Utjecaj glutamina na diferencijaciju stanica leukemijskih linija

Kodvanj, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:622485

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Kodvanj

Utjecaj glutamina na diferencijaciju stanica leukemijskih linija

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za staničnu biologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga pod vodstvom prof. dr. sc. Dore Višnjić, u sklopu znanstvenog projekta „Signalni mehanizmi i metaboličke promjene u diferencijaciji stanica akutne mijeloične leukemije“ financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost, šifra projekta: IP-2016-06-4581, voditelj projekta: prof. dr. sc. Dora Višnjić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2019./2020.

Popis kratica

αKG α-ketoglutarat

AICAR 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleozid monofosfat

AICAr 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleozid, akadezin

AKT proteinska kinaza B

AML akutna mijeloična leukemija

AMPK AMP-ovisna kinaza, prema engl*. AMP-activated protein kinase*

APL akutna promijelocitna leukemija

ATRA sve-*trans*-retinska-kiselina, prema engl. a*ll-trans-retinoic-acid*

BPTES bis-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-il)etil sulfid

FAB francusko-američko-britanska (klasifikacija)

GLS1 glutaminaza 1, prema engl. *glutaminase 1*

IDH izocitrat dehidrogenaza

LKB1 jetrena kinaza B1, prema engl. *liver kinase B1*

MFI srednji intenzitet fluorescencije, prema engl. *mean fluorescence intensity*

mTOR ciljna molekula rapamicina u sisavaca, prema engl. *mammalian target of rapamycin*

NAD^+ oksidirani oblik nikotinamida adenina dinukleotida

NADH reducirani oblik nikotinamida adenina dinukleotida

PI3K fosfoinozitid 3-kinaza, prema engl. *phosphoinositide 3-kinase*

PML protein promijelocitne leukemije, prema engl. *promyelocytic leukemia protein*

PTEN homolog fosfataze i tenzina prema engl. *phosphatase and tensin homolog*

RARα receptor retinske kiseline, prema engl. *retinoic acid receptor*

SIRT1 sirtuin 1

Sadržaj

Sažetak

Summary

1. Uvod 1

1.1. Akutna mijeloična leukemija 1

1.2. Diferencijacijska terapija 1

1.3. Unutarstanični signalni putevi i diferencijacija ATRA-om 2

1.4. AMPK 3

1.5. AICAr i metformin 3

1.6. Metabolizam i leukemije 4

2. Hipoteza 7

3. Opći i specifični ciljevi rada 7

4. Materijali i metode 8

4.1. Kemikalije 8

4.2. Stanična kultura 8

4.3. Utvrđivanje koncentracije glukoze, laktata i amonijaka 9

4.4. Protočna citometrija 9

4.5. Statistička obrada 9

5. Rezultati 10

5.1. Učinak diferencijacijskih tvari i metformina na potrošnju glukoze, proizvodnju laktata i proizvodnju amonijaka u leukemijskim stanicama 10

5.2. Metabolizam glutamina i učinci AICAr-a 10

5.3. Metabolizam glutamina i učinci ATRA-e 15

6. Rasprava 18

7. Zaključci 21

8. Zahvale 22

9. Popis literature 23

10. Životopis..... 28

Sažetak

UTJECAJ GLUTAMINA NA DIFERENCIJACIJU STANICA LEUKEMIJSKIH LINIJA
Ivan Kodvanj

Agonisti AMP-ovisne kinaze (AMPK), bigvanid metformin i 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleozid (AICAr), koče proliferaciju stanica leukemijskih linija, ali samo AICAr potiče izražaj diferencijacijskih biljega u monocitnoj liniji U937. Mehanizam diferencijacije potaknute AICAr-om nije u potpunosti razjašnjen, ali je znano da ne ovisi o AMPK-u. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi ulogu metabolizma glukoze i glutamina u učincima AICAr-a na stanice leukemijskih linija. Koristili smo komercijalno dostupne setove za mjerenje glukoze, laktata i amonijaka u odgovoru na agoniste AMPK-a i sve-*trans*-retinsku kiselinu (ATRA) koja potiče granulocitnu diferencijaciju. Rezultati su pokazali da ATRA smanjuje, metformin povećava, a AICAr nema učinaka na potrošnju glukoze i proizvodnju laktata. Međutim, AICAr povećava proizvodnju amonijaka, a to povećanje izostaje ako se stanice uzgajaju bez glutamina ili uz dodatak bis-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-il)etil sulfida (BPTES), farmakološkog inhibitora glutaminaze 1 (GLS1). Analize protočnom citometrijom pokazale su da manjak glutamina i inhibicija GLS1 koče izražaj diferencijacijskih biljega u odgovoru na AICAr, ali nemaju učinaka na diferencijaciju potaknutu ATRA-om. Ti rezultati upućuju da je metabolizam glutamina povezan s diferencijacijom stanica U937 u odgovoru na AICAr.

Ključne riječi: AML, AICAR, diferencijacija, glutamin, glukoza

Summary

THE EFFECTS OF GLUTAMINE IN DIFFERENTIATION OF LEUKEMIA CELL LINES

Ivan Kodvanj

AMP-dependent kinase (AMPK) agonists, the biguanide metformin and 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAr) inhibit proliferation of leukemia cell lines, but only AICAr induces expression of differentiation markers in monocytic U937 cell line. The mechanism of AICAr-induced differentiation is not fully understood, but it is known to be AMPK-independent. In this study, we investigated the role of glucose and glutamine metabolism in AICAr-mediated effects in leukemia cell lines. We used commercially available kits for measuring glucose, lactate and ammonia in response to AMPK-agonists and all-*trans*-retinoic acid (ATRA) as an inducer of granulocytic differentiation. The results showed that ATRA decreased, metformin increased, and AICAr had no effects on glucose consumption and lactate production. However, AICAr increased ammonia production, and the increase was abolished when U937 cells were grown in the absence of glutamine or in the presence of bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-ethyl sulphide (BPTES), a pharmacological inhibitor of glutaminase 1 (GLS1). Flow cytometry analyses revealed that the lack of glutamine and the inhibition of GLS1 inhibited the expression of differentiation markers in response to AICAr, but had no effects on ATRA-mediated differentiation. These results show that glutamine metabolism is associated with AICAr-mediated differentiation of U937 cells.

Key words: AML, AICAR, differentiation, glutamine, glucose

1. Uvod

1.1. Akutna mijeloična leukemija

Akutne mijeloične leukemije (AML) zloćudne su bolesti koje pogađaju hematopoetske matične stanice mijeloidne linije. Leukemijski klon nastaje zbog stečenih genetskih mutacija i epigenetskih promjena koje uzrokuju poremećenu diferencijaciju i sazrijevanje te nekontroliranu diobu. Takvi nezreli oblici (blasti) nalaze se u krvi, a mogu infiltrirati i bilo koje tkivo, pa tako i koštanu srž gdje suprimiraju normalnu hematopoezu što dovodi do anemije, trombocitopenije i leukopenije - poremećaja koji dominiraju u kliničkoj slici ove zloćudne bolesti. Bolest najčešće nastupa naglo, iako joj može prethoditi i mijelodisplastični sindrom. Ako se ne liječi, AML može dovesti do smrtnog ishoda u nekoliko tjedana. Najčešće pogađa starije dobne skupine, a medijan oboljenja je 67 godina. Tradicionalno se koristi francusko-američko-britanska klasifikacija (FAB) koja se temelji na morfološkim i citokemijskim osobinama leukemijskih stanica, a AML dijeli u 8 kategorija (AML-M0 do AML-M7). Danas se koristi klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, prema engl. *World Health Organization*) koja u obzir uzima čimbenike koji utječu na prognozu bolesti i izbor terapije, a temelji se na genetičkim, citogenetičkim i citološkim (citomorfološkim i citokemijskim) osobinama stanica (1).

1.2. Diferencijacijska terapija

Iako petogodišnje preživljenje oboljelih od AML-a iznosi svega 20-30%, izlječenje akutne promijelocitne leukemije (APL ili AML-M3 po FAB-klasifikaciji), podvrste AML-a, iznosi 60-90%. Manji broj pacijenata oboljelih od APL-a umire akutno zbog komplikacija terapije dok većina postiže trajnu remisiju, a relapsi su rijetki (2). Razlog uspješnog liječenja APL-a je primjena diferencijacijske terapije sve-*trans*-retinskom-kiselinom (ATRA, prema engl. *all-trans-retinoic-acid*). Posebnost APL-a je translokacija kromosoma 15 i 17 koja proizvodi fuzijski protein u kojem su vezani tumorski supresor PML (prema engl. *promyelocytic leukemia protein*) i receptor za retinsku kiselinu RARα (prema engl. *retinoic acid receptor α*) što dovodi do smanjene funkcije RARα (3). Diferencijacijski učinci ATRA-e objašnjavaju se djelovanjem na receptor RARα i poticanjem transkripcije gena koji sadrže elemente odgovora na retinsku kiselinu (RARE, prema engl. *retinoic acid response elements*).

