

Signalni mehanizmi i metaboličke promjene tijekom diferencijacije i proliferacije leukemijskih stanica

Tomić, Barbara

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:105:392291>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Barbara Tomić

**Signalni mehanizmi i metaboličke
promjene tijekom diferencijacije i
proliferacije leukemijskih stanica**

DISERTACIJA



Zagreb, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Barbara Tomić

**Signalni mehanizmi i metaboličke
promjene tijekom diferencijacije i
proliferacije leukemijskih stanica**

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

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 Višnjić

ZAHVALA

Prije svega, od srca zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Dori Višnjić na srdačnom pristupu, vodstvu i savjetima. Sigurna sam kako ne samo meni, nego i mojim kolegama, predstavlja uzor u vršenju poziva znanstvenika, ali također i mentora te sveučilišnog profesora. Zahvaljujem i divnoj kolegici, doc. dr. sc. Vilmi Dembitz, koja me je poučavala metodama istraživanja, strpljivo i temeljito te sa mnom nesebično dijelila svoje znanje. Njezina vedrina pretvarala je svaki dan rada u laboratoriju u lijepo iskustvo. Hvala gospođi Marijani Andrijašević na svojoj tehničkoj pomoći koju nam pruža iz dana u dan, ali također i na svakoj riječi ohrabrenja, mirnoći i podršci koju daruje svima oko sebe. Zahvaljujem i doc. dr. sc. Hrvoju Laliću na vrijednim savjetima vezanima uz neke od najzahtjevnijih metoda, na staloženosti i osobitom smislu za humor. Hvala dr. med. Tomislavu Smolji na nesebičnoj pomoći te uistinu lijepoj suradnji. Neizmjereno sam zahvalna i svojim roditeljima, na njihovoj velikoj požrtvornosti i svemu što su uložili u mene – svi moji rezultati su ujedno i Vaši. Hvala Robertu na pomoći oko lektoriranja ovog rada te što mi je bio oslonac u svemu proteklih mjeseci. Ovom bih prilikom također htjela zahvaliti i svojim dragim kolegama, a prije svega prijateljima, koji su vjerovali u mene i bili mi podrška tijekom izrade ovog doktorata; riječima ohrabrenja, spremnošću da me saslušaju, pomognu, te na osobite, sebi svojstvene načine svaki radni dan učine posebnim – poklonili ste mi divna sjećanja. Svima onima koji nisu mogli biti spomenuti u ovom kratkom tekstu, ovim se putem ispričavam. Ako ste na bilo kakav, pa i najmanji, način dotaknuli moj život, na tome sam Vam od srca zahvalna.

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA	1
1.1. Akutna mijeloična leukemija (AML).....	1
1.2. Diferencijacijska terapija u liječenju AML-a.....	2
1.3. Uloga staničnog metabolizma u proliferaciji i diferencijaciji stanica AML-a.....	3
1.4. Leukemijske stanične linije kao modeli u istraživanjima metabolizma i diferencijacije leukemijskih stanica	7
1.5. 5-aminoimidazol-4-karboksamid-ribonukleozid (AIKAr)	10
1.6. Signalni put ATR/Chk1	13
2. HIPOTEZA	19
3. CILJEVI RADA.....	20
3.1. Opći cilj.....	20
3.2. Specifični ciljevi	20
4. MATERIJALI I METODE	21
4.1. Kemikalije.....	21
4.2. Stanična kultura.....	23
4.3. Određivanje koncentracije glukoze, laktata i amonijaka u mediju	24
4.4. Određivanje izražaja površinskih staničnih biljega protočnom citometrijom	24
4.5. Analiza staničnog ciklusa.....	25
4.6. Izoliranje ukupnih staničnih lizata i Western blot analiza	25
4.7. Utišavanje proteinske ekspresije metodom siRNA-transfekcije.....	27
4.8. Metabolomička analiza pomoću LC/MS/MS	27
4.9. Statistička analiza.....	28
5. REZULTATI.....	29
5.1. AIKAr nema učinaka na potrošnju glukoze i stvaranje laktata, ali povećava stvaranje amonijaka	29
5.2. Povećano stvaranje amonijaka i izražaj diferencijacijskih biljega potaknuti AIKAr- om ovisni su o glutaminu	30

5.3. Dimetil- α -ketoglutarat i linolna kiselina ne mogu nadomjestiti manjak glutamina ili inhibiciju glutaminaze 1	32
5.4. Smjesa nukleozida i uridin sprječavaju AIKAr-om posredovani zastoj stanica u S-fazi staničnog ciklusa i povećanje izražaja biljega diferencijacije.....	33
5.5. AIKAr i brekvinar ostvaruju sinergistički učinak na stanični ciklus i diferencijaciju	37
5.6. AIKAr koči sintezu primidina <i>de novo</i>	38
5.7. AIKAr pospješuje aktivnost Chk1, a farmakološki inhibitori signalnoga puta ATR/Chk1 smanjuju njegove učinke na stanični ciklus i diferencijaciju	40
5.8. Smanjenje količine proteina Chk1 umanjuje učinke AIKAr-a na stanični ciklus i diferencijaciju u stanicama transficiranim specifičnom siRNA.....	43
5.9. Učinci AIKAr-a na stanični ciklus i diferencijaciju zamjećuju se i u drugim monocitnim staničnim linijama.....	44
5.10. Zastoj u S-fazi staničnog ciklusa potaknut AIKAr-om povezan je s inhibicijom Cdk1	48
5.11. Diferencijacija stanične linije MOLM-14 potaknuta AIKAr-om povezana je s povećanim izražajem transkripcijskog čimbenika PU.1	48
6. RASPRAVA	50
6.1. Učinci AIKAr-a na metabolizam glukoze i glutamina leukemijskih stanica.....	50
6.2. Učinci AIKAr-a posredovani su inhibicijom sinteze pirimidina <i>de novo</i>	53
6.3. Učinci AIKAr-a na aktivnost signalnoga puta ATR/Chk1	55
7. ZAKLJUČCI.....	60
8. SAŽETAK.....	61
9. SUMMARY	62
10. LITERATURA.....	63
11. ŽIVOTOPIS	82

POPIS KRATICA

α -KG	α -ketoglutarat
2-HG	2-hidroksiglutarat
ADP	adenozin-5'-difosfat
AIKAr	5-aminoimidazol-4-karboksamid-ribonukleozid
AIKAR	5-aminoimidazol-4-karboksamid-ribonukleotid
AML	akutna mijeloična leukemija
AMP	adenozin-5'-fosfat (prema engl. <i>adenosine-5'-monophosphate</i>)
AMPK	kinaza ovisna o AMP-u (AMPK, prema engl. <i>AMP-activated kinase</i>)
APL	akutna promijelocitna leukemija
ATP	adenozin-5'-trifosfat (prema engl. <i>adenosine-5'-triphosphate</i>)
ATR	ataksija telangiektazija-mutirana i povezana s Rad3 (prema engl. <i>ataxia-telangiectasia-mutated-and-Rad3-related</i>)
ATRA	sve-trans-retinska kiselina (prema engl. <i>all-trans-retinoic acid</i>)
BPTES	bis-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-il)-etil-sulfid (prema engl. <i>bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide</i>)
BSA	goveđi serumski albumin (prema engl. <i>bovine serum albumin</i>)
CD	biljeg diferencijacije (prema engl. <i>cluster of differentiation</i>)
CDC	protein ciklusa stanične diobe (prema engl. <i>cell division cycle protein</i>)
Cdk1	kinaza ovisna o ciklinima 1 (prema engl. <i>cyclin-dependent kinase 1</i>)
Chk1	kinaza kontrolne točke 1 (prema engl. <i>checkpoint kinase 1</i>)
ctrl	kontrola (prema engl. <i>control</i>)
DHO	dihidroorotat

DHODH	dihidroorotat-dehidrogenaza
DM- α KG	dimetil- α -ketoglutarat
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNA-PK	protein kinaza ovisna o DNA
FAB-klasifikacija	klasifikacija AML-a francuskih, američkih i britanskih patologa (prema engl. <i>the French-American-British (FAB) classification of AML</i>)
FBS	fetusni goveđi serum (prema engl. <i>fetal bovine serum</i>)
FITC	fluorescein-izotiocijanat (prema engl. <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FLT3	FMS-u slična tirozinska kinaza 3 (prema engl. <i>feline McDonough sarcoma (FMS)-like tyrosine kinase 3</i>)
G-CSF	čimbenik stimulacije granulocitnih kolonija (prema engl. <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>)
GLS1	glutaminaza 1 (prema engl. <i>glutaminase 1</i>)
GM-CSF	čimbenik stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (prema engl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
IC50	koncentracija koja uzrokuje 50-postotnu inhibiciju danoga parametra
IDH	izocitrat-dehidrogenaza
JAK	Janus kinaza
LA	linolna kiselina (prema engl. <i>linoleic acid</i>)
LC/MS/MS	tekućinska kromatografija s tandemskom spektrometrijom masa (prema engl. <i>liquid chromatography with tandem mass spectrometry</i>)
M-CSF	čimbenik stimulacije makrofagnih kolonija (prema engl. <i>macrophage colony-stimulating factor</i>)
MFI	srednji intenzitet fluorescencije (prema engl. <i>mean fluorescence intensity</i>)

MTHFD2	metilentetrahidrofolat-dehidrogenaza 2
mTOR	ciljna molekula rapamicina u sisavaca (prema engl. <i>mammalian/mechanistic target of rapamycin</i>)
mTORC1	kompleks 1 ciljne molekule rapamicina u sisavaca (prema engl. <i>mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1</i>)
OMP	orotidin-5'-fosfat (prema engl. <i>orotidine-5'-monophosphate</i>)
OPRT-ODC	orotat-fosforibozil-transferaza-orotidilat-dekarboksilaza (prema engl. <i>orotate phosphoribosyltransferase-orotidylic decarboxylase</i>)
PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatom (prema engl. <i>phosphate-buffered saline</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 α</i>)
PRPP	5-fosforibozil-1-pirofosfat (prema engl. <i>5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate</i>)
PTEN	homolog fosfataze i tenzina (prema engl. <i>phosphatase and tensin homolog</i>)
ROS	slobodni radikali kisika (prema engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RPA	replikacijski protein A (prema engl. <i>replication protein A</i>)
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>)
siRNA	mala interferirajuća RNA (prema engl. <i>small interfering RNA</i>)
STAT	prijenosnici signala i aktivatori transkripcije (prema engl. <i>signal transducers and activators of transcription</i>)
UMP	uridin-5'-monofosfat (prema engl. <i>uridine-5'-monophosphate</i>)

UMPS

UMP-sintaza

6BT

6-benziltioinozin

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Akutna mijeloična leukemija (AML)

Hematopoeza je proces nastanka zrelih staničnih komponentata krvi pri kojem je važna ravnoteža samoobnavljanja i umnažanja te diferencijacije (sazrijevanja) stanica. Do nastanka akutne mijeloične leukemije (AML) dolazi posljedično zastoju u mijeloidnoj diferencijaciji te nekontroliranom umnažanju nezrelih oblika stanica. AML je najčešći oblik akutne leukemije u odraslih, s medijanom dobi pri postavljanju dijagnoze od 68 godina, te je bez primjene terapije teška i smrtonosna hematološka bolest (1).

Iako je zapravo riječ o heterogenoj skupini različitih podtipova bolesti, uobičajeni protokol liječenja započinje primjenom citarabina i jednog kemoterapeutika iz antraciklinske skupine. Po indukciji remisije citotoksičnim lijekovima slijedi daljnja, konsolidacijska terapija te, u pacijenata u kojih ju je moguće provesti s obzirom na razinu rizika, transplantacija matičnih stanica koštane srži. Pritom su stope preživljenja niske za većinu podtipova AML-a, a uspjeh liječenja osobito nizak u starijih pacijenata koji, poglavito uz postojanje dodatnih komorbiditeta, teško podnose nuspojave liječenja (1).

Vrijedi spomenuti kako se od 2017. godine ostvario znatan napredak odobrenjem novih lijekova usmjerenih na mutirane inačice enzima poput kinaze FLT3 (FMS-u slična tirozinska kinaza 3, prema engl. *feline McDonough sarcoma (FMS)-like tyrosine kinase 3, FLT3*), midostaurina i gilteritiniba, te izocitrat-dehidrogenaze (IDH), ivosideniba i enasideniba, kao i inhibitora protuapoptotičnog proteina BCL2 (prema engl. *B-cell lymphoma 2*), venetoklaksa te ponovnog uvođenja gemtuzumab ozogamicina usmjerenog protiv molekule CD33 (1).

Međutim, i dalje se temeljem uspješnosti odgovora na liječenje među podtipovima AML-a ističe akutna promijelocitna leukemija (APL). U liječenju APL-a primjenjuje se *sve-trans* retinska kiselina (prema engl. *all-trans retinoic acid, ATRA*), kojom se potiče sazrijevanje zloćudnih stanica. Pretpostavlja se kako je osnovni način djelovanja ATRA-e njezino vezanje za fuzijski protein kodiran translokacijom *t(15;17)* karakterističnom za APL, čime se potiče njegova razgradnja i prekida zastoj u diferencijaciji stanice (2). Iako terapija ATRA-om predstavlja najuspješniji primjer diferencijacijske terapije u liječenju malignih bolesti sa stopom izlječenja višom od 90 %, ta je terapija ograničena na APL koji čini samo 10 – 15 % slučajeva AML-a, dok se drugi podtipovi AML-a najčešće i dalje liječe kombinacijom citotoksičnih lijekova (1,2). Iz tog se razloga proučavaju novi potencijalni pristupi liječenju

preostalih, tzv. ne-APL podtipova akutne mijeloične leukemije, kao i drugih malignih bolesti, na osnovi diferencijacijske terapije. Također, vrijedi spomenuti kako je djelovanje ATRA-e otkriveno na leukemijskoj staničnoj liniji HL60 (3), koja ne sadrži spomenutu translokaciju (4), kao ni proteinski produkt translokacije *t(15;17)*, fuzijski protein PML-RAR α (prema engl. *promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor α*) (5), ukazujući na činjenicu da mehanizmi poticanja diferencijacije stanica nisu u potpunosti razjašnjeni (6).

Ukorak s vremenom i dosezima dijagnostičkih metoda, podjela podtipova AML-a prošla je kroz značajne promjene. Izvorna, francusko-američko-britanska (FAB) klasifikacija obuhvaćala je podjelu na podtipove AML-M0 – M7 temeljenu na stupnju, odnosno ogranku hematopoeze kod kojeg je došlo do zastoja u sazrijevanju stanica, tj. na njihovim morfološkim i citokemijskim osobinama (7,8). Danas je u primjeni klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije, koja, uz citomorfološke i citokemijske karakteristike, obuhvaća i genetičke te citogenetičke osobine leukemijskih stanica. Njoj je pridružena i ELN-2017 (prema engl. *European LeukemiaNet, ELN*) stratifikacija, prognostičko stupnjevanje rizika koje pacijente smješta u jednu od tri skupine ishoda (povoljan, intermedijaran i nepovoljan), ovisno o citogenetičkom nalazu te mutacijskom statusu određenih gena (9). Međutim, novije studije, poput one koju su proveli Lo Presti i sur. metabolomičkom analizom većeg broja uzoraka pacijenata oboljelih od AML-a, ukazuju na utjecaj varijacija u metaboličkom reprogramiranju na odgovor na liječenje i prognozu bolesti (10).

U budućnosti je stoga moguće ponovno redefiniranje podtipova AML-a, kao i skupina bolesnika temeljeno na razlikama u metaboličkom profilu leukemijskih stanica te unapređenje i nadopuna postojećih klasifikacija. Nadalje, on bi mogao postati i temeljem individualnog terapijskog pristupa (11).

1.2. Diferencijacijska terapija u liječenju AML-a

Još je od sedamdesetih godina prošloga stoljeća poznato kako određeni citokini i druge molekule mogu potaknuti ireverzibilnu diferencijaciju stanica *ex vivo* (2). Budući da je AML hematološka bolest obilježena klonalnom proliferacijom nezrelih stanica (blasta) zaustavljenih u ranom stadiju diferencijacije, ograničenje svojstva samoobnavljanja te poticanje sazrijevanja stanica čini se kao obećavajuća strategija liječenja. Prethodno spomenuta primjena ATRA-e tako je preobrazila APL iz jednog od najsmrtonosnijih podtipova AML-a posljedično brzoj

progresiji i krvarenjima, u podtip s najboljom prognozom po liječenju kombinacijom ATRA-e i arsenovog trioksida (12,13).

Uz ATRA-u, važan primjer lijekova diferencirajućeg djelovanja su i inhibitori mutiranog oblika enzima izocitrat-dehidrogenaze (IDH-inhibitori) (14). Aktivnošću mutirane inačice enzima, umjesto alfa-ketoglutarata (α -KG) nastaje onkometabolitni produkt 2-hidroksiglutarat (2-HG) (15,16). Zbog strukturne sličnosti s α -KG-om, 2-HG kompetitivno inhibira enzime ovisne o α -KG-u uključene u regulaciju epigenetskih procesa poput metilacije histona i DNA, dovodeći do zastoja u staničnoj diferencijaciji (17), dok se inhibicijom spomenutog enzima potiče diferencijacija leukemijskih stanica (18,19). Mutacije ljudskih izoformi izocitrat-dehidrogenaze, IDH1 i IDH2, prisutne su u oko 10 – 20 % slučajeva AML-a (20,21) te su inhibitor IDH1, ivosidenib, i inhibitor IDH2, enasidenib, prvi lijekovi odobreni za njihovo liječenje od strane Američke agencije za hranu i lijekove (prema engl. *Food and Drug Administration, FDA*) (1). Rezultati kliničkih ispitivanja pokazuju kako ivosidenib potiče diferencijaciju blasta te uspješno dovodi do remisije u pacijenata koji nisu odgovorili na standardne protokole liječenja (22), dok enasidenib uspješno ostvaruje remisije u starijih pacijenata (23,24). Pritom vrijedi napomenuti kako se smatra da, izuzev učinaka na same leukemijske stanice, IDH-inhibitori ostvaruju i povoljne učinke na njihov mikrookoliš, odnosno stromu, modulacijom citokinskog odgovora (25).

Djelotvornost IDH inhibitora pobudila je interes za proučavanje uloge metabolizma u diferencijaciji stanica te su utvrđeni novi mogući ciljevi poput enzima metilentetrahidrofolat-dehidrogenaze 2 (MTHFD2) (26) i dihidroorotat-dehidrogenaze (DHODH) (27). Tako su upravo biokemijski mehanizmi uključeni u diferencijaciju malignih stanica postali fokusom novijih istraživanja.

1.3. Uloga staničnog metabolizma u proliferaciji i diferencijaciji stanica AML-a

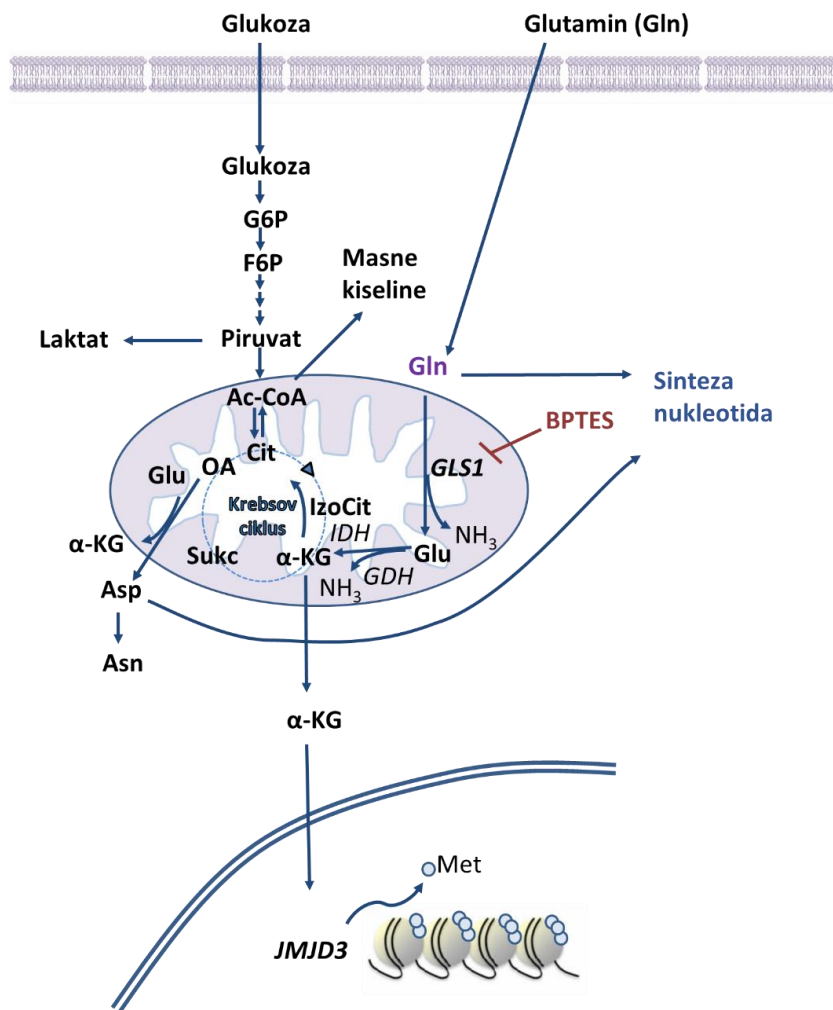
Poznato je kako se metabolički procesi malignih stanica znatno razlikuju od onih karakterističnih za fiziološke uvjete. To se ponajprije odnosi na metabolizam glukoze, uključujući prelazak na aerobnu glikolizu (tzv. Warburgov učinak), ali također i na Krebsov ciklus (ciklus trikarboksilnih kiselina, ciklus limunske kiseline), metabolizam masnih kiselina, glutamina te nukleotida (28).

Za većinu je malignih stanica karakterističan Warburgov učinak, metaboliziranje glukoze glikolizom do laktata čak i u aerobnim uvjetima. Pretpostavlja se kako takav oblik metabolizma omogućuje veću dostupnost međuprodukata glikolize koji su potom stanici na raspolaganju za upotrebu u anaboličkim putevima poput puta pentoza-fosfata (29). Pri radu s pacijentima uočena je povezanost njihovog metaboličkog statusa i težine bolesti, odnosno hiperglikemije i prognoze AML-a. Veće koncentracije glukoze povezane su s nižim stopama remisije i povećanim mortalitetom u oboljelih od AML-a (30,31). Štoviše, čini se da leukemijske stanice utječu na metabolizam glukoze i njegovu regulaciju, primjerice izazivanjem inzulinske rezistencije, te da povećana dostupnost glukoze pri hiperglikemiji omogućuje veći priljev tog supstrata za potrebe njihovih energetskih procesa (32). Poznato je kako se maligne pa tako i leukemijske stanice oslanjaju ponajprije na glikolitički put u odnosu na metaboliziranje glukoze kroz oksidativnu fosforilaciju u svrhu namicanja energije, jer se glikolizom osigurava velik priljev međuprodukata za biosintetske procese (33–35), kao što je prethodno spomenuto. Također, upravo glikoliza ima važnu ulogu u otpornosti na arsenov trioksid, kao i u diferencijaciji stanica *in vitro* (36). U leukemijskoj liniji HL60, Wu i sur. (37) pokazali su da ATRA smanjuje potrošnju glukoze tijekom procesa diferencijacije. U stanicama U937 Scotland i sur. (38) utvrdili su da tvari koje potiču apoptozu stimuliraju glikolizu povećavajući potrošnju glukoze i stvaranje laktata.

Metabolizam masnih kiselina leukemijskim je stanicama također važan radi staničnog rasta, ali i preživljenja, odnosno izbjegavanja apoptoze (39). Osim toga, poznato je i kako linolna kiselina uzrokuje neutrofilnu diferencijaciju (40).

Glutamin je važan izvor ugljika za Krebsov ciklus, dušika za sintezu nukleotida, ali i supstrat u sintezi glutathiona, važnog u održavanju homeostaze redoks-sustava stanice (41,42). Glutamin se, susljedno djelovanju glutaminaze i nastanku glutamata, u stanicama koristi kao izvor α -KG-a za Krebsov ciklus (Slika 1). Održavanjem anaplerotske reakcije glutamin se, uz glukožu, smatra glavnim izvorom energije potrebne za rast i umnažanje malignih stanica (42,43). Shodno tome, u malignim je stanicama, u usporedbi s normalnim stanicama, povećana potrošnja, odnosno metabolizam glutamina (29,44). Iz tih je razloga ograničenje unosa i metabolizma glutamina razmatrano kao mogući terapijski pristup u liječenju AML-a (43,45–48). Istraživanje provedeno na staničnim linijama HL60, NB4 i THP-1 utvrdilo je smanjenje proliferacije stanica posljedično nedostatku glutamina te da je taj učinak na liniju HL60, koja se pokazala najosjetljivijom na manjak glutamina, moguće poništiti dodatkom oksaloacetata,

čime se nadoknađuju međuprodukti Krebsovog ciklusa (49). Analogno tome, u novijim je studijama opisano kako se dodavanjem egzogenog α -KG-a u dimetiliranom obliku, čime je omogućen njegov ulazak u stanice, može nadomjestiti manjak glutamina tijekom alternativne (M2) aktivacije makrofaga (50) i diferencijacije stanica Th2 (51). Poznato je da primjerice α -KG, putem povećanja demetilacije DNA i histona, omogućuje pluripotentnost embrionalnih matičnih stanica te dodatak α -KG u obliku za koji su stanice propusne potiče njihovo samoobnavljanje (52) (Slika 1).

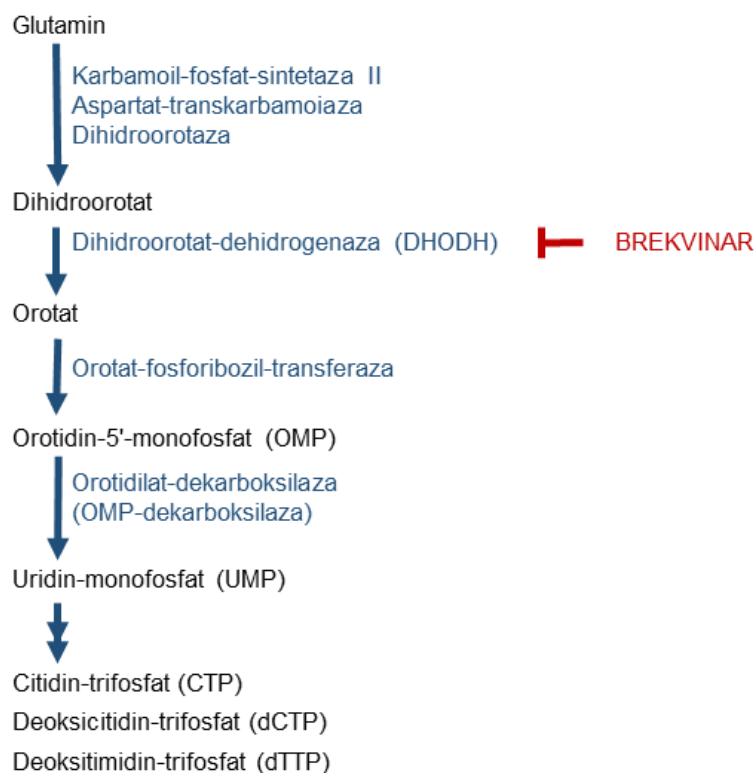


Slika 1. Shematski prikaz metabolizma glutamina u stanici. Unutar stanice glutamin ima važne uloge kao donor ugljika za međuprodukte Krebsovog ciklusa te kao donor dušika za sintezu nukleotida. Kratice (abecednim redom): α -KG – α -ketoglutarat, Ac-CoA – acetil-koenzim A, Asp – aspartat, Asn – asparagin, BPTES – bis-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-il)etil-sulfid (prema engl. *bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide*), Cit – citrat, F6P – fruktoza-6-fosfat (prema engl. *fructose 6-phosphate*), G6P – glukoza-6-fosfat (prema engl. *glucose 6-phosphate*), GDH – glutamat-dehidrogenaza, Gln – glutamin, GLS1 – glutaminaza 1, Glu – glutamat, IDH – izocitrat-dehidrogenaza, IzoCit – izocitrat, JMJD3 – histonske lizinske demetilaze koje sadrže domenu Jumonji 3, Met – metilna skupina, OA – oksaloacetat, Sukc – sukcinat.

Osim u proliferaciji, poznata je i važnost glutamina u autofagiji i diferencijaciji stanica. Amonijak koji nastaje procesom glutaminolize smatra se jednim od regulatora autofagije (44). Opisana je i uloga glutamina u eritroidnom sazrijevanju matičnih stanica (53) i prethodno spomenutoj alternativnoj aktivaciji makrofaga (50). Također, istraživanje provedeno na staničnoj liniji U937 pokazalo je da manjak glutamina pospješuje diferencijaciju leukemijskih stanica u monocitnom smjeru (54).

Metabolizam nukleotida od velikog je značaja za tumorske pa tako i leukemijske stanice ponajprije radi namicanja dovoljne količine supstrata za umnažanje genetskog materijala prethodno diobi. Poznato je da je u malignih stanica povećan izražaj enzima nukleotidnog anabolizma i sinteze DNA uz smanjenje izražaja enzima uključenih u razgradnju purina i pirimidina (55–57). Osim što omogućuje pojačanu proliferaciju stanica, suvišak nukleotida također povećava i vjerojatnost njihove pogrešne ugradnje prilikom sinteze DNA te smanjuje uspješnost mehanizama popravka molekule, što u konačnici dovodi do povećane stope mutacija i pospješnja leukemogeneze. S druge strane, više je istraživanja pokazalo da inhibicija sinteze DNA može dovesti do diferencijacije i gubitka klonogenog potencijala leukemijskih stanica (55,58–60). Primjerice, inhibitori polimerizacije DNA, kao što su analozi prirodnih nukleozida, potiču diferencijaciju stanica HL60 (55,58,59).

