.
97. Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy*. 2007;3:452-60.
98. Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Isaka Y. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res*. 2012;73:3-7.
99. Karvela M, Baquero P, Kuntz EM, Mukhopadhyay A, Mitchell R, Allan EK i sur. ATG7 regulates energy metabolism, differentiation and survival of Philadelphia-chromosome-positive cells. *Autophagy*. 2016;12:936-48.
100. Orfali N, O'Donovan TR, Nyhan MJ, Britschgi A, Tschan MP, Cahill MR i sur. Induction of autophagy is a key component of all-trans-retinoic acid-induced differentiation in leukemia cells and a potential target for pharmacologic modulation. *Exp Hematol*. 2015;43:781-93.
101. Goussetis DJ, Altman JK, Glaser H, McNeer JL, Tallman MS, Plataniias LC. Autophagy is a critical mechanism for the induction of the antileukemic effects of arsenic trioxide. *J Biol Chem*. 2010;285:29989-97.
102. Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest*. 2015;125:25-32.
103. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Ikezoe T, Yang J i sur. 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.
104. Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Ni L, Koeffler HP, Yokoyama A. Inhibition of mTORC1 by RAD001 (everolimus) potentiates the effect 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.
105. 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.
106. Dembitz V, Lalic H, Ostojic A, Vrhovac R, Banfic H, Visnjic D. The mechanism of synergistic effects of arsenic trioxide and rapamycin in acute myeloid leukemia cell lines lacking typical t(15;17) translocation. *Int J Hematol*. 2015;102:12-24.
107. Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR i sur. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*. 2010;285:10850-61.
108. Staskiewicz L, Thorburn J, Morgan MJ, Thorburn A. Inhibiting autophagy by shRNA knockdown: cautions and recommendations. *Autophagy*. 2013;9:1449-50.

109. Jaber N, Dou Z, Chen JS, Catanzaro J, Jiang YP, Ballou LM i sur. Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:2003-8.
110. Brigger D, Proikas-Cezanne T, Tschan MP. WIPI-dependent autophagy during neutrophil differentiation of NB4 acute promyelocytic leukemia cells. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1315.
111. Trocoli A, Mathieu J, Priault M, Reiffers J, Souquère S, Pierron G i sur. ATRA-induced upregulation of Beclin 1 prolongs the life span of differentiated acute promyelocytic leukemia cells. *Autophagy*. 2011;7:1108-14.
112. 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.
113. 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.
114. 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.
115. Samudio I, Fiegl M, McQueen T, Clise-Dwyer K, Andreeff M. The warburg effect in leukemia-stroma cocultures is mediated by mitochondrial uncoupling associated with uncoupling protein 2 activation. *Cancer Res*. 2008;68:5198-205.
116. Russell RR, Bergeron R, Shulman GI, Young LH. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am J Physiol*. 1999;277:H643-9.
117. Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Meroni SB. The AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose, regulates lactate production in rat Sertoli cells. *J Mol Endocrinol*. 2007;39:279-88.
118. Dagher Z, Ruderman N, Tornheim K, Ido Y. The effect of AMP-activated protein kinase and its activator AICAR on the metabolism of human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;265:112-5.
119. 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.
120. Ahmed N, Williams JF, Weidemann MJ. Glycolytic, glutaminolytic and pentose-phosphate pathways in promyelocytic HL60 and DMSO-differentiated HL60 cells. *Biochem Mol Biol Int*. 1993;29:1055-67.
121. Wang YH, Israelsen WJ, Lee D, Yu VW, Jeanson NT, Clish CB i sur. Cell-state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis. *Cell*. 2014;158:1309-23.
122. Haschemi A, Kosma P, Gille L, Evans CR, Burant CF, Starkl P i sur. The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab*. 2012;15:813-26.
123. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ i sur. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood*. 2010;115:4742-9.

124. Williams T, Forsberg LJ, Viollet B, Brenman JE. Basal autophagy induction without AMP-activated protein kinase under low glucose conditions. *Autophagy*. 2009;5:1155-65.
125. Song YM, Lee YH, Kim JW, Ham DS, Kang ES, Cha BS i sur. Metformin alleviates hepatosteatosis by restoring SIRT1-mediated autophagy induction via an AMP-activated protein kinase-independent pathway. *Autophagy*. 2015;11:46-59.
126. Grimaldi C, Chiarini F, Tabellini G, Ricci F, Tazzari PL, Battistelli M 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.
127. Shi R, Lin J, Gong Y, Yan T, Shi F, Yang X i sur. The antileukemia effect of metformin in the Philadelphia chromosome-positive leukemia cell line and patient primary leukemia cell. *Anticancer Drugs*. 2015;26:913-22.
128. Wang F, Liu Z, Zeng J, Zhu H, Li J, Cheng X i sur. Metformin synergistically sensitizes FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia to sorafenib by promoting mTOR-mediated apoptosis and autophagy. *Leuk Res*. 2015;39:1421-7.
129. Jagannathan S, Abdel-Malek MA, Malek E, Vad N, Latif T, Anderson KC i sur. Pharmacologic screens reveal metformin that suppresses GRP78-dependent autophagy to enhance the anti-myeloma effect of bortezomib. *Leukemia*. 2015;29:2184-91.
130. Luu K, Luty W, Kumar A. HTS profiling method for autophagy-modulators: mix-and-read autophagy and cell viability dyes enable simple, rapid high-throughput screening. *Genetic Engineering & Biotechnology News*. 2014 Dec 2, 35:12-13.
131. Dahia PL, Aguiar RC, Alberta J, Kum JB, Caron S, Sill H i sur. PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. *Hum Mol Genet*. 1999;8:185-93.
132. Yuan HX, Russell RC, Guan KL. Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy*. 2013;9:1983-95.
133. Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P i sur. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:14238-43.
134. Bago R, Sommer E, Castel P, Crafter C, Bailey FP, Shpiro N i sur. The hVps34-SGK3 pathway alleviates sustained PI3K/Akt inhibition by stimulating mTORC1 and tumour growth. *EMBO J*. 2016;35:1902-22.
135. Gao P, Bauvy C, Souquère S, Tonelli G, Liu L, Zhu Y i sur. The Bcl-2 homology domain 3 mimetic gossypol induces both Beclin 1-dependent and Beclin 1-independent cytoprotective autophagy in cancer cells. *J Biol Chem*. 2010;285:25570-81.
136. Devereaux K, Dall'Armi C, Alcazar-Roman A, Ogasawara Y, Zhou X, Wang F i sur. Regulation of mammalian autophagy by class II and III PI 3-kinases through PI3P synthesis. *PLoS One*. 2013;8:e76405.
137. Vicinanza M, Korolchuk VI, Ashkenazi A, Puri C, Menzies FM, Clarke JH i sur. PI(5)P regulates autophagosome biogenesis. *Mol Cell*. 2015;57:219-34.
138. Zhong Y, Morris DH, Jin L, Patel MS, Karunakaran SK, Fu YJ i sur. Nrbf2 protein suppresses autophagy by modulating Atg14L protein-containing Beclin 1-Vps34 complex architecture and reducing intracellular phosphatidylinositol-3 phosphate levels. *J Biol Chem*. 2014;289:26021-37.

139. Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;13:7-12.
140. Jacquelin A, Obba S, Boyer L, Dufies M, Robert G, Gounon P i sur. Autophagy is required for CSF-1-induced macrophagic differentiation and acquisition of phagocytic functions. *Blood.* 2012;119:4527-31.
141. Mortensen M, Ferguson DJ, Edelmann M, Kessler B, Morten KJ, Komatsu M i sur. Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:832-7.
142. Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9:57-67.
143. Lindqvist LM, Simon AK, Baehrecke EH. Current questions and possible controversies in autophagy. *Cell Death Discov.* 2015;1.pii:15036.
144. Stranks AJ, Hansen AL, Panse I, Mortensen M, Ferguson DJ, Puleston DJ i sur. Autophagy Controls Acquisition of Aging Features in Macrophages. *J Innate Immun.* 2015;7:375-91.
145. Cao Y, Zhang S, Yuan N, Wang J, Li X, Xu F i sur. Hierarchical Autophagic Divergence of Hematopoietic System. *J Biol Chem.* 2015;290:23050-63.
146. Schaaf MB, Keulers TG, Vooijs MA, Rouschop KM. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB J.* 2016 Sep 6. pii: fj.201600698R. [Epub ahead of print]

11. ŽIVOTOPIS

Vilma Dembitz rođena je 18. kolovoza 1987. u Splitu. Osnovnu školu i V. gimnaziju završila je u Zagrebu, a 2006. upisala je Medicinski fakultet na kojem je diplomirala 2012. s prosjekom ocjena 4,97. Tijekom studija dobila je Dekanovu nagradu za najboljeg studenta 1. godine, Rektorovu nagradu za rad „*Rapamicin i sve-trans-retinska kiselina pojačavaju učinak arsenovog trioksida na proliferaciju leukemijskih stanica*“ (mentorica: prof. dr. sc. Dora Višnjić), Posebnu Rektorovu nagradu Uredništvu časopisa Medicinar te Stipendiju Grada Zagreba. Od listopada 2012. zaposlena je kao asistentica na Katedri za fiziologiju i imunologiju, a istodobno radi i na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga na projektima pod mentorstvom prof. dr. sc. Dore Višnjić. Nakon odrađenog pripravničkog staža položila je stručni ispit i stekla odobrenje za samostalni rad u veljači 2014. U listopadu 2013. upisuje doktorski studij „*Biomedicina i zdravstvo*“, a u sklopu doktorske izobrazbe boravi šest mjeseci u MD Anderson Cancer Centeru, Houston, TX, SAD (mentor: prof. dr. sc. Srđan Verstovšek). Tijekom dokorskog studija bila je stipendistica Zaklade Adris te dobitnica potpore Suradnja i Potpore za doktorske studente Sveučilišta u Zagrebu. Koautorica je na četiri rada indeksirana u bazi Current Contents, od čega je prvi autor na jednom radu, te na dva rada indeksirana u bazi Web of Science.

Publikacije vezane uz temu doktorata:

1. Dembitz V, Lalic H, Ostojic A, Vrhovac R, Banfic H, Visnjic D. The mechanism of synergistic effects of arsenic trioxide and rapamycin in acute myeloid leukemia cell lines lacking typical t(15;17) translocation. *Int J Hematol.* 2015;102:12-24.
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. *Periodicum Biologorum* 2014; 116:37-43.
4. 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.

Ostale publikacije:

1. Rozovski U, Verstovsek S, Manshouri T, Dembitz V, Bozinovic K, Newberry K, Zhang Y, Bove JE, Pierce S, Kantarjian H, Estrov Z. An accurate, simple prognostic model consisting of age, JAK2, CALR, and MPL mutation status for patients with primary myelofibrosis. *Haematologica.* 2017;102:79-84.
2. Banfic H, Crljen V, Lukinovic-Skudar V, Dembitz V, Lalic H, Bedalov A, Visnjic D. Inositol pyrophosphates modulate cell cycle independently of alteration in telomere length. *Adv Biol Regul.* 2016;60:22-28.