Protuleukemijskom učinku doprinosi i učinak ATRA-e u visokim koncentracijama na povećanu razgradnju fuzijskog proteina PML-RARα proteasomskim putem, što omogućuje proteinima PML uspostavu nuklearnih tjelešaca i aktivaciju proteina p53 (4).

Iako je opće prihvaćeno objašnjenje da ATRA ostvaruje svoje diferencijacijske učinke na leukemijske stanice djelovanjem na fuzijski protein PML-RARα, diferencijacijski učinci ATRA-e po prvi puta su dokazani na staničnoj liniji HL-60 (5), koja uopće ne sadrži translokaciju između kromosoma 15 i 17 (6), pa tako ni fuzijski protein PML-RARα (7). Prema FAB-klasifikaciji, stanična linija HL-60 odgovara AML-M2 ili akutnoj mijeloblastičnoj leukemiji sa sazrijevanjem (6). Ti podatci upućuju da je mehanizam djelovanja ATRA-e složeniji od objašnjenja da ATRA djeluje putem receptora PML-RARα što otvara mogućnosti da bi boljim poznavanjem mehanizma djelovanja ATRA-e mogli pojačati njezine učinke mijenjanjem staničnih procesa.

1.3. Unutarstanični signalni putevi i diferencijacija ATRA-om

Signalni put fosfoinozitid 3-kinaze (PI3K, prema engl. *phosphoinositide 3-kinase*)/Akt aktivira se nizvodno od receptora za inzulin i čimbenike rasta te se uglavnom smatra odgovornim za prijenos proliferacijskog signala (8). Budući da je hiperaktivacija PI3K/Akt česta u zloćudnim hematološkim bolestima, razvijeni su inhibitori tog signalnog puta kako bi se zakočila proliferacija stanica (9,10). Međutim, prijašnja istraživanja pokazala su da se aktivacija PI3K (11) i Akt (12) zamjećuje u jezgrama leukemijskih stanica koje se diferenciraju pomoću ATRA-e te je pokazano da iako inhibicija PI3K/Akt koči proliferaciju, istodobno smanjuje i diferencijaciju stanica u odgovoru na ATRA-u (11–13).

Ciljna molekula rapamicina u sisavaca (mTOR, prema engl, *mammalian target of rapamycin*) aktivira se nizvodno od Akt te regulira sintezu proteina, stanični ciklus, metabolizam i autofagiju (8). Kako je pokazano da prekomjerna aktivacija mTOR povratnom spregom smanjuje aktivnost uzvodnog dijela puta PI3K-AKT (8), moguće je da bi se diferencijacijski učinak ATRA-e mogao pojačati inhibiranjem mTOR-a. Rezultati *in vitro* potvrđuju da farmakološka inhibicija mTOR-a pojačava diferencijacijske učinke ATRA-e na HL-60 i NB4 stanicama (14,15), dok istovremena inhibicija PI3K i mTOR-a znatno smanjuje diferencijacijske učinke ATRA-e (13).

1.4. AMPK

Fiziološki inhibitor mTOR-a je AMP-ovisna kinaza (AMPK, prema engl. *AMP-activated protein kinase*). AMPK je unutarstanični senzor omjera ATP-a i AMP-a te se sastoji od katalitičke podjedinice α i dvije regulacijske podjedinice β i γ. U uvjetima kada stanici nedostaje energije u njoj se nalaze manje količine ATP-a te veće količine AMP-a i ADP-a koji se vežu za γ podjedinicu i aktiviraju AMPK. Kako bi AMP i ADP mogli aktivirati AMPK, jetrena kinaza B1 (LKB1, prema engl. *liver kinase B1*) mora prethodno fosforilirati AMPK (16,17). Kada stanici nedostaje energije, ostvaruju se uvjeti da se to i dogodi jer će osim promjene omjera AMP-a i ATP-a doći i do promjena u omjeru NAD^+ i NADH. Povećani omjer NAD^+/NADH aktivira sirtuin 1 (SIRT1, prema engl. *sirtuin 1)* koji putem LKB1 aktivira AMPK. Također vjerojatno postoji i pozitivna povratna sprega između SIRT1 i AMPK jer regulacija NAD^+/NADH putem AMPK-a dodatno pojačava aktivnost SIRT1 (18). Aktivirani AMPK jedan je od glavnih proteina u stanicama koji koči anaboličke i potiče kataboličke procese. Unutarstaničnom signalizacijom AMPK povećava unos glukoze i masnih kiselina u stanice, potiče njihovo iskorištavanje i smanjuje njihovu sintezu, pojačava proces autofagije, stimulira mitogenezu te smanjuje reakcije sinteze proteina putem inhibicije mTOR-a (16,17). Upravo zbog sposobnosti da inhibira mTOR, što može pojačati ATRA-ine diferencijacijske učinke kao što je prethodno opisano (13,14), istraživano je djelovanje često korištenih farmakoloških aktivatora AMPK-a, 5-aminoimidazola-4-karboksamida ribonukleozida (AICAr) i metformina, na diferencijaciju leukemijskih stanica posredovanu ATRA-om (19).

1.5. AICAr i metformin

AICAr je spoj koji prolazi kroz staničnu membranu i preteča je 5-aminoimidazola-4-karboksamida ribonukleozida monofosfata (AICAR, ZMP), endogenog intermedijera metabolizma purina. AICAR, kao analog AMP-a, pokazuje sposobnost aktiviranja AMPK vezanjem γ-podjedinice (20). AICAR utječe na transkripciju 50 različitih gena uključenih u regulaciju metabolizma (21). U kulturi mioblasta pokazano je da povećava β-oksidaciju masnih kiselina (22), te povećava unos glukoze u stanice djelovanjem na transportere GLUT4 (23). U kontekstu hematoloških bolesti, AICAr može zaustaviti proliferaciju i inducirati apoptozu u staničnim linijama akutne limfoblastične leukemije CCRF-CEM (T-ALL), NALM6 (Bp-

ALL), REH (Bp-ALL, TEL/AML1) i SupB15 (Bp-ALL, BCR/ABL) (24). U stanicama kronične limfocitne leukemije AICAr ostvaruje citotoksične učinke neovisno o aktivaciji AMPK-a (25) zbog čega je i bio istraživan kao lijek za kroničnu limfocitnu leukemiju u kliničkim studijama (26). Dodatno, u našem prethodnom radu, AICAr je pospješio učinke ATRA-e na stanice HL-60 i NB4 te samostalno potaknuo izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama monocitne linije U937 neovisno o AMPK-u (19).

Još jedan agonist AMPK-a je metformin, lijek iz skupine bigvanida, najčešće korišten kao lijek prvog izbora za šećernu bolest tipa 2. Metformin je zapravo neizravni agonist AMPK-a jer svoje učinke ostvaruje inhibicijom kompleksa 1 mitohondrijskog respiracijskog lanca. Tako smanjuje proizvodnju ATP-a te posljedično u stanicama smanjuje omjer ATP/ADP, a povećava omjer NAD^+ i NADH što aktivira AMPK (17,27). Za razliku od AICAr-a, metformin ne pokazuje diferencijacijske učinke na stanice HL-60, NB4 i U937, iako oba agonista imaju usporedive učinke na broj živih stanica (19). Iako se i AICAr i metformin uobičajeno koriste kao farmakološki agonisti AMPK-a, postoji sve više rezultata koji ukazuju da svoje učinke u stanici na proliferaciju, preživljenje i metabolizam ostvaruju neovisno o AMPK-u (17). Budući da su opisane razlike u djelovanju AICAr-a i metformina na glikolizu (17), moguće je da su različiti učinci na puteve staničnog energetskog metabolizma odgovorni za razliku u njihovom djelovanju na diferencijaciju leukemijske stanice.

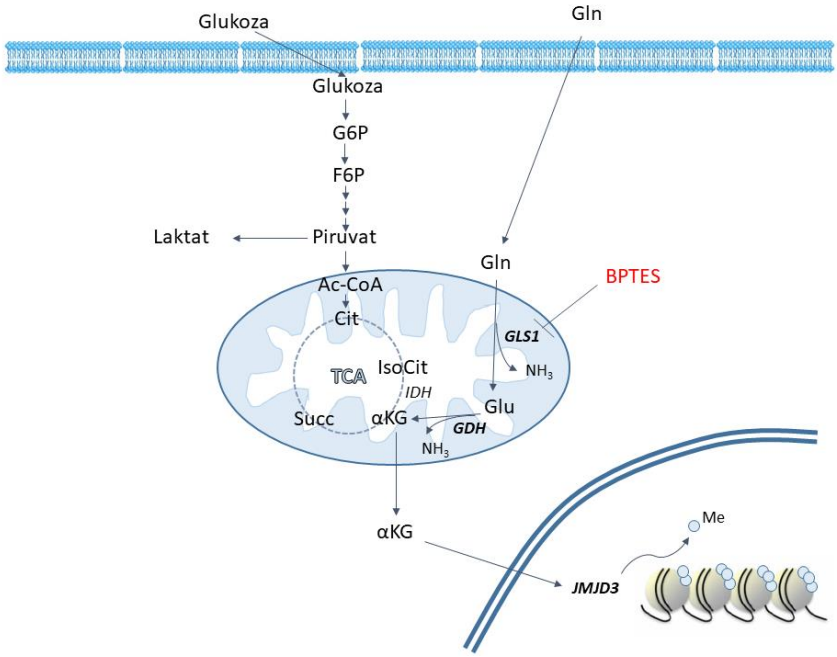
1.6. Metabolizam i leukemije

Nedavno je opisano da AMPK-neovisni proapoptotički učinci metformina u stanicama AML-a ovise o kočenju oksidativne fosforilacije i poticanju glikolize, ali učinci AICAR-a nisu istraženi (28). U usporedbi sa stanicama HL-60, stanice U937 zbog delecije fosfataze PTEN (homolog fosfataze i tenzina, prema engl. *phosphatase and tensin homolog*) imaju povećanu aktivnost signalnog puta PI3K/Akt/mTOR te povećani intenzitet glikolize i u bazalnim uvjetima (28). Uloga glikolize u diferencijaciji leukemijskih stanica je samo djelimice istražena, ali je opisano da u stanicama HL-60 ATRA smanjuje potrošnju glukoze i nastanak laktata tijekom diferencijacije (29). U modelu matičnih stanica znano je da glikoliza prevladava u slabije diferenciranim stanicama (30).