Jedna od novijih studija koju su proveli Sykes i sur., temeljena na analitičkom probiru velikog broja molekula u svrhu pronalaženja onih koje imaju sposobnost nadvladavanja zastoja u diferencijaciji leukemijskih stanica, pokazala je da je ta sposobnost najizraženija u molekula koje inhibiraju enzim DHODH (27). Brekvinar, poznati inhibitor DHODH-a, pospješuje diferencijaciju leukemijskih stanica U937 *in vitro* te presatka ljudskih leukemijskih staničnih linija miševima *in vivo*. Pritom je utvrđeno smanjenje ukupnog broja leukemijskih stanica, kao i ishodišnih stanica leukemije (prema engl. *leukemia-initiating cells, LICs*) te povećanje ukupnog preživljenja na mišjem modelu *in vivo*. U spomenutoj je studiji pokazano kako opisani učinci nisu posljedica suviška dihidroorotata (DHO), nego manjka uridin-5'-monofosfata (prema engl. *uridine-5'-monophosphate, UMP*) te da se diferencijacija može poništiti dodatkom uridina. Nadalje, pirazofurin, inhibitor orotidin-5'-fosfat-dekarboksilaze, ostvario je učinke analogne inhibitoru DHODH-a. Ti rezultati sugeriraju kako je diferencijacija stanica u odgovoru na inhibitore DHODH-a posljedica manjka nukleotida posljedično inhibiciji puta sinteze pirimidina *de novo* (27) (Slika 2).



Slika 2. Shematski prikaz sinteze pirimidina *de novo* i djelovanja brekvinara.

1.4. Leukemijske stanične linije kao modeli u istraživanjima metabolizma i diferencijacije leukemijskih stanica

Različiti su metabolički putevi uključeni u unutarstanično metaboličko reprogramiranje ovisno o genetskim karakteristikama stanica AML-a. Također, ovisno o razini na kojoj je diferencijacija zaustavljena, u leukemijskim su progenitorima aktivni različiti metabolički „programi“, tj. skupine metaboličkih procesa (10). Postojanje modela različitih tipova i podtipova AML-a u vidu različitih staničnih linija ljudskih leukemija, od iznimne je važnosti za istraživanja mehanizama nastanka AML-a, kao i novih terapijskih pristupa, osobito na razini staničnog metabolizma. Osnovna obilježja leukemijskih staničnih linija korištenih u ovom istraživanju sažeto su prikazana u Tablici 1.

Linija HL60 na kojoj su izvorno bili utvrđeni diferencirajući učinci ATRA-e postala je prototipom stanične linije za istraživanje diferencijacije malignih stanica. Međutim, iako ATRA u stanicama HL60 ostvaruje diferencirajuće učinke nalik onima u stanicama APL-a

(AML-M3), već je vrlo rano utvrđeno kako bi prema FAB-klasifikaciji tu staničnu liniju trebalo svrstavati u akutnu mijeloblastičnu leukemiju sa sazrijevanjem (AML-M2) (4).

Tablica 1. Obilježja korištenih leukemijskih staničnih linija (61,62).

stanična linija	karakteristike bolesnika iz kojeg je linija izolirana		izvor	FAB (citologija)	imunofenotip	kariogram	prisutne mutacije
	spol	dob					
HL60	Ž	35	periferna krv	M2 (AML sa sazrijevanjem)	CD3 ⁻ , CD4 ⁺ , CD13 ⁺ , CD14 ⁻ , CD15 ⁺ , CD19 ⁻ , CD33 ⁺ , CD34 ⁻ , HLA-DR ⁻	Kompleksni; <i>t(5;17)(q11;q11)</i> , amplifikacija <i>c-myc</i>	<i>CDKN2A</i> , <i>NRAS</i> , <i>TP53</i>
NB4	Ž	23	koštana srž	M3 (akutna promijelocitna leukemija)	CD3 ⁻ , CD4 ⁺ , CD11b ⁻ , CD13 ⁺ , CD14 ⁻ , CD15 ⁺ , CD19 ⁻ , CD33 ⁺ , CD34 ⁻ , CD38 ⁺ , HLA-DR ⁻	Kompleksni; <i>t(15;17)</i>	<i>PML-RARA</i> , <i>KRAS</i> , <i>TP53</i>
MOLM-14	M	20	periferna krv	M5a/post MDS-RAEB (akutna monoblastna leukemija)	CD3 ⁻ , CD4 ⁺ , CD13 ⁺ , CD14 ⁻ , CD15 ⁺ , CD19 ⁻ , CD33 ⁺ , CD34 ⁻ , cyCD68 ⁺ , CD64 ⁺	Kompleksni; <i>t(9;11)</i> , +8, +13	<i>KMT2A-MLLT3</i> , <i>FLT3-ITD</i> , <i>CBLdelta exon8</i>
THP-1	M	1	periferna krv	M5 (akutna monocitna leukemija)	CD3 ⁻ , CD4 ⁺ , CD13 ⁺ , CD15 ⁺ , CD19 ⁻ , CD34 ⁻ , cyCD68 ⁺ , HLA-DR ⁺ , CD64 ⁺	Kompleksni; <i>t(9;11)</i>	<i>CSNK2A1-DDX39B</i> , <i>KMT2A-MLLT3</i> , <i>NRAS</i> , <i>TP53</i>
U937	M	37	pleuralni izljev	M5/histiocitni limfom	CD3 ⁻ , CD4 ⁺ , CD14 ⁻ , CD15 ⁺ , CD19 ⁻ , CD33 ⁺ , CD34 ⁻ , CD54 ⁺ , CD64 ⁺	Kompleksni; <i>t(10;11)</i> , <i>t(1;5)</i>	<i>PICALM-MLLT10</i> , <i>PTEN</i> , <i>TP53</i>

S obzirom na nedostatak translokacije *t(15;17)* i nepostojanje fuzijskog transkripta, u tom je vidu nadopunjuje linija NB4. Iako primjerice morfološki ni te stanice ne posjeduju zrnca tipična za APL, stanice leukemijske linije NB4 sadrže translokaciju *t(15;17)* te se svrstavaju u AML-M3 podtip. Štoviše, riječ je o liniji podrijetlom iz uzorka koštane srži bolesnice s relapsom APL-a (63).

Kod stanica HL60 također je zanimljiva njihova mogućnost diferencijacije u smjeru različitih loza mijeloidnog tipa, ovisno o tvari kojom se diferencijacija potiče te o uvjetima u kojima se stanica nalazi. ATRA potiče granulocitnu diferencijaciju (3), citarabin sazrijevanje u

monocitnom smjeru (58), a esteri forbola sazrijevanje u smjeru makrofaga (64,65). HL60 stanice se stoga, izuzev sazrijevanja u granulocite, koriste i kao pouzdan model monocitno-makrofagne diferencijacije (66–68). Stanice leukemijskih linija U937 i THP-1 svrstavaju se u monocitno-usmjereni podtip AML-a te su u upotrebi kao model u istraživanjima diferencijacije monocita i makrofaga, pri čemu se međusobno razlikuju u statusu mutacija. Iako je stanična linija U937 izvorno izolirana iz pleuralnog izljeva bolesnika oboljelog od difuznog histiocitnog limfoma, treba napomenuti kako se zbog svojih karakteristika svrstava u AML-M5 podtip (akutna monoblastično-monocitna leukemija) (69). Stanice U937 pod utjecajem ATRA-e (70), kao i estera forbola (71) sazrijevaju u monocitno-makrofagnom smjeru. Linije U937 i THP-1 korištene su u novijim studijama posvećenima diferencijaciji te proučavan njihov odgovor na inhibitor DHODH-a brekvinar (27) i citarabin (72).

Nadalje, vrijedi istaknuti kako je posebnost linije MOLM-14, koja također diferencira u mijeloidnom smjeru (73), među ranije spomenutim staničnim linijama, divlji tip gena *p53*, koji kodira tumorsupresorski protein p53, budući da je on u stanicama linija HL60, NB4, U937 i THP-1 mutiran (Tablica 1) (61,62).

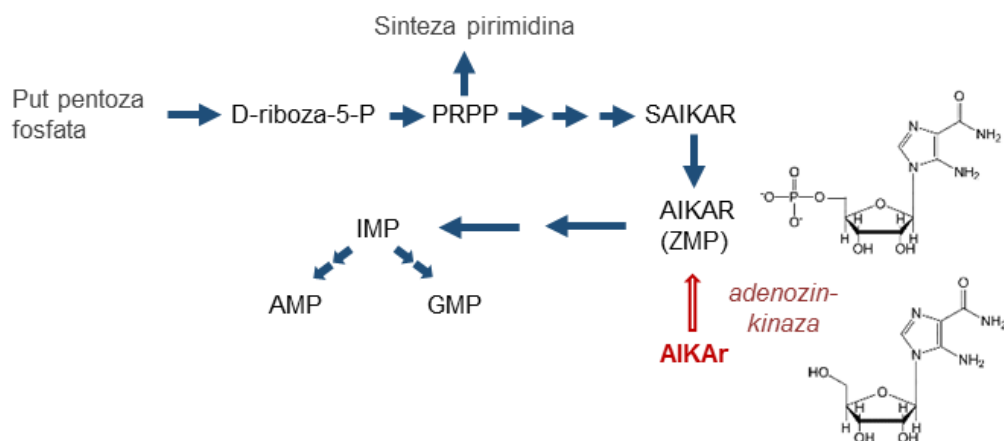
Varijabilnost leukemijskih podtipova, kao i statusa mutacija različitih leukemijskih staničnih linija odražava se na njihove metaboličke i pridružene procese. Primjerice, za razliku od stanične linije HL60, u stanicama U937, posljedično deleciji tumorsupresorskog gena *PTEN* (prema engl. *phosphatase and tensin homolog*) koji kodira za istoimenu fosfatazu, povećana je aktivnost glikolitičkog puta i u bazalnim uvjetima (38). Osim povećanog metabolizma glukoze, inaktivacijom *PTEN*-a u stanicama dolazi do smanjenja popravka DNA te smanjene aktivnosti signalnih puteva kontrolnih (restriksijskih) točaka u odgovoru na oštećenje DNA (prema engl. *DNA damage checkpoint pathways*) (74). Istraživanje koje su proveli Mathur i sur. utvrdilo je ulogu povezanosti metabolizma glutamina i sinteze nukleotida u *PTEN*^{-/-} stanicama. Povećani rast takvih stanica pokazao se ovisnim o korištenju glutamina u sintezi pirimidina *de novo*, što ih je činilo osjetljivima na djelovanje inhibitora DHODH-a. U tim je stanicama povećan broj replikacijskih vilica DNA u S-fazi staničnog ciklusa te su inhibitori DHODH-a doveli do lomova kromosoma i stanične smrti posljedično oštećenju replikacijskih vilica. Važnu ulogu u tome imala je neadekvatna aktivacija kontrolne točke posredovane kinazom ATR (prema engl. *ataxia-telangiectasia-mutated-and-Rad3-related kinase*) (74).

Stanične linije kao modeli sastavljeni od većinski uniformnih stanica omogućuju da se praćenjem promjena u izražaju biljega karakterističnih za određene stupnjeve i smjerove

sazrijevanja stanica proučava stanična diferencijacija. U kontekstu monocitno-makrofagne diferencijacije od osobite su važnosti biljezi CD11b i CD64. Molekula CD11b pripada proteinskoj obitelji integrina te je važna za adheziju, odnosno migraciju leukocita (75). Također, djeluje i kao receptor komponente komplementa C3bi, omogućujući fagocitozu čestica opsoniziranih komplementom (76). Osim na stanicama monocitno-makrofagnog tipa, molekula CD11b može biti izražena i na granulocitima te stanicama NK (76). Molekula CD64 visokim afinitetom veže Fc-fragment protutijela IgG tipa te je poznata i kao Fc-receptor gama (Fc γ RI) sudjelujući u staničnoj aktivaciji. Uobičajeno je prisutna na monocitima i makrofagima, međutim, moguće je potaknuti njezin izražaj i na leukocitima granulocitnog tipa tretiranjem tih stanica određenim citokinima poput interferona gama (77).

1.5. 5-aminoimidazol-4-karboksamid-ribonukleozid (AIKAr)

5-aminoimidazol-4-karboksamid-ribonukleozid (AIKAr) ili akadezin poznati je aktivator kinaze ovisne o AMP-u (prema engl. *AMP-activated kinase*, AMPK). Kao egzogeni spoj, AIKAr ulazi u stanicu putem adenzinskih transportera te biva fosforiliran adenzinskom kinazom u AIKA-ribonukleotid ili ribotid (AIKAR, ZMP). Endogeni je AIKAR evolucijski očuvani unutarstanični međuprodukt u biosintezi purina *de novo* te je poznato da dolazi do njegovog nakupljanja u sklopu poremećaja sinteze purina poput Lesch-Nyhanovog i srodnih sindroma (78) (Slika 3). Zbog strukturnih sličnosti s adenzinom, AIKAr je prvotno bio osmišljen kao blokator ponovne pohrane adenzina u ishemičnoj bolesti srca (79). Po otkriću djelovanja AIKAR-a kao alosteričkog aktivatora AMPK-a, korišten je u brojnim studijama metabolizma, kao i inzulinskih signalnih puteva (80). Zbog strukturne sličnosti s AMP-om, AKAR se veže za γ -podjedinicu te alosterički aktivira AMPK, iako 40-ak puta slabije u odnosu na AMP (78).



Slika 3. Shematski prikaz sinteze purina *de novo*. Kratice (abecednim redom): AMP – adenzin-5'-fosfat (prema engl. *adenosine-5'-monophosphate*), AIKAr – 5-amino-4-imidazolkarboksamid-ribonukleozid, AIKAR – 5-amino-4-imidazolkarboksamid-ribonukleotid, D-riboza-5-P – D-riboza-5-fosfat (prema engl. *D-ribose-5-phosphate*), GMP – gvanozin-5'-monofosfat (prema engl. *guanosine-5'-monophosphate*), IMP – inozin-5'-monofosfat (prema engl. *inosine-5'- monophosphate*), PRPP – 5-fosforibozil-1-pirofosfat (prema engl. *5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate*), SAIKAR – sukcinil-5-aminoimidazol-4-karboksamid-1-riboza-5'-fosfat.

AMPK je enzim koji ima središnju ulogu u regulaciji staničnog metabolizma (81,82). Povećanje omjera AMP-a i ADP-a u odnosu na ATP dovodi do aktivacije AMPK-a te poticanja kataboličkih puteva, uz istovremenu inhibiciju anaboličkih puteva (78,82). Sukladno tome, ta se evolucijski očuvana serin/treonin-kinaza aktivira u odgovoru na procese koji dovode do manjka energije u stanici poput gladovanja, hipoksije, ishemije, mišićne kontrakcije, odnosno tjelovježbe te otrovanja metaboličkog tipa (82,83). AMPK ima ulogu u fiziološkoj hematopoezi, ali i u leukemogenezi, pri čemu ona nije jednoznačna. Primjerice, AMPK je važan u prilagodbi stanica na nepovoljne metaboličke uvjete, poput manjka hranjivih tvari. Istraživanje koje su proveli Saito i sur. (84) pokazalo je kako ishodišne stanice leukemije prilikom leukemogeneze mijeloidnog tipa, mehanizmom ovisnim o AMPK-u bivaju zaštićene od metaboličkog stresa izazvanim manjkom glukoze. S druge strane, višestrukim mehanizmima kao što su povećanje metabolizma i aktivacija autofagije, AMPK osigurava hranjive tvari i energiju potrebne za proces diferencijacije stanica (85). Osim toga, pokazano je kako aktivacija AMPK-a potiče fagocitozu makrofaga i neutrofila (86). Također, AMPK je negativni regulator staničnog rasta i proliferacije kao procesa koji podrazumijevaju potrošnju energije (85). Poznato je kako AMPK inhibira rast brojnih hematoloških novotvorina te, primjerice, potiče apoptozu stanica kronične B-limfocitne leukemije i zaustavlja stanični rast u limfoma plaštene zone (87,88). Izravni i neizravni farmakološki aktivatori AMPK-a iz tog su razloga proučavani

kao spojevi potencijalnih antitumorskih svojstava, kako u solidnih tumora (89), tako i u hematoloških malignih bolesti poput leukemija (90–92).

Metformin, bigvanid najpoznatiji kao zlatni standard u liječenju šećerne bolesti tipa 2, neizravni je aktivator AMPK-a te upravo tim mehanizmom ostvaruje većinu svojih blagotvornih učinaka. Inhibirajući kompleks 1 dišnog lanca oksidativne fosforilacije u mitohondrijima, metformin dovodi do povećanja omjera AMP-a u odnosu na ATP, što dovodi do aktivacije AMPK-a. Ta je opažanja potvrdila studija koja je utvrdila da aktivacija AMPK-a posredovana metforminom izostaje ukoliko regulatorna γ -podjedinica AMPK-a nije osjetljiva na AMP (93). Istraživanje koje su proveli Zhou i sur. (94) utvrdilo je da metformin aktivira AMPK te povećava unos glukoze u stanice i oksidaciju masnih kiselina, uz usporedno smanjenje proizvodnje glukoze u jetri i smanjenje izražaja gena koji kodiraju za proteine važne u lipogenezi. Međutim, vrijedi spomenuti kako je dio učinaka metformina neovisan o aktivaciji AMPK (38,95,96).

Temeljem rezultata više različitih epidemioloških studija u kojima je utvrđena povezanost uzimanja metformina i smanjenog rizika obolijevanja od karcinoma debelog crijeva, prostate i gušterače, metformin počinje biti predmetom istraživanja usmjerenih proučavanju njegovih potencijalnih protutumorskih svojstava (89). Ona su potvrđena u solidnih tumora poput karcinoma prostate, jajnika i dojke (89), ali također i u različitim tipova leukemija poput kronične mijeloične leukemije (92), akutne limfatične leukemije (91,92,97) te AML-a (98), kod kojih je metformin ostvario antiproliferativna i proapoptotična svojstva. Vrijedi napomenuti kako se u staničnim linijama AML-a, kao što su U937, HL60 i MOLM-14, proapoptotični učinci metformina nisu pokazali ovisnima o AMPK-u, već su povezani s povećanjem glikolize (38). Pritom su se učinci razlikovali između pojedinih staničnih linija te je dodatak metformina stanicama HL60 i MOLM-14 značajno potaknuo apoptozu, što nije bio slučaj u linije U937. Također, razlikovao se i učinak metformina na stanični ciklus jer su stanice HL60 i MOLM-14 bile zaustavljene u napredovanju iz S-faze u G₂/M-fazu staničnog ciklusa, dok su stanice U937 zaustavljene u G₀/G₁-fazi (38).

Otkrićem antiproliferativnih učinaka metformina i drugih agonista AMPK-a na maligne stanice, i AIKAr počinje biti proučavan u kontekstu liječenja malignih bolesti (90,99) te je opisano njegovo citotoksično djelovanje na stanice limfocitnih leukemija i limfoma (87,91,92,100).

Naše prethodno istraživanje pokazalo je da AIKAr i metformin ostvaruju slične učinke na smanjenje broja živih stanica leukemijskih linija (101). U istraživanju Huai i sur. (102) provedenom na više različitih staničnih linija metformin je pokazao proapoptotična svojstva u linijama NB4 i HL60. Međutim, rezultati pokusa provedenih na staničnoj liniji NB4 pokazali su kako metformin može potaknuti diferencijaciju stanica APL-a u mijelocitnom i metamijelocitnom smjeru, dok to nije bio slučaj s ne-APL linijama (102). Sukladno tome, u našem prethodnom istraživanju, metformin nije ostvario diferencirajući učinak u stanicama U937 (101). Nadalje, rezultati našeg istraživanja pokazali su kako AIKAr potiče diferencijaciju stanica leukemijske stanične linije U937 u monocitnom smjeru mehanizmom neovisnim o AMPK-u povećavajući izražaj staničnih biljega diferencijacije CD11b i CD64 (101). Učinci AIKAr-a neovisni o AMPK-u prethodno su pokazani na stanicama kronične limfocitne leukemije u studiji Santidriana i sur. (100), pri čemu je proučavana indukcija apoptoze posredovana AIKAr-om, dok učinci na diferencijaciju nisi bili istraženi. Nadalje, istraživanje koje su proveli Zang i sur. (103) provedeno na živčanim matičnim stanicama, pokazalo je da AIKAr potiče astrogljalnu diferencijaciju mehanizmom neovisnim o AMPK-u, a posredovanu signalnim putem JAK/STAT3 (Janus-kinaza, JAK/prijenosnici signala i aktivatori transkripcije, prema engl. *signal transducers and activators of transcription, STAT*). Istraživanje Roberta i sur. (104) utvrdilo je staničnu smrt stanica kronične mijeloične leukemije posredovanu autofagijom u odgovoru na AIKAr. Međutim, iako je naša nedavna studija pokazala kako AIKAr i ATRA u stanicama U937 potiču autofagiju, učinci obje tvari na izražaj staničnih biljega diferencijacije nisu ovisili o klasičnom ili kanonskom putu aktivacije autofagije (105). Još je uvijek nejasno koji su mehanizmi odgovorni za antiproliferacijske i diferencijacijske učinke AIKAr-a koje smo zamijetili u stanicama U937. Naime, barem je dio učinaka AIKAr-a na staničnu proliferaciju, metabolizam i diferencijaciju neovisan o AMPK-u (100,101).

1.6. Signalni put ATR/Chk1

Stanični je ciklus slijed zbivanja u stanici koji omogućuje staničnu diobu i njome se dovršava, a sastoji se od četiri faze: G₁ (prema engl. *gap*), S (sinteza), G₂ i M (mitoza). G₀-faza jest ona u kojoj se nalaze stanice u mirovanju do trenutka uspostave preduvjeta za diobu. G₁-fazom nazivamo period u kojem se događa stanični rast i priprema za umnažanje DNA koje će uslijediti u S-fazi staničnog ciklusa, dok se tijekom G₂-faze odvija neposredna priprema za

diobu, mitozu. Tijekom faza G_0 i G_1 , koje prethode fazi sinteze, kao i u fazama G_2 i M , koje slijede nakon sinteze, u stanicama se nalazi jednaka količina DNA te ih se ne može razlikovati analizama temeljenima na analizi ukupne unutarstanične količine DNA, već se one promatraju skupno kao G_0/G_1 te G_2/M (106).

Budući da stanični ciklus, posljedično mitozu, treba osigurati nastanak stanica kćeri istovjetnih ishodišnoj stanici, procesi staničnog ciklusa, odnosno prelazak stanice iz jedne faze u drugu, strogo su regulirani. Ti se mehanizmi nadzora nazivaju kontrolnim točkama staničnog ciklusa (prema engl. *cell cycle checkpoints*) te kontroliraju ispravnost i pravovremenost zbivanja ključnih za pojedinu fazu ciklusa poput umnažanja organela i DNA.

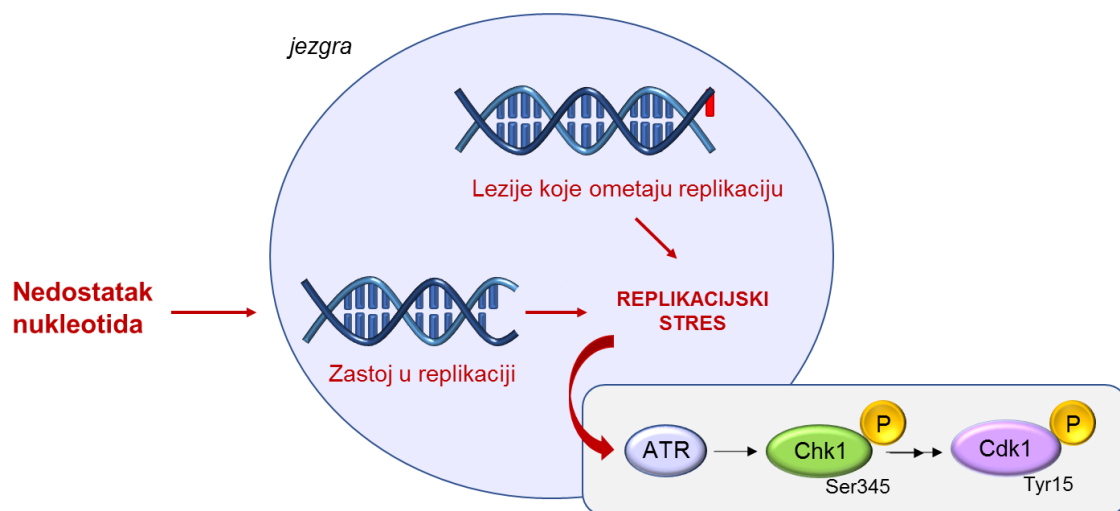
Naša su prethodna istraživanja pokazala da AIKAr u stanicama leukemijskih linija uzrokuje zastoj u S-fazi staničnog ciklusa (107). Studija Liu i sur. (108) pokazala je kako u stanicama glioma AIKAr zaustavlja stanični ciklus poticanjem proteasomalne razgradnje fosfataze CDC25C (prema engl. *cell division cycle, CDC*) uključene u regulaciju kontrolne točke G_2/M . Istraživanje Chae i sur. (109) provedeno na mišjim embrionalnim matičnim stanicama utvrdilo je G_1/S -zastoj u staničnom ciklusu u odgovoru na AIKAr.

Zastoj u S-fazi staničnog ciklusa nalik onom do kojeg dolazi u sklopu odgovora na AIKAr, zamjećuje se i pri manjku unutarstaničnih zaliha nukleotida (74). Istraživanje Bardelebena i sur. (110) provedeno na stanicama multiplog mijeloma utvrdilo je kako AIKAr dovodi do smanjenja UMP-a te da su proapoptotski učinci AIKAr-a i zastoj u S-fazi staničnog ciklusa posljedica nedostatka pirimidina, no učinci na diferencijaciju nisu bili istraženi.

Povezanost zastoja u staničnom ciklusu i diferencijacije nije dovoljno poznata. Istraživanje Wald i sur. (111) utvrdilo je kako 6-benziltioinozin (6BT), spoj koji potiče sazrijevanje leukemijskih stanica u monocitnom i monocitno-makrofagnom smjeru te dovodi do akumulacije stanica u G_0/G_1 -fazi staničnog ciklusa smanjuje količinu ATP-a u stanici. Susljedna studija Chakrabarti i sur. (112) pokazala je da nedostatak ATP-a u stanici potiče signalni put u odgovoru na replikacijski stres i oštećenje DNA posredovan kinazama ATR i kinazom kontrolne točke 1 (prema engl. *checkpoint kinase 1, Chk1*) te da je upravo aktivacija puta ATR/Chk1 zaslužna za diferencijaciju stanica u mijelomonocitnom smjeru. Ta su saznanja u skladu s prethodnom studijom jer ograničena mogućnost replikacije DNA onemogućuje prolazak stanice kroz S-fazu staničnog ciklusa.

Kontrolna točka posredovana ATR-om aktivira se prilikom zastoja u replikaciji DNA zbog zaustavljenih replikacijskih vilica (prema engl. *replication stall*). Jednolančana DNA tada ulazi u interakciju s proteinima koji vežu jednolančanu DNA poput proteina RPA (prema engl. *replication protein A*), evolucijski očuvanog proteina važnog za održavanje stabilnosti genoma, koji posreduje vezanju kompleksa kinaza ATR-ATRIP (prema engl. *ATR-interacting protein*). Kinaza ATR potom fosforilacijom aktivira kinazu Chk1 čineći jedan od najvažnijih signalnih puteva stanice u odgovoru na replikacijski stres (prema engl. *replication stress response*), disregulaciju DNA replikacije koja rezultira genetskom nestabilnošću i pridruženim ishodima (113). Fosforilacija kinaze Chk1 na aminokiselinskom ostatku Ser345 smatra se aktivacijskom za navedeni protein (113).

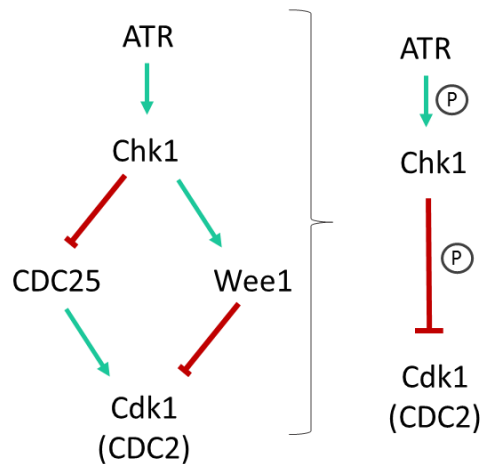
Za razliku od ATM-a, druge važne kinaze uključene u odgovor na oštećenje DNA i replikacijski stres, koja odgovara na pojavu dvostrukih lomova uzvojnice DNA (prema engl. *double-strand breaks, DSBs*), ATR aktiviraju poremećaji na razini replikacijskih vilica uzrokovani oštećenjem DNA molekule, nastankom baznih adukata ili poprečnih veza, nedostatkom nukleotida i sl., te procesuirani dvostruki lomovi uzvojnice DNA putem povećane izloženosti jednolančane DNA molekule (113,114) (Slika 4). O važnosti ATR-a svjedoči činjenica da je homozigotnost za mutacije s posljedicom gubitka funkcije ATR-a nespojiva sa životom za stanice sisavaca (113).



