

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Ljubica M. Vučićević

**Uloga inhibicije protein-kinaze aktivirane
adenozin-monofosfatom u indukciji
apoptoze i autofagije u tumorskim
ćelijskim linijama**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Ljubica M. Vučićević

**The role of adenosine monophosphate-
activated protein kinase inhibition in
apoptosis and autophagy induction in
tumor cell lines**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

MENTORI:

dr Pavle Anđus
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Ljubica Harhaji-Trajković
viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za
biološka istraživanja „Siniša Stanković“

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Vladimir Trajković
vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski
fakultet

dr Biljana Božić
vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

DATUM ODBRANE:

ZAHVALNICA

Ova doktorska teza je urađena u Laboratoriji za imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Odeljenju za biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Zahvaljujem se

prof. dr Pavlu Anđusu na korisnim savetima pri pisanju teze,

dr Ljubici Harhaji Trajković i prof. dr Vladimiru Trajkoviću na neposrednom rukovođenju pri izradi i pisanju doktorske teze i radova koji su iz nje proistekli,

prof. dr Biljani Božić na pomoći prilikom uobličavanja teze

Maji Misirkić Marjanović i Kristini Janjetović na pomoći pri eksperimentalnom radu i iskrenoj podršci pri izradi i pisanju disertacije

dr Verici Paunović, dr Neveni Zogović i dr Gordani Tovilović na korisnim savetima i iskrenoj podršci pri izradi i pisanju disertacije,

dr Emini Sudar na pomoći pri eksperimentalnom radu

svim koleginicama i kolegama koji su neposredno doprineli uspešnom završetku ove doktorske disertacije.

Uloga inhibicije protein-kinaze aktivirane adenozin-monofosfatom u indukciji apoptoze i autofagije u tumorskim ćelijskim linijama

IZVOD

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivan je uticaj inhibicije intracelularnog energetskog senzora protein kinaze aktivirane adenozin-monofosfatom (AMPK) na indukciju apoptoze i autofagije u tumorskim ćelija. Farmakološki inhibitor AMPK dorzomorfina indukovao je G₂/M blokadu ćelijskog ciklusa, praćen apoptozom koju karakteriše aktivacija kaspaza, eksternalizacija fosfatidilserina i fragmentacija DNK u U251 humanim i C6 pacovskim ćelijama glioma, dok na vijabilitet primarnih pacovskih astrocita i ćelija mišjeg melanoma B16 nije imao uticaja. Mehanizam indukcije apoptoze dorzomorfina bio je posredovan stimulacijom produkcije reaktivnih vrsta kiseonika i inhibicijom ekspresije antiapoptotskog Bcl-2 proteina. Dorzomorfina je inhibirao fosforilaciju i enzimatsku aktivnost AMPK, što je za posledicu imalo smanjenje fosforilacije njenog supstrata acetyl-CoA karboksilaze. Aktivatori AMPK metformin i AICAR delimično su neutralisali blokadu ćelijskog ciklusa, oksidativni stres i apoptozu indukovanu dorzomorfina. Mala interferirajuća RNK (siRNK) koja sprečava ekspresiju humanog AMPK enzima je poput dorzomorfina zaustavila proliferaciju ćelija u G₂/M fazi ćelijskog ciklusa, ali nije izazvala oksidativni stres i apoptozu u U251 ćelijama. Dakle, inhibicija AMPK je neophodna, ali ne i dovoljna za indukciju apoptoze dorzomorfina u ćelijama glioma.

U ovoj studiji takođe je pokazano da dorzomorfina indukuje autofagiju u ćelijama kancera. Indukcija autofagije u U251 ćelijama detektovana je fluorescentnim bojenjem unutarćelijskih kiselih vezikula akridin oranžom, indukcijom beklina-1, degradacijom p62 proteina i konverzijom LC3-I u formu asociranu sa autofagozomima LC3-II u odsustvu i