Glutamin je uz glukozu glavni izvor energije za povećani rast i diobu malignih stanica, pa je inhibicija unosa i metabolizma glutamina nedavno predložena kao novi

oblik liječenja AML-a (31). Glutamin je uvjetno esencijalna aminokiselina koja se može uključiti u ciklus limunske kiseline preko α-ketoglutarata (αKG) (slika 1.) te se stoga u stanicama koristi za održavanje anaplerotskih reakcija u ciklusu limunske kiseline (32). Nedostatak glutamina dovodi do smanjenja proliferacije staničnih linija HL-60, THP-1, Kasumi-1 i NB4, a nadomještanje intermedijera ciklusa limunske kiseline oksaloacetatom sprječava suprimirajući učinak manjka glutamina na rast stanica HL-60 linije (33). Također, iako se terapijski učinak asparaginaze kod liječenja akutne limfoblastične leukemije objašnjava snižavanjem koncentracije asparagina i nemogućnošću stanica ALL-a da sintetiziraju asparagin, primjena asparaginaza dovodi i do sniženja koncentracije glutamina. Upravo sniženje glutamina može biti još jedno od objašnjenja uspješnosti ove terapije ALL-a jer glutamin ulazi u ograničavajuću reakciju sinteze purina koji su potrebni za izgradnju DNA (32,34). Uloga glutamina u diferencijaciji opisana je u eritroidnom sazrijevanju matičnih stanica (35) i alternativnoj aktivaciji makrofaga (36), a u leukemijskim stanicama opisano je da manjak glutamina pospješuje diferencijaciju stanica U937 u monocitnom smjeru (37).

Najbolji dokaz da metabolizam ima ulogu u diferencijaciji leukemijskih stanica pružila su nedavna istraživanja učinaka farmakoloških inhibitora mutirane izocitrat-dehidrogenaze (IDH). IDH je enzim koji u ciklusu limunske kiseline (Krebsov ciklus ili TCA, prema engl. *tricarboxylic acid cycle*) pretvara izocitrat u αKG (slika 1.). Mutacija IDH zamjećuje se u 10-20% oboljelih od AML te dovodi do nastanka onkometabolita, 2-hidroksiglutarata, i manjka αKG, intermedijera metabolizma glutamina, što se povezuje sa smanjenom aktivnosti histonskih demetilaza i posljedičnim kočenjem diferencijacije stanica (4). Inhibicija mutacija IDH *in vitro* potiče diferencijaciju stanica eritroleukemije TF-1, primarnih uzoraka stanica AML, te glioma (38,39), a od 2017. godine je i u kliničkoj primjeni inhibitor IDH, enasidenib, koji se koristi za liječenje AML-a s mutacijom IDH kod kojih potiče diferencijaciju blasta (40).



Slika 1. Shematski prikaz metabolizma glukoze i glutamina.

αKG – α-ketoglutarat, Ac-CoA – acetil-koenzim A, BPTES – bis-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-il)etil sulfid, Cit – citrat, F6P – fruktoza 6-fosfat, G6P – glukoza 6-fosfat, GDH – glutamat dehidrogenaza, Gln – glutamin, GLS1 – glutaminaza 1, Glu – glutamat, IDH – izocitrat dehidrogenaza, IsoCit – izocitrat, JMJD3 – histonske lizinske demetilaze koje sadrže domenu Jumonji 3, Me – metilna skupina, Succ – sukcinat

2. Hipoteza

Učinci AICAr-a na stanice leukemijskih linija ovise o metabolizmu glukoze i glutamina.

3. Opći i specifični ciljevi rada

Opći cilj ovog rada je odrediti ulogu metabolizma glukoze i glutamina u diferencijaciji stanica leukemijskih linija.

Specifični ciljevi rada:

1. Odrediti promjene u metabolizmu glukoze i glutamina u stanicama HL-60 i U937 koje su tretirane ATRA-om, AICAr-om i metforminom.
2. Ispitati ulogu metabolizma glutamina u diferencijaciji stanica U937 koje su tretirane AICAr-om i ATRA-om.

4. Materijali i metode

4.1. Kemikalije

5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleozid (AICAr, A9978) kupljen je od tvrtke Sigma (St. Louis, MO, SAD) i razrijeđen u sterilnoj vodi do otopine temeljne koncentracije 100 mM. 1,1-dimetilbigvanid hidroklorid (metformin, D150959) kupljen je od tvrtke Sigma i razrijeđen u mediju RPMI 1640 do otopine temeljne koncentracije 1 M. Sve-*trans*-retinska kiselina (ATRA, #554720) kupljena je od tvrtke Calbiochem (San Diego, CA, SAD) i razrijeđena u dimetil-sulfoksidu do otopine temeljne koncentracije 1 mM. Bis-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-il)-etil sulfidom (BPTES, SML0601) kupljen je od tvrtke Sigma i razrijeđen u dimetil-sulfoksidu do otopine temeljne koncentracije 10 mM.

Monoklonska protutijela konjugirana s fluorescein izotiocijanatom (FITC) za CD11b (IM0530) i CD64 (IM1604) te FITC-konjugirani mišji IgG1 (IM0639) kupljeni su od tvrtke Immunotech Beckman Coulter (Marseille, Francuska).

Setovi za određivanje glukoze (MAK263), laktata (MAK065) i amonijaka (AA0100) kupljeni su od tvrtke Sigma.

Medij RPMI-1640, fetusni goveđi serum (FBS, prema engl. *fetal bovine serum*), L-glutamin, penicilin/streptomicin kupljeni su od tvrtke Thermo Fisher Scientific – Gibco (Waltham, MA, SAD).

4.2. Stanična kultura

Stanične linije HL-60 i U937 kupljene su od European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC 98070106 i 88112501; Porton, Salisbury, UK). Stanice su uzgajane u mediju RPMI-1640 uz dodatak 10%-tnog FBS-a inaktiviranog toplinom, L-glutamina (2 mM), penicilina (50 U/ml) i streptomicina (50 µg/ml) u vlažnom okolišu temperature 37 °C uz 5%-tni CO_2.

U pokusima, stanice su centrifugirane i raspršene u odgovarajućem mediju (sa i bez glutamina). Broj živih stanica određen je pomoću hemocitometra i tripanskog modrila. Stanice su zasađene u ploče sa 6 bunarića u koncentraciji 2 x 10^5/mL te izložene djelovanju AICAr-a (0.5 mM), ATRA-e (1 µM) i metformina (15 mM). U pokusima u kojima je određivana uloga glutaminaze 1 (GLS1), farmakološki inhibitor BPTES (10 µM) dodan je 15 minuta prije dodavanja tvari.

4.3. Utvrđivanje koncentracije glukoze, laktata i amonijaka

Nakon inkubacije, određen je broj živih stanica. Stanice su centrifugirane, a prikupljeni nadtalozi pohranjeni na -20 °C. Koncentracije metabolita određene su pomoću komercijalno dostupnih setova prema uputama proizvođača. Za očitavanje apsorbancije u uzorcima u kojima su mjerene koncentracije glukoze i laktata korišten je kolorimetrijski čitač pločica 680 XR tvrtke Bio-Rad (Hercules, CA, SAD), a za uzorke u kojima je mjerena koncentracija amonijaka korišten je spektrofotometar Biophotometer tvrtke Eppendorf (Hamburg, Njemačka). Vrijednosti koncentracija metabolita određene su u duplikatu korištenjem baždarnih pravaca dobivenih linearnom regresijom iz rezultata apsorbancije standarda prema uputama proizvođača. Baždarni pravci dobiveni su pomoću programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software., La Jolla, CA, SAD).