Slika 4. Shematski prikaz signalnog puta ATR/Chk1. Kratice (abecednim redom): ATR – prema engl. *ataxia-telangiectasia-mutated-and-Rad3-related kinase*), Cdk1 – kinaza ovisna o ciklinima 1 (prema engl. *cyclin-dependent kinase 1*), Chk1 – kinaza kontrolne točke 1 (prema engl. *checkpoint kinase 1*), Ser345 – aminokiselinski ostatak serin 345, Tyr15 – aminokiselinski ostatak tirozin 15.

Kao što se može zaključiti već iz njezinog naziva, kinaza Chk1 kao jedna od kinaza kontrolnih točaka, ima važnu ulogu u prolasku stanica kroz stanični ciklus. Osim uloge u aktivnosti replikacijskih vilica tijekom S-faze staničnog ciklusa, odnosno odgovoru na njihove poremećaje, Chk1 ima važnu ulogu u ulasku stanica u mitozu, osobito putem transkripcijske regulacije mitotičkih komponenti stanice kao što je kinaza CDC2, poznatija kao kinaza ovisna o ciklinima, Cdk1 (prema engl. *cyclin dependent kinase 1*) (115) (Slika 4).

Chk1 fosforilacijom inhibira aktivnost fosfataze CDC25 te na taj način posredno dovodi do inhibitorne fosforilacije kinaze Cdk1 budući da izostaje defosforilacija njezinih inhibicijskih fosforilacijskih mjesta (Slika 5). Učinak Chk1 razlikuje se ovisno o paralogu CDC25 te tako u ljudskim stanicama fosforilacija Chk1 potiče razgradnju CDC25A, odnosno smanjuje aktivnost CDC25B i CDC25C. Moguć je i alternativni signalni put posredovan aktivacijom kinaze Wee1 koja potom vrši inhibitornu fosforilaciju Cdk1 (Slika 5). Inhibicija kinaze Cdk1 dovodi do zastoja u staničnom ciklusu (115,116).



Slika 5. Shematski prikaz signalnog puta ATR/Chk1. Kratice (abecednim redom): ATR – prema engl. *ataxia-telangiectasia-mutated-and-Rad3-related kinase*, CDC – protein ciklusa stanične diobe (prema engl. *cell division cycle protein*), Cdk1 – kinaza ovisna o ciklinima 1 (prema engl. *cyclin-dependent kinase 1*), Chk1 – kinaza kontrolne točke 1 (prema engl. *checkpoint kinase 1*).

Iako je Chk1 jedan od regulatora stanične proliferacije i u uvjetima odsutnosti egzogenog oštećenja DNA, njegovoj izrazito važnoj ulozi u odgovoru na replikacijski stres govore ranije studije kojima je utvrđeno kako potpuna nedostatnost kinaza ATR ili Chk1 uzrokuje akumulaciju oštećenja DNA koja naposljetku dovodi do smrti u ranim fazama embrionalnog razvoja (117,118).

Replikacijski se stres može javiti od najranijih faza onkogeneze, pri čemu je često induciran djelovanjem samih onkogenih (113,119). Osim toga, kao što je već ranije spomenuto, povećani izražaj enzima uključenih u nukleotidni metabolizam te povećana dostupnost nukleotida u malignih stanica povećavaju mogućnost grešaka prilikom sinteze DNA. Odgovor posredovan kinazama ATR i Chk1 potiče stabilizaciju replikacijskih vilica te njihovo ponovno pokretanje, istovremeno onemogućujući napredovanje kroz stanični ciklus do završetka replikacije DNA (119). Na taj je način spriječen ulazak stanica s izrazitim oštećenjem DNA u mitozu, što bi rezultiralo apoptotičnom smrću stanice poznatom kao mitotička katastrofa. Nadalje, moguća je i aktivacija puteva tolerancije oštećenja DNA (119).

U mnogih je tipova malignih stanica povećana razina izražaja i aktivnosti kinaza ATR i Chk1, što im omogućuje izbjegavanje stanične smrti, odnosno preživljenje (120,121). Naime, odgovor na replikacijski stres posredovan putem ATR/Chk1 ključan je za preživljenje stanica jer posreduje popravku DNA i replikaciji DNA molekule te kontrolnim točkama staničnog ciklusa i ulasku u mitozu, sprječavajući apoptozu kao moguću alternativni ishod.

Znatna indukcija replikacijskog stresa vidljiva je u stanicama i po tretiranju određenim lijekovima. Naime, djelovanje pojedinih kemoterapeutika poput citarabina također može rezultirati replikacijskim stresom. Citarabin ometa sintezu DNA te, ugradnjom u nosintetizirani lanac molekule i inhibicijskim utjecajem na DNA-polimeraze, dovodi do zastoja u replikaciji i/ili stvaranja lanca s neispravnim sastavom nukleotida, a time i replikacijskog stresa. U stanicama s većom količinom Chk1 utvrđena je smanjena inhibicija progresije replikacijskih vilica u odgovoru na citarabin (122). Čini se kako povećani izražaj Chk1 omogućuje ubrzano napredovanje replikacijskih vilica te njihovo ponovno pokretanje po zaustavljanju, što u konačnici omogućuje proliferaciju stanica. Uistinu, primarni uzorci AML-a za koje je utvrđena veća količina Chk1 pokazali su izrazitiju proliferaciju te klonogeni potencijal u *in vitro* uvjetima formirajući kolonije veće brojnosti i veličine u odnosu na one s manjom količinom Chk1. To bi mogao biti jedan od mehanizama rezistencije, odnosno probira subpopulacija stanica otpornijih na djelovanje citarabina te uzrok relapsa po liječenju. U studiji provedenoj na 198 oboljelih od AML-a, visoka ekspresija gena *CHEK1*, koji kodira Chk1, istaknula se kao najznačajniji nezavisni prediktor kraćeg preživljenja u usporedbi s ostalim genima uključenima u replikaciju DNA (122).

Delecija *PTEN*-a dovodi do smanjene aktivacije kontrolne točke posredovane ATR-om, kao i do inhibitorne fosforilacije kinaze Chk1 posredovane protein-kinazom B (prema engl.

protein kinase B, AKT) na ostatku Ser280, čime se smanjuje aktivnost Chk1. Stanice s delecijom *PTEN*-a ne mogu ostvariti adekvatnu aktivaciju signalnog puta ATR-Chk1, zbog čega po izlaganju noksi kao što je zračenje, dolazi do akumulacije oštećenja DNA, nedostatnosti kromosoma te replikacijskog stresa koji naposljetku dovodi do stanične smrti (123). Međutim, povezanost s diferencijacijom stanica nije bila utvrđena.

Prilikom razvoja makrofaga dolazi do produljenja staničnog ciklusa uz povećanje unutarstanične količine proteina PU.1 (124). Također, PU.1 usklađuje stanični ciklus s diferencijacijom mijeloidnih progenitora (124,125). PU.1 transkripcijski je faktor kodiran genom *Spi1* i ima važnu ulogu u hematopoezi utječući na izražaj oko 3000 gena hematopoetskih stanica. PU.1 modulira ekspresiju gena koji kodiraju za proteine stanične površine poput CD11b i CD64, citokine poput čimbenika stimulacije granulocitnih kolonija (prema engl. *granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF), čimbenika stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (prema engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) i čimbenika stimulacije makrofagnih kolonija (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) te njihove receptore, kao i mnoge druge proteine uključene u mijelopoezu (126). PU.1 upravlja procesom hematopoeze i diferencijacije kao pozitivni regulator gena usmjerenosti sazrijevanja prema lozama makrofaga, granulocita, limfocita B i dendritičnih stanica (127). Njegov izražaj odsutan je u limfocita T, retikulocita i megakariocita, dok je izražen u limfocitima B, stanicama NK, granulocitima, a najviše u monocitima, odnosno makrofagima (126–128).

Poznato je kako fuzijski protein PML-RAR α vrši supresiju PU.1, a time i njemu nizvodnih signalnih puteva te se primjenom ATRA-e može povratiti njegov izražaj (129,130). Štoviše, smanjenje razine PU.1 pomoću male interferirajuća RNA (prema engl. *small interfering RNA*, *siRNA*) sprječava diferencijaciju potaknutu ATRA-om (130). Također, ustanovljeno je kako je izražaj PU.1 najniži u pacijenata oboljelih od APL-a u usporedbi s drugim podtipovima AML-a, a smatra se da taj transkripcijski faktor ima ulogu i u samom nastanku *de novo* APL-a (131). Čini se kako smanjena aktivnost PU.1 dovodi do nastanka AML-a jer izostaje zaustavljanje staničnog rasta povezano s diferencijacijom, dok se ponovnim izražajem PU.1 dokida stanični rast (124).

2. HIPOTEZA

AIKAr uzrokuje diferencijaciju leukemijskih stanica i zastoj u S-fazi staničnog ciklusa kočenjem sinteze pirimidina i aktivacijom signalnoga puta ATR/Chk1.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Odrediti metaboličke promjene i signalne mehanizme u diferencijaciji i proliferaciji leukemijskih stanica.

3.2. Specifični ciljevi

1. Odrediti učinke AIKAr-a na metabolizam glukoze i glutamina leukemijskih stanica.
2. Odrediti učinke AIKAr-a na prolazak kroz stanični ciklus leukemijskih stanica.
3. Odrediti ulogu metaboličkih promjena u diferencijaciji i prolasku kroz stanični ciklus leukemijskih stanica.
4. Odrediti učinke AIKAr-a na aktivnost signalnoga puta ATR/Chk1 i ciljnih molekula signalnog puta, kinaze ovisne o ciklinima, Cdk1 te transkripcijskog čimbenika PU.1 u leukemijskim stanicama.
5. Odrediti ulogu signalnoga puta ATR/Chk1 u diferencijaciji i prolasku kroz stanični ciklus leukemijskih stanica pomoću farmakoloških inhibitora i transfekcije siRNA.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Kemikalije

Tijekom ovog istraživanja korišteni su reagensi, protutijela, male interferirajuće RNA te setovi za metaboličke testove navedeni u Tablicama 2., 3., 4., 5. i 6.

Tablica 2. Korištene stanične linije

STANIČNA LINIJA	PROIZVOĐAČ	KATALOŠKI BROJ
U937	European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Porton, Salisbury, UK	85011440
HL60	European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Porton, Salisbury, UK	98070106
MOLM-14	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Njemačka	ACC 777
NB4	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Njemačka	ACC 207
THP-1	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Njemačka	ACC 16

Tablica 3. Korišteni reagensi

REAGENS	PROIZVOĐAČ	KATALOŠKI BROJ
Kemikalije		
5-aminoimidazol-4-karboksamid (AICAr)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	A9978
bifenkvinat natrijev hidrat, brekvinar	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	SML0113
bis-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-il)etil sulfid (BPTES)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	314045-39-1
dimetil- α -ketoglutarat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	349631
linolna kiselina	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	L1012
kofein	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	C0750
nukleozidi EmbryoMax	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	ES-008-D
uridin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	U3750
uridin 5-monofosfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	U6375
orotat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	O2750
sve-trans-retinska kiselina (ATRA)	Calbiochem, San Diego, CA, SAD	554720
1,1-dimetilbigvanid hidroklorid (metformin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	D150959
Torin2	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	SML1224
VE-821	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	SML1415
dimetil-sulfoksid (DMSO)	Honeywell, Muskegon, MI, SAD	472301
propidijev jodid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	P4170
Human TruStain FcX™ Fc Receptor Blocking Solution	BioLegend, San Diego, CA, SAD	422302
goveđi serumski albumin (prema engl. <i>bovine serum albumin</i> , BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	A4503
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	P7949
akrilamid/bis-akrilamid otopina	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	A3574
Igepal CA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	I3021
otopina po Bradfordu	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	B6916

kemiluminiscencijski supstrat SuperSignal™ West Pico PLUS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	34577
nitrocelulozna membrana Amersham™ Protran® 0.45 µM	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, SAD	GE10600007
mikrocistin-LR	Enzo, Life Sciences, Farmingdale, NY, SAD	ALX-350-012-C100
fenilmetansulfonil-fluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	P7626
pufer za lizu stanica (10x)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD	9803S
ColorBurst™ electrophoresis marker mol wt 8,000-220,000 Da	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	C1992-1VL
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	26619
natrijev dodecil-sulfat (prema engl. <i>sodium dodecyl sulfate, SDS</i>), approx. 95 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	L5750
glicerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	G7893
bromfenol-plavilo	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	B6131
Trizma® base	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	T1503
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	X-100
N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	T9281
tripansko modriilo (0.4 %)	Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD	15250-061
natrijev azid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	S8032
amonijev persulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	A3678
glicerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	G7893
natrijev klorid	Fagron, Krakow, Poljska	1002476
glicin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	G7126
natrijev hidrogenfosfat-dihidrat	Kemika, Zagreb, Hrvatska	1410207
natrijev dihidrogenfosfat-dihidrat	Kemika, Zagreb, Hrvatska	1406707
RNaza	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	R6513
Kemikalije korištene za staničnu kulturu		
medij RPMI 1640	Life Technologies, Grand Island, NY, SAD	42401-018
fetusni goveđi serum (prema engl. <i>fetal bovine serum, FBS</i>)	Life Technologies, Grand Island, NY, SAD	10270-106
L-glutamin 200 mM	Life Technologies, Grand Island, NY, SAD	25030-024
penicilin/streptomycin	Life Technologies, Grand Island, NY, SAD	15070-063

Tablica 4. Korištena protutijela

PROTUTIJELO	PROIZVOĐAČ	KATALOŠKI BROJ
IgG1 FITC-konjugirano protutijelo (klon 679.1Mc7)	Immunotech BeckmanCoulter, Marseille, Francuska	A07795, RRID:AB_2832964
CD11b FITC-konjugirano protutijelo (klon Bear1)	Immunotech BeckmanCoulter, Marseille, Francuska	IM0530, RRID:AB_130987
CD64 FITC-konjugirano protutijelo (klon 22)	Immunotech BeckmanCoulter, Marseille, Francuska	B49185 RRID:n/a
Chk1 miše monoklonsko protutijelo (2G1D5)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD	2360, RRID:AB_2080320
p-Chk1 (S345) kuniće monoklonsko protutijelo (133D3)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD	2348, RRID:AB_331212

p-CDC2 kuniće poliklonsko protutijelo (Tyr15)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD	9111, RRID:AB_331460
β-aktin mišje monoklonsko protutijelo (klon AC-15)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	A5441, RRID:AB_476744
protu-mišje IgG, HRP-konjugirano protutijelo	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD	7076, RRID:AB_330924
protu-kuniće IgG, HRP-konjugirano protutijelo	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD	7074, RRID:AB_2099233

Tablica 5. Reagensi korišteni za transfekciju siRNA

REAGENS	PROIZVOĐAČ	KATALOŠKI BROJ
ON-TARGETplus SMARTpool Human CHEK1 siRNA	Dharmacon, Lafayette, CO, SAD	L-003255-00
ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool	Dharmacon, Lafayette, CO, SAD	D-001810-10
voda bez nukleaza	Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	9914G7
set Neon Transfection System 100 µl	Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD	MPK10025

Tablica 6. Setovi korišteni za provedbu metaboličkih testova

METABOLIČKI TEST	PROIZVOĐAČ	KATALOŠKI BROJ
test za određivanje koncentracije glukoze	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	MAK263
test za određivanje koncentracije laktata	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	MAK065
test za određivanje koncentracije amonijaka	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	AA0100

4.2. Stanična kultura

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 pri temperaturi od 37 °C uz 5 % CO₂. Pritom, prilikom provođenja pokusa kojima se ispitivao utjecaj glutamina, korišten je i medij bez dodatka 2 mM L-glutamina.

U pokusima stanice su oprane, resuspendirane u svježem mediju uz dodatak FBS-a, L-glutamina, penicilina i streptomicina te zasađene u gustoći 0,2 x 10⁶ stanica/mL (2 mL po jažici ploče sa šest jažica promjera 24 mm), odnosno 0,3 x 10⁶ stanica/mL prilikom sađenja u pljoskice površine 25 cm² u svrhu kasnije izolacije ukupnih staničnih lizata. Nakon bojanja mrtvih stanica tripanskim modrilom, udio živih stanica određen je brojanjem hemocitometrom. Stanice su tretirane s AIKAr-om (0,1, 0,2 i 0,5 mM), ATRA-om (1 µM), metforminom (15 mM) i

brekvinarom (0,1 i 0,5 μM) u različitim vremenskim intervalima. Kofein (4 mM), Torin2 (10 nM, 100 nM) i VE-821 (2 μM) dodani su 30 minuta, a BPTES (10 μM), linolna kiselina (10 $\mu\text{g/mL}$) i DM- α KG (2 mM) 15 minuta prije ostalih korištenih tvari, dok su smjesa nukleozida (1x), uridin (30 i 300 μM) i orotati (0,3 mM) dodani 15 minuta nakon dodavanja ostalih ispitivanih tvari.

4.3. Određivanje koncentracije glukoze, laktata i amonijaka u mediju

Stanice su zasađene u gustoći $0,2 \times 10^6/\text{mL}$ u prisutnosti AIKAr-a (0,5 mM), ATRA-e (1 μM) 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 brojenjem hemocitometrom. Stanična suspenzija centrifugirana je tijekom 3 minute na $750 \times g$, a koncentracija glukoze, laktata te amonijaka u nadtalogu određena je uz pomoć komercijalno dostupnih setova (Tablica 6) prema uputama proizvođača. Izmjerene vrijednosti standardizirane su prema broju stanica u uzorku. Kolorimetrijska analiza provedena je za tri međusobno neovisna pokusa u triplicatu pomoću uređaja za očitavanje mikropločica Bio-Rad 680 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD) pri valnim duljinama od 595 nm, odnosno 450 nm.

4.4. Određivanje izražaja površinskih staničnih biljega protočnom citometrijom

Nakon inkubacije s ispitivanim tvarima, stanice su pokupljene te je broj živih stanica određen bojenjem pomoću tripanskog modrila i brojenjem pomoću hemocitometra. Posljedično pranju u hladnoj puferiranoj fiziološkoj otopini (prema engl. *phosphate-buffered saline, PBS*), svakom uzorku dodana su FITC-konjugirana (fluorescein-izotiocijanat, prema engl. *fluorescein isothiocyanate*) odgovarajuća protutijela (anti-CD11b, anti-CD64, odnosno IgG1 izotipska kontrola) razrijeđena u PBS-u s dodatkom natrijevog azida (0,1 %). Stanice su inkubirane s protutijelima u tami na sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta. Kako bi se izbjeglo nespecifično membransko vezanje protutijela putem Fc-receptora, uzorci stanica MOLM-14 i THP-1 su prije obilježavanja specifičnim protutijelima inkubirani u 2,5 postotnoj otopini koja blokira Fc- γ receptore (Human TruStain FcX™ Fc Receptor Blocking solution) tijekom deset minuta u tami na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije s odgovarajućim protutijelima uzorci su oprani u PBS-

u s dodatkom natrijevog azida te su obilježene stanice raspršene u 250 μ L otopine PBS-a s dodatkom natrijevog azida. Stanične suspenzije analizirane su protočnom citometrijom pomoću uređaja FACSCalibur System (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, SAD) te računalnih programa CellQuest software (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, SAD) i FlowJo v.10 platform (TreeStar, Ashland, OR, SAD).

Stanice su označene kao žive koristeći njihove osobine raspršenja laserske svjetlosti prema naprijed (prema engl. *forward scatter*, *FSC*) i u stranu (prema engl. *side scatter*, *SSC*). U svrhu određivanja srednjeg intenziteta fluorescencije (prema engl. *mean fluorescence intensity*, *MFI*), MFI izotipske kontrole oduzet je od MFI-vrijednosti uzorka obilježenog specifičnim protutijelom.

4.5. Analiza staničnog ciklusa

Po inkubaciji s ispitivanim tvarima, stanice su oprane u 1 mL hladnog PBS-a te inkubirane u 250 μ L Vindelove otopine koja sadrži propidijev jodid (50 μ g/ml propidijevog jodida, 10 mM Tris, pH 8, 10 mM NaCl, 10 μ g/ml RNaza A, 0,1 % Igepal) tijekom 20 minuta. Analiza sadržaja DNA provedena je protočnom citometrijom na najmanje 10 000 stanica iz svakog uzorka koristeći uređaj FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, SAD). Određivanje udjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa, odnosno izrada pripadajućih histogramskih grafičkih prikaza, provedeni su pomoću računalnih programa CellQuest i ModFit (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, SAD), te FlowJo v.10 platform (TreeStar, Ashland, OR, SAD).

4.6. Izoliranje ukupnih staničnih lizata i Western blot analiza

Po završetku inkubacije s ispitivanim tvarima, stanice su oprane u hladnom PBS-u, raspršene u puferu za lizu stanica (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM natrijev etilen-diamin-tetraoctena kiselina (EDTA), 1 mM etilen-glikol-tetraoctena kiselina (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 tijekom 10 minuta. Radi pospješenja lize, stanice su zatim homogenizirane protiskivanjem kroz iglu promjera 23 G sedam puta te ponovno inkubirane na ledu 10 minuta. Nastali je homogenat

zatim centrifugiran na 14 000 x g pri temperaturi od 4 °C tijekom 10 minuta. Izdvojeni nadtalog pohranjen je na -80 °C. Koncentracija proteina u ukupnim staničnim lizatima izmjerena je spektrofotometrijski korištenjem Bradfordovog reagensa u skladu s uputama proizvođača. Vrijednosti apsorbancije uzoraka pri valnoj duljini od 595 nm izmjerene su na spektrofotometru (BioPhotometer Plus, Eppendorf, Hamburg, Njemačka), a koncentracije proteina određene su usporedbom izmjerenih vrijednosti s baždarnom krivuljom dobivenom mjerenjem apsorbancije poznatih koncentracija BSA (0,1 – 1,0 mg/mL).

Po dodatku pufera koji sadrži 2 x SDS (125 mM Tris, 4 % SDS, 2 % β-merkaptoetanol, 40 % glicerol i 0,1 mg/mL bromfenol-plavilo) provedeno je denaturiranje 100 μg proteina po uzorku kuhanjem na 100 °C tijekom 4 minute. Jednake količine proteina potom su nanosene u jažice dvaju usporednih 8 %-tnih SDS-poliakrilamidnih gelova. Elektroforeza pri konstantnom naponu od 100 V te potonji transfer na nitroceluloznu membranu pri konstantnom naponu od 7 V preko noći, provedeni su pomoću uređaja Mini-PROTEAN Tetra electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD).

Po dovršetku transfera, u svrhu sprječavanja nespecifičnog vezivanja protutijela, nitrocelulozne membrane inkubirane su u otopini za blokiranje koja se sastoji od 5 % bezmasnog mlijeka u prahu otopljenog u puferu TBS-Tween (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, pH 8,0), tijekom 30 minuta pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano protresanje. Membrane su potom oprane (3 puta po 5 minuta u 20 mL TBS-Tween-a) te su preko noći inkubirane s odgovarajućim primarnim protutijelima razrijeđenima (1:60 000 za β-aktin te 1:1000 za preostala) u TBS-Tween-u s 5 % BSA na 4 °C uz kontinuirano protresanje. Sljedećeg su jutra, nakon trostrukog pranja od suviška primarnog protutijela, membrane inkubirane s odgovarajućim sekundarnim protutijelima razrijeđenima u otopini sastavom jednakoju otopini za blokiranje (1:2500 za β-aktin te 1:2000 za preostala) na sobnoj temperaturi te uz kontinuirano protresanje tijekom dva sata. Po pranju od suviška sekundarnog protutijela (3 puta po 5 minuta u 20 mL TBS-Tween-a), nanošenjem kemiluminiscencijskog supstrata potaknut je signal koji je potom zabilježen radiografskim filmom, odnosno pomoću sistema ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD). U svrhu provjere ujednačenog nanošenja proteina u svaku jažicu gela korišten je signal β-aktina.

4.7. Utišavanje proteinske ekspresije metodom siRNA-transfekcije

Dan ranije stanice U937 oprane su u svježem mediju te zasađene u gustoći od $0,4 \times 10^6$ stanica/mL, kako bi se osiguralo da prilikom provedbe transfekcije stanice budu u eksponencijalnoj fazi rasta. Na dan transfekcije, 15×10^6 stanica oprano je u 3 mL sterilnog PBS-a bez Ca^{2+} i Mg^{2+} te resuspendirano u 600 μL transfekcijskog pufera R (komponenta seta za transfekciju Neon, MPK10025100). Polovina dobivene stanične suspenzija pomiješana je s kontrolnom siRNA, odnosno sa siRNA za ciljni protein tako da otopina siRNA sačinjava 13 – 14 % ukupnog volumena. Elektroporacija stanica provedena je pomoću uređaja Neon Transfection System (Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD) jednim udarom napona 1050 V u trajanju od 50 ms, korištenjem odgovarajućih elektrodnih nastavaka volumena 100 μL . Nakon elektroporacije, 100 μL stanične suspenzije preneseno je u 200 μL medija RPMI-1640 s dodatkom 10 % FBS-a i 2 mM glutamina bez antibiotika, inkubirano 15 minuta na 37 °C te potom razrijeđeno u ukupnom volumenu od 2,5 mL medija bez antibiotika. Dan poslije, stanice su pokupljene te je dio stanica upotrebljen za zasađivanje pokusa kojima se ispitao učinak na proliferaciju, stanični ciklus te diferencijaciju, a preostali za pripremu ukupnih staničnih lizata i Western blot analizu kojom se ujedno provjeravala i uspješnost provedene transfekcije, tj. ostvareno utišavanje proteinske ekspresije.

4.8. Metabolomička analiza pomoću LC/MS/MS

Prethodno analizi pomoću tekućinske kromatografije s tandemskom spektrometrijom masa (prema engl. *liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, LC/MS/MS), stanice su inkubirane u koncentraciji od $0,25 \times 10^6/\text{mL}$ u prisutnosti odgovarajućih tvari tijekom 24 sata. Na kraju inkubacije stanice su lizirane ledeno hladnim 80 %-tnim metanolom, vorteksirane i pohranjene na -20 °C. Osnovne standardne otopine UMP i orotata pripremljene su u koncentraciji od 0,1 mg/mL u 0,1 % mravlje kiseline (v/v), metanolu (50:50) i pohranjene na -20 °C.

Standardi i uzorci analizirani su u BioCentru Zagreb korištenjem Agilent 1290 Infinity LC spojenog s Agilent 6460 trostrukim kvadrupolom MS/MS s tehnologijom Jet Streaming i ionizacijom elektrosprejom (prema engl. *electrospray ionization*, ESI) korištenjem programa Agilent MassHunter (B.07.00). Razdvajanje je provedeno pomoću Synergy Polar-RP LC kolone (4 μm ; $150 \times 4,6$ mm) zagrijane na 40 °C u pećnici s kolonom. Brzina protoka iznosila

je 0,3 mL/min s pokretnom fazom A (0,1 % mravlja kiselina) i pokretnom fazom B (100 % metanol). Gradijent je formiran kako slijedi: početni eluent, 90 % A, 10 % B; 20 % A, 80 % B 7 minuta i držalo se u tim uvjetima 1,5 min prije povratka na 90 % A, 10% B. Koncentracije 90 % A i 10 % B održavale su se do 15 min. Prikupljanje podataka izvedeno je u načinu praćenja višestrukih reakcija MRM (prema engl. *multiple reaction monitoring, MRM*) s pozitivnim i negativnim ESI koristeći jedan glavni MRM prijelaz za kvantifikaciju i jedan dodatni prijelaz kao kvalifikator za svaki analit (Tablica 7). Parametri MS izvora postavljeni su kako slijedi: temperatura plina, 250 °C; protok plina, 7 L/min; raspršivač, 25 p.s.i.; plinski grijač plašta, 350 °C; protok plinova iz omotača, 10 L/min; kapilarni napon, 3500 V; i napon punjenja, 1500 V.

Tablica 7. Parametri provedbe LC/MS/MS analize

Ime spoja	Prekursorski ion	ESI polarnost	Fragmentator	Fragmentni ion	Energija kolizije	Dwell (ms)	Akceleracija čestice
	<i>m/z</i>		<i>V</i>		<i>V</i>		<i>V</i>
Orotat	157.1	pozitivna	90	110.8 ^a	14	15	7
Orotat	157.1	pozitivna	90	68.1	24	15	7
UMP	323.5	negativna	130	150.8 ^a	16	15	7
UMP	323.5	negativna	130	97.0	18	15	7

^a, MRM tranzicija korištena za relativnu kvantifikaciju

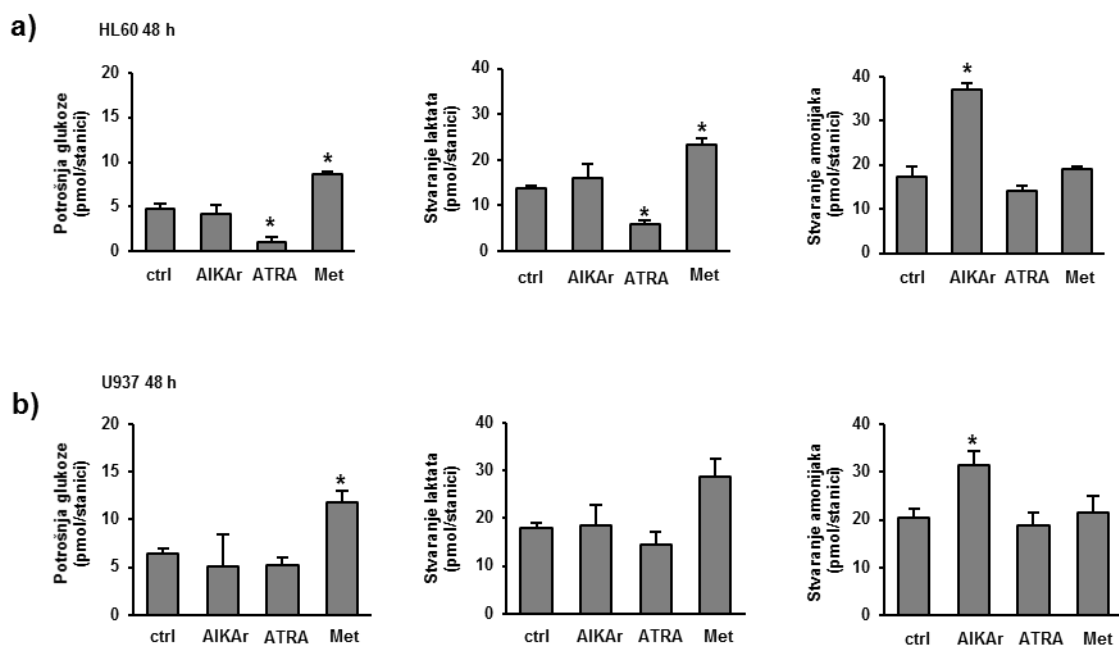
4.9. Statistička analiza

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednosti (engl. *mean*) ± standardna pogreška (prema engl. *standard error of the mean, SEM*) te analizirani pomoću Studentovog t-testa ili jednosmjerne analize varijance (prema engl. *analysis of variance, ANOVA*) s Tukey-testom. Značajnima su smatrane vrijednosti $p < 0,05$. Rezultati su temeljeni na najmanje tri nezavisna pokusa, a navedene metode statističke analize, tj. statistički testovi i način prikaza dobivenih vrijednosti odabrani na temelju distribucije preliminarnih rezultata, odnosno na temelju preliminarne analize normalnosti distribucije. Za statističku analizu korišteni su programi Microsoft Excel i GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD).