prisustvu proteolitičkih inhibitora. Prisustvo autofagozomima sličnih vezikula potvrđeno je transmisivnom elektronskom mikroskopijom. Inhibicija AMPK i Raptora indukovana dorzomorfonom u U251 ćelijama bila je paradoksalno asocirana sa smanjenjem fosforilacije AMPK/Raptorom inhibiranog glavnog represora autofagije mTOR i njegovog supstrata p70S6K. Fosforilacija mTOR aktivatora Akt i PI3K-aktivirane Src kinaze bile su također inhibirane u ćelijama tretiranim dorzomorfonom. Poništavanje ekspresije AMPK sa siRNA nije redukovalo aktivnost Akt/mTOR/p70S6K signalnog puta, a AMPK aktivatori metformin i AICAR nisu uspjeli da blokiraju autofagiju indukovanu dorzomorfonom. Inhibitori autofagije bafilomicin i hlorokin značajno su povećali citotoksičnost dorzomorfina prema U251 ćelijama, što je pokazano povećanjem oslobađanja laktat dehidrogenaze, fragmentacije DNK i aktivacije kaspaze-3. Sličan efekat dorzomorfina je imao i prema ćelijama pacovskog glioma C6, mišjeg fibrosarkoma L929 i mišjeg melanoma B16. Pošto je ranije pokazano da dorzomorfina suprimira AMPK-zavisnu autofagiju u različitim ćelijskim tipovima, rezultati ove studije sugeriraju da efekat dorzomorfina na autofagiju zavisi od doze, konteksta i/ili vrste ćelija. Imajući u vidu da dorzomorfina indukuje autofagiju u ćelijama kancera nezavisno od inhibicije AMPK, inhibicijom Akt/mTOR signalnog puta, rezultati ove studije ukazuju na neophodnost opreza pri interpretaciji rezultata eksperimenata u kojima se dorzomorfina koristi kao inhibitor AMPK, ali također sugeriraju da bi dorzomorfina, sam ili u kombinaciji sa inhibitorima autofagije, mogao biti potencijalni kandidat za terapiju tumora.

Ključne reči: gliomi, dorzomorfina, AMPK, apoptoza, oksidativni stres, autofagija, kancer, Akt, mTOR

Naučna oblast: biologija

Uža naučna oblast: ćelijska biologija

UDK broj: [616-006.04:616-08]:576.343:576.38(043.3)

The role of adenosine monophosphate-activated protein kinase inhibition in apoptosis and autophagy induction in tumor cell lines

ABSTRACT

In this doctoral dissertation the effect of intracellular energy sensor AMP-activated protein kinase (AMPK) inhibition on induction of apoptosis and autophagy in tumor cells was investigated. Pharmacological AMPK inhibitor dorsomorphin caused G₂/M cell cycle block, accompanied by apoptotic cell death characterized by caspase activation, phosphatidylserine exposure and DNA fragmentation in U251 human and C6 rat glioma cells, while it had no effect on viability of primary rat astrocytes and B16 mouse melanoma cells. The mechanisms underlying the pro-apoptotic action of dorsomorphin involved induction of oxidative stress and down-regulation of antiapoptotic molecule Bcl-2. Dorsomorphin diminished AMPK phosphorylation and enzymatic activity, resulting in reduced phosphorylation of its target acetyl CoA carboxylase. AMPK activators metformin and AICAR partly prevented the cell cycle block, oxidative stress and apoptosis induced by dorsomorphin. The small interfering RNA (siRNA) targeting of human AMPK mimicked dorsomorphin-induced G₂/M cell cycle arrest, but failed to induce oxidative stress and apoptosis in U251 glioma cells. Therefore, AMPK inhibition is required, but not sufficient for dorsomorphin-mediated apoptotic death of glioma cells.

In this study, it was also reported that dorsomorphin can induce autophagy in cancer cells. The induction of autophagy in U251 human glioma cell line was demonstrated by acridine orange staining of intracellular acidic vesicles, Beclin 1 induction, p62 decrease and conversion of LC3-I to autophagosome-associated LC3-II in the absence and presence of proteolysis inhibitors. The presence of autophagosome like vesicles was confirmed by transmission electron microscopy. Dorsomorphin-mediated inhibition of AMPK and Raptor in U251 cells was associated with paradoxical decrease in phosphorylation of