4.4. Protočna citometrija

Nakon inkubacije, određen je broj živih stanica. Stanice su potom oprane u hladnoj puferiranoj fiziološkoj otopini (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*) te inkubirane u otopini PBS-a koja sadrži 0,1%-tni natrijev azid uz dodatak odgovarajućih protutijela (anti-CD11b, anti-CD64 ili izotipska kontrola IgG1). Nakon inkubacije uzorci su oprani u PBS-u te su obilježene stanice raspršene u 200 µL PBS-a s azidom i signal je očitan protočnom citometrijom pomoću uređaja FACSCalibur system (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, SAD). Prikupljeni podatci obrađeni su pomoću računalnog programa Cell Quest (BD Biosciences).

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*). Za određivanje srednjeg intenziteta fluorescencije (MFI, prema engl. *mean fluorescence intensity*), MFI izotipske kontrole je oduzet od MFI-ja uzorka obilježenog specifičnim protutijelom.

4.5. Statistička obrada

Rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti +/- standardna greška (S.E.M., prema engl. *standard error of the mean*) i analizirani Studentovim t-testom uz odabranu razinu značajnosti $p<0,05$. Za statističku obradu korišten je Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, SAD).

5. Rezultati

5.1. Učinak diferencijacijskih tvari i metformina na potrošnju glukoze, proizvodnju laktata i proizvodnju amonijaka u leukemijskim stanicama

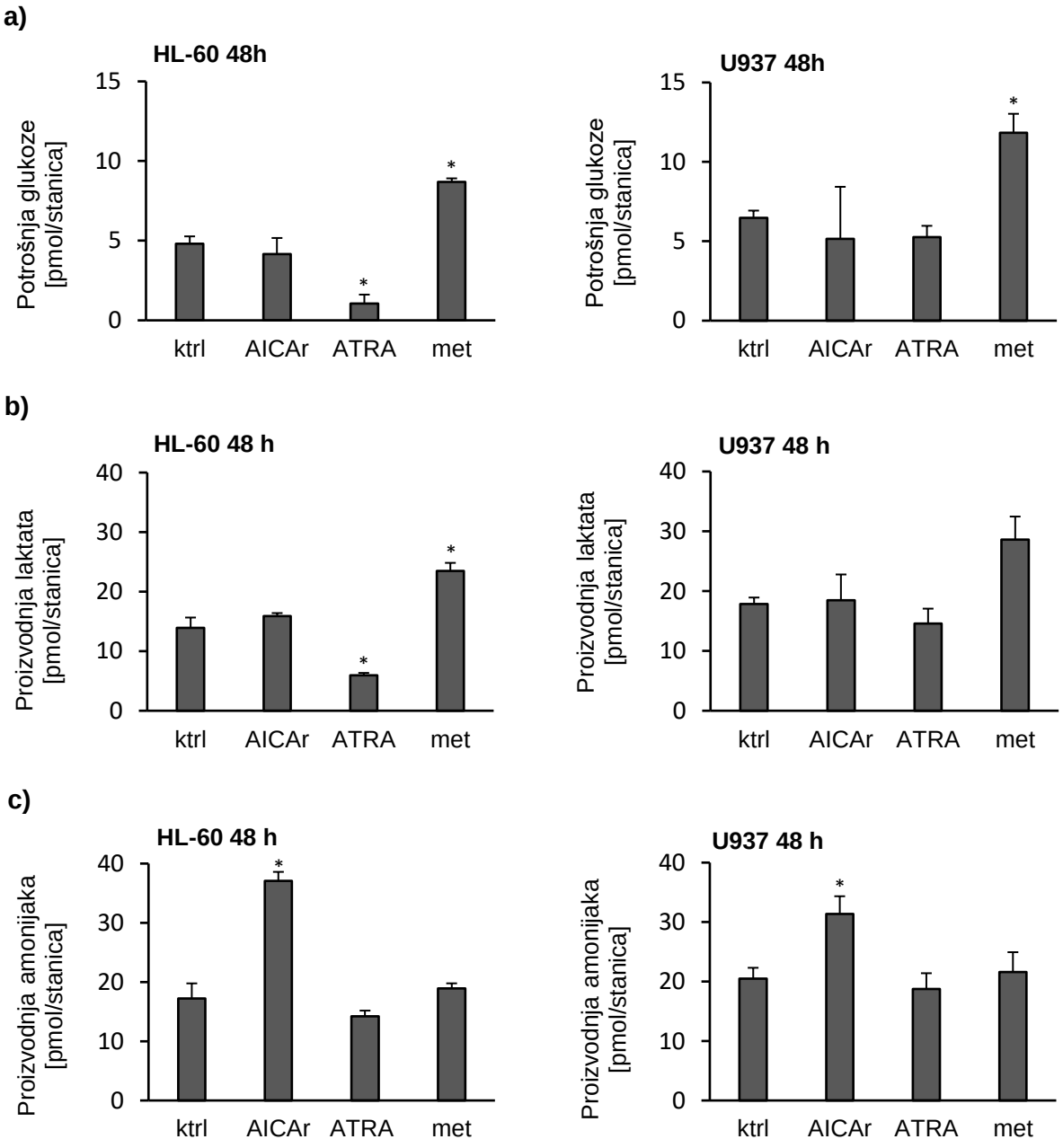
Stanice HL-60 i U937 izložili smo tijekom 48 sati djelovanju AICAr-a (0.5 mM), ATRA-e (1 μM) i metformina (15 mM). Nakon inkubacije odredili smo broj živih stanica te kolorimetrijskim metodama odredili koncentracije glukoze, laktata i amonijaka u nadtalozima staničnih uzoraka. Potrošnja glukoze odgovarala je razlikama koncentracije glukoze u mediju bez stanica i koncentracija glukoze u pojedinim uzorcima. Potrošnja glukoze te proizvodnja laktata i amonijaka izraženi su prema broju živih stanica. Kao što je vidljivo na slici 1, potrošnja glukoze i proizvodnja laktata u kontrolnim stanicama HL-60 bila je nešto manja nego u stanicama U937, kao što je prethodno opisano (28). Metformin je povećavao potrošnju glukoze i proizvodnju laktata u obje stanične linije, a trend promjena u koncentracijama glukoze i laktata upućuje na aktivaciju glikolitičkog puta. ATRA je značajno smanjivala potrošnju glukoze i proizvodnju laktata u staničnoj liniji HL-60. U stanicama tretiranima AICAr-om potrošnja glukoze i proizvodnja laktata nije se značajno razlikovala od vrijednosti u kontrolnim stanicama. Međutim, AICAr je jedini od korištenih tvari statistički značajno povećavao proizvodnju amonijaka u obje stanične linije.

5.2. Metabolizam glutamina i učinci AICAr-a

Budući da je opisano da je glutamin glavni izvor proizvodnje amonijaka u stanicama (41), stanice U937 zasadili smo u mediju koji je sadržavao 2 mM glutamin i u mediju bez glutamina te smo ih tretirali AICAr-om tijekom 72 h. Na slici 2a vidljivo je da se proizvodnja amonijaka značajno povećava u stanicama tretiranim AICAr-om kada su zasađene u mediju koji sadrži glutamin, a to povećanje izostaje u stanicama koje se tretiraju AICAr-om u mediju bez glutamina. Ovi rezultati upućuju da je glutamin glavni izvor povećane proizvodnje amonijaka u stanicama U937 koje su tretirane AICAr-om.