5. REZULTATI

5.1. AIKAr nema učinaka na potrošnju glukoze i stvaranje laktata, ali povećava stvaranje amonijaka

U svrhu ispitivanja metabolizma tijekom diferencijacije leukemijskih stanica potaknute AIKAr-om, najprije smo istražili njegove učinke na potrošnju glukoze i stvaranje laktata. Radi usporedbe učinaka AIKAr-a s drugim diferencirajućim tvarima, stanice su inkubirane s ATRA-om u koncentraciji za koju je prethodno opisano da smanjuje potrošnju glukoze u stanicama HL60 istovremeno povećavajući izražaj diferencijacijskih biljega (37). Također, ispitan je i učinak metformina kao aktivatora AMPK-a. Pritom je metformin korišten u koncentraciji za koju je prethodno pokazano da potiče glikolizu tijekom apoptoze (38), ali koja nema utjecaja na diferencijaciju stanica HL60 i U937 (101). Takvim je pristupom bilo moguće razlučiti jesu li zapaženi učinci na stanični metabolizam svojstveni AIKAr-u ili se pak javljaju posljedično samoj diferencijaciji stanica. Rezultati prikazani na Slici 6 pokazuju kako u nazočnosti AIKAr-a (0,5 mM) u koncentraciji koja uzrokuje diferencijaciju stanica U937 i HL60 (101), nisu utvrđeni značajni učinci na potrošnju glukoze i stvaranje laktata. U skladu s rezultatima ranijih istraživanja metformin (15 mM) je povećao (38), a ATRA smanjila (132) potrošnju glukoze i proizvodnju laktata u obje stanične linije nakon 48 sati inkubacije. Kako inkubacijom stanica u prisutnosti AIKAr-a (0,5 mM) nisu utvrđeni značajni učinci na potrošnju glukoze i stvaranje laktata, može se zaključiti kako diferencijacija leukemijskih stanica potaknuta AIKAr-om ne dovodi do inhibicije glikolize. Međutim, utvrđeno je značajno povećanje proizvodnje amonijaka (Slika 6).



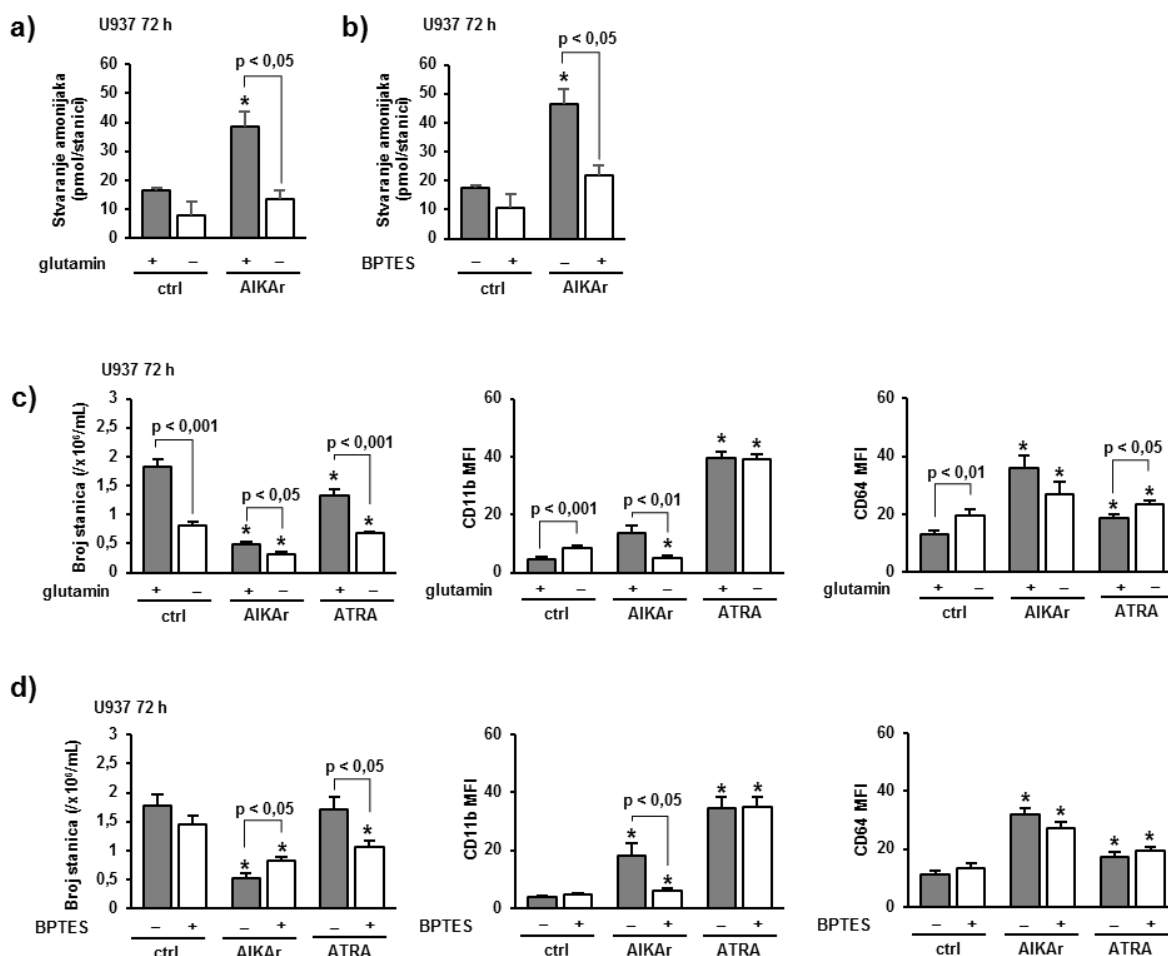
Slika 6. AIKAr ne utječe na potrošnju glukoze i stvaranje laktata u stanicama U937 te HL60, no povećava stvaranja amonijaka. Stanice HL60 (a) i U937 (b) inkubirane su tijekom 48 sati u nazočnosti AIKAr-a (0,5 mM), ATRA-e (1 μ M) i metformina (Met) (15 mM) te su izmjerene koncentracije glukoze, laktata i amonijaka u mediju za staničnu kulturu. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SEM iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test).

5.2. Povećano stvaranje amonijaka i izražaj diferencijacijskih biljega potaknuti AIKAr-om ovisni su o glutaminu

U stanicama amonijak nastaje iz glutamina, a naši standardni uvjeti uzgoja stanica u staničnoj kulturi uključuju dodatak 2 mM glutamina mediju RPMI. Poznato je da maligne stanice, u usporedbi s normalnim stanicama, unose više glutamina te imaju veću aktivnost glutaminaze u mitohondrijima (44). Kako bismo ispitali ulogu egzogenog glutamina u proizvodnji amonijaka i učincima posredovanim AIKAr-om, inkubirali smo stanice u mediju RPMI bez dodatka glutamina. U takvim su uvjetima stanične kulture stanice izložene izrazito niskim koncentracijama glutamina (procijenjena vrijednost iznosi manje od 0,15 mM), uglavnom stoga što se značajne količine L-glutamina nalaze u fetusnom goveđem serumu (51). Kao što je prikazano na Slici 7.c, broj živih stanica nakon 72 sata inkubacije u mediju bez dodatka glutamina bio je značajno smanjen u svim skupinama. U kontrolnim stanicama U937 zamijećeno je malo, ali statistički značajno povećanje izražaja biljega CD11b i CD64 (Slika 7.c), kako je i ranije opisano (54). Manjak glutamina u potpunosti je spriječio povećano

stvaranje amonijaka potaknuto AIKAr-om (Slika 7.a), značajno smanjio izražaj biljega CD11b u stanicama tretiranim AIKAr-om, ali nije ostvario značajni učinak na povećanje izražaja biljega CD64. S druge strane, nedostatak je glutamina u stanicama tretiranim ATRA-om povećao izražaj biljega CD64, a nije imao učinka na izražaj biljega CD11b.

U mitohondrijima se glutamin, djelovanjem enzima glutaminaze, deaminira u glutamat, a prethodna su istraživanja pokazala da je aktivnost toga enzima osobito visoka u nekim leukemijskim stanicama (46). Kako bi se ispitala uloga glutaminaze u učincima posredovanim AIKAr-om, stanice su inkubirane u prisutnosti 10 μ M BPTES-a, farmakološkog inhibitora glutaminaze 1 (GLS1). BPTES je smanjio povećano stvaranje amonijaka (Slika 7.b) i izražaj CD11b u stanicama tretiranim AIKAr-om, a nije imao utjecaja na izražaj biljega diferencijacije u stanicama tretiranim ATRA-om (Slika 7.d). Nadalje, BPTES nije oponašao učinak uskraćivanja glutamina na izražaj diferencijacijskih biljega u kontrolnim stanicama U937. Dodatno, BPTES je značajno umanjio AIKAr-om uzrokovano smanjenje broja živih stanica (Slika 7.d).

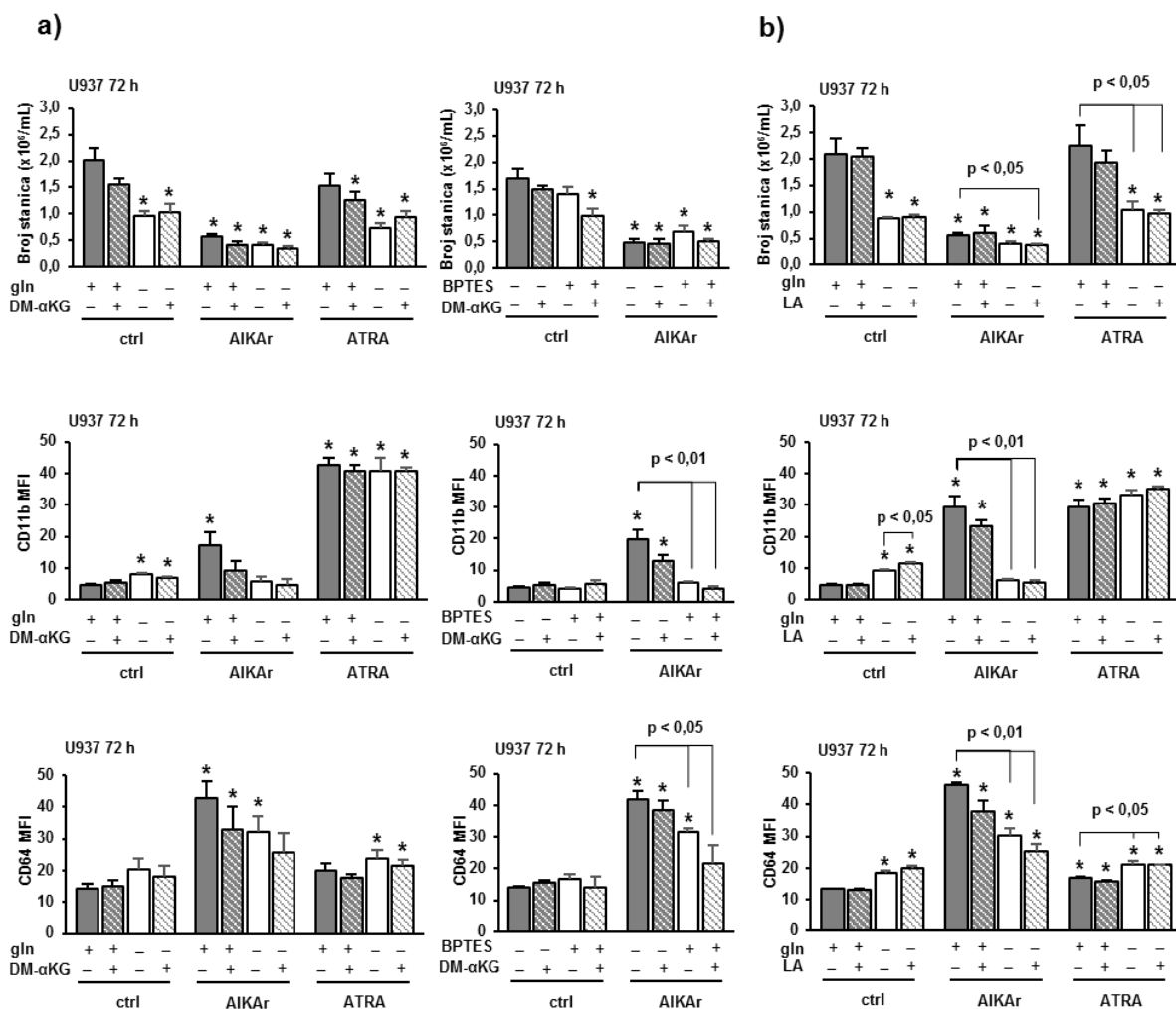


Slika 7. AIKAr-om potaknuto povećano stvaranje amonijaka i izražaj diferencijacijskih biljega ovisni su o glutaminu te se mogu poništiti uskraćivanjem glutamina ili dodavanjem BPTES-a, farmakološkog inhibitora glutaminaze 1 (GLS1). Stanice U937 inkubirane su tijekom 72 sata u nazočnosti AIKAr-a (0,5 mM) i ATRA-e (1 μ M) u mediju s dodatkom (+) ili bez dodatka (-) 2 mM L-glutamina (**a, c**), odnosno bez dodatka (-) ili s dodatkom (+) BPTES-a (10 μ M) (**b, d**) 15 minuta prije dodavanja ispitivanih tvari. Koncentracija amonijaka u mediju određena je komercijalno dostupnim testom (**a, b**), broj živih stanica brojenjem pomoću hemocitometra i tripsanskog modrila, a izražaj biljega diferencijacije CD11b i CD64 pomoću protočne citometrije (**c, d**). Rezultati su srednje vrijednosti \pm SEM iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) s dodatkom glutamina, odnosno bez dodatka BPTES-a (Studentov t-test).

5.3. Dimetil- α -ketoglutarat i linolna kiselina ne mogu nadomjestiti manjak glutamina ili inhibiciju glutaminaze 1

Deaminacija glutamina djelovanjem glutaminaze u konačnici dovodi do stvaranja α -KG-a koji ulazi u Krebsov ciklus, odnosno može dovesti do promjena na epigenetskoj razini stanice (50). Budući da membrana stanica nije propusna za α -KG, taj se spoj unutar stanice može nadomjestiti dodavanjem α KG-a u obliku dimetil (DM)-estera za kojeg su stanične membrane propusne. U studijama je opisano kako dodavanje DM- α KG-a može nadomjestiti manjak glutamina tijekom alternativne (M2) aktivacije makrofaga (50) i diferencijacije stanica u smjeru Th2 (51). Kako bismo ispitali jesu li učinci manjka glutamina, odnosno dodatka BPTES-a bili posljedica nedostatka α -KG-a, stanicama je dodan 2 mM DM- α KG. Kao što je prikazano na Slici 8.a, dodavanje DM- α KG-a nije spriječilo učinke manjka glutamina ni inhibicije glutaminaze BPTES-om na izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama tretiranima AIKAr-om.

Potom smo ispitali učinak linolne kiseline, za koju je prethodno pokazano da uzrokuje neutrofilnu diferencijaciju (40). Kao što je prikazano na Slici 8.b, dodavanje linolne kiseline (LA) nije spriječilo učinke manjka glutamina na broj živih stanica i izražaj diferencijacijskih biljega u stanicama tretiranima AIKAr-om.



Slika 8. AIKAr-om posredovani učinci na broj živih stanica i diferencijaciju u mediju bez glutamina ili s dodatkom BPTES-a ne mogu se nadomjestiti dodavanjem DM- α KG-a ili linolne kiseline (LA). Stanice U937 inkubirane su tijekom 72 sata u nazočnosti AIKAr-a (0,5 mM), ATRA-e (1 μ M) te DM- α KG (2 mM) (a) ili LA (10 μ g/mL) (b) u mediju s dodatkom (+) ili bez dodatka (-) 2 mM L-glutamina (gln), odnosno bez dodatka (-) ili s dodatkom (+) BPTES-a (10 μ M). Broj živih stanica određen je pomoću hemocitometra i tripanskog modrila, a izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD64 pomoću protočne citometrije. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SEM iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test).

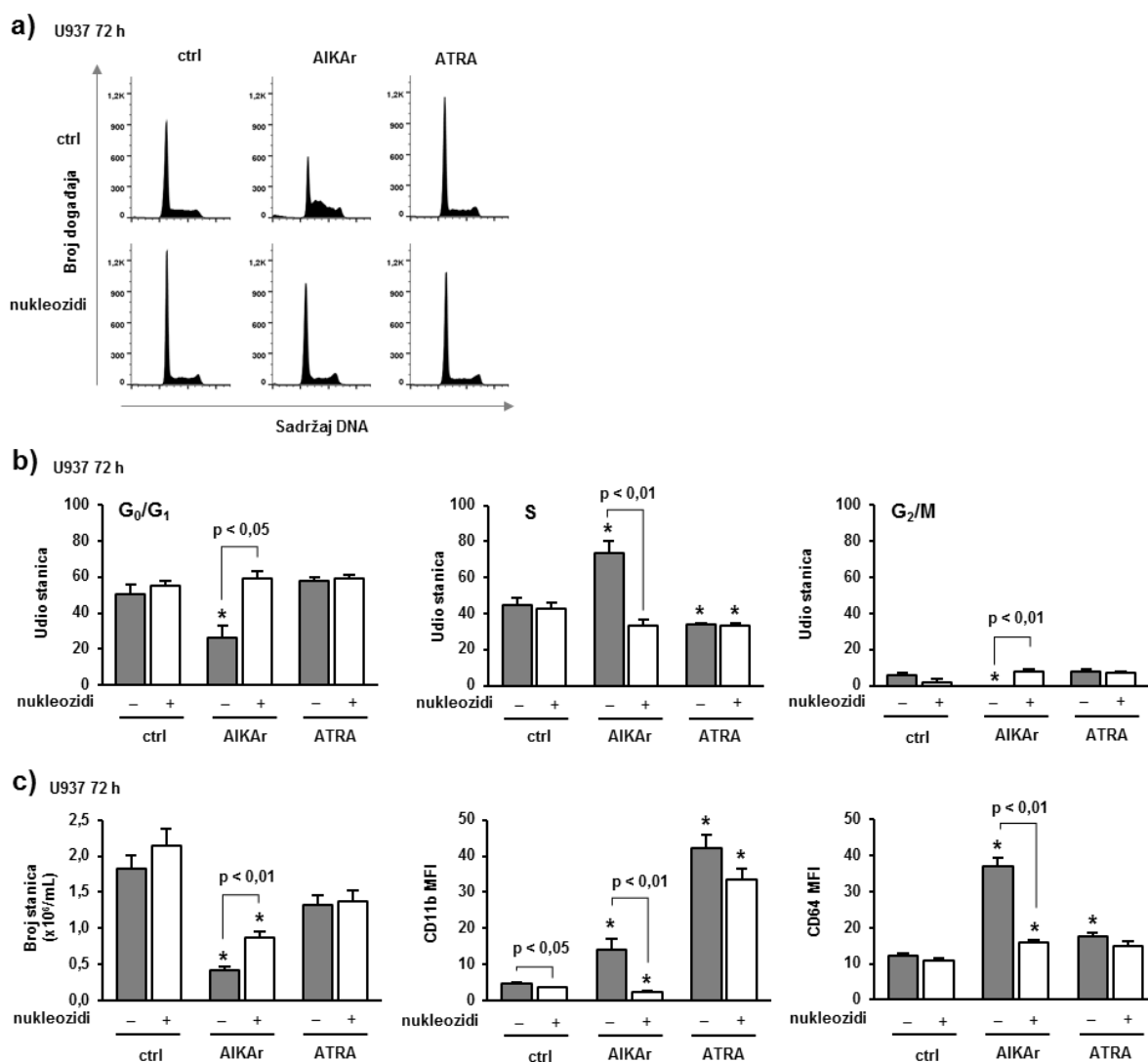
5.4. Smjesa nukleozida i uridin sprječavaju AIKAr-om posredovani zastoj stanica u S-fazi staničnog ciklusa i povećanje izražaja biljega diferencijacije

Glutamin nije samo značajan anaplerotski izvor ugljika za međuprodukte Krebsovog ciklusa, već i izvor dušika potrebnog za biosintezu nukleotida. Budući da AIKAr sudjeluje u

sintezi nukleotida te da su promjene u unutarstaničnim zalihama nukleotida povezane sa zastojem u S-fazi staničnog ciklusa (74), ispitali smo učinke AIKAr-a na prolazak stanica kroz stanični ciklus. Stanice koje smo tretirali AIKAr-om i ATRA-om obilježene su propidijevim jodidom te analizirane protočnom citometrijom kako bi se odredio udio stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa.

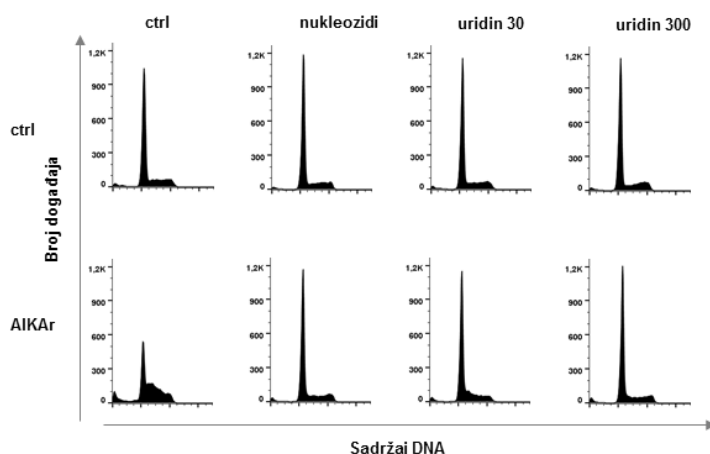
Kao što je prikazano na Slikama 9.a i 9.b, dvije diferencirajuće tvari imale su različite učinke, jer je AIKAr značajno povećao, dok je ATRA značajno smanjila udio stanica u S-fazi staničnog ciklusa.

Budući da se zaustavljanje stanica u S-fazi staničnog ciklusa može dogoditi posljedično iscrpljivanju nukleotidnog bazena, ispitali smo može li se dodavanjem smjese nukleozida promijeniti stanični odgovor na AIKAr. Kao što je prikazano na Slikama 9.a i 9.b učinci na stanični ciklus posredovani AIKAr-om mogu se u potpunosti poništiti dodavanjem smjese nukleozida (A, T, G, C i U). Osim toga, nukleozidi su značajno smanjili učinke AIKAr-a na smanjenje broja živih stanica i povećanje izražaja biljega diferencijacije (Slika 9.c). Rezultati koji pokazuju da se fenotip posredovan AIKAr-om može poništiti prisutnošću nukleozida sugeriraju da AIKAr vjerojatno ometa njihovu sintezu. U stanicama multiplog mijeloma zamijećeno je da AIKAr inhibira UMP-sintazu (UMPS) te da se apoptotski učinci AIKAr-a mogu spriječiti dodatkom uridina (110). Iz tog smo razloga ispitali mogu li se učinci dodatka smjese nukleozida oponašati i dodatkom rastućih koncentracija uridina. Uridin je učinkom ovisnim o koncentraciji spriječio AIKAr-om posredovani zastoj stanica u S-fazi staničnog ciklusa te povećanje izražaja biljega diferencijacije (Slika 10). Shodno tome, može se zaključiti kako su AIKAr-om posredovani zastoj staničnog ciklusa, kao i diferencijacija leukemijskih stanica povezani s njegovim utjecajem na sintezu pirimidina.

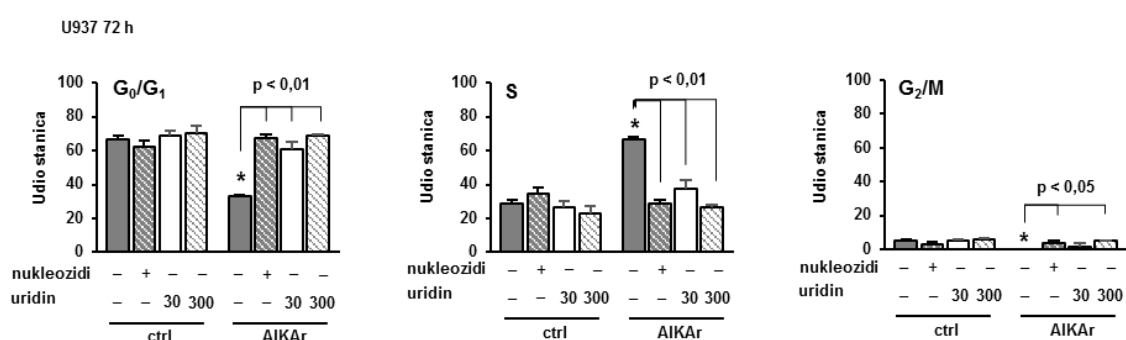


Slika 9. Nukleozidi sprječavaju AIKAr-om posredovani zastoje stanica u S-fazi staničnog ciklusa i povećanje izražaja biljega diferencijacije. Stanice U937 inkubirane su tijekom 72 sata u nazočnosti AIKAr-a (0,5 mM) i ATRA-e (1 μ M) bez dodatka (-) ili s dodatkom (+) smjese nukleozida (1x) (nukleozidi). **a)** Primjerna histogrami analize udjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. **b)** Udio stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa određen kao što je opisano u odjeljku „Materijali i metode“. **c)** Broj živih stanica određen pomoću hemocitometra i tripanskog modrila te izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD64 određen pomoću protočne citometrije. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SEM iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test).

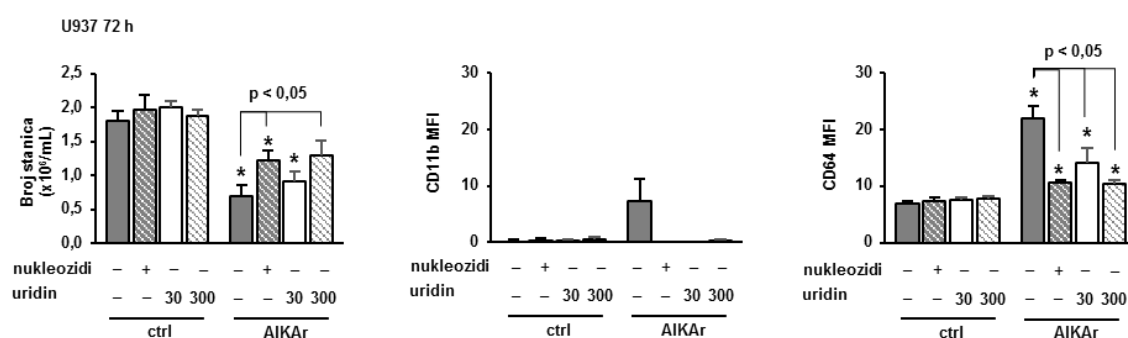
a) U937 72 h



b)



c)

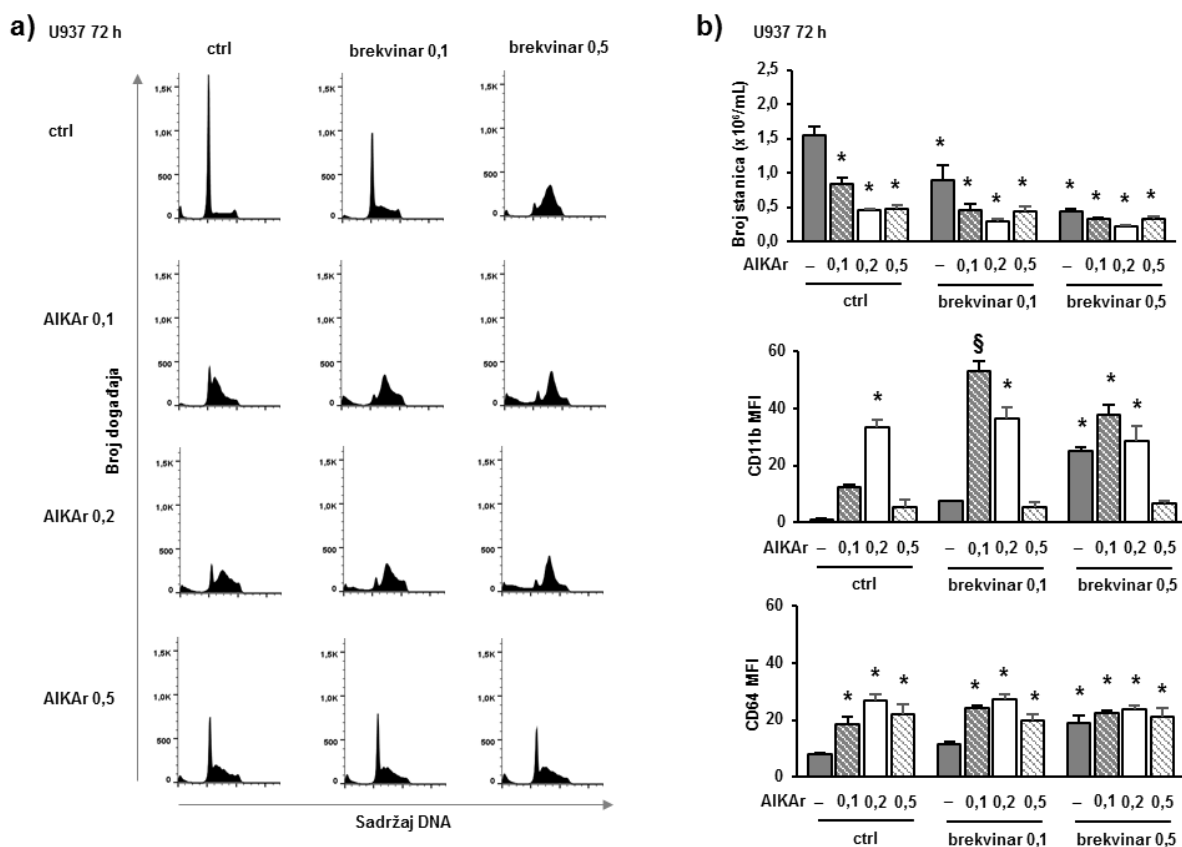


Slika 10. Uridin sprječava AIKAr-om posredovani zastoje stanica u S-fazi staničnog ciklusa i povećanje izražaja biljega diferencijacije učinkom ovisnim o dozi. Stanice U937 su tijekom 72 sata inkubirane u nazočnosti AIKAr-a (0,5 mM), smjese nukleozida (1x) (nukleozidi) te uridina (30 i 300 μ M). a) Primjerna histograme analize udjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. b) Udio stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa određen kao što je opisano u odjeljku „Materijali i metode“. c) Broj živih stanica određen pomoću hemocitometra i tripsanskog modrila te izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD64 određen pomoću protočne citometrije. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SEM iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test).