AMPK/Raptor-repressed mTOR, a major negative regulator of autophagy, and its downstream target p70S6K. The phosphorylation of mTOR activator Akt and PI3K-activating kinase Src was also impaired in dorsomorphin-treated cells. The siRNA-mediated AMPK silencing did not reduce the activity of the Akt/mTOR/p70S6K pathway and AMPK activators metformin and AICAR failed to block dorsomorphin-induced autophagy. Autophagy inhibitors bafilomycin and chloroquine significantly increased the cytotoxicity of dorsomorphin towards U251 cells, as confirmed by the increase in lactate dehydrogenase release, DNA fragmentation and caspase-3 activation. Similar effects of dorsomorphin were also observed in C6 rat glioma, L929 mouse fibrosarcoma and B16 mouse melanoma cell lines. Since dorsomorphin has previously been reported to suppress AMPK dependent autophagy in different cell types, results in this study suggest that the effects of dorsomorphin on autophagy might be dose-, cell type- and/or context-dependent. By demonstrating the ability of dorsomorphin to induce autophagic response in cancer cells via AMPK inhibition-independent downregulation of Akt/mTOR pathway, results warrant caution when using dorsomorphin to inhibit AMPK-dependent cellular responses, but also suggest that dorsomorphin, alone or in combination with autophagy inhibitors, could be potential candidate for anticancer therapy.

Keywords: glioma, dorsomorphin, AMPK, apoptosis, oxidative stress, autophagy, cancer, Akt, mTOR

Research area: Biology

Research field: Cell Biology

UDC number: [616-006.04:616-08]:576.343:576.38(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Tumori.....	1
1.2 Apoptoza	3
1.3 Autofagija	5
1.4 Protein-kinaza aktivirana adenozin-monofosfatom (AMPK).....	9
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	12
3. MATERIJAL I METODE	13
3.1. Ćelije i ćelijske kulture	13
3.2. Rastvori i reagensi	14
3.3. Testovi vijabiliteta	15
3.3.1. MTT test	15
3.3.2. Kristal violet test.....	16
3.3.3. LDH test	17
3.3.4. Fazno kontrastna mikroskopija.....	18
3.4. Analiza parametara ćelijske smrti i produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta metodom protočne citofluorimetrije	18
3.4.1. Određivanje faza ćelijskog ciklusa i fragmentacije DNK	18
3.4.2. Određivanje apoptoze i nekroze	19
3.4.3. Određivanje aktivacije kaspaza	20
3.4.4. Određivanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta.....	21
3.4.5. Određivanje autofagije u ćelijama obojenim akridin oranžom	21
3.5. Imunoblot analiza	22
3.6. Elisa test.....	25
3.7. Ultrastrukturalna analiza ćelija na transmisionom elektronskom mikroskopu (TEM)	27
3.8. Određivanje nivoa ekspresije iRNK za Bax i Bcl-2	27

3.8.1. Izolacija RNK.....	27
3.8.2. Reverzna transkripcija	28
3.8.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (RT-PCR, real time polymerase chain reaction).....	29
3.9. Transfekcija sa malom interferirajućom RNK - siRNA (engl. small interfering RNA)	29
3.11. Statistička analiza	30
4. REZULTATI	31
4.1 Dorzomorfin smanjuje vijabilitet C6 i U251 glioma ćelija, ali ne B16 melanoma ćelija i primarnih astrocita	31
4.2 Dorzomorfin menja morfologiju U251 ćelija.....	33
4.3 Dorzomorfin indukuje blok ćelijskog ciklusa i apoptozu ćelija glioma.....	34
4.4 Dorzomorfin stimuliše produkciju reaktivnih vrsta kiseonika u ćelijama glioma.....	36
4.5 Dorzomorfin smanjuje ekspresiju Bcl-2, ali ne utiče na ekspresiju Bax proteina.....	37
4.6 Metformin blokira inhibiciju AMPK indukovanu dorzomorfinom.....	39
4.7 Metformin smanjuje blokadu ćelijskog ciklusa i apoptozu indukovane dorzomorfinom	41
4.8 AICAR inhibira apoptozu indukovanu dorzomorfinom u ćelijama glioma	43
4.9 Inhibicija AMPK nije dovoljna za indukciju oksidativnog stresa i apoptoze	44
4.10 Dorzomorfin indukuje autofagiju u U251 ćelijama.....	48
4.11 Dorzomorfin izaziva inhibiciju AMPK proteina i Akt/mTOR signalnog puta	52
4.12 Mehanizam autofagije indukovane dorzomorfinom posredovan je inhibicijom Akt/mTOR signalnog puta.....	53
4.13 Autofagija indukovana dorzomorfinom ne zavisi od inhibicije AMPK.....	55
4.14 Autofagija štiti U251 glioma ćelije od apoptoze indukovane dorzomorfinom	58
4.15 Dorzomorfin indukuje protektivnu autofagiju u različitim ćelijskim linijama kancera	61
5. DISKUSIJA	64
6. ZAKLJUČCI	75
7. LITERATURA	76