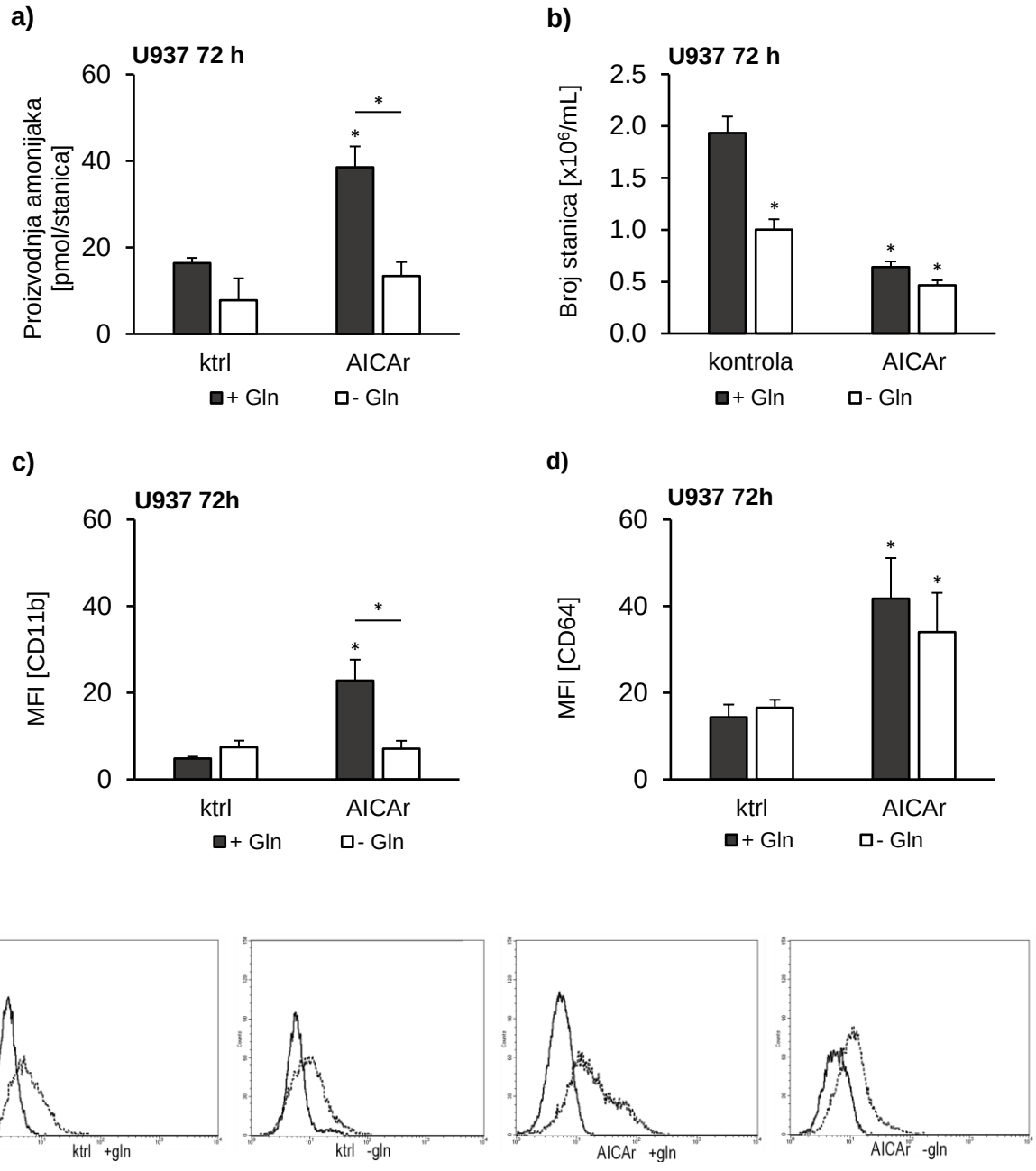
Potom smo ispitali učinak manjka glutamina na broj živih stanica i izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD64. Kao što je prikazano na slici 2b, manjak glutamina statistički značajno smanjuje broj kontrolnih stanica, ali nema značajni učinak na smanjenje broja stanica u odgovoru na AICAr. Međutim, na slici 2c i 2d

vidljivo je da AICAr značajno povećava izražaj biljega CD11b i CD64 u stanicama zasađenim u mediju koji sadrži glutamin, dok porast izražaja CD11b izostaje kod stanica koje su zasađene u mediju bez glutamina. Nedostatak glutamina u mediju nije statistički značajno utjecao na učinak AICAr-a na izražaj CD64.



Slika 1. AICAr nema učinaka na potrošnju glukoze i proizvodnju laktata, ali značajno povećava proizvodnju amonijaka. Stanice HL-60 i U937 inkubirane su u nazočnosti AICAr-a (0,5 mM), ATRA-e (1 μM) i metformina (15 mM) tijekom 48 h. Potrošnja glukoze (a), proizvodnja laktata (b) i proizvodnja amonijaka (c) određeni su

komercijalno dostupnim testovima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri pokusa ± S.E.M. * p<0.05



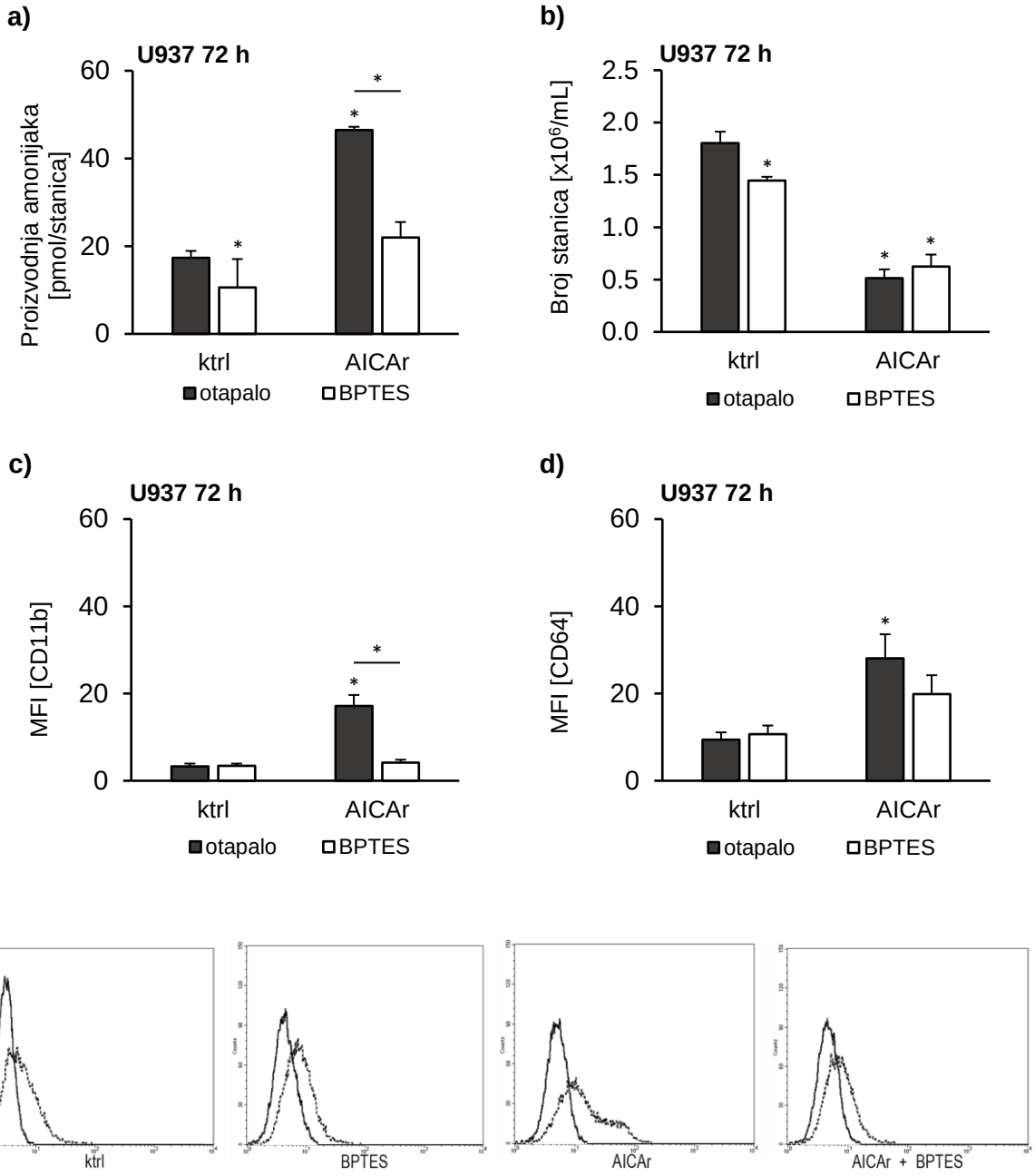
Slika 2. Učinak AICAr-a na proizvodnju amonijaka te izražaj diferencijacijskih biljega ovisi o glutaminu. Stanice U937 inkubirane su u nazočnosti AICAr-a (0,5 mM), tijekom 72 h u mediju sa ili bez 2 mM glutamina. Proizvodnja amonijaka (a) određena je komercijalno dostupnim testom, broj živih stanica (b) tripanskim modrilom, a izražaj biljega CD11b (c) i CD64 (d) protočnom citometrijom. e) Primjerni histogrami

analize izražaja biljega CD11b; puna crta predstavlja izotipsku kontrolu, dok isprekidana crta predstavlja CD11b. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri pokusa ± S.E.M. * $p<0.05$

Kako bismo dodatno opisali put kojim glutamin regulira učinke AICAr-a, ispitali smo ulogu aktivnosti GLS1, koja je glavni enzim razgradnje glutamina u stanicama. Stanice U937 zasadili smo u mediju koji je sadržavao 2 mM glutamin, ali smo stanice tretirali 10 μM BPTES-om koji je farmakološki inhibitor GLS1. Kao što je vidljivo na slici 3a, farmakološka inhibicija GLS1 BPTES-om smanjuje proizvodnju amonijaka u kontrolnim stanicama te poništava učinke AICAr-a. Ovi rezultati sukladni su rezultatima prikazanima na slici 2a u kojima smo ispitali učinke manjka glutamina te potvrđuju da je učinak AICAr-a na povećanje koncentracije amonijaka posredovan aktivacijom GLS1.