5.5. AIKAr i brekvinar ostvaruju sinergistički učinak na stanični ciklus i diferencijaciju

Nedavna je studija utvrdila povezanost stanične diferencijacije i uridina; farmakološka inhibicija DHODH-a, enzima koji katalizira četvrti korak u sintezi pirimidina *de novo*, može nadvladati zastoj u diferencijaciji stanica AML-a (27). Primjena brekvinara, farmakološkog inhibitora DHODH-a, dovodi do povećanja izražaja biljega diferencijacije u leukemijskim stanicama, uključujući stanice U937, pri $IC_{50} < 1 \mu M$. Međutim, učinci inhibicije DHODH na prolazak stanica kroz stanični ciklus nisu bili ispitani. DHODH djeluje korak prije UMPS-a katalizirajući reakciju pretvorbe DHO u orotat pa inhibicija aktivnosti enzima povećava koncentraciju uzvodnog metabolita, DHO-a istovremeno smanjujući koncentraciju nukleotida koji nastaju od uridina. Rezultati spomenute studije pokazali su da je mijeloidna diferencijacija posljedica nedostatka uridina, a ne nakupljanja DHO-a (27). Naši rezultati svjedoče da AIKAr ostvaruje sličan utjecaj na pirimidinsku sintezu te da su učinci AIKAr-a na stanični ciklus i diferencijaciju stanica posljedica nedostatka uridina.

Kako bi se provjerilo dijeli li mijeloidna diferencijacija u odgovoru na AIKAr isti mehanizam djelovanja kao ona potaknuta inhibitorima DHODH-a, stanice U937 stimulirane su postupno povećavajućim koncentracijama AIKAr-a i brekvinara. Kao što je prikazano na Slici 11.a, brekvinar ostvaruje učinke na stanični ciklus analogne učincima AIKAr-a. Štoviše, primijenjeni u suboptimalnim koncentracijama, AIKAr (0,1 mM) i brekvinar (0,1 μM), ostvaruju sinergistički učinak na izražaj diferencijacijskih biljega (Slika 11.b). Također, važno je ukazati na to da AIKAr pokazuje bifazično djelovanje te su najizraženiji učinci AIKAr-a na zaustavljanje stanica u S-fazi staničnog ciklusa te ekspresiju biljega CD11b bili zamijećeni pri koncentraciji (0,2 mM), koja je manja od koncentracije upotrebene u našim prethodnim istraživanjima (101). Osim toga, iako AIKAr u koncentraciji od 0,5 mM potiče izražaj biljega diferencijacije i zaustavljanje stanica u S-fazi staničnog ciklusa, 0,5 mM AIKAr umanjuje učinke brekvinara. Stoga smo zaključili da AIKAr ima bifazični učinak na zastoj u S-fazi staničnog ciklusa i diferencijaciju te da manje koncentracije AIKAr-a djeluju slično brekvinaru.



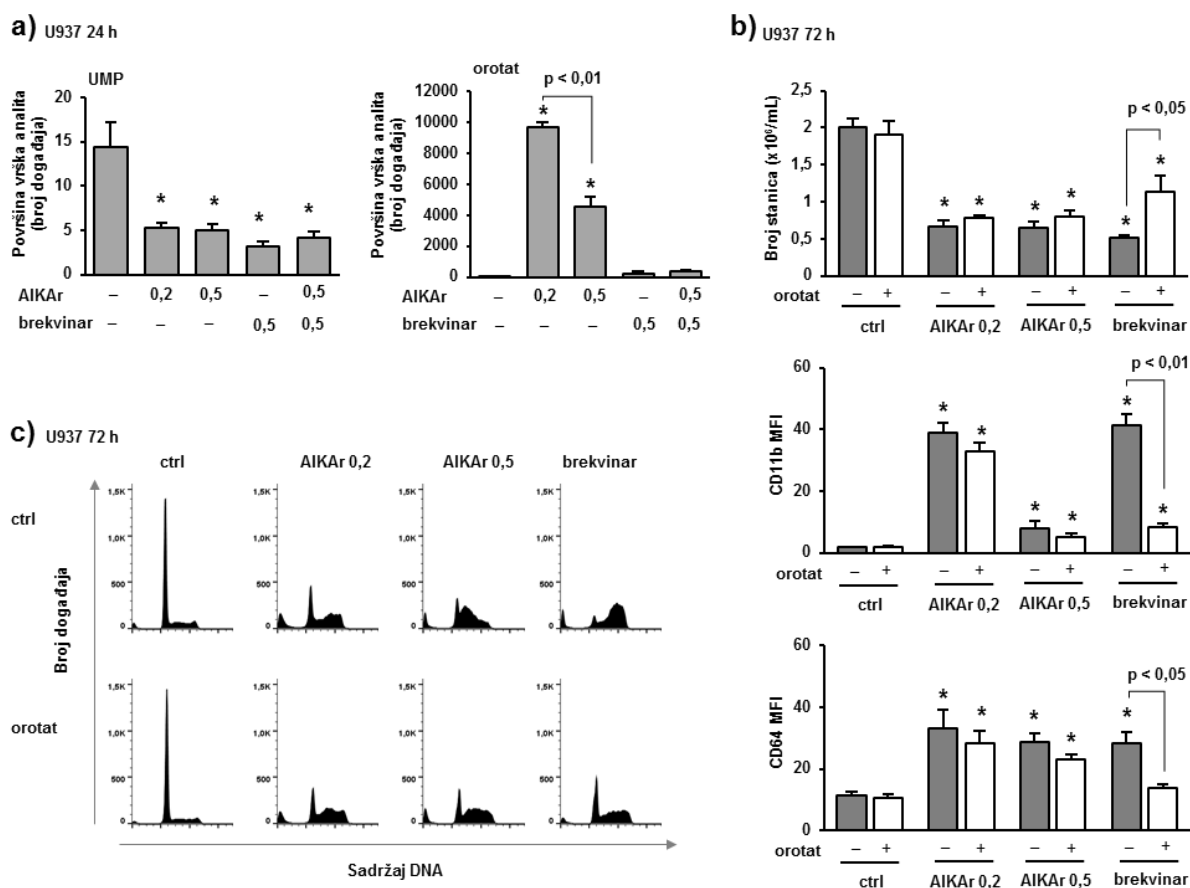
Slika 11. AIKAr i brekvinar u niskim koncentracijama ostvaruju sinergistički učinak na stanični ciklus i diferencijaciju. Stanice U937 su tijekom 72 sata inkubirane u nazočnosti AIKAr-a (0,1, 0,2, ili 0,5 mM), brekvinara (0,1 ili 0,5 μM) te njihovih kombinacija. **a)** Primjerni histogrami analize udjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. **b)** Broj živih stanica određen pomoću hemocitometra i tripanskog modrila te izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD64 određen pomoću protočne citometrije. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SEM iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test); §, $p < 0,05$ u odnosu na obje ispitivane tvari zasebno.

5.6. AIKAr koči sintezu primidina *de novo*

Ukoliko AIKAr koči sintezu uridina inhibirajući UMPS, očekivali bismo da AIKAr u stanicama povećava koncentraciju orotata kao supstrata, a smanjuje koncentraciju UMP-a kao produkta reakcije. Iz tog smo razloga izmjerili koncentraciju UMP-a i orotata u stanicama tretiranim dvjema različitim koncentracijama AIKAr-a tijekom 24 sata. Kao što je prikazano na Slici 12.a, obje koncentracije AIKAr-a smanjile su koncentraciju UMP-a i povećale koncentraciju orotata. Pritom je povećanje koncentracije orotata bilo značajno veće u stanicama inkubiranim s nižom koncentracijom AIKAr-a. Nadalje, kao što se moglo i pretpostaviti, brekvinar je smanjio koncentraciju UMP-a ne povećavajući pritom koncentraciju orotata.

Dodatno, brekvinar je spriječio i povećanje koncentracije orotata u stanicama tretiranima 0,5 mM AIKAr-om.

Nadalje, ispitali smo učinke dodavanja orotata stanicama koje su tretirane dvjema koncentracijama AIKAr-a te brekvinarom. Primjena orotata u koncentraciji (0,3 mM) koja nije imala utjecaja na broj živih stanica (Slika 12.b), spriječila je povećanje izražaja biljega diferencijacije (Slika 12.b) i zastoj u staničnom ciklusu (Slika 12.c) stanica tretiranima brekvinarom, ali ne i onih tretiranima AIKAr-om.



Slika 12. AIKAr smanjuje koncentraciju UMP-a, a povećava koncentraciju orotata; dodatak egzogenoga orotata sprječava učinke brekvinara, ali nema utjecaja na učinke AIKAr-a. a) Stanice U937 su tijekom 24 sata inkubirane u nazočnosti AIKAr-a (0,2 i 0,5 mM) ili brekvinara (0,5 μM). Koncentracije orotata i UMP-a određene su metodom LC/MS/MS, kao što je opisano u odjeljku „Materijali i metode“. (b, c) Stanice U937 su tijekom 72 sata inkubirane u nazočnosti AIKAr-a (0,2 i 0,5 mM) ili brekvinara (0,5 μM). Orotat (0,3 mM) je dodan 5–15 min nakon dodavanja ispitivanih tvari, dok je kontrolnim stanicama dodan odgovarajući volumen otapala (DMSO). b) Primjerni histogrami analize udjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. c) Broj živih stanica određen pomoću hemocitometra i tripanskog modrila te izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD64 određen pomoću protočne citometrije. Rezultati su srednje vrijednosti ± SEM iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test).

Na temelju ovih rezultata može se zaključiti kako AIKAr inhibira sintezu pirimidina *de novo* na razini reakcije katalizirane UMPS-om, jedan korak nakon reakcije katalizirane DHODH-om.

5.7. AIKAr pospješuje aktivnost Chk1, a farmakološki inhibitori signalnoga puta ATR/Chk1 smanjuju njegove učinke na stanični ciklus i diferencijaciju

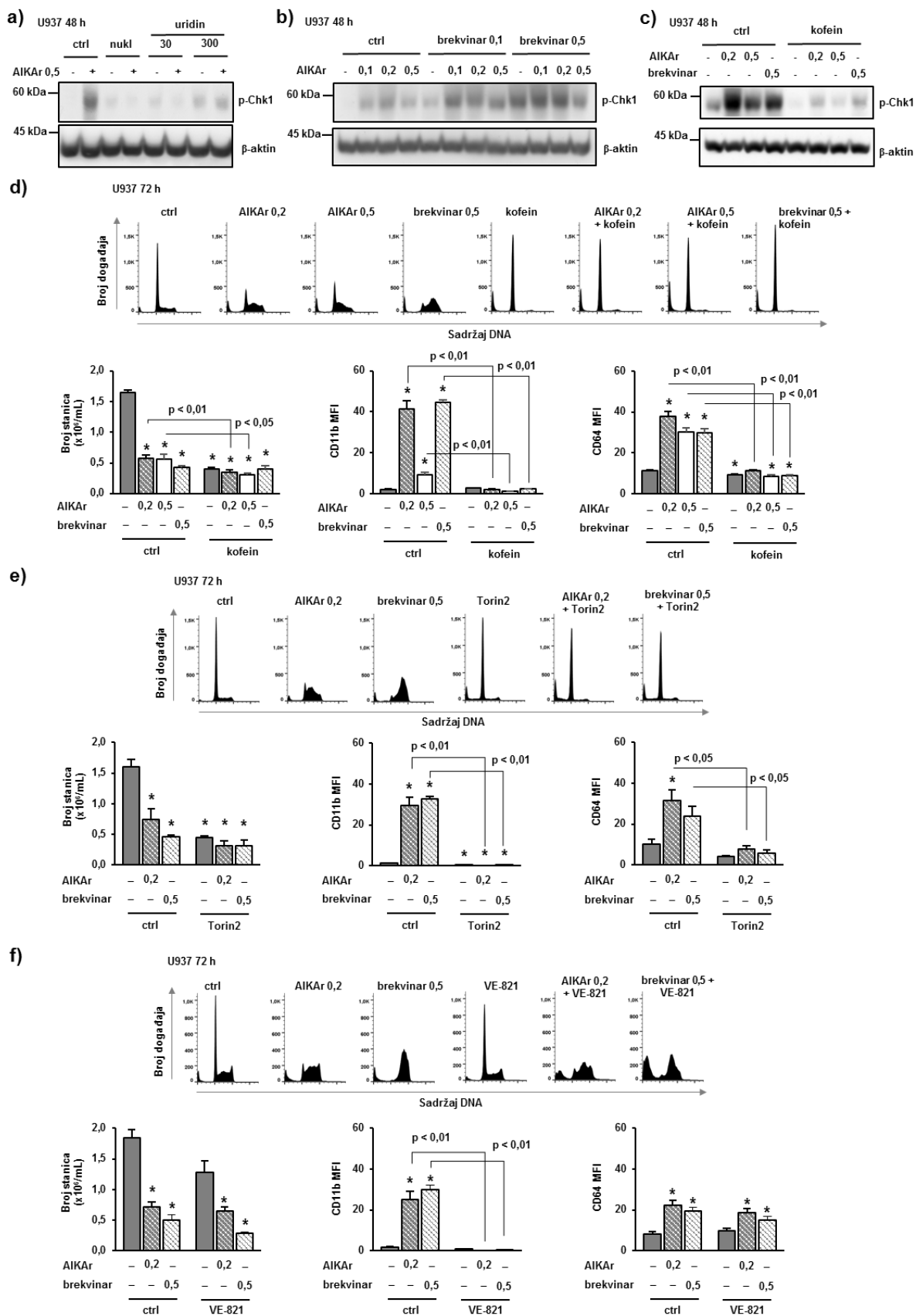
Poznato je da nedostatak nukleotida aktivira signalni put oštećenja DNA aktivacijom kontrolne točke u S-fazi staničnog ciklusa posredovane kinazom ATR (74). ATR aktivira kinazu Chk1 i tako nadzire prolazak stanica kroz stanični ciklus. Kako bismo ispitali ulogu signalnoga puta ATR/Chk1 u učincima AIKAr-a, odredili smo količinu Chk1 fosforiliranog na aminokiselinskom ostatku Ser345 u stanicama tretiranima AIKAr-om tijekom 48 sati. Kao što je prikazano na Slici 13.a, količina Ser345-fosforiliranog Chk1 povećana je u AIKAr-om tretiranim stanicama, a dodavanje smjese nukleozida ili uridina poništava aktivaciju Chk1.

U svrhu daljnjeg ispitivanja uloge aktivacije Chk1 u učincima brekvinara i AIKAr-a na progresiju staničnog ciklusa te izražaj biljega diferencijacije, količina Ser345-fosforiliranog Chk1 bila je izmjerena u lizatima stanica tretiranim rastućim koncentracijama tih tvari tijekom 48 sati. Kao što je prikazano na Slici 13.b, povećanje količine Ser345-fosforiliranog Chk1 odgovara povećanju izražaja diferencijacijskih biljega, kao i zastoju stanica u S-fazi staničnog ciklusa u odgovoru na AIKAr i brekvinar.

Kako bismo dodatno pojasnili ulogu aktivacije kinaze Chk1 u AIKAr-om posredovanim učincima, stanice U937 prethodno dodavanju agensa tretirane su kofeinom, inhibitorom ATM-a i ATR-a (133). Prisutnost inhibitora u koncentraciji koja je smanjila aktivirajuću fosforilaciju Chk1 (Slika 13.c) smanjila je izražaj diferencijacijskih biljega te spriječila zastoj u S-fazi staničnog ciklusa u odgovoru na AIKAr i brekvinar (Slika 13.d).

Potom smo ispitali učinak Torin2, farmakološkog inhibitora mTOR-a, ATM-a te ATR-a (134). Kao što je prikazano na Slici 13.e, Torin2 uzrokuje zastoj stanica u G₀/G₁-fazi staničnog ciklusa te u potpunosti sprječava učinke AIKAr-a i brekvinara na stanični ciklus i diferencijaciju.

U recentnoj studiji Fordhama i sur. (135), VE-821 pokazao se kao selektivni inhibitor ATR-a u stanicama U937. Kao što je prikazano na Slici 13.f, VE-821 je djelomično spriječio zastoj u staničnom ciklusu te značajno spriječio povećanje izražaja biljega CD11b u odgovoru na AIKAr i brekvinar. Pritom je važno napomenuti kako je VE-821 korišten u koncentraciji od 2 μ M koja sama po sebi ne ostvaruje značajnije učinke na proučavane stanice (Slika 13.f). Na temelju ovih rezultata može se zaključiti kako je za diferencijaciju stanica u odgovoru na AIKAr i brekvinar odgovoran isti signalni put odgovora na oštećenje DNA.



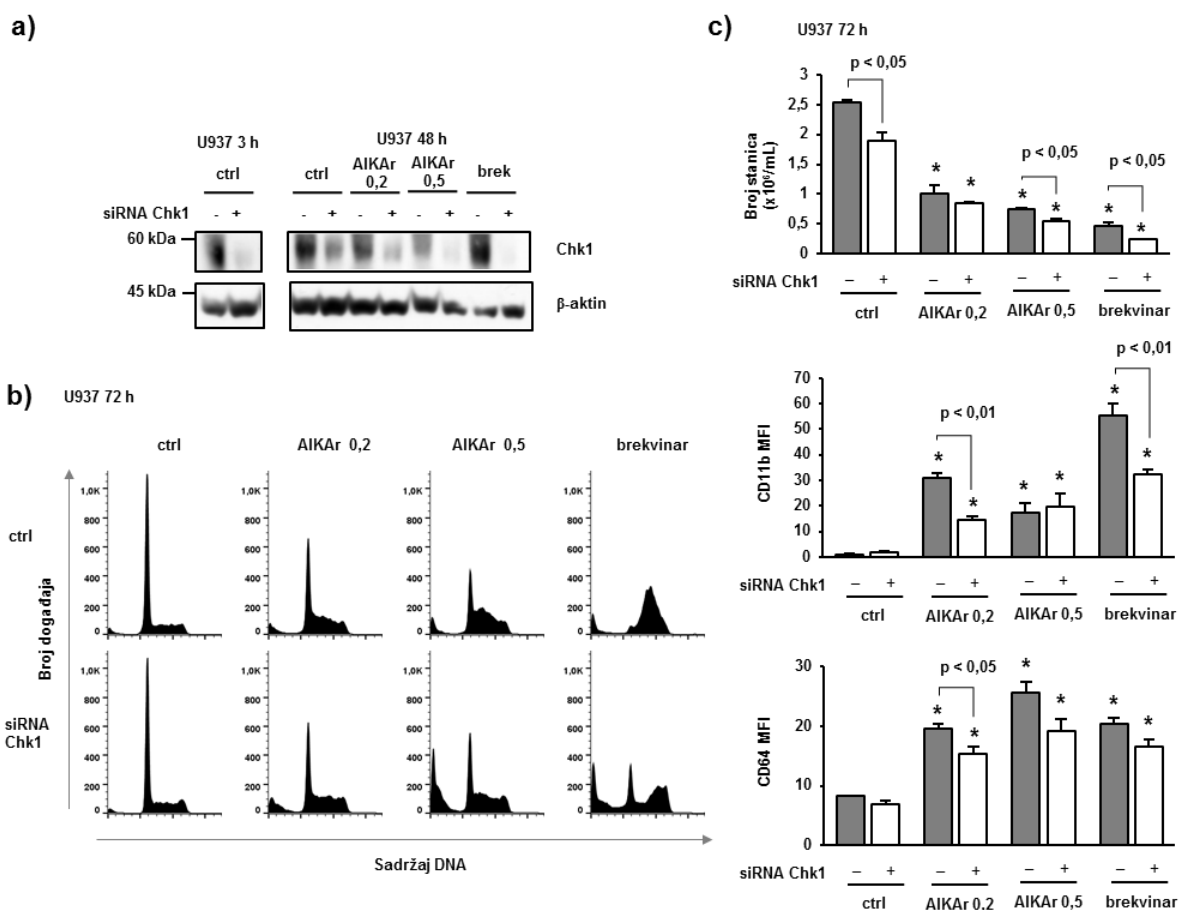
Slika 13. AIKAr pospešuje aktivnost Chk1, a farmakološki inhibitori signalnoga puta ATR/Chk1 smanjuju njegove učinke na stanični ciklus i diferencijaciju stanica. Stanice U937 uzgajane su u nazočnosti a) AIKAr-a

(0,5 mM), smjese nukleozida (nukl) i uridina (30 i 300 μ M); **b**) rastućih koncentracija AIKAr-a (0,1, 0,2 ili 0,5 mM), brekvinara (0,1 ili 0,5 μ M) i njihovih kombinacija; **c**) AIKAr-a (0,2 i 0,5 mM) i brekvinara (0,5 μ M) uz dodatak kofeina (4 mM) 5-15 minuta prije dodavanja ispitivanih tvari. Ukupni stanični lizati izolirani su nakon 48 sati inkubacije te analizirani metodom Western blot radi utvrđivanja količine Ser345-fosforiliranog Chk1 (p-Chk1). Prikazani su primjerni rezultati tri nezavisna pokusa (**a** – **c**). Stanice U937 inkubirane su tijekom 72 sata u nazočnosti AIKAr-a (0,2 i 0,5 mM) i brekvinara (0,5 μ M). Farmakološki inhibitori puta ATR/Chk1, kofein (4 mM) (**d**), Torin2 (100 nM) (**e**) i VE-821 (2 μ M) (**f**) dodani su 30 minuta prije dodavanja ispitivanih tvari. Prikazani su primjerni histogrami analize udjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. Broj živih stanica određen je pomoću hemocitometra i tripanskog modrila, a izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD64 pomoću protočne citometrije. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SEM iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test).

5.8. Smanjenje količine proteina Chk1 umanjuje učinke AIKAr-a na stanični ciklus i diferencijaciju u stanicama transficiranim specifičnom siRNA

Poznato je kako farmakološki inhibitori ne ostvaruju samo specifičnu inhibiciju puta ATR/Chk1, već da djeluju i na druge stanične enzime. Torin2, osim na kinazu ATR, inhibicijski djeluje na kinazu mTOR (prema engl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin*) te inhibira fosforilaciju kinaze S6K posredovanu kompleksom mTORC1 (prema engl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1*). Također, inhibicijski djeluje na ATM i DNA-PK (prema engl. *DNA-dependent protein kinase*) (134). Za razliku od Torin2, inhibicijski učinci VE-821 na mTOR, ATM i DNA-PK zanemarivi su, međutim, VE-821 je primarno inhibitor ATR-a, a ne selektivni inhibitor kinaze Chk1 (135).

Iz tog razloga, kako bismo potvrdili uključenost Chk1 u diferencirajućim učincima AIKAr-a i brekvinara, ispitali smo njihove učinke u stanicama u kojima je Chk1 posttranslacijski utišan pomoću RNA-interferencije. Kao što je prikazano na Slici 14.a, transfekcija specifičnom siRNA smanjila je količinu Chk1 u kontrolnim stanicama i stanicama tretiranim AIKAr-om i brekvinarom. Smanjenje količine proteina Chk1 umanjilo je učinke AIKAr-a i brekvinara na stanični ciklus (Slika 14.b) i diferencijaciju (Slika 14.c), čime je potvrđeno da je diferencijacija stanica U937 u odgovoru na AIKAr i brekvinar posredovana aktivacijom kinaze Chk1.



Slika 14. Smanjenje količine proteina Chk1 transfekcijom siRNA umanjuje učinke AIKAr-a na zastoju u S-fazi staničnoga ciklusa i izražaj biljega diferencijacije. Stanice U937 transficirane su odgovarajućom kontrolnom siRNA i siRNA usmjerenom protiv Chk1 (kombinacija četiri slijeda). AIKAr (0,2 ili 0,5 mM) i brekvinar (brek) (0,5 μ M) dodani su 24 sata nakon transfekcije. **a)** Ukupni stanični lizati izolirani su 3 sata ili 48 sati nakon dodatka ispitivanih tvari te analizirani metodom Western blot radi utvrđivanja količine ukupnog Chk1. Prikazani su primjerni rezultati tri nezavisna pokusa. **b)** Primjerni histogrami analize udjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. **c)** Broj živih stanica određen brojenjem pomoću hemocitometra i tripanskog modrila te izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD64 određen pomoću protočne citometrije. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SEM iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test).