1. UVOD

1.1 Tumori

Tumori ili *neoplazije* predstavljaju masu izmenjenih ćelija koje nekontrolisano proliferišu. Za razliku od njih kod normalnog tkiva precizno se kontroliše produkcija i oslobađanje faktora rasta kojima se održava homeostaza u broju ćelija i funkciji tkiva. Ćelije tumora su izgubile diferenciranost i sposobnost da obavljaju specifične funkcije. Formiranje tumora ili karcinogeneza je postepen proces koji podrazumeva akumulaciju genetskih i epigenetskih promena u onkogenima, tumorsupresor genima ili drugim genima koji su uključeni u regulaciju ćelijskog rasta i proliferacije (*Heeg, Doebele i sar., 2006*). Tokom procesa neoplastične transformacije ćelije kancera su stekle osobine da: proizvode sopstvene signale rasta, ignorišu postojeće inhibitore ćelijskog rasta i deobe, izbegavaju ćelijsku smrt, neograničeno proliferišu, održavaju angiogenezu i stiču sposobnost invazije u okolna tkiva (*Hanahan i Weinberg 2011*). U osnovi ovih osobina je genomska nestabilnost, gubitak sposobnosti reparacije genetskih oštećenja i akumulacija mutacija koje daju prednost tumorskim ćelijama (*Sieber, Heinemann i sar., 2005*). Postoje dva osnovna tipa tumora: benigni i maligni. Benigni tumori su oštro ograničeni u tkivima u kojima se razvijaju, tj. inkapsulirani su, rastu ekspanzivno i ne stvaraju metastaze. Maligni tumori, za razliku od benignih, nisu inkapsulirani i sposobni su da metastaziraju. Metastaziranje predstavlja proces odvajanja male grupe ćelija sa mesta nastanka i njihovo odlaženje putem krvi i limfe u druga tkiva i organe, gde se infiltriraju i formiraju sekundarne tumore, uzrokujući propadanje normalnog tkiva (*Bravo-Cordero, Hodgson i sar., 2012*).

Prema najopštijoj podeli maligni tumori se dele na osnovu vrsta ćelija ili tkiva od kojih su se razvili. Tumori nastali od glijalnih ćelija, potpornih ćelija nervnog sistema, se nazivaju gliomi. Gliomi su najčešći primarni tumori centralnog nervnog sistema. Gliomi

astrocitnog porekla (astrocitomi) su klasifikovani u četiri stadijuma na osnovu histologije i stepena maligniteta, pri čemu je poslednji stadijum „glioblastoma multiforme“ (GBM) jedan od najčešćih i najletalnijih tumora mozga (*Jones i Holland 2011; Westphal i Lamszus 2011*). Različite genetske promene u genima za proteine koji regulišu ćelijski ciklus dovode do maligne transformacije ćelija i progresije glioma. Pored toga, amplifikacija gena u gliomima rezultira prekomernom ekspresijom nekoliko mitogena i njihovih specifičnih receptora (*Parney, Hao i sar., 2000*). To su epidermalni faktor rasta (*engl. epidermal growth factor, EGF*) i njegov receptor (*engl. epidermal growth factor receptor, EGFR*), faktor rasta trombocita (*engl. platelet derived growth factor, PDGF*) i njegov receptor (*engl. platelet derived growth factor receptor, PDGFR*), kao i faktor rasta sličan insulinu (*engl. insulin-like growth factor-1, IGF-1*) i njegov receptor (*engl. insulin-like growth factor-1 receptor, IGF1R*), koji su uključeni u autokrinu i parakrinu signalizaciju kod glioma (*Krakstad i Chekenya 2010*). Svi ovi receptori sadrže tirozin kinazni domen koji reguliše nekoliko signalnih puteva kao što su: fosfoinozitol-3-kinaza/AKT protein kinaza B (PI3K/AKT-PKB), RAS/mitogen-aktivirana protein kinaza (RAS/MAPK) i fosfolipaza C/protein kinaza C (PLC/PKC) signalni put. Ovi signalni putevi kontrolišu nekoliko procesa uključujući proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu (*Lino i Merlo 2011*). Osim toga, fosfataza/tenzin homolog protein (PTEN), koji funkcioniše kao tumor supresor time što inhibira PI3K/AKT signalni put, može biti uključen i u proces geneze glioma tako što zbog mutacije gubi svoju supresornu funkciju (*Navis, van den Eijnden i sar., 2010*). Na kraju, nekoliko prekomerno eksprimiranih angiogenih faktora, kao što su fibroblastni faktor rasta (*engl. fibroblast growth factor, FGF*), interleukin-8, PDGF i vaskularno-endotelni faktor rasta (*engl. vascular-endothelial growth factor, VEGF*) takođe su identifikovani kod glioma (*Nazarenko, Hede i sar., 2012*). Sve ove genetske promene zajedno dovode do agresivne ćelijske proliferacije, invazije i angiogeneze pri čemu nastaju maligni gliomi otporni na indukciju apoptoze konvencionalnim terapijama: zračenjem, hemoterapijom ili imunoterapijom (*Giessa, Bjerkvig i sar., 2003*). Osim toga zbog svog specifičnog mesta nastanka ovi tumori smatraju se gotovo inoperabilnim. Iako se ulažu snažni naponi za pronalaženje novih terapijskih pristupa u lečenju glioma još uvek ne postoji adekvatna terapija za ove najletalnije tumore mozga.