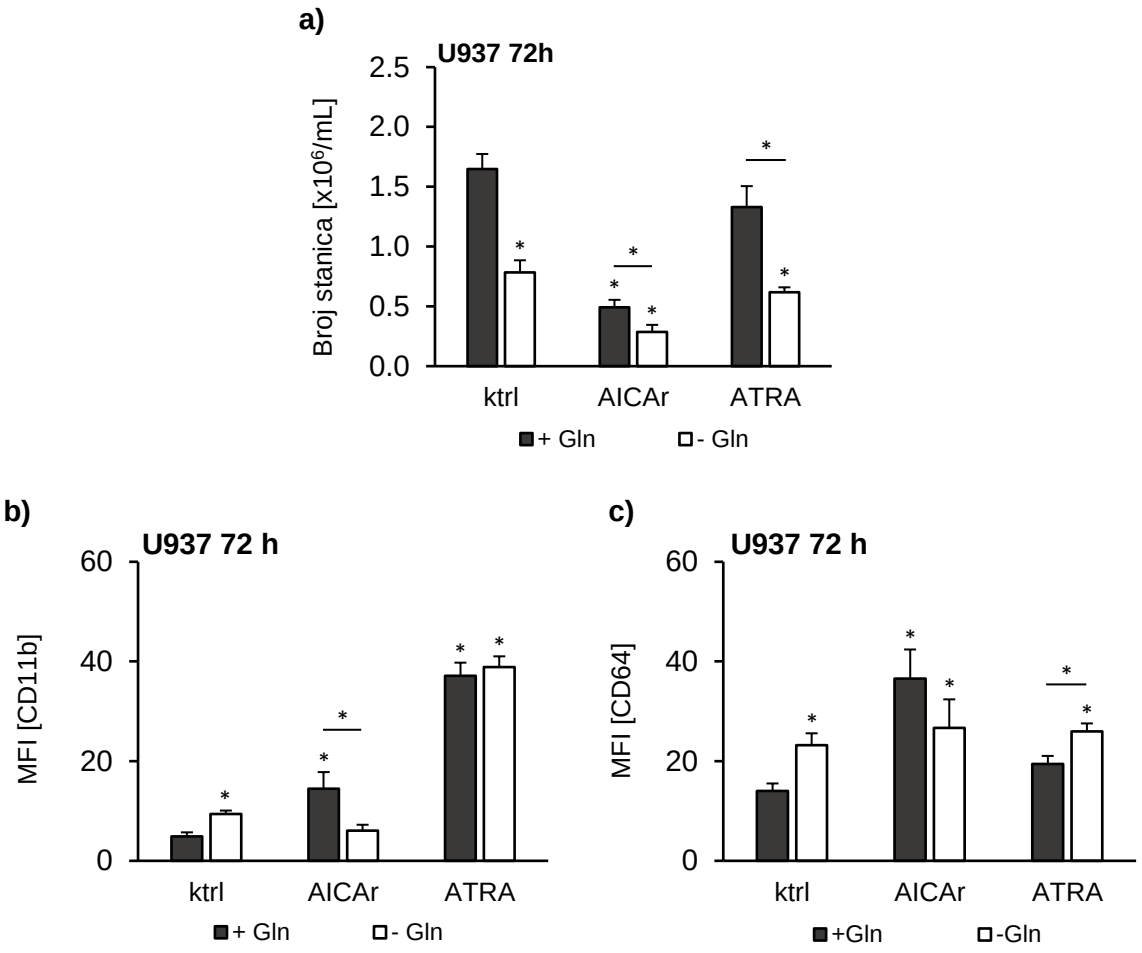
Dodatno, prethodno dodavanje BPTES-a nije poništilo učinak AICAr-a na smanjenje broja stanica (slika 3b), ali je značajno smanjilo izražaj biljega CD11b (slika 3c). Slično rezultatima prikazanim na slici 2d, BPTES nije statistički značajno utjecao na učinak AICAr-a na izražaj diferencijacijskog biljega CD64 (slika 3d). Primjerni histogrami podataka dobivenih protočnom citometrijom za CD11b u ovom pokusu prikazani su na slici 3e.

Budući da su rezultati pokusa prikazani na slikama 2c i 2d sukladni rezultatima prikazanim na slikama 3c i 3d, može se pretpostaviti da AICAr ostvaruje učinke na izražaj CD11b djelujući na metabolizam glutamina i njegovu razgradnju glutaminazom 1.



Slika 3. BPTES, farmakološki inhibitor GLS1, koči učinak AICAr-a na proizvodnju amonijaka te izražaj diferencijacijskih biljega. Stanice U937 inkubirane su u nazočnosti AICAr-a (0,5 mM), tijekom 72 h. BPTES je dodan 15 minuta prije dodavanja AICAr-a. Proizvodnja amonijaka (a) određena je komercijalno dostupnim testom, broj živih stanica (b) tripanskim modrilom, a izražaj biljega CD11b (c) i CD64 (d) protočnom citometrijom. e) Primjerni histogrami analize izražaja biljega CD11b; puna crta predstavlja izotipsku kontrolu, dok isprekidana crta predstavlja CD11b. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri pokusa ± S.E.M. * $p<0.05$

5.3. Metabolizam glutamina i učinci ATRA-e

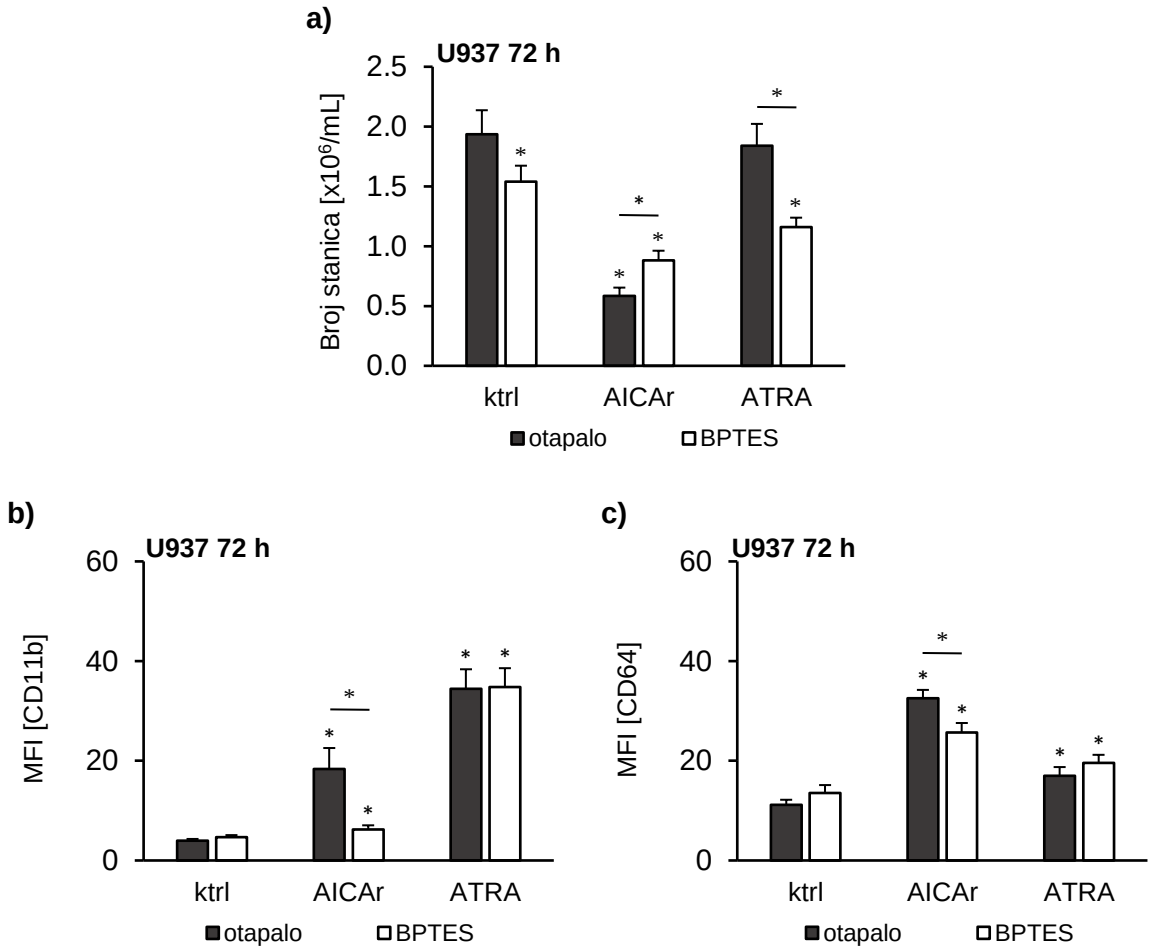


Slika 4. Učinci ATRA-e na povećani izražaj diferencijacijskih biljega ne ovise o glutaminu. Stanice U937 inkubirane su u nazočnosti AICAr-a (0,5 mM) i ATRA-e (1 μM), tijekom 72 h u mediju sa ili bez 2 mM glutamina. Broj živih stanica (a) određen je tripanskim modrilom, a izražaj biljega CD11b (b) i CD64 (c) protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost najmanje tri pokusa ± S.E.M. * $p<0.05$

Iako i AICAr i ATRA povećavaju izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama U937, ATRA nije povećavala produkciju amonijaka (slika 1c). Kako bismo dodatno potvrdili specifičnu ulogu metabolizma glutamina u učincima AICAr-a, ispitali smo utjecaj manjka glutamina na učinke AICAr-a i ATRA-e. Kao što je vidljivo na slici 4a, manjak glutamina smanjuje broj živih stanica u svim skupinama. Međutim, manjak glutamina u potpunosti koči učinke AICAr-a na izražaj CD11b, ali nema značajnog

učinka na izražaj biljega CD11b (slika 4b) u stanicama tretiranim ATRA-om te dodatno povećava izražaj biljega CD64 (slika 4c).