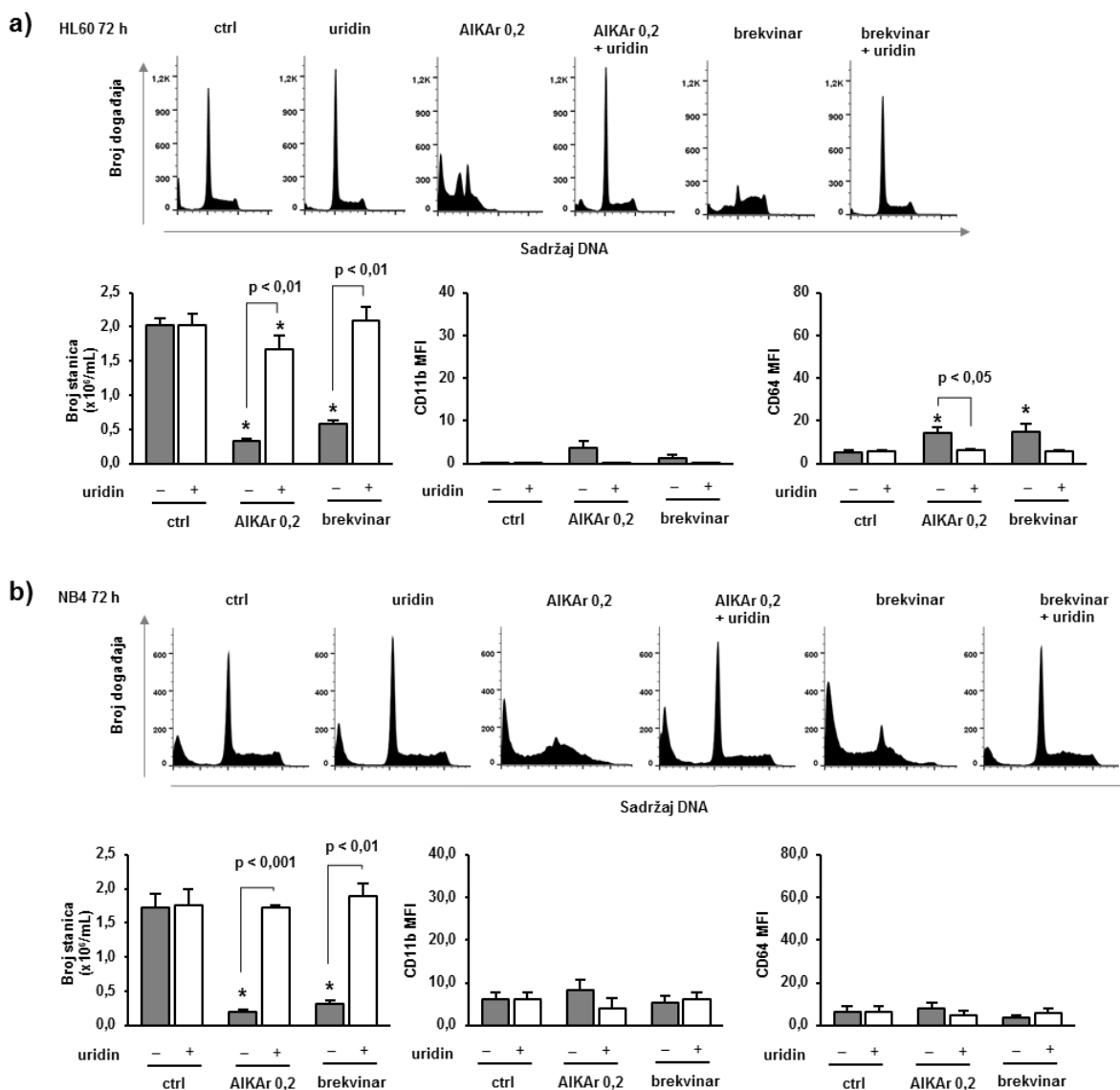
5.9. Učinci AIKAr-a na stanični ciklus i diferencijaciju zamjećuju se i u drugim monocitnim staničnim linijama

Kako bismo pokazali da učinci AIKAr-a nisu ograničeni samo na monocitnu liniju U937, ispitani su učinci AIKAr-a na stanični ciklus te diferencijaciju i na drugim staničnim linijama: mijeloblastičnoj HL60, promijelocitnoj NB4 te monocitnim linijama MOLM-14 i THP-1. Kao što je prikazano na Slici 15, u linijama HL60 i NB4 AIKAr i brekvinar statistički značajno

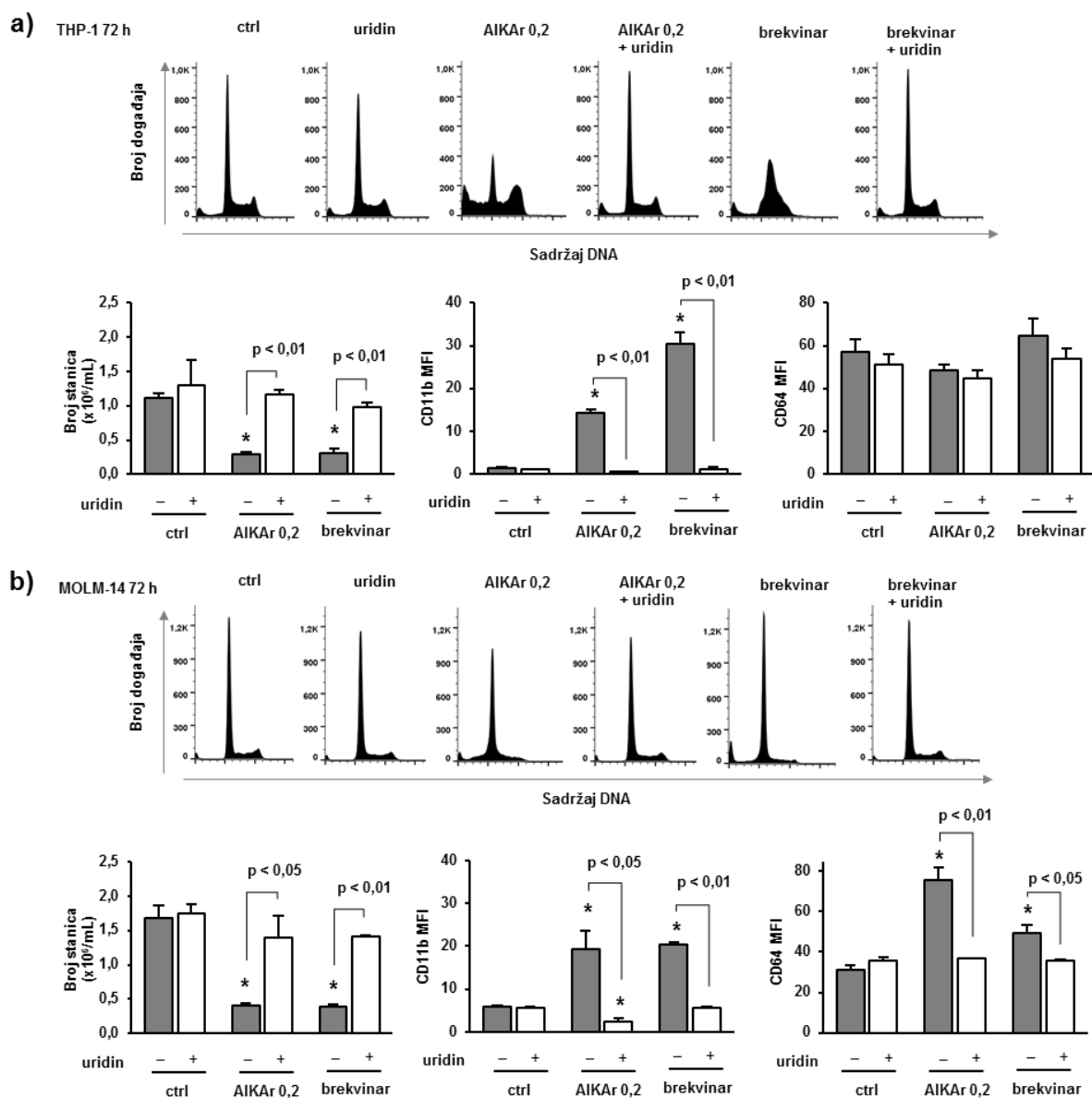
smanjuju broj živih stanica te povećavaju udio stanica u sub-G₀-fazi staničnog ciklusa. Međutim, u stanicama HL60 i NB4 nije zamijećeno statistički značajno povećanje izražaja biljega CD11b u odgovoru na AIKAr, kao što je prethodno opisano (101). Dodatno, u stanicama HL60 zamijećeno je malo, ali statistički značajno povećanje izražaja biljega CD64 koje je poništeno dodatkom uridina. Kao što je prikazano na Slici 15, učinci AIAKr-a na izražaj diferencijacijskih biljega jednaki su učincima brekvinara u obje stanične linije.

Međutim, u monocitnim staničnim linijama THP-1 i MOLM-14, AIKAr i brekvinar uzrokovali su statistički značajno povećanje izražaja biljega CD11b i smanjenje broja živih stanica, koje je poništeno uridinom (Slika 16). U linije THP-1 u kojoj je prisutan visok bazalni izražaj biljega CD64, AIKAr i brekvinar nemaju učinka na izražaj CD64. Međutim, u liniji MOLM-14 AIKAr i brekvinar povećavaju izražaj CD64 slično učincima u stanicama U937. Analiza staničnog ciklusa pokazala je da AIKAr i brekvinar u stanicama THP-1 uzrokuju zastoje u S-fazi staničnog ciklusa slično učincima opisanima u liniji U937. U stanicama linije MOLM-14 obje su tvari zakočile prolazak stanica kroz stanični ciklus već u ranoj S-fazi (Slika 16).

Iz toga se može zaključiti kako AIKAr-om posredovana diferencijacija posljedično nedostatku pirimidina nije ograničena na liniju U937, već se javlja i u drugim monocitnim leukemijskim linijama.



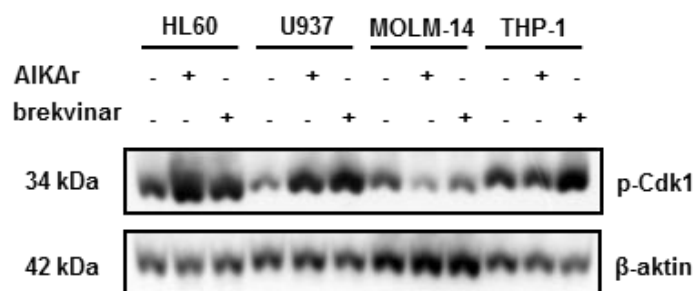
Slika 15. U stanicama mijeloblastične i promijelocitne linije AIKAr smanjuje broj živih stanica i taj se učinak može poništiti uridinom. Mijeloblastične stanice HL60 (a) i promijelocitne stanice NB4 (b) inkubirane su tijekom 72 sata u nazočnosti AIKAr-a (0,2 mM) ili brekvinara (0,5 μ M), u mediju s dodatkom (+) ili bez dodatka (-) uridina (300 μ M). Prikazani su primjerni histogrami analize udjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. Broj živih stanica određen je pomoću hemocitometra i tripanskog modrila, a izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD64 pomoću protočne citometrije. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SEM iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test).



Slika 16. AIKAr uzrokuje zastoju u staničnom ciklusu te diferencijaciju stanica i drugih monocitnih staničnih linija, a ti učinci bivaju poništeni uridinom. Monocitne stanice THP-1 (a) i MOLM-14 (b) inkubirane su tijekom 72 sata u nazočnosti AIKAr-a (0,2 mM) ili brekvinara (0,5 μ M), u mediju s dodatkom (+) ili bez dodatka (-) uridina (300 μ M). Prikazani su primjerni histogrami analize udjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. Broj živih stanica određen je pomoću hemocitometra i tripanskog modrila, a izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD64 pomoću protočne citometrije. Rezultati su srednje vrijednosti \pm SEM iz tri nezavisna pokusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (ctrl) (Studentov t-test).

5.10. Zastoj u S-fazi staničnog ciklusa potaknut AIKAr-om povezan je s inhibicijom Cdk1

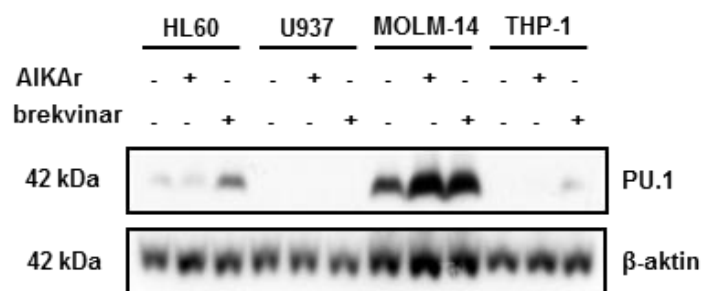
Kinaza Chk1 regulira prolazak stanica kroz S- i G₂/M-fazu staničnog ciklusa regulacijom aktivnosti kinaze Cdk1 (115). Budući da su naši rezultati pokazali da AIKAr i brekvinar koče prolazak staničnih linija U937, HL60 i THP-1 u S- i/ili G₂-fazi, ispitali smo učinak AIKAr-a i brekvinara na fosforilaciju Cdk1 na aminokiselinskom ostatku Tyr15, koja se smatra pokazateljem inhibicije aktivnosti Cdk1. Kao što je prikazano na Slici 17, obje su tvari potaknule fosforilaciju Cdk1 u linijama HL60, U937 i THP-1, što je u skladu s prethodno opisanim rezultatima analize staničnog ciklusa. U liniji MOLM-14, u kojoj je učinak AIKAr-a i brekvinara na stanični ciklus zastoj već u ranoj S-fazi, nema povećanja fosforilacije Cdk1.



Slika 17. AIKAr-om potaknuti zastoj u S-fazi staničnog ciklusa povezan je s inhibicijom Cdk1. Ukupni stanični lizati izolirani su nakon 48 sati inkubacije te analizirani metodom Western blot radi utvrđivanja količine Tyr15-fosforiliranog oblika Cdk1 (p-Cdk1). Prikazani su primjerni rezultati tri nezavisna pokusa.

5.11. Diferencijacija stanične linije MOLM-14 potaknuta AIKAr-om povezana je s povećanim izražajem transkripcijskog čimbenika PU.1

Budući da je poznato da prilikom razvoja makrofaga dolazi do produljenja staničnog ciklusa uz povećanje unutarstanične količine proteina PU.1 (124) te da taj transkripcijski čimbenik sudjeluje u usklađivanju staničnog ciklusa s diferencijacijom mijeloidnih progenitora (124,125), odlučili smo ispitati njegov izražaj u stanicama tretiranih AIKAr-om i brekvinarom. Kao što je prikazano na Slici 18, analiza ukupne količine transkripcijskog čimbenika PU.1 u ukupnim lizatima stanica linija HL60, U937, MOLM-14 i THP-1, pokazala je da je količina proteina PU.1 najveća u kontrolnim stanicama linije MOLM-14 te da se dodatno povećava nakon izlaganja AIKAr-u i brekvinaru.



Slika 18. U staničnoj liniji MOLM-14 povećan je izražaj transkripcijskog čimbenika PU.1. Ukupni stanični lizati izolirani su nakon 48 sati inkubacije te analizirani metodom Western blot radi utvrđivanja ukupne količine transkripcijskog čimbenika PU.1. Prikazani su primjerni rezultati tri nezavisna pokusa.

6. RASPRAVA

6.1. Učinci AIKAr-a na metabolizam glukoze i glutamina leukemijskih stanica

Metabolički putevi malignih stanica nisu samo naglašeniji fiziološki anabolički procesi kakve pronalazimo u zdravim tkivima visokog stupnja proliferacije, već je riječ o složenim promjenama staničnog metabolizma u svrhu ostvarivanja najvećeg mogućeg anabolizma, uz zaštitu od povećane razine oksidativnog stresa te zaobilaznje uobičajenih kontrolnih točaka staničnog ciklusa.

Uloga glikolize u diferencijaciji leukemijskih stanica samo je djelomice istražena, međutim, istraživanje koje su proveli Wu i sur. (132) još je 1991. godine opisalo kako ATRA u stanicama linije HL60, u koje su i izvorno bili ustanovljeni njeni diferencirajući učinci, smanjuje potrošnju glukoze i stvaranje laktata tijekom procesa diferencijacije. Rezultati našeg istraživanja podudarni su s rezultatima spomenute studije te također pokazuju da ATRA, primijenjena u koncentraciji koja dovodi do diferencijacije stanica (101), ostvaruje jednake učinke na glikolitičku aktivnost stanica HL60. U malignih je stanica povećana aktivnost glikolize radi zadovoljenja povećanih energetske zahtjeva prilikom izraženog staničnog rasta i proliferacije. Poznato je kako maligne stanice pokazuju sklonost oslanjanju na glikolitički put čak i u aerobnim uvjetima, dok je viši stupanj diferencijacije stanica povezan sa smanjenjem aktivnosti glikolize i povećanjem aktivnosti oksidativnog metabolizma (33–35). Iako glikoliza rezultira nastankom manjeg broja molekula ATP-a kao temeljne „energetske valute“ stanice u odnosu na oksidativnu fosforilaciju, pretpostavlja se da sklonost malignih stanica tom metaboličkom putu proizlazi iz činjenice da su odabirom tih kemijskih procesa manje izložene nastanku slobodnih radikala kisika (prema engl. *reactive oxygen species, ROS*), koji bi doveli do oštećenja staničnih struktura i genetskog materijala (136). Druga od postojećih teorija jest da je metabolizam temeljen na iskorištavanju glukoze naprosto odraz nemogućnosti malignih stanica da prijeđu na oksidativnu fosforilaciju kao temeljni metabolički proces svojstven diferenciranim stanicama (137). Rezultati našeg prethodnog istraživanja koji pokazuju da metformin ne potiče diferencijaciju stanica HL60 i U937 (101), u skladu su s tom teorijom jer metformin koči oksidativnu fosforilaciju (38), a rezultati ovoga istraživanja pokazuju da metformin potiče potrošnju glukoze i nastanak laktata.

Povezanost metabolizma glukoze i diferencijacije stanica potvrđena je u oba smjera. Izuzev promjena u metabolizmu do kojih dolazi promjenom stupnja diferencijacije stanica, poznato je i kako je djelovanjem na stanični metabolizam moguće spriječiti ili potaknuti njihovu diferencijaciju. Tako je, primjerice, inhibicijom glikolitičkih enzima moguće potaknuti diferencijaciju embrionalnih matičnih stanica, jer promjene koncentracije acetil-koenzima A utječu na acetilaciju histona te izražaj gena uključenih u diferencijaciju (138).

U skladu s rezultatima ranijih studija, potrošnja glukoze u stanicama U937 bila je veća u odnosu na potrošnju stanica HL60. Naime, za razliku od stanične linije HL60, u stanicama U937 je, posljedično deleciji tumorsupresorskog gena *PTEN*, povećana aktivnost glikolitičkog puta i u bazalnim uvjetima (38).

Iako AIKAr potiče diferencijaciju staničnih linija HL60 i U937 (101), rezultati ovog istraživanja pokazuju kako AIKAr, za razliku od ATRA-e, nije ostvario značajni učinak na potrošnju glukoze i stvaranje laktata ni u jednoj od dvije spomenute stanične linije. Učinci AIKAr-a na glikolizu razlikuju se i od učinaka metformina, iako oba spoja aktiviraju AMPK, što je u skladu s prethodnim istraživanjem koje je pokazalo da je diferencijacija potaknuta AIKAr-om neovisna o AMPK-u (101). Za ispravnu interpretaciju takvog rezultata na biokemijskoj razini, bila bi potrebna opsežna daljnja istraživanja svih uključenih metaboličkih puteva. Međutim, budući da je poznato kako je u stanicama višeg stupnja diferencijacije manja aktivnost glikolitičkog puta, dok istovremeno u stanicama tretiranim AIKAr-om dolazi do aktivacije AMPK-a i poticanja metaboličkih puteva kojima se dobiva energija, postoji i mogućnost da usporednost diferencijacije stanica i aktivacije AMPK-a dovodi do ukupnog učinka koji se očituje kao izostanak promjene potrošnje glukoze i nastanka laktata.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako jedino dodatak AIKAr-a rezultira povećanim stvaranjem amonijaka u mediju stanica HL60 i U937. Izostanak takvog učinka u stanicama tretiranim ATRA-om sugerira kako pojačano stvaranje amonijaka u odgovoru na AIKAr nije posljedica diferencijacije stanica *per se*, već one u odgovoru na AIKAr.

Amonijak stvoren glutaminolizom poznati je regulator autofagije (44), međutim naše je prethodno istraživanje pokazalo da učinci AIKAr-a na diferencijaciju stanica nisu ovisni o ključnim proteinima kanonskog puta aktivacije autofagije (105).

Povezanost glutamina i diferencijacije stanica dobro je poznata. U našem je istraživanju nedostatak egzogenog glutamina samostalno potaknuo diferencijaciju kontrolnih stanica U937,

kao što je prethodno utvrđeno studijom Spittlera i sur. (54) koja je pokazala kako smanjenje koncentracije glutamina u mediju dovodi do smanjenja sinteze DNA i potiče diferencijaciju stanica U937 u monocitnom smjeru.

Na liniji HL60 također je prethodno utvrđeno kako uskraćivanje esencijalnih aminokiselina, među koje je kao uvjetno-esencijalna aminokiselina bio ubrojen i glutamin, potiče diferencijaciju tih leukemijskih stanica u monocitnom smjeru te dovodi do smanjenja sinteze nukleinskih kiselina i promjena u staničnom ciklusu po tipu zaustavljanja stanica u G₀/G₁-fazi staničnog ciklusa (139). S druge strane, manjak glutamina, dovodeći do manjka glutationa, jednog od ključnih regulatora oksido-redukcijskog statusa stanice, dovodi do povišenja ROS-a u stanica HL60 (49). S obzirom na to da je poznato kako oksido-redukcijski status stanice utječe na diferencijaciju leukemijskih stanica, te da je utvrđeno kako oksidativni stres može djelovati poticajno na diferencijaciju stanica HL60 u granulocitnom smjeru (140), moguće je da nedostatak glutamina takvim mehanizmom također potiče njihovu diferencijaciju, samo u drugom od mogućih smjerova sazrijevanja.

Iako manjak glutamina, odnosno dodatak AIKAr-a, sami po sebi potiču diferencijaciju stanica U937, naši rezultati pokazuju kako je, u nedostatku egzogenog glutamina, odnosno inhibicijom GLS1, značajno smanjen učinak AIKAr-a na povećano stvaranje amonijaka, a također i na izražaj diferencijacijskog biljega CD11b. Takvi uvjeti uzgoja, međutim, nisu umanjili diferencirajući učinak ATRA-e, dodatno potvrđujući važnost prisutnosti glutamina u diferencijaciji stanica posredovanoj AIKAr-om, ali ne i ATRA-om.

Glutamin je važan izvor energije osobito za maligne stanice budući da glutaminolizom nastali glutamat, po pretvorbi u α -KG, može biti usmjeren prema Krebsovom ciklusu (49). Međutim, izuzev učinaka na energetske metabolizam i biosintetske procese stanice, glutamin posredstvom α -KG-a ostvaruje i epigenetske promjene. α -KG podrijetlom iz glutamina pokazao se značajnim za epigenetsku modulaciju gena alternativne aktivacije makrofaga putem histonske demetilaze Jmjd3 (prema engl. *Jumonji domain-containing protein D3*) (50). Rezultati našeg istraživanja pokazuju kako se učinci manjka glutamina, odnosno inhibicije glutaminaze, na diferencijaciju leukemijskih stanica ne mogu nadomjestiti dodatkom α -KG-a. Studija Oburoglu i sur. pokazala je kako inhibicija metabolizma glutamina potiče diferencijaciju hematopoetskih matičnih stanica u mijelomonocitnom, umjesto eritroidnog smjera sazrijevanja čak i u prisutnosti eritropoetina (53). Naši rezultati, međutim, pokazuju kako manjak glutamina, ali ne i inhibicija glutaminaze, povećava izražaj diferencijacijskih

biljega CD11b i CD64 u leukemijske stanične linije U937. U spomenutoj je studiji također utvrđeno kako se u hematopoetskim matičnim stanicama učinci inhibicije glutaminaze ne mogu poništiti dodatkom α -KG-a, već samo dodatkom egzogenih nukleozida, čime se nadoknađuju nukleotidi unutar stanice (53).

6.2. Učinci AIKAr-a posredovani su inhibicijom sinteze pirimidina *de novo*

Glutamin je jedan od temeljnih supstrata u sintezi pirimidina *de novo*, sudjelujući u prvoj od slijeda reakcija sinteze pirimidinskih nukleotida. Prethodno diobi stanice, tijekom S-faze staničnog ciklusa, odvija se udvostručenje njezinog genetskog materijala. Budući da je kod malignih stanica sklonost umnažanju još izraženija, procesi nukleotidnog metabolizma još su izrazitiji, a izražaj proteina uključenih u metabolizam nukleotida, kao i aktivnost pripadajućih biokemijskih reakcija povećani. Nadalje, u malignih je stanica naglašenije oslanjanje na putove sinteze nukleotida *de novo* u odnosu na tzv. spasonosni (prema engl. *salvage*) put (141). Takva svojstva malignih stanica čine ih osobito osjetljivima na perturbacije na razini metabolizma nukleotida, bilo da se radi o njihovoj sintezi ili ugradnji u DNA molekulu.

Poznato je da se u slučaju teških, tj. nepopravljivih oštećenja DNA stanice usmjeravaju u apoptozu ili stanje mirovanja, kako bi se spriječio prijenos takvih promjena na stanice kćeri. Već su rana istraživanja utvrdila kako inhibicija sinteze DNA može potaknuti i terminalnu diferencijaciju leukemijskih stanica, neovisno radi li se o inhibiciji putem ugradnje u novosintetizirani lanac DNA, kao što je to slučaj kod citarabina, ili mehanizmom inhibicije DNA-polimeraze bez ugradnje u DNA, kao u slučaju afidikolina (58). Uz to, utvrđen je sinergizam diferencirajućeg učinka retinske kiseline i inhibitora sinteze DNA (142).

Nadalje, nekolicina istraživanja utvrdila je važnost metabolizma nukleotida, kao i njihovih međusobnih omjera unutar stanice, u mijeloidnoj diferencijaciji. Usporedno s indukcijom sazrijevanja stanica, uočene su promjene u metabolizmu nukleotida. U malignih su stanica putevi uključeni u sintezu nukleotida izrazito aktivni, dok aktivnost tih puteva opada po indukciji diferencijacije stanica, kao što je to opisano na primjeru linije HL60 (143). Također, inhibicijom enzima uključenih u sintezu nukleotida smanjuje se proliferacija leukemijskih stanica te se inducira njihovo funkcionalno i morfološko sazrijevanje (143). Osim toga, prilikom sazrijevanja leukemijskih stanica dolazi do promjena u unutrastaničnom sastavu

nukleotida te u omjerima purina i pirimidina (144). Iz navedenih i sličnih zapažanja proizlazi da su unutarstanična raspoloživost nukleotida, putevi njihove sinteze, kao i enzimi uključeni u kataliziranje pojedinih reakcija tih puteva, važni regulatori mijeloidne diferencijacije.

Svi rezultati našeg istraživanja potvrđuju da je sinteza pirimidina ključna za diferencijaciju potaknutu AIKAr-om. Učinci AIKAr-a na izražaj biljega diferencijacije u potpunosti se ukidaju dodatkom smjese nukleozida ili uridina. AIKAr povećava koncentraciju orotata, a smanjuje koncentraciju UMP-a, što upućuje na inhibiciju UMP-sintaze, enzima koji katalizira reakciju nizvodno od DHODH-a u sintezi pirimidina *de novo*. U našem istraživanju male koncentracije AIKAr-a i brekvinara imaju sinergistički učinak, što dokazuje da su učinci posljedica manjka produkta, a ne nagomilavanja supstrata reakcije. Inhibicijski učinak na biosintetski put pirimidina te poticanje diferencijacije stanica stavljaju AIKAr uz bok inhibitorima DHODH-a poput brekvinara, ali i novijih sintetičkih spojeva ASLAN003 i PTC299, čiji je potencijal u liječenju AML-a predmetom istraživanja kliničkih studija (NCT03760666, NCT03451084, NCT03761069) te leflunomida, lijeka odobrenog za liječenje reumatoidnog artritisa, a koji se istražuje u liječenju multiplog mijeloma (NCT02509052, NCT04370483, NCT05014646, NCT04508790) (145).

Sva dosadašnja istraživanja učinaka AIKAr-a u hematološkim bolestima, kao što su kronična mijeloična leukemija (146) i kronična limfocitna leukemija (87,100) temelje se na proučavanju citotoksičnih učinaka, no mehanizam poticanja diferencijacije nije istražen. Slično rezultatima našeg istraživanja, citotoksični učinci AIKAr-a u stanicama akutne limfoblastične leukemije (147) i multiplog mijeloma (110), mogu se poništiti dodatkom uridina. U staničnim linijama limfoblastične leukemije zamijećen je porast orotata, DHO-a i karbamoil-aspartata u odgovoru na AIKAr, koji izostaje primjenom agonista AMPK-a, A-769662 što potvrđuje kako nije riječ o učincima posredovanim AMPK-om (148). Nadalje, slični su učinci neovisni o AMPK-u opisani u stanicama multiplog mijeloma, pri čemu je kao mogući mehanizam inhibicije UMP-sintaze bilo predloženo smanjenje koncentracije 5-fosforibozil-1-pirofosfata (prema engl. *5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate*, PRPP) (110).

Smanjenje koncentracije PRPP-a zamijećeno je i u modelu stanične kulture fibroblasta u kojem je utvrđen neobični bifazični učinak AIKAr-a na stanični rast, nalik učincima zamijećenima u našem modelu. I u modelu fibroblasta zamijećen je pad u unutarstaničnim koncentracijama pirimidinskih nukleotida UTP-a i CTP-a uz povećanje koncentracije orotata u mediju, a predloženi mehanizam djelovanja AIKAr-a na razini pirimidinske sinteze bila je

inhibicija enzima orotat-fosforibozil-transferaze-orotidilat-dekarboksilaze (prema engl. *orotate phosphoribosyltransferase-orotidyllic decarboxylase*, *OPRT-ODC*), odnosno UMP-sintaze (149). U našem istraživanju, manja koncentracija AIKAr-a (0,2 mM) ima veći učinak na zastoj u S-fazi staničnog ciklusa, diferencijaciju te povećanje koncentracije orotata, nego veća koncentracija (0,5 mM), a veća koncentracija AIKAr-a još dodatno smanjuje učinke brekvinara. U modelu fibroblasta, 0,2 mM AIKAr jače koči proliferaciju fibroblasta od 0,7 mM koncentracije. Iako obje koncentracije smanjuju koncentraciju PRPP-a, koncentracije purina se bitno razlikuju jer manja koncentracija AIKAr-a povećava, dok veća koncentracija smanjuje koncentraciju purina (149). U našem modelu nismo izmjerili koncentracije purina, ali možemo pretpostaviti da je inhibicijski učinak veće koncentracije AIKAr-a na učinke brekvinara povezan sa smanjenjem koncentracije purinskih nukleotida. Dodatno, izmjerene koncentracije orotata u odgovoru na dvije koncentracije AIKAr-a u našem istraživanju ukazuju na to da niže koncentracije AIKAr-a ostvaruju izraženije učinke na inhibiciju UMPS-a te da bi mehanizam djelovanja 0,2 mM AIKAr-a mogao biti analogan djelovanju brekvinara na leukemijske stanice.

Ukratko, rezultati našeg istraživanja po prvi puta pokazuju ulogu pirimidinske sinteze u diferencijaciji potaknutoj AIKAr-om. Naime, pirimidinski metabolizam nije bio ispitan u modelima stanica u kojima AIKAr ostvaruje diferencirajuće učinke, kao što su eritroidna diferencijacija embrionalnih matičnih stanica (109), diferencijacija živčanih matičnih stanica u astrogljalnom smjeru (103), stimulacija mineralizacije osteoplastne stanične linije MC3T3-E1 (150), osteogenetska diferencijacija mezenhimalnih matičnih stanica (37), kao i epitelna diferencijacija Caco-2 stanične linije adenokarcinoma kolona (151).