1.2 Apoptoza

Apoptoza, ili programirana ćelijska smrt tipa I je evolutivno konzerviran i genetički determinisan proces eliminacije ćelija. Ima važnu ulogu u razviću i starenju, održavanju homeostaze tkiva, odbrambenu funkciju u različitim procesima imunskog sistema i u uklanjanju ćelija oštećenih toksičnim agensima ili patološkim stanjima, tj. bolestima (*Norbury i Hickson 2001; Yuan i Kroemer 2010*). Apoptoza je energetski zavisna i podrazumeva kontrolisanu, kaskadnu aktivaciju proteolitičkih enzima, kaspaza koje zatim degradiraju osnovne ćelijske strukture uključujući i genetski materijal. Ćelije koje umiru apoptozom imaju specifične morfološke promene, kao što su smanjivanje ćelijskog volumena, kondenzacija hromatina (piknoza), intenzivno pupljenje plazma membrane praćeno fragmentacijom hromatina (karioreksa) i stvaranje apoptotskih tela. Apoptotska tela predstavljaju citoplazmu sa gusto pakovanim organelama, sa ili bez fragmenata jedra i sa očuvanom plazma membranom na čijoj površini se nalazi fosfatidilserin. Eksternalizovani fosfatidilserin predstavlja signal za makrofage i okolne ćelije da ih fagocituju (*Elmore 2007*). Na ovaj način kod ćelija koje umiru apoptozom ne dolazi do oslobađanja ćelijskog sadržaja u okolnu sredinu i oštećenja tkiva, jer su apoptotska tela brzo fagocitovana od strane okolnih ćelija, što sprečava sekundarnu nekrozu i produkciju citokina. Dakle, za razliku od nekroze apoptozu karakteriše odsustvo inflamatorne reakcije (*Kurosaka, Takahashi i sar., 2003*).

Apoptoza je kordinisana familijom cistein-proteaza, poznatim kao kaspaze. One su sintetisane kao neaktivni prekursori, pro-kaspaze, i dele se u inicijatorske (kaspaza-2,-8,-9,-10), efektorske (kaspaza-3,-6,-7) i inflamatorne kaspaze (kaspaza-1,-4,-5) (*Cohen 1997*). Grupisanjem u odgovarajuće komplekse prekursorske forme inicijatorskih kaspaza se autokatalitički aktiviraju, a svojom proteolitičkom aktivnošću one dalje aktiviraju efektorske kaspaze. Efektorske ili egzekucione kaspaze su odgovorne za aktivaciju endonukleaza i proteaza, što rezultuje fragmentacijom hromozomalne DNK i isecanjem proteina citoskeleta i nukleusa, stvarajući citomorfološke promene karakteristične za apoptozu (*Slee, Adrain i sar., 2001*).