Svi rezultati prikazani na slici 4. dodatno su potvrđeni pokusima u kojima su stanice prethodno tretirane BPTES-om.



Slika 5. BPTES, farmakološki inhibitor GLS1, ne smanjuje izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama inkubiranima s ATRA-om. Stanice U937 inkubirane su u nazočnosti AICAr-a (0,5 mM) i ATRA-e (1 µM), tijekom 72 h. BPTES je dodan 15 minuta prije dodavanja AICAr-a. Broj živih stanica (a) određen je tripanskim modrilom, a izražaj biljega CD11b (b) i CD64 (c) protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost najmanje tri pokusa ± S.E.M. * $p<0.05$

Kao što je vidljivo na slici 5, BPTES sprječava povećanje izražaja biljega CD11b posredovano AICAr-om, ali nema učinaka na povećani izražaj CD11b i CD64 u stanicama koje su diferencirane pomoću ATRA-e. Dobiveni rezultati upućuju da je

ovisnost o metabolizmu glutamina specifična za diferencijaciju posredovanu AICAr-om, a da nije osobitost metaboličkih promjena nužnih za diferencijaciju stanica u odgovoru na ATRA-u.

6. Rasprava

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da ATRA smanjuje potrošnju glukoze i proizvodnju laktata u stanicama HL-60, kao što je i prethodno opisano (29). Budući da ATRA snažno potiče diferencijaciju leukemijskih stanica, ovi rezultati su očekivani jer i druge stanice većeg stupnja diferencijacije pokazuju smanjenu glikolitičku aktivnost i pojačanu aktivnost oksidativnog metabolizma u odnosu na matične stanice (30). Smatra se da anaerobni metabolizam prevladava u matičnim stanicama kako bi omogućio dostatnu sintezu ATP-a, a bez nastanka slobodnih radikala kisika koji mogu oštetiti DNA i tako narušiti njihovu cjeloživotnu funkciju obnavljanja. Nadalje, u anaerobnom metabolizmu intermedijeri glikolize mogu se koristiti kao preteče za sintezu drugih molekula bitnih za stanicu. Također, istraživanja su pokazala da je moguće utjecati na diferencijaciju stanica djelovanjem na metabolizam. Primjerice, blokiranjem oksidativnog metabolizma moguće je spriječiti diferencijaciju stanica, dok inhibicija glikolitičkih enzima i enzima puta pentoza fosfata ubrzava diferencijaciju. Objašnjenje ovog fenomena je da su intermedijeri metabolizma, kao što su ATP, acetil-CoA, uridin-difosfat-N-acetilglukozamin i S-adenozilmetionin ujedno i regulatori genske ekspresije. Primjerice, acetil-CoA bitan je za acetilaciju gena dok N-acetilglukozamin posttranslacijski modificira proteine uključene u izražaj gena (30).

Zamijetili smo i povećanu potrošnju glukoze u stanicama U937 u odnosu na kontrolne stanice HL-60, a ta se osobitost stanica U937 pripisuje mutaciji fosfataze PTEN koja u konačnici dovodi do povećane aktivnosti PI3K/Akt signalnog puta i pojačane glikolize (28). Metformin je očekivano pojačavao potrošnju glukoze i proizvodnju laktata u obje stanične linije jer su prethodna istraživanja (28) pokazala da metformin djeluje tako što koči respiracijski lanac te pojačava potrošnju glukoze i smanjuje potrošnju kisika u stanicama HL-60 i U937. AICAr nije imao značajnog utjecaja na potrošnju glukoze i proizvodnju laktata u obje stanične linije. Učinci AICAr-a u stanicama U937 prethodno nisu opisani, a učinci u drugim modelima ovise o vrstama stanica. Iako su AICAr i metformin najčešće rabljeni agonisti AMPK-a, sve više istraživanja pokazuje da su mnogi učinci ovih tvari na stanične odgovore neovisni o AMPK-u. Tako je opisano da su metabolički učinci metformina i AICAr-a u stanicama HEK-293 različiti jer metformin pospješuje, a AICAr koči potrošnju glukoze i proizvodnju laktata (17).

Međutim, AICAr je statistički značajno povećavao proizvodnju amonijaka u obje stanične linije, a ti učinci su izostali u stanicama koje su tretirane metforminom i ATRA-om. Svi naši pokusi u kojima smo stanice inkubirali u mediju bez glutamina ili u nazočnosti inhibitora GLS1 pokazali su da je glavni izvor amonijaka metabolizam glutamina, tj. glutaminoliza. Do sada, koliko nam je poznato, nije opisano da AICAr povećava proizvodnju amonijaka ili glutaminolizu, iako je opisana uloga glutamina i amonijaka u regulaciji signalnog puta AMPK/mTOR. Tako je opisano da amonijak aktivira mTOR u uvjetima uzgoja stanica Hep3B u mediju bez glutamina (42), ali i da pojačava autofagiju u stanicama U2OS tako što koči signalni put mTOR (41). Naša su dosadašnja istraživanja pokazala da AICAr i drugi agonisti diferencijacije stanica U937 potiču izražaj biljega autofagije i protok autofagije, ali da diferencijacija ne ovisi o ključnim proteinima klasičnog puta autofagije (43). Postoji mogućnost da nastanak amonijaka doprinosi povećanju biljega autofagije koji smo zamijetili u stanicama U937 nakon dugotrajnog (48 sati) izlaganja AICAr-u.

Naša istraživanje je po prvi puta pokazalo da učinci AICAr-a na izražaj diferencijacijskih biljega ovise o metabolizmu glutamina. Do sada su opisane različite uloge glutamina u diferencijaciji stanica. U mišjim embrionalnim matičnim stanicama opisano je da stanice koje se uzgajaju u mediju bez glutamina zadržavaju svojstvo pluripotentnosti (44). Nadalje, usmjeravanje hematopoetskih matičnih stanica ka pojedinoj liniji ovisi o nazočnosti glutamina jer se stanice nakon izlaganja eritropoetinu u mediju s glutaminom diferenciraju u smjeru eritrocita, a u mediju bez glutamina usmjeravaju ka mijeloidnoj lozi (35). Isto tako, polarizacija makrofaga u smjeru M1 i M2 ovisi o glutaminu jer je pri manjku glutamina moguća samo klasična aktivacija, a alternativna aktivacija u smjeru M2 izostaje (36).

U našem istraživanju nismo objasnili kako povećana glutaminoliza utječe na transkripciju gena odgovornih za diferencijaciju, ali su rezultati drugih autora uputili na moguću ulogu αKG i biosinteze nukleotida (35). Omjer αKG i sukcinata tako se smatra ključnim za učinke glutamina u mišjim embrionalnim matičnim stanicama (44) i polarizaciji makrofaga (36), a posljedica je regulacije histonske demetilaze Jumonji (JMJD3) koja je odgovorna za regulaciju transkripcije gena. Međutim, inhibicija glutaminaze u hematopoetskim matičnim stanicama ne može se nadomjestiti αKG-om nego samo dodatkom nukleotida (35). U našem bi modelu, stoga, također valjalo

ispitati moguću ulogu JMJD3, αKG i nukleotida u učincima AICAr-a na izražaj gena za CD11b i CD64.

7. Zaključci

1. ATRA smanjuje, metformin povećava, a AICAr nema značajnog učinka na potrošnju glukoze i proizvodnju laktata u stanicama HL-60 i U937.
2. AICAr povećava proizvodnju amonijaka koja ovisi o glutaminu i aktivnosti glutaminaze 1.
3. Učinci AICAr-a na izražaj diferencijacijskih biljega ovise o nazočnosti glutamina u mediju.
4. Farmakološki inhibitor glutaminaze 1 koči učinke AICAr-a na izražaj diferencijacijskih biljega.
5. Učinci AICAr-a na smanjenje broja stanica ne ovise o glutaminu i glutaminazi 1.
6. Učinci ATRA-e na povećani izražaj diferencijacijskih biljega ne ovise o glutaminu i aktivnosti glutaminaze 1.

8. Zahvale

Ovim putem želim zahvaliti prof. dr. sc. Dori Višnjić na mentoriranju ovog rada, ukazanom povjerenju i pruženoj prilici da sudjelujem na projektu i radu laboratorija.

Veliko hvala dr. sc. Vilmi Dembitz na izuzetnoj strpljivosti i nesebičnoj pomoći koju mi pružila za vrijeme učenja, rada u laboratoriju i pisanja ovog rada.

Hvala i ostalim djelatnicima iz laboratorija, osobito dr. sc. Hrvoju Laliću na svim korisnim savjetima i podršci kod prvog izlaganja postera.

Najveće hvala mojoj obitelji na podršci tijekom cijelog studija.