6.3. Učinci AIKAr-a na aktivnost signalnoga puta ATR/Chk1

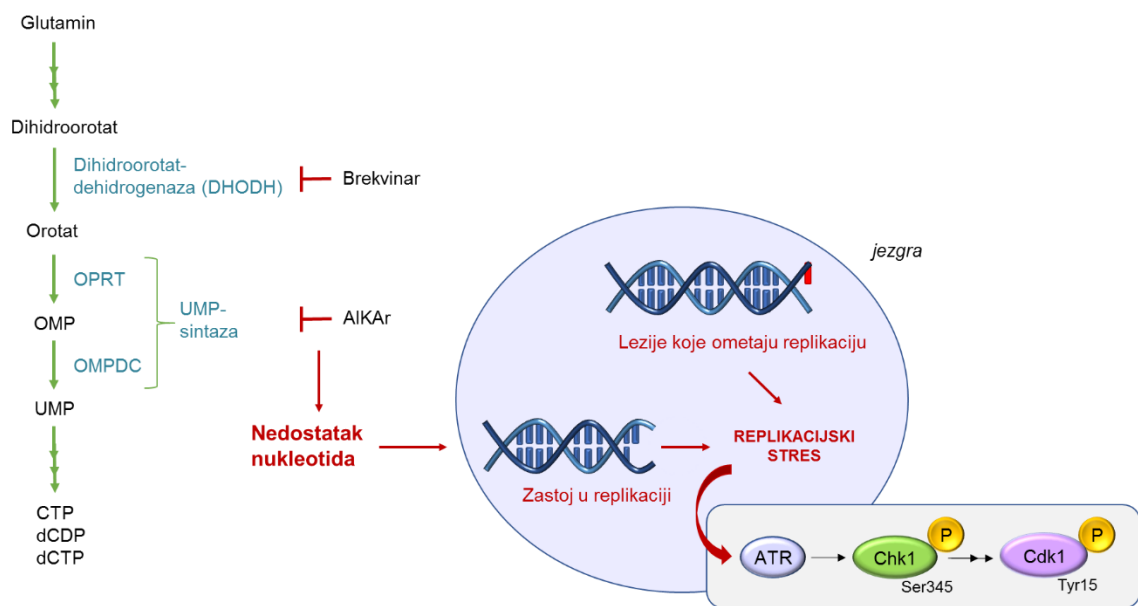
Aktivacija signalnoga puta ATR/Chk1 uglavnom se smatra staničnim mehanizmom odgovora na oštećenje DNA koji omogućuje zastoj u određenoj fazi staničnog ciklusa, mogući popravak oštećenja te preživljenje stanice. Ukoliko ovaj mehanizam popravka izostane, nastupa stanična smrt, pa se stoga u liječenju malignih bolesti uglavnom proučavaju inhibitori signalnoga puta ATR/Chk1. Osobito se istražuje sinergizam inhibitora i terapijskih pristupa koji dovode do povećane razine replikacijskog stresa, tj. oštećenja DNA molekule, poput zračenja i primjene lijekova koji djeluju na razini sinteze DNA (152). Na taj bi se način mogla povećati citotoksičnost kemoterapeutika poput doksorubicina i omogućiti djelotvornost

primjene nižih doza, odnosno nadvladati rezistencija tumorskih stanica na pojedine lijekove. Pritom se povišen izražaj nizvodnih proteina signalnog puta ATR/Chk1, poput fosfataze CDC25A, aktivatora kinaze Cdk1, razmatra kao pokazatelj osjetljivosti stanica na djelovanje inhibitora (153).

Sprječavanje djelovanja kontrolnih točaka staničnog ciklusa, tj. onemogućavanje odgovora stanice na replikacijski stres, dovodi do njenog ulaska u diobu sa značajnim greškama udvostručenja DNA molekule, što rezultira tzv. mitotičkom katastrofom, odnosno staničnom smrću (154,155). Stanična smrt posljedično primjeni inhibitora puta ATR/Chk1 željeni je ishod po maligne stanice, međutim, s obzirom na važnost uloge Chk1 u preživljenju limfocita B germinalnog centra, njihovo bi korištenje moglo, među ostalim, dovesti do neželjenih učinaka vezanih uz humoralnu imunost (156). Rezultati našeg istraživanja pokazuju kako se dodatkom odgovarajuće doze AIKAr-a, spoja obećavajućeg sigurnosnog profila, postiže aktivacija signalnoga puta ATR/Chk1 točno određenog stupnja te koja posljedično dovodi do zastoja u staničnom ciklusu i diferencijacije leukemijskih stanica. Diferencijacija u odgovoru na oštećenje DNA nije osobitost samo hematoloških stanica jer su slični učinci opisani u embrionalnih matičnih stanica (157) i matičnih stanica melanocita (158).

Poznato je kako nedostatak nukleotida može dovesti do aktivacije tzv. odgovora na oštećenje DNA. Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako AIKAr i brekvinar, inhibitor DHODH-a, potiču aktivaciju Chk1 i uzrokuju zastoj u S-fazi staničnog ciklusa te da izostanak aktivnosti Chk1, bilo putem primjene inhibitora signalnog puta ATR/Chk1, bilo pomoću RNA-interferencije, koči učinke na stanični ciklus i diferencijaciju stanica. Iz tog razloga predlažemo upravo aktivaciju signalnog puta ATR/Chk1 posljedično manjku pirimidina kao središnji mehanizam diferencijacije stanica leukemijske linije U937 u odgovoru na inhibitore pirimidinske sinteze (Slika 19).

Sinteza pirimidina *de novo* :



Slika 19. Shematski prikaz djelovanja proučavanih spojeva, AIKAr-a i brekvinara, na signalni put ATR/Chk1. Kratice (abecednim redom): ATR – prema engl. *ataxia-telangiectasia-mutated-and-Rad3-related kinase*), Cdk1 – kinaza ovisna o ciklinima 1 (prema engl. *cyclin-dependent kinase 1*), Chk1 – kinaza kontrolne točke 1 (prema engl. *checkpoint kinase 1*), Ser345 – aminokiselinski ostatak serin 345, CTP – citidin-5'-trifosfat, dCDP – deoksicitidin-5'-difosfat, dCTP – deoksicitidin-5'-trifosfat, OMP – orotidin-5'-monofosfat, OMPDC – OMP-dekarboksilaza (prema engl. *orotidine-5'-monophosphate decarboxylase*), OPRT – orotat-fosforibozil-transferaza (prema engl. *orotate phosphoribosyltransferase*), Tyr15 – aminokiselinski ostatak tirozin 15, UMP – uridin-5'-monofosfat.

Aktivacija nizvodnih kinaza kontrolnih točaka (Chk1 i Chk2) opisana je u diferencijaciji ljudskih leukemijskih staničnih linija. Uloga Chk1 opisana je u diferencijaciji leukemijske linije K562 u kojoj sniženje Chk1 i Chk2 pomoću transfekcije siRNA koči eritroidnu diferencijaciju potaknutu citarabinom (159), a aktivacija Chk1 utvrđena je i u diferencijaciji AML-a u odgovoru na manjak ATP-a (112).

Važnosti puta ATR/Chk1 u diferencijaciji stanica svjedoči činjenica kako je za više molekula nizvodno od kinaze Chk1 utvrđena povezanost s mijeloidnom diferencijacijom. Tako je opisano da CDC25A nadzire proliferaciju i diferencijaciju AML-a s mutacijom *FLT3-ITD* jer je pokazano da farmakološka inhibicija ili smanjenje količine CDC25A pomoću RNA-interferencije potiče monocitnu diferencijaciju stanica s mutacijom (160). U modelu diferencijacije stanica K562 potaknutih citarabinom zamijećena je proteosomalna razgradnja CDC25A i fosforilacija CDC25C (159).

CDC25 fosfataze reguliraju aktivnost Cdk1, a rezultati našeg istraživanja pokazuju inhibitornu fosforilaciju Cdk1 na aminokiselinskom ostatku Tyr15 u odgovoru na AIKAr i brekvinar u stanicama HL60, U937 i THP-1, što korelira sa zastojem u S- i G₂-fazi staničnog ciklusa. U stanicama AML-a prethodno je opisano da inhibicija Cdk1 potiče diferencijaciju. U staničnim linijama i primarnim uzorcima AML-a s mutacijom *FLT3* inhibicija Cdk1 potiče morfološku diferencijaciju, povećani izražaj biljega CD11b, kao i fosforilaciju CEBPA (prema *engl. CCAAT-enhancer-binding protein α*), transkripcijskog čimbenika koji potiče sazrijevanje (161). I druge kinaze ovisne o ciklinima mogu se regulirati pomoću Chk1 i CDC25, kao što je Cdk2, a prethodno je istraživanje pokazalo da se u stanicama AML-a koje se diferenciraju u granulocite zbiva proteasomalna razgradnja kinaze Cdk2 posljedično ubikvitinaciji (162). Dodatno, smanjeni izražaj Cdk6 zamijećen je tijekom eritroidne diferencijacije u stanicama mišje eritroleukemije (163).

U našem istraživanju nije zamijećena inhibitorna fosforilacija Cdk1 u liniji MOLM-14. Takvi su rezultati očekivani s obzirom na to da je Cdk1 ključan za prolazak kroz G₂/M-fazu staničnog ciklusa (115), a naši rezultati analize staničnog ciklusa pokazuju da i AIKAr i brekvinar zaustavljaju stanice MOLM-14 u ranoj S-fazi. Međutim, i AIKAr i brekvinar u monocitnoj liniji MOLM-14 potiču diferencijaciju, što pretpostavlja uključenost drugih kontrolnih točaka staničnog ciklusa. Osobitost linije MOLM-14 u odnosu na druge proučavane leukemijske linije divlji je tip gena *p53*, a znano je da protein *p53* regulira prolazak i kroz G₁/S-kontrolnu točku staničnog ciklusa pa bi mogao biti dijelom mehanizama kojim AIKAr i brekvinar potiču diferencijaciju stanica MOLM-14, osobito stoga što je uloga *p53* u diferencijaciji potaknutoj oštećenjem DNA već opisana u drugim staničnim modelima, kao što su embrionalne matične stanice (157). Dodatno, *p53* nadzire izražaj inhibitora kinaze ovisne o ciklinima *p21*, a prethodne studije pokazale su da manjak *p21* ukida diferencijaciju leukemijskih blasta u odgovoru na oštećenje DNA (164), dok povećani izražaj *p21* retroviralnom transdukcijom potiče mijeloidnu diferencijaciju (124). Mijeloidna diferencijacija potaknuta prekomjernim izražajem *p21* pripisuje se produljenom trajanju staničnog ciklusa koje omogućuje nakupljanje transkripcijskog čimbenika PU.1 (124), a povećani izražaj PU.1 zamijećen je i u stanicama AML-a koje diferenciraju zbog manjka Cdk2 (162). U našem istraživanju nismo ispitali moguće uloge *p53* i *p21* u diferencijaciji stanica MOLM-14, ali rezultati su pokazali da je nakupljanje transkripcijskog čimbenika PU.1 u odgovoru na AIKAr i brekvinar najizraženije u liniji MOLM-14.

Zaključno, naši rezultati upućuju da AIKAr potiče diferencijaciju leukemijskih stanica inhibicijom sinteze pirimidina i signaliziranjem oštećenja DNA, ali se nizvodni ciljevi odgovorni za diferencijaciju razlikuju u ovisnosti o mutacijskom statusu pojedine stanične linije. Nejasni su mehanizmi koji određuju ishod signaliziranja oštećenja DNA, a koji uključuju zastoj u ciklusu s ciljem popravka oštećene DNA, apoptozu, senescenciju ili staničnu diferencijaciju (165). Naši rezultati pokazuju da inhibitori pirimidinske sinteze potiču zastoj u S-fazi i aktivaciju Chk1 u linijama HL60, NB4, U937 i THP-1, ali se ishod aktivacije razlikuje jer u mijeloblastičnim HL60 i promijelocitnim stanicama NB4 prevladava apoptoza, dok u monocitnim linijama U937 i THP-1, AIKAr i brekvinar potiču diferencijaciju. Bez obzira na točan mehanizam koji određuje stanični ishod, naše nedavno objavljeno istraživanje pokazalo je da diferencirajući učinci AIKAr-a nisu ograničeni samo na stanice ljudskih leukemijskih linija, već se zamjećuju i u uzorcima koštane srži izoliranih iz pacijenata oboljelih od AML-a koja nije APL (166). U dva od pet uzoraka primarnih AML blasta koji su proliferirali *in vitro*, AIKAr je potaknuo izražaj biljega i morfološke promjene tipične za diferencijaciju u monocitno-makrofagnom smjeru. Ti učinci nisu korelirali s FAB-klasifikacijom ili mutacijskim statusom *FLT3* ili *NPM1* (prema engl. *nucleophosmin 1*), ali su korelirali s osjetljivošću na brekvinar, što upućuje na inhibiciju pirimidinske sinteze kao podležeći mehanizam djelovanja (166). Kao što je ranije opisano, zbog povećanih potreba pri proliferaciji, maligne stanice mnogo teže podnose nedostatak nukleotida i oslanjanje na tzv. spasonosne puteve, što sugerira povećanu osjetljivost malignih stanica na inhibitore pirimidinske sinteze u odnosu na zdrave stanice. Budući da je upravo inhibicija sinteze pirimidina *de novo* mehanizam kojim AIKAr potiče diferencijaciju stanica aktivacijom signalnog puta ATR/Chk1, takva bi svojstva leukemijskih stanica mogla omogućiti selektivnost njegovog djelovanja prilikom primjene.

Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se odredile podskupine oboljelih koji mogu odgovoriti na diferencijacijsko liječenje AIKAr-om, ali rezultati istraživanja pokazuju da signalni mehanizmi potaknuti manjkom pirimidina i oštećenjem DNA predstavljaju jedan od mogućih novih pristupa diferencijacijske terapije AML-a.

7. ZAKLJUČCI

1. AIKAr nema učinaka na potrošnju glukoze i stvaranje laktata, ali povećava stvaranje amonijaka.
2. Povećano stvaranje amonijaka potaknuto AIKAr-om i izražaj diferencijacijskih biljega ovisni su o glutaminu.
3. Dimetil- α -ketoglutarat i linolna kiselina ne mogu nadomjestiti manjak glutamina ili inhibiciju glutaminaze 1.
4. Smjesa nukleozida i uridin sprječavaju AIKAr-om posredovani zastoj stanica u S-fazi staničnog ciklusa i povećanje izražaja biljega diferencijacije.
5. AIKAr i brekvinar ostvaruju sinergistički učinak na stanični ciklus i diferencijaciju.
6. AIKAr koči sintezu primidina *de novo*.
7. AIKAr pospješuje aktivnost Chk1, a farmakološki inhibitori signalnoga puta ATR/Chk1 smanjuju njegove učinke na stanični ciklus i diferencijaciju.
8. Smanjenje količine proteina Chk1 umanjuje učinke AIKAr-a na stanični ciklus i diferencijaciju u stanicama transficiranim specifičnom siRNA.
9. Učinci AIKAr-a na stanični ciklus i diferencijaciju zamjećuju se i u drugim monocitnim staničnim linijama.
10. Zastoj u S-fazi staničnog ciklusa potaknut AIKAr-om povezan je s inhibicijom Cdk1.
11. Diferencijacija stanične linije MOLM-14 potaknuta AIKAr-om povezana je s povećanim izražajem transkripcijskog čimbenika PU.1.

8. SAŽETAK

5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleozid (AIKAr) prekursor je u biosintezi purina i poznati aktivator kinaze ovisne o AMP-u (AMPK). Naše je prethodno istraživanje pokazalo da AIKAr koči proliferaciju i potiče diferencijaciju stanica akutne mijeloične leukemije (AML) neovisno o AMPK-u. Cilj ovoga istraživanja bio je odrediti ulogu signalnoga puta ATR/Chk1 (prema engl. *ataxia-telangiectasia-mutated-and-Rad3-related/checkpoint kinase 1*) u diferencijaciji leukemijskih stanica potaknutoj AIKAr-om, koristeći metaboličke testove, tekućinsku kromatografiju s tandemskom spektrometrijom masa (LC/MS/MS), Western blot, protočnu citometriju, farmakološke inhibitore te RNA-interferenciju. Rezultati pokazuju kako učinci AIKAr-a na staničnu diferencijaciju ne ovise o potrošnji glukoze, već ovise o metabolizmu glutamina i sintezi nukleotida, odnosno aktivaciji kinaze Chk1 posljedično manjku pirimidina. LC/MS/MS analiza otkrila je da AIKAr povećava koncentraciju orotata i smanjuje koncentraciju uridin-monofosfata (UMP), u skladu s inhibicijom sinteze UMP-a u reakciji nakon dihidroorotat-dehidrogenaze (DHODH). AIKAr i inhibitor DHODH-a, brekvinar, povećali su izražaj biljega diferencijacije i zakočili stanice u S-fazi staničnog ciklusa. Inhibicija signalnoga puta Chk1 primjenom farmakoloških inhibitora i RNA-interferencije poništila je oba spomenuta učinka. Naši rezultati otkrivaju da je učinak AIKAr-a na diferencijaciju stanica AML uzrokovan poremećajem biosinteze pirimidina te posredovan aktivacijom signalnog puta u odgovoru na oštećenje DNA.

9. SUMMARY

Signaling mechanisms and metabolic changes during differentiation and proliferation of leukemia cells

Barbara Tomić

Zagreb, 2022

5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAr) is a precursor in purine biosynthesis and a well-known activator of AMP-dependent kinase (AMPK). Our previous research has shown that AICAr inhibits proliferation and promotes differentiation of acute myeloid leukemia (AML) cells in an AMPK-independent manner. The aim of this study was to determine the role of ataxia telangiectasia and RAD3-related (ATR)/checkpoint kinase 1 (Chk1) in AICAr-mediated differentiation of leukemia cells using metabolic tests, liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), Western blot, flow cytometry, pharmacological inhibitors and RNA-interference. The results show that AICAr-mediated differentiation is independent of glucose consumption, but instead depends on glutamine metabolism, nucleotide synthesis and activation of Chk1 due to pyrimidine depletion. LC/MS/MS analysis revealed that AICAr increased orotate levels and decreased uridine monophosphate (UMP) levels, consistent with inhibition of UMP synthesis at a step downstream of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH). AICAr and DHODH inhibitor, brequinar, increased the expression of differentiation markers and arrested cells in the S-phase of the cell cycle. Pharmacologic and siRNA-mediated inhibition of Chk1 pathway diminished both effects. Our results reveal that the effect of AICAr on AML differentiation is caused by impaired pyrimidine biosynthesis and mediated by the activation of DNA damage response pathway.

10. LITERATURA

1. Short NJ, Konopleva M, Kadia TM, Borthakur G, Ravandi F, DiNardo CD, i sur. Advances in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: New Drugs and New Challenges. *Cancer Discov.* 2020 Apr 3;10(4):506–25. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-1011.
2. de Thé H. Differentiation therapy revisited. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(2):117–27. doi:10.1038/nrc.2017.103.
3. 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 May 1;77(5):2936–40. doi:10.1073/pnas.77.5.2936.
4. Dalton Jr 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(1):242–7. doi:https://doi.org/10.1182/blood.V71.1.242.242.
5. Grignani F, Ferrucci PF, Testa U, Talamo G, Fagioli M, Alcalay M, i sur. The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR α fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell.* 1993 Aug 13;74(3):423–31. doi:10.1016/0092-8674(93)80044-F.
6. Nguyen CH, Grandits AM, Purton LE, Sill H, Wieser R. All-trans retinoic acid in non-promyelocytic acute myeloid leukemia: driver lesion dependent effects on leukemic stem cells. *Cell Cycle.* 2020 Oct 17;19(20):2573–88. doi:10.1080/15384101.2020.1810402.
7. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, i sur. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol.* 1976 Aug 1;33(4):451–8. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x.
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, i sur. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol.* 1991 Jul 1;78(3):325–9. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1991.tb04444.x.

9. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, i sur. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 Jan 26;129(4):424–47. doi:10.1182/blood-2016-08-733196.
10. Lo Presti C, Fauvelle F, Jacob M-C, Mondet J, Mossuz P. The metabolic reprogramming in acute myeloid leukemia patients depends on their genotype and is a prognostic marker. *Blood Adv*. 2021 Jan 6;5(1):156–66. doi:10.1182/bloodadvances.2020002981.
11. Dembitz V, Gallipoli P. The Role of Metabolism in the Development of Personalized Therapies in Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol*. 2021 May 19;11:665291. doi:10.3389/fonc.2021.665291.
12. 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 Jul 10;369(2):111–21. doi:10.1056/NEJMoa1300874.
13. Platzbecker U, Avvisati G, Cicconi L, Thiede C, Paoloni F, Vignetti M, i sur. Improved Outcomes With Retinoic Acid and Arsenic Trioxide Compared With Retinoic Acid and Chemotherapy in Non-High-Risk Acute Promyelocytic Leukemia: Final Results of the Randomized Italian-German APL0406 Trial. *J Clin Oncol*. 2016 Jul 11;35(6):605–12. doi:10.1200/JCO.2016.67.1982.
14. Golub D, Iyengar N, Dogra S, Wong T, Bready D, Tang K, i sur. Mutant Isocitrate Dehydrogenase Inhibitors as Targeted Cancer Therapeutics. *Front Oncol*. 2019 May 17;9:417. doi:10.3389/fonc.2019.00417.
15. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, i sur. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009;462(7274):739–44. doi:10.1038/nature08617.
16. 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 Mar;17(3):225–34. doi:10.1016/j.ccr.2010.01.020.

17. Julie-Aurore L, E. LR, Peppi K, Sungwoo L, K. SR, Christine M, i sur. (R)-2-Hydroxyglutarate Is Sufficient to Promote Leukemogenesis and Its Effects Are Reversible. *Science*. 2013 Mar 29;339(6127):1621–5. doi:10.1126/science.1231677.
18. Wang Y-H, Israelsen WJ, Lee D, Yu VWC, Jeanson NT, Clish CB, i sur. Cell-State-Specific Metabolic Dependency in Hematopoiesis and Leukemogenesis. *Cell*. 2014 Sep 11;158(6):1309–23. doi:10.1016/j.cell.2014.07.048.
19. Amatangelo MD, Quek L, Shih A, Stein EM, Roshal M, David MD, i sur. Enasidenib induces acute myeloid leukemia cell differentiation to promote clinical response. *Blood*. 2017 Aug 10;130(6):732–41. doi:10.1182/blood-2017-04-779447.
20. Patel KP, Ravandi F, Ma D, Paladugu A, Barkoh BA, Medeiros LJ, i sur. Acute Myeloid Leukemia With IDH1 or IDH2 Mutation: Frequency and Clinicopathologic Features. *Am J Clin Pathol*. 2011 Jan 1;135(1):35–45. doi:10.1309/AJCPD7NR2RMNQDVF.
21. DiNardo CD, Ravandi F, Agresta S, Konopleva M, Takahashi K, Kadia T, i sur. Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML. *Am J Hematol*. 2015 Aug 1;90(8):732–6. doi:https://doi.org/10.1002/ajh.24072.
22. DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Roboz GJ, Altman JK, Mims AS, i sur. Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *N Engl J Med*. 2018 Jun 2;378(25):2386–98. doi:10.1056/NEJMoa1716984.
23. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, Fathi AT, Roboz GJ, Altman JK, i sur. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017 Aug 10;130(6):722–31. doi:10.1182/blood-2017-04-779405.
24. Pollyea DA, Tallman MS, de Botton S, Kantarjian HM, Collins R, Stein AS, i sur. Enasidenib, an inhibitor of mutant IDH2 proteins, induces durable remissions in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2019;33(11):2575–84. doi:10.1038/s41375-019-0472-2.
25. Chen J-Y, Lai Y-S, Tsai H-J, Kuo C-C, Yen BL, Yeh S-P, i sur. The oncometabolite R-2-hydroxyglutarate activates NF- κ B-dependent tumor-promoting stromal niche for acute myeloid leukemia cells. *Sci Rep*. 2016;6(1):32428. doi:10.1038/srep32428.

26. Pikman Y, Puissant A, Alexe G, Furman A, Chen LM, Frumm SM, i sur. Targeting MTHFD2 in acute myeloid leukemia. *J Exp Med*. 2016 Jun 27;213(7):1285–306. doi:10.1084/jem.20151574.
27. Sykes DB, Kfoury YS, Mercier FE, Wawer MJ, Law JM, Haynes MK, i sur. Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase overcomes differentiation blockade in acute myeloid leukemia. *Cell*. 2016;167(1):171–86. doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.057.
28. Castro I, Sampaio-Marques B, Ludovico P. Targeting Metabolic Reprogramming in Acute Myeloid Leukemia. *Cells*. 2019 Aug 24;8(9):967. doi:10.3390/cells8090967.
29. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, i sur. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Dec 4;104(49):19345 LP – 19350. doi:10.1073/pnas.0709747104.
30. Ali NA, O'Brien Jr JM, Blum W, Byrd JC, Klisovic RB, Marcucci G, i sur. Hyperglycemia in patients with acute myeloid leukemia is associated with increased hospital mortality. *Cancer*. 2007 Jul 1;110(1):96–102. doi:https://doi.org/10.1002/cncr.22777.
31. Kuhlman P, Isom S, Pardee TS, Burns C, Tawfik B, Lamar ZS, i sur. Association between glycemic control, age, and outcomes among intensively treated patients with acute myeloid leukemia. *Support Care Cancer*. 2019;27(8):2877–84. doi:10.1007/s00520-018-4582-6.
32. Ye H, Adane B, Khan N, Alexeev E, Nusbacher N, Minhajuddin M, i sur. Subversion of Systemic Glucose Metabolism as a Mechanism to Support the Growth of Leukemia Cells. *Cancer Cell*. 2018;34(4):659-673.e6. doi:https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.08.016.
33. Warburg O. The Metabolism of Carcinoma Cells. *J Cancer Res*. 1925 Mar 1;9(1):148 LP – 163. doi:10.1158/jcr.1925.148.
34. Warburg O. On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science*. 1956 Aug 10;124(3215):269–70. doi:10.1126/science.124.3215.269.

35. Rashkovan M, Ferrando A. Metabolic dependencies and vulnerabilities in leukemia. *Genes Dev.* 2019 Nov 1;33(21–22):1460–74. doi:10.1101/gad.326470.119.
36. Balasundaram N, Ganesan S, Chendamarai E, Palani HK, Venkatraman A, Alex AA, i sur. Metabolic adaptation drives arsenic trioxide resistance in acute promyelocytic leukemia. *Blood Adv.* 2021 Oct 8; doi:10.1182/bloodadvances.2021005300.
37. Wu W, Ye Z, Zhou Y, Tan W-S. AICAR, a Small Chemical Molecule, Primes Osteogenic Differentiation of Adult Mesenchymal Stem Cells. *Int J Artif Organs.* 2011 Dec 1;34(12):1128–36. doi:10.5301/ijao.5000007.
38. 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 Nov;27:2129. doi:10.1038/leu.2013.107
39. 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 Jan 4;120(1):142–56. doi:10.1172/JCI38942.
40. Riffelmacher T, Clarke A, Richter FC, Stranks A, Pandey S, Danielli S, i sur. Autophagy-Dependent Generation of Free Fatty Acids Is Critical for Normal Neutrophil Differentiation. *Immunity.* 2017;47(3):466-480.e5. doi:https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.005.
41. 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 (Brooklyn).* 2006 Sep 1;20(5):587 LP – 589.
42. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci.* 2010 Aug 1;35(8):427–33. doi:10.1016/j.tibs.2010.05.003.
43. Fultang L, Gneo L, De Santo C, Mussai FJ. Targeting Amino Acid Metabolic Vulnerabilities in Myeloid Malignancies. *Front Oncol.* 2021 May 20;11:674720. doi:10.3389/fonc.2021.674720.
44. Eng CH, Yu K, Lucas J, White E, Abraham RT. Ammonia Derived from Glutaminolysis Is a Diffusible Regulator of Autophagy. *Sci Signal.* 2010 Apr 27;3(119):ra31–ra31. doi:10.1126/scisignal.2000911.

45. Willems L, Jacque N, Jacquet A, Neveux N, Trovati Maciel T, Lambert M, i sur. Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013 Nov 14;122(20):3521–32. doi:10.1182/blood-2013-03-493163.
46. Jacque N, Ronchetti AM, Larrue C, Meunier G, Birsen R, Willems L, i sur. Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. *Blood*. 2015 Sep 10;126(11):1346–56. doi:10.1182/blood-2015-01-621870.
47. Matre P, Velez J, Jacamo R, Qi Y, Su X, Cai T, i sur. Inhibiting glutaminase in acute myeloid leukemia: metabolic dependency of selected AML subtypes. *Oncotarget*. 2016 Nov;7(48):79722–35. doi:10.18632/oncotarget.12944.
48. Gallipoli P, Giotopoulos G, Tzelepis K, Costa ASH, Vohra S, Medina-Perez P, i sur. Glutaminolysis is a metabolic dependency in FLT3ITD acute myeloid leukemia unmasked by FLT3 tyrosine kinase inhibition. *Blood*. 2018 Apr 12;131(15):1639–53. doi:10.1182/blood-2017-12-820035.
49. Goto M, Miwa H, Shikami M, Tsunekawa-Imai N, Suganuma K, Mizuno S, i sur. Importance of Glutamine Metabolism in Leukemia Cells by Energy Production Through TCA Cycle and by Redox Homeostasis. *Cancer Invest*. 2014 Jul 3;32(6):241–7. doi:10.3109/07357907.2014.907419.
50. Liu P-S, Wang H, Li X, Chao T, Teav T, Christen S, i sur. α -ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. *Nat Immunol*. 2017 Sep;18(9):985–94. doi:10.1038/ni.3796.
51. Kuwahara M, Izumoto M, Honda H, Inoue K, Imai Y, Suzuki J, i sur. Glutamine metabolism regulates Th2 cell differentiation via the α -ketoglutarate-dependent demethylation of histone H3K27. *bioRxiv*. 2017 Jan 1;184648. doi:10.1101/184648.
52. 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. doi:10.1038/nature13981.