9. Popis literature

1. Wetzler M, Byrd JC, Bloomfield CD. Acute and Chronic Myeloid Leukemia. U: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, i ostali, ur. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17. izd. McGraw-Hill Professional; 2008. Str. 677-684.
2. Park JH, Qiao B, Panageas KS, Schymura MJ, Jurcic JG, Rosenblat TL, i ostali. Early death rate in acute promyelocytic leukemia remains high despite all-trans retinoic acid. Blood. 2011;118(5):1248–54.
3. de Thé H, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L, Dejean A. The PML-RARα fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. Cell. 1991;66(4):675–84.
4. de Thé H. Differentiation therapy revisited. Nat Rev Cancer. 2018;18(2):117–27.
5. 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 1980;77(5):2936–40.
6. Dalton WJ, Ahearn M, McCredie K, Freireich E, Stass S, Trujillo J. HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. Blood. 1988;71(1):242–7.
7. Grignani F, Ferrucci PF, Testa U, Talamo G, Fagioli M, Alcalay M, i ostali. The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RARα fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. Cell. 1993;74(3):423–31.
8. Laplante M, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. Cell. 2012;149(2):274–93.
9. Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, Grimaldi C, Manzoli L, McCubrey JA. Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling network in acute myelogenous leukemia. Expert Opin Investig Drugs. 2009;18(9):1333–49.
10. Yang Q, Modi P, Newcomb T, Queva C, Gandhi V. Idelalisib: First-in-Class PI3K Delta Inhibitor for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia, Small Lymphocytic Leukemia, and Follicular Lymphoma. Clin Cancer Res. 2015;21(7):1537–42.

11. Bertagnolo V, Neri LM, Marchisio M, Mischiati C, Capitani S. Phosphoinositide 3-kinase activity is essential for all-trans-retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 cells. Cancer Res. 1999;59(3):542–6.
12. Matkovic K, Brugnoli F, Bertagnolo V, Banfic H, Visnjic D. The role of the nuclear Akt activation and Akt inhibitors in all-trans-retinoic acid-differentiated HL-60 cells. Leukemia. 2006;20(6):941–51.
13. 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(3):645–56.
14. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Gery S, Koeffler HP, Yokoyama A. Inhibition of mammalian target of rapamycin signaling potentiates the effects of all- trans retinoic acid to induce growth arrest and differentiation of human acute myelogenous leukemia cells. Int J Cancer. 2009;125(7):1710–20.
15. 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(11):2253–61.
16. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13(4):251–62.
17. 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(28):3627–39.
18. Ruderman NB, Julia Xu X, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F, i ostali. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? Am J Physiol Metab. 2010;298(4):E751–60.
19. 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(10):2375–83.
20. Kim J, Yang G, Kim Y, Kim J, Ha J. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. Exp Mol Med. 2016;48(4):e224–e224.
21. Pinson B, Vaur S, Sagot I, Coulpier F, Lemoine S, Daignan-Fornier B. Metabolic intermediates selectively stimulate transcription factor interaction and modulate phosphate and purine pathways. Genes Dev. 2009;23(12):1399–407.

22. Lee WJ, Kim M, Park H-S, Kim HS, Jeon MJ, Oh KS, i ostali. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARα and PGC-1. Biochem Biophys Res Commun. 2006;340(1):291–5.
23. 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 Circ Physiol. 1999;277(2):H643–9.
24. Sengupta TK, Leclerc GM, Hsieh-Kinser T, Leclerc GJ, Singh I, Barredo JC. Cytotoxic effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-4-ribofuranoside (AICAR) on childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells: implication for targeted therapy. Mol Cancer. 2007;6(1):46.
25. Santidrián AF, González-Gironès DM, Iglesias-Serret D, Coll-Mulet L, Cosialls AM, de Frias M, i ostali. 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(16):3023–32.
26. Van Den Neste E, Cazin B, Janssens A, González-Barca E, Terol MJ, Levy V, i ostali. Acadesine for patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): a multicenter phase I/II study. Cancer Chemother Pharmacol. 2013;71(3):581–91.
27. El-Mir M-Y, 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(1):223–8.
28. Scotland S, Saland E, Skuli N, de Toni F, Boutzen H, Micklow E, i ostali. Mitochondrial energetic and AKT status mediate metabolic effects and apoptosis of metformin in human leukemic cells. Leukemia. 2013;27(11):2129–38.
29. Wu H, Scher BM, Chu CL, Leonard M, Olmedo R, Scher GS, i ostali. Reduction in lactate accumulation correlates with differentiation-induced terminal cell division of leukemia cells*. Differentiation. 1991;48(1):51–8.
30. Folmes CDL, Dzeja PP, Nelson TJ, Terzic A. Metabolic Plasticity in Stem Cell Homeostasis and Differentiation. Cell Stem Cell. 2012;11(5):596–606.
31. Willems L, Jacque N, Jacquel A, Neveux N, Trovati Maciel T, Lambert M, i ostali. Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. Blood. 2013;122(20):3521–32.
32. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in

cancer. Trends Biochem Sci. 2010;35(8):427–33.

33. Goto M, Miwa H, Shikami M, Tsunekawa-Imai N, Suganuma K, Mizuno S, i ostali. Importance of Glutamine Metabolism in Leukemia Cells by Energy Production Through TCA Cycle and by Redox Homeostasis. Cancer Invest. 2014;32(6):241–7.
34. Cory JG, Cory AH. Critical roles of glutamine as nitrogen donors in purine and pyrimidine nucleotide synthesis: asparaginase treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia. In Vivo. 2006;20(5):587–9.
35. Oburoglu L, Tardito S, Fritz V, de Barros SC, Merida P, Craveiro M, i ostali. Glucose and Glutamine Metabolism Regulate Human Hematopoietic Stem Cell Lineage Specification. Cell Stem Cell. 2014;15(2):169–84.
36. Liu P-S, Wang H, Li X, Chao T, Teav T, Christen S, i ostali. α-ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. Nat Immunol. 2017;18(9):985–94.
37. Spittler A, Oehler R, Goetzinger P, Holzer S, Reissner CM, Leutmezer F, i ostali. Low Glutamine Concentrations Induce Phenotypical and Functional Differentiation of U937 Myelomonocytic Cells. J Nutr. 1997;127(11):2151–7.
38. Wang F, Travins J, DeLaBarre B, Penard-Lacronique V, Schalm S, Hansen E, i ostali. Targeted Inhibition of Mutant IDH2 in Leukemia Cells Induces Cellular Differentiation. Science (80-). 2013;340(6132):622–6.
39. Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, Campos C, i ostali. An Inhibitor of Mutant IDH1 Delays Growth and Promotes Differentiation of Glioma Cells. Science (80-). 2013;340(6132):626–30.
40. Amatangelo MD, Quek L, Shih A, Stein EM, Roshal M, David MD, i ostali. Enasidenib induces acute myeloid leukemia cell differentiation to promote clinical response. Blood. 2017;130(6):732–41.
41. Eng CH, Yu K, Lucas J, White E, Abraham RT. Ammonia Derived from Glutaminolysis Is a Diffusible Regulator of Autophagy. Sci Signal. 2010;3(119):ra31–ra31.
42. Davie E, Forte GMA, Petersen J. Nitrogen Regulates AMPK to Control TORC1 Signaling. Curr Biol. 2015;25(4):445–54.
43. Dembitz V, Lalic H, Visnjic D. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside-induced autophagy flux during differentiation of monocytic leukemia cells. Cell

Death Discov. 2017;3(1):17066.

44. Carey BW, Finley LWS, Cross JR, Allis CD, Thompson CB. Intracellular α-ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. Nature. 2015;518(7539):413–6.

10. Životopis

Rođen sam u Zagrebu 22. lipnja 1994. godine gdje sam završio V. gimnaziju. Do 2014. godine bavio sam se plivanjem te sam kao sportaš II. kategorije Hrvatskog olimpijskog odbora nastupao kao član Hrvatske reprezentacije. Godine 2014. upisao sam Medicinski fakultet na Sveučilištu u Zagrebu na kojem imam odličan uspjeh. Od početka akademske godine 2016/2017 sudjelujem na projektu „Signalni mehanizmi i metaboličke promjene u diferencijaciji stanica akutne mijeloične leukemije“. Za vrijeme studija bio sam autor i koautor nekoliko sažetaka na znanstvenim kongresima, a za sažetak *Kodvanj I, Dembitz V, Višnjić D. „The role of glutamine metabolism in differentiation of acute monocytic leukemia cells“* na studentskom kongresu Croatian Student Summit 14 sam nagrađen nagradom za najbolji plakat. Godine 2018. nagrađen sam Dekanovom nagradom za znanstveni rad, a čiji je nastavak objavljen u *Journal of Biological Chemistry*, gdje sam također jedan od koautora. Za vrijeme studija bio sam jedan od voditelja Studentske sekcije za Fiziologiju sporta te član organizacijskog odbora prve studentske konferencije „Primijenjena fiziologija sporta“ koja se održala u travnju 2018. godine u Zagrebu. 2018. godine proveo sam mjesec dana u posjeti Sveučilišnoj bolnici Charité u Berlinu, a 2019. godine sudjelovao sam na ljetnoj školi Medicine u Sankt Peterburgu.