53. 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(2):169–84.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.002>.
54. Spittler A, Oehler R, Goetzinger P, Holzer S, Reissner CM, Leutmezer F, i sur. Low Glutamine Concentrations Induce Phenotypical and Functional Differentiation of U937 Myelomonocytic Cells. *J Nutr*. 1997 Nov 1;127(11):2151–7.
doi:10.1093/jn/127.11.2151.
55. Hatse S, De Clercq E, Balzarini J. Role of antimetabolites of purine and pyrimidine nucleotide metabolism in tumor cell differentiation. *Biochem Pharmacol*. 1999;58(4):539–55. doi:[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00035-0](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00035-0).
56. Siddiqui A, Ceppi P. A non-proliferative role of pyrimidine metabolism in cancer. *Mol Metab*. 2020/02/13. 2020 May;35:100962. doi:10.1016/j.molmet.2020.02.005.
57. Mollick T, Laín S. Modulating pyrimidine ribonucleotide levels for the treatment of cancer. *Cancer Metab*. 2020;8(1):12. doi:10.1186/s40170-020-00218-5.
58. Griffin J, Munroe D, Major P, Kufe D. Induction of differentiation of human myeloid leukemia cells by inhibitors of DNA synthesis. *Exp Hematol*. 1982 Oct;10(9):774–81.
59. Munroe D, Sugiura M, Griffin J, Kufe D. Effect of ara-A on differentiation and proliferation of HL-60 cells. *Leuk Res*. 1984;8(3):355–61.
doi:[https://doi.org/10.1016/0145-2126\(84\)90075-4](https://doi.org/10.1016/0145-2126(84)90075-4).
60. Fram RJ, Kufe DW. DNA Strand Breaks Caused by Inhibitors of DNA Synthesis: 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine and Aphidicolin. *Cancer Res*. 1982 Oct 1;42(10):4050 LP – 4053.
61. DSMZ. Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH - catalogue [Internet]. [cited 2021 Aug 22]. Available from: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue>
62. SIB. Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) - Cellosaurus - a knowledge resource on cell lines [Internet]. [cited 2021 Aug 22]. Available from: <https://web.expasy.org/cellosaurus/>

63. Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, Berger R. NB4, a Maturation Inducible Cell Line With t(15;17) Marker Isolated From a Human Acute Promyelocytic Leukemia (M3). *Blood*. 1991;77(5):1080–6.
doi:<https://doi.org/10.1182/blood.V77.5.1080.1080>.
64. Rovera G, O'Brien TG, Diamond L. Induction of Differentiation in Human Promyelocytic Leukemia Cells by Tumor Promoters. *Science* (80-). 1979 May 25;204(4395):868–70. doi:10.1126/science.286421.
65. Rovera G, Santoli D, Damsky C. Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc Natl Acad Sci*. 1979 Jun 1;76(6):2779 LP – 2783. doi:10.1073/pnas.76.6.2779.
66. Collins SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood*. 1987 Nov 1;70(5):1233–44.
doi:10.1182/blood.V70.5.1233.1233.
67. Birnie GD. The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br J Cancer Suppl*. 1988 Dec;9:41–5.
68. Takahashi H, Hatta Y, Iriyama N, Hasegawa Y, Uchida H, Nakagawa M, i sur. Induced Differentiation of Human Myeloid Leukemia Cells into M2 Macrophages by Combined Treatment with Retinoic Acid and 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3. *PLoS One*. 2014 Nov 19;9(11):e113722. doi:10.1371/journal.pone.0113722
69. Broad Institute. Broad Institute - depmap portal [Internet]. [cited 2021 Aug 22]. Available from: https://depmap.org/portal/cell_line/ACH-000406?tab=mutation
70. Olsson IL, Breitman TR. Induction of Differentiation of the Human Histiocytic Lymphoma Cell Line U-937 by Retinoic Acid and Cyclic Adenosine 3':5'-Monophosphate-inducing Agents. *Cancer Res*. 1982 Oct 1;42(10):3924 LP – 3927.
71. Song M, Ryoo I, Choi H, Choi B, Kim S-T, Heo T-H, i sur. NRF2 Signaling Negatively Regulates Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA)-Induced Differentiation of Human Monocytic U937 Cells into Pro-Inflammatory Macrophages. *PLoS One*. 2015 Jul 29;10(7):e0134235. doi:10.1371/journal.pone.0134235.

72. Chen L, Guo P, Zhang Y, Li X, Jia P, Tong J, i sur. Autophagy is an important event for low-dose cytarabine treatment in acute myeloid leukemia cells. *Leuk Res.* 2017 Sep;60:44–52. doi:10.1016/j.leukres.2017.06.007.
73. Matsuo Y, MacLeod RAF, Uphoff CC, Drexler HG, Nishizaki C, Katayama Y, i sur. Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, *ins(11;9)(q23;p22p23)*. *Leukemia.* 1997;11(9):1469–77. doi:10.1038/sj.leu.2400768.
74. Mathur D, Stratikopoulos E, Ozturk S, Steinbach N, Pegno S, Schoenfeld S, i sur. PTEN Regulates Glutamine Flux to Pyrimidine Synthesis and Sensitivity to Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibition. *Cancer Discov.* 2017 Mar 2;7(4):380-390. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0612
75. Schmid MC, Khan SQ, Kaneda MM, Pathria P, Shepard R, Louis TL, i sur. Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity. *Nat Commun.* 2018;9(1):5379. doi:10.1038/s41467-018-07387-4.
76. Roberts AL, Fürnrohr BG, Vyse TJ, Rhodes B. The complement receptor 3 (CD11b/CD18) agonist Leukadherin-1 suppresses human innate inflammatory signalling. *Clin Exp Immunol.* 2016 Sep 1;185(3):361–71. doi:10.1111/cei.12803.
77. Višnjić D, Batinić D, Banfić H. Arachidonic Acid Mediates Interferon- γ -Induced Sphingomyelin Hydrolysis and Monocytic Marker Expression in HL-60 Cell Line. *Blood.* 1997;89(1):81–91. doi:https://doi.org/10.1182/blood.V89.1.81.
78. Višnjić D, Lalić H, Dembitz V, Tomić B, Smoljo T. AICAr, a Widely Used AMPK Activator with Important AMPK-Independent Effects: A Systematic Review. *Cells.* 2021 May 4;10(5):1095. doi:10.3390/cells10051095.
79. Mangano DT. Effects of acadesine on myocardial infarction, stroke, and death following surgery: a meta-analysis of the 5 international randomized trials. *JAMA.* 1997 Jan 22;277(4):325–32. doi:10.1001/jama.1997.03540280063035.

80. Towler MC, Hardie DG. AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling. *Circ Res.* 2007 Feb 16;100(3):328–41. doi:10.1161/01.RES.0000256090.42690.05.
81. Hardie DG, Schaffer BE, Brunet A. AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends Cell Biol.* 2016 Mar;26(3):190–201. doi:10.1016/j.tcb.2015.10.013.
82. Garcia D, Shaw RJ. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol Cell.* 2017 Jun 15;66(6):789–800. doi:10.1016/j.molcel.2017.05.032.
83. Višnjić D, Lalić H, Dembitz V, Banfić H. Metabolism and differentiation. *Period Biol.* 2014;116(1):37–43.
84. Saito Y, Chapple RH, Lin A, Kitano A, Nakada D. AMPK Protects Leukemia-Initiating Cells in Myeloid Leukemias from Metabolic Stress in the Bone Marrow. *Cell Stem Cell.* 2015/10/01. 2015 Nov 5;17(5):585–96. doi:10.1016/j.stem.2015.08.019.
85. Jacquél A, Luciano F, Robert G, Auberger P. Implication and Regulation of AMPK during Physiological and Pathological Myeloid Differentiation. *Int J Mol Sci.* 2018 Sep 30;19(10):2991. doi:10.3390/ijms19102991.
86. Bae H-B, Zmijewski JW, Deshane JS, Tadie J-M, Chaplin DD, Takashima S, i sur. AMP-activated protein kinase enhances the phagocytic ability of macrophages and neutrophils. *FASEB J.* 2011 Dec 1;25(12):4358–68. doi:https://doi.org/10.1096/fj.11-190587.
87. Campàs C, López 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 May 1;101(9):3674–80. doi:10.1182/blood-2002-07-2339.
88. Drakos E, Atsaves V, Li J, Leventaki V, Andreeff M, Medeiros LJ, i sur. Stabilization and activation of p53 downregulates mTOR signaling through AMPK in mantle cell lymphoma. *Leukemia.* 2009;23(4):784–90. doi:10.1038/leu.2008.348.

89. Ben Sahra I, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J-F, Bost F. Metformin in Cancer Therapy: A New Perspective for an Old Antidiabetic Drug? *Mol Cancer Ther.* 2010 May 1;9(5):1092 LP – 1099. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-1186.
90. 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(3):581–91. doi:10.1007/s00280-012-2033-5.
91. 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(1):114–26. doi:https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.04.015.
92. Vakana E, Altman JK, Glaser H, Donato NJ, Plataniias LC. Antileukemic effects of AMPK activators on BCR-ABL-expressing cells. *Blood.* 2011 Dec 8;118(24):6399–402. doi:10.1182/blood-2011-01-332783.
93. Hawley SA, Ross FA, Chevtzoff C, Green KA, Evans A, Fogarty S, i sur. Use of Cells Expressing γ Subunit Variants to Identify Diverse Mechanisms of AMPK Activation. *Cell Metab.* 2010;11(6):554–65. doi:https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.04.001.
94. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, i sur. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001 Oct 15;108(8):1167–74. doi:10.1172/JCI13505.
95. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia.* 2017;60(9):1577–85. doi:10.1007/s00125-017-4342-z.
96. Biondani G, Peyron J-F. Metformin, an Anti-diabetic Drug to Target Leukemia. *Front Endocrinol.* 2018 Aug 10;9:446. doi:10.3389/fendo.2018.00446.
97. 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(1):91–100. doi:10.1038/leu.2011.269.

98. Green AS, Chapuis N, Trovati Maciel T, 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 Nov 18;116(20):4262–73. doi:10.1182/blood-2010-02-269837.
99. Bost F, Decoux-Poullot A-G, Tanti JF, Clavel S. Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy? *Oncogenesis*. 2016 Jan 18;5:e188. doi:10.1038/oncsis.2015.46
100. 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 Oct 21;116(16):3023–32. doi:10.1182/blood-2010-05-283960.
101. 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 Oct 24;55(10):2375–83. doi:10.3109/10428194.2013.876633.
102. Huai L, Wang C, Zhang C, Li Q, Chen Y, Jia Y, i sur. Metformin induces differentiation in acute promyelocytic leukemia by activating the MEK/ERK signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;422(3):398–404. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.001.
103. Zang Y, Yu L-F, Pang T, Fang L-P, Feng X, Wen T-Q, 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 Mar;283(10):6201–8. doi:10.1074/jbc.M708619200.
104. 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 Nov 18;4(11):e7889–e7889. doi:10.1371/journal.pone.0007889.
105. Dembitz V, Lalic H, Visnjic D. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside-induced autophagy flux during differentiation of monocytic leukemia cells. *Cell Death Discov*. 2017 Oct 2;3:17066. doi:10.1038/cddiscovery.2017.66

106. Barnum KJ, O'Connell MJ. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol.* 2014;1170:29–40. doi:10.1007/978-1-4939-0888-2_2.
107. Prepolec I. 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -d-ribofuranoside induces accumulation of leukemia cells in S-phase [Internet]. University of Zagreb School of Medicine; 2015.
108. Liu X, Chhipa RR, Pooya S, Wortman M, Yachyshin S, Chow LML, i sur. Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014 Jan 28;111(4):E435–44. doi:10.1073/pnas.1311121111.
109. Chae HD, Lee MR, Broxmeyer HE. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide Ribonucleoside Induces G1/S Arrest and Nanog Downregulation via p53 and Enhances Erythroid Differentiation. *Stem Cells.* 2012 Feb 1;30(2):140–9. doi:10.1002/stem.778.
110. Bardeleben C, Sharma S, Reeve JR, Bassilian S, Frost P, Hoang B, et al. Metabolomics Identifies Pyrimidine Starvation as the Mechanism of 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide-1- β -Riboside-Induced Apoptosis in Multiple Myeloma Cells. *Mol Cancer Ther.* 2013 Apr 12;12(7):1310-1321. doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-1042.
111. Wald DN, Vermaat HM, Zang S, Lavik A, Kang Z, Peleg G, i sur. Identification of 6-Benzylthioinosine as a Myeloid Leukemia Differentiation–Inducing Compound. *Cancer Res.* 2008 Jun 1;68(11):4369 LP – 4376. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6559.
112. Chakrabarti A, Gupta K, Sharma JP, Yang J, Agarwal A, Glick A, i sur. ATP Depletion Triggers Acute Myeloid Leukemia Differentiation through an ATR/Chk1 Protein-dependent and p53 Protein-independent Pathway. *J Biol Chem.* 2012;287(28):23635–43. doi:https://doi.org/10.1074/jbc.M111.312801.
113. Nam EA, Cortez D. ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem J.* 2011 May 27;436(3):527–36. doi:10.1042/BJ20102162.
114. Labib K, De Piccoli G. Surviving chromosome replication: the many roles of the S-phase checkpoint pathway. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2011 Dec 27;366(1584):3554–61. doi:10.1098/rstb.2011.0071.

115. Patil M, Pabla N, Dong Z. Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(21):4009–21. doi:10.1007/s00018-013-1307-3.
116. Goto H, Natsume T, Kanemaki MT, Kaito A, Wang S, Gabazza EC, i sur. Chk1-mediated Cdc25A degradation as a critical mechanism for normal cell cycle progression. *J Cell Sci.* 2019 Jan 25;132(2):jcs223123. doi:10.1242/jcs.223123.
117. Brown EJ, Baltimore D. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev.* 2000 Feb 15;14(4):397–402. doi:10.1101/gad.14.4.397.
118. Takai H, Tominaga K, Motoyama N, Minamishima YA, Nagahama H, Tsukiyama T, i sur. Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1 $-/-$ mice. *Genes Dev.* 2000 Jun 15;14(12):1439–47. doi:10.1101/gad.14.12.1439.
119. Zeman MK, Cimprich KA. Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol.* 2014;16(1):2–9. doi:10.1038/ncb2897.
120. Feng W, Dean DC, Hornicek FJ, Wang J, Jia Y, Duan Z, i sur. ATR and p-ATR are emerging prognostic biomarkers and DNA damage response targets in ovarian cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2020 Jan 1;12:1758835920982853. doi:10.1177/1758835920982853.
121. Sarmiento LM, Póvoa V, Nascimento R, Real G, Antunes I, Martins LR, i sur. CHK1 overexpression in T-cell acute lymphoblastic leukemia is essential for proliferation and survival by preventing excessive replication stress. *Oncogene.* 2015;34(23):2978–90. doi:10.1038/onc.2014.248.
122. David L, Fernandez-Vidal A, Bertoli S, Grgurevic S, Lepage B, Deshaies D, i sur. CHK1 as a therapeutic target to bypass chemoresistance in AML. *Sci Signal.* 2016 Sep 13;9(445):ra90–ra90. doi:10.1126/scisignal.aac9704.
123. Puc J, Keniry M, Li HS, Pandita TK, Choudhury AD, Memeo L, i sur. Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell.* 2005 Feb 1;7(2):193–204. doi:10.1016/j.ccr.2005.01.009.
124. Kueh Hao Y, Champhekar A, Nutt Stephen L, B. EM, V. RE. Positive Feedback Between PU.1 and the Cell Cycle Controls Myeloid Differentiation. *Science (80-).* 2013 Aug 9;341(6146):670–3. doi:10.1126/science.1240831.

125. Choe KS, Ujhelly O, Wontakal SN, Skoultchi AI. PU.1 Directly Regulates cdk6 Gene Expression, Linking the Cell Proliferation and Differentiation Programs in Erythroid Cells. *J Biol Chem*. 2010 Jan 29;285(5):3044–52. doi:10.1074/jbc.M109.077727.
126. Burda P, Laslo P, Stopka T. The role of PU.1 and GATA-1 transcription factors during normal and leukemogenic hematopoiesis. *Leukemia*. 2010;24(7):1249–57. doi:10.1038/leu.2010.104.
127. Rothenberg E V, Hosokawa H, Ungerbäck J. Mechanisms of Action of Hematopoietic Transcription Factor PU.1 in Initiation of T-Cell Development. *Front Immunol*. 2019 Feb 20;10:228. doi:10.3389/fimmu.2019.00228.
128. Back J, Allman D, Chan S, Kastner P. Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Exp Hematol*. 2005;33(4):395–402. doi:https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.12.010.
129. Wang K, Wang P, Shi J, Zhu X, He M, Jia X, i sur. PML/RAR α Targets Promoter Regions Containing PU.1 Consensus and RARE Half Sites in Acute Promyelocytic Leukemia. *Cancer Cell*. 2010;17(2):186–97. doi:https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.045.
130. Mueller BU, Pabst T, Fos J, Petkovic V, Fey MF, Asou N, i sur. ATRA resolves the differentiation block in t(15;17) acute myeloid leukemia by restoring PU.1 expression. *Blood*. 2006 Apr 15;107(8):3330–8. doi:10.1182/blood-2005-07-3068.
131. Zhu X, Zhang H, Qian M, Zhao X, Yang W, Wang P, i sur. The significance of low PU.1 expression in patients with acute promyelocytic leukemia. *J Hematol Oncol*. 2012;5(1):22. doi:10.1186/1756-8722-5-22.
132. 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(1):51–8. doi:https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1991.tb00242.x.
133. Bode AM, Dong Z. The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer Lett*. 2006/05/18. 2007 Mar 8;247(1):26–39. doi:10.1016/j.canlet.2006.03.032.

134. Liu Q, Xu C, Kirubakaran S, Zhang X, Hur W, Liu Y, i sur. Characterization of Torin2, an ATP-Competitive Inhibitor of mTOR, ATM, and ATR. *Cancer Res.* 2013 Apr 15;73(8):2574 LP – 2586. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1702.
135. Fordham SE, Blair HJ, Elstob CJ, Plummer R, Drew Y, Curtin NJ, i sur. Inhibition of ATR acutely sensitizes acute myeloid leukemia cells to nucleoside analogs that target ribonucleotide reductase. *Blood Adv.* 2018 May 22;2(10):1157 LP – 1169. doi:10.1182/bloodadvances.2017015214.
136. Ghanbari Movahed Z, Rastegari-Pouyani M, Mohammadi M hossein, Mansouri K. Cancer cells change their glucose metabolism to overcome increased ROS: One step from cancer cell to cancer stem cell? *Biomed Pharmacother.* 2019;112:108690. doi:https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108690.
137. Riester M, Xu Q, Moreira A, Zheng J, Michor F, Downey RJ. The Warburg effect: persistence of stem-cell metabolism in cancers as a failure of differentiation. *Ann Oncol.* 2018 Jan 1;29(1):264–70. doi:10.1093/annonc/mdx645.
138. Moussaieff A, Rouleau M, Kitsberg D, Cohen M, Levy G, Barasch D, i sur. Glycolysis-Mediated Changes in Acetyl-CoA and Histone Acetylation Control the Early Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Cell Metab.* 2015;21(3):392–402. doi:https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.02.002.
139. Nichols KE, Weinberg JB. Essential Amino Acid Deprivation Induces Monocytic Differentiation of the Human HL-60 Myeloid Leukemia Cell Line. *Blood.* 1989;73(5):1298–306. doi:https://doi.org/10.1182/blood.V73.5.1298.1298.
140. Ogino T, Ozaki M, Matsukawa A. Oxidative stress enhances granulocytic differentiation in HL 60 cells, an acute promyelocytic leukemia cell line. *Free Radic Res.* 2010 Nov 1;44(11):1328–37. doi:10.3109/10715762.2010.503757.
141. Yamauchi T, Miyawaki K, Semba Y, Takahashi M, Izumi Y, Nogami J, i sur. Targeting leukemia-specific dependence on the de novo purine synthesis pathway. *Leukemia.* 2021; doi:10.1038/s41375-021-01369-0.

142. Ishikura H, Okazaki T, Mochizuki T, Izumi Y, Tashima M, Sawada H, i sur. Effect of antimetabolites and thymidine blockage on the induction of differentiation of HL-60 cells by retinoic acid or 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Exp Hematol.* 1985 Nov;13(10):981–8.
143. Lucas DL, Webster HK, Wright DG. Purine metabolism in myeloid precursor cells during maturation. Studies with the HL-60 cell line. *J Clin Invest.* 1983 Dec 1;72(6):1889–900. doi:10.1172/JCI111152.
144. de Korte D, Haverkort WA, de Boer M, van Gennip AH, Roos D. Imbalance in the Nucleotide Pools of Myeloid Leukemia Cells and HL-60 Cells: Correlation with Cell-Cycle Phase, Proliferation, Differentiation, and Transformation. *Cancer Res.* 1987 Apr 1;47(7):1841 LP – 1847.
145. NIH U.S. National Library of Medicine. NIH U.S. National Library of Medicine – ClinicalTrials.gov database [Internet]. [cited 2021 Aug 22]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
146. Vakana E, Altman JK, Plataniias LC. Targeting AMPK in the treatment of malignancies. *J Cell Biochem.* 2012 Feb 1;113(2):404–9. doi:<https://doi.org/10.1002/jcb.23369>.
147. Du L, Yang F, Fang H, Sun H, Chen Y, Xu Y, i sur. AICAr suppresses cell proliferation by inducing NTP and dNTP pool imbalances in acute lymphoblastic leukemia cells. *FASEB J.* 2019 Jan 31;33(3):4525–37. doi:10.1096/fj.201801559RR.
148. Paglia G, Hrafnisdóttir S, Magnúsdóttir M, Fleming RMT, Thorlacius S, Pálsson BØ, i sur. Monitoring metabolites consumption and secretion in cultured cells using ultra-performance liquid chromatography quadrupole–time of flight mass spectrometry (UPLC–Q–ToF-MS). *Anal Bioanal Chem.* 2012;402(3):1183–98. doi:10.1007/s00216-011-5556-4.
149. Thomas CB, Meade JC, Holmes EW. Aminoimidazole carboxamide ribonucleoside toxicity: A model for study of pyrimidine starvation. *J Cell Physiol.* 1981 Jun 1;107(3):335–44. doi:10.1002/jcp.1041070305.

150. 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 Metab.* 2009 Jan 1;296(1):E139–46. doi:10.1152/ajpendo.90677.2008.
151. Sun X, Yang Q, Rogers CJ, Du M, Zhu M-J. AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating Cdx2 expression. *Cell Death Differ.* 2017;24(5):819–31. doi:10.1038/cdd.2017.14.
152. Di Rorà GLA, Ghetti M, Ledda L, Ferrari A, Bocconcelli M, Padella A, i sur. Exploring the ATR-CHK1 pathway in the response of doxorubicin-induced DNA damages in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cell Biol Toxicol.* 2021; doi:10.1007/s10565-021-09640-x.
153. Ruiz S, Mayor-Ruiz C, Lafarga V, Murga M, Vega-Sendino M, Ortega S, i sur. A Genome-wide CRISPR Screen Identifies CDC25A as a Determinant of Sensitivity to ATR Inhibitors. *Mol Cell.* 2016;62(2):307–13. doi:https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.006.
154. Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene.* 2004;23(16):2825–37. doi:10.1038/sj.onc.1207528.
155. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ.* 2008;15(7):1153–62. doi:10.1038/cdd.2008.47.
156. Schoeler K, Jakic B, Heppke J, Soratroi C, Aufschnaiter A, Hermann-Kleiter N, i sur. CHK1 dosage in germinal center B cells controls humoral immunity. *Cell Death Differ.* 2019;26(12):2551–67. doi:10.1038/s41418-019-0318-5.
157. Lin T, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Murphy ME, Appella E, i sur. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol.* 2005;7(2):165–71. doi:10.1038/ncb1211.

158. Inomata K, Aoto T, Binh NT, Okamoto N, Tanimura S, Wakayama T, i sur. Genotoxic Stress Abrogates Renewal of Melanocyte Stem Cells by Triggering Their Differentiation. *Cell*. 2009;137(6):1088–99. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.037>.
159. Takagaki K, Katsuma S, Kaminishi Y, Horio T, Tanaka T, Ohgi T, i sur. Role of Chk1 and Chk2 in Ara-C-induced differentiation of human leukemia K562 cells. *Genes to Cells*. 2005 Feb 1;10(2):97–106. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2005.00821.x>.
160. Bertoli S, Boutzen H, David L, Larrue C, Vergez F, Fernandez-Vidal A, i sur. CDC25A governs proliferation and differentiation of FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2015 Oct 16;6(35):38061–78. doi:10.18632/oncotarget.5706.
161. Radomska HS, Alberich-Jordà M, Will B, Gonzalez D, Delwel R, Tenen DG. Targeting CDK1 promotes FLT3-activated acute myeloid leukemia differentiation through C/EBP α . *J Clin Invest*. 2012 Aug 1;122(8):2955–66. doi:10.1172/JCI43354.
162. Ying M, Shao X, Jing H, Liu Y, Qi X, Cao J, i sur. Ubiquitin-dependent degradation of CDK2 drives the therapeutic differentiation of AML by targeting PRDX2. *Blood*. 2018 Jun 14;131(24):2698–711. doi:10.1182/blood-2017-10-813139.
163. Matushansky I, Radparvar F, Skoultchi AI. CDK6 blocks differentiation: coupling cell proliferation to the block to differentiation in leukemic cells. *Oncogene*. 2003;22(27):4143–9. doi:10.1038/sj.onc.1206484.
164. Santos MA, Faryabi RB, Ergen A V, Day AM, Malhowski A, Canela A, i sur. DNA-damage-induced differentiation of leukaemic cells as an anti-cancer barrier. *Nature*. 2014 Jul 27;514:107. doi:10.1038/nature13483.
165. Sherman MH, Bassing CH, Teitell MA. Regulation of cell differentiation by the DNA damage response. *Trends Cell Biol*. 2011 May 1;21(5):312–9. doi:10.1016/j.tcb.2011.01.004.
166. Dembitz V, Lalic H, Kodvanj I, Tomic B, Batinic J, Dubravcic K, i sur. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside induces differentiation in a subset of primary acute myeloid leukemia blasts. *BMC Cancer*. 2020 Dec 11;20(1):1090. doi:10.1186/s12885-020-07533-6.

11. ŽIVOTOPIS

Barbara Tomić, dr. med.

Barbara Tomić rođena je 22. siječnja 1993. u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu te prirodoslovno-matematičku XV. gimnaziju. 2011. godine upisala je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje je po prvoj godini studija nagrađena Dekanovom nagradom za najbolju studenticu prve godine studija. U akad. god. 2016./2017. nagrađena je i Rektorovom nagradom u području „Biomedicina i zdravstvo“ kao članica Studentske sekcije za neuroznanost Medicinskog fakulteta. Diplomirala je 2017. godine s prosjekom 4,98, a diplomski rad „Leukemije u djece s Downovim sindromom“ izradila je pod mentorstvom prof. dr. sc. Ernesta Bilića, dr. med. Po dovršetku pripravničkog staža položila je stručni ispit te u svibnju 2018. godine stekla odobrenje za samostalni rad kao doktorica medicine. Od 14.9.2018. zaposlena je u suradničkom zvanju i na radnom mjestu asistenta za rad na HRZZ projektu „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Dore Višnjić, dr. med. u sklopu projekta “Signalni mehanizmi i metaboličke promjene u diferencijaciji stanica akutne mijeloične leukemije” (IP 2016-06-4581). U listopadu 2018. upisuje doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. 2019. godine položila je Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama, kategorija B (LabAnim, PMF Zagreb). 2021. godine nagrađena je nagradom „Molecular Oncology Poster Award“ na skupu Systems approaches in cancer (EMBO, Split).

Publikacije vezane uz temu doktorata:

1. Dembitz V, **Tomić B**, Kodvanj I, Simon JA, Bedalov A, Višnjić D. The ribonucleoside AICAr induces differentiation of myeloid leukemia by activating the ATR/Chk1 via pyrimidine depletion. *J Biol Chem.* 2019;294(42):15257-15270. doi:10.1074/jbc.RA119.009396
2. Dembitz V, Lalic H, Kodvanj I, **Tomic B**, Batinic J, Dubravcic K, Batinic D, Bedalov A, Visnjic D. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside induces differentiation in a subset of primary acute myeloid leukemia blasts. *BMC Cancer.* 2020;20(1):1090. doi:10.1186/s12885-020-07533-6.
3. Dembitz V, Lalic H, **Tomic B**, Smoljo T, Batinic J, Dubravcic K, Batinic D, Bedalov A, Visnjic D. All-*trans* retinoic acid induces differentiation in primary acute myeloid leukemia blasts carrying an inversion of chromosome 16. *Int J Hematol.* 2022;115(1):43-53. doi:10.1007/s12185-021-03224-5
4. **Tomic B**, Smoljo T, Lalic H, Dembitz V, Batinic J, Batinic D, Bedalov A, Visnjic D. Cytarabine-induced differentiation of AML cells depends on Chk1 activation and shares the mechanism with inhibitors of DHODH and pyrimidine synthesis. *Sci Rep.* 2022;12(1):11344. doi:10.1038/s41598-022-15520-z

Ostale publikacije:

1. Višnjić D, Lalić H, Dembitz V, **Tomić B**, Smoljo T. AICAr, a Widely Used AMPK Activator with Important AMPK-Independent Effects: A Systematic Review. *Cells.* 2021;10(5):1095. Published 2021 May 4. doi:10.3390/cells10051095.