Postoje dva glavna apoptotska puta: unutrašnji ili mitohondrijalni i spoljašnji ili receptorski put. Mitohondrijalni put apoptoze je najčešće iniciran faktorima koji izazivaju oštećenja DNK ili nekih drugih struktura u ćeliji i odsustvom faktora rasta, hormona i citokina koji su neophodni za preživljavanje ćelija. Svi ovi stimuli izazivaju depolarizaciju i promenu propustljivosti spoljašnje mitohondrijalne membrane i oslobađanje u citoplazmu proapoptotskih proteina kao što su: citohrom c, indukujući faktor apoptoze (AIF), Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 i endonukleaza G (*Saelens, Festjens i sar., 2004*). Citohrom c u citoplazmi zajedno sa kaspazom-9 i Apaf-1 proteinom formira kompleks, apoptozom, koji aktivira efektorsku kaspazu-3, dok Smac/DIABLO i Omi/HtrA2 pojačavaju kaspaznu aktivaciju neutralizacijom inhibitornog efekta IAP proteina (*Cain, Bratton i sar., 2000; Fulda i Debatin 2006*).

U procesu apoptoze učestvuje niz regulatornih proteina koji svojom aktivnošću mogu da modulišu propustljivost mitohondrijalne membrane i time aktiviraju ili sprečavaju apoptozu. Proteini sa anti- ili pro-apoptotskom funkcijom pripadaju Bcl-2 familiji proteina i na osnovu homologije (BH) domena mogu biti podeljeni u tri kategorije: anti-apoptotski (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1), pro-apoptotski (Bax, Bak, Bad) i BH3 proteini (Bad, Bid, Bim). Jedinstvena karakteristika proteina Bcl-2 familije jeste heterodimerizacija između antiapoptotskih i proapoptotskih proteina, čime se inhibira biološka aktivnost partnera (*Tsujimoto i Shimizu 2000*).

Spoljašnji ili receptorski put iniciran je na nivou ćelijske membrane aktivacijom receptora smrti iz TNFR (*engl. tumor necrosis factor receptor*) familije u koju između ostalih spadaju Fas/CD95 i TRAIL (TNF-srodni apoptoza indukujući ligand) receptori (*Locksley, Killeen i sar., 2001*). Svi članovi TNF receptorske familije imaju sličan ekstracelularni domen bogat cisteinom i imaju citoplazmatski domen od 80 aminokiselina koji se zove domen smrti (*engl. death domain*) (*Ashkenazi i Dixit 1998*). Ovaj domen ima ključnu ulogu u prenošenju signala sa površine ćelije na intracelularne signalne puteve. Po vezivanju liganada za receptor smrti dolazi do konformacione promene i grupišu se adaptori za intraćelijske domene smrti, kao što vezivanje Fas liganada za Fas receptor rezultuje u vezivanju adaptorskog proteina FADD i vezivanje TNF liganada za TNF receptor rezultuje u vezivanju adaptorskih proteina TRADD i FADD (*Hsu, Xiong i sar., 1995*;

Lavrik, Golks i sar., 2005). Adaptorski protein FADD zatim grupiše i kaspazu-8 formirajući aktivni kompleks DISC (*engl. death-inducing signalling complex*) u kome je stimulisana autokatalitička aktivacija kaspaze-8. Na kraju kaspaza-8 aktivira efektorsku kaspazu-3 i započinje egzekucionu fazu apoptoze (*Kischkel, Hellbardt i sar., 1995; Cabal-Hierro i Lazo 2012*).

Terapija kancera kao što su hemoterapija, gama zračenje i imunoterapija primarno svoj antitumorski efekat ostvaruju indukcijom apoptoze u ćelijama tumora (*Debatin 2004*). Oštećenje DNK ili nekih drugih ćelijskih struktura i molekula predstavlja najčešći mehanizam kojim se izaziva apoptoza u terapiji kancera. Takođe aktivacija receptora smrti može biti mehanizam u terapiji kancera i doprineti osetljivosti tumorskih ćelija na tretman citostaticima. Međutim veliki broj tumora postaje rezistentan na terapiju koja stimuliše apoptozu, pa se formira nova strategija u terapiji kancera koja se bazira na indukciji drugih tipova ćelijske smrti, kao što su nekroza ili autofagija (*Fulda i Debatin 2004; Brown i Attardi 2005*).

1.3 Autofagija

Autofagija je lizosomalni katabolički proces razgradnje proteinskih agregata i oštećenih organela koji ima važnu ulogu u preživljavanju, rastu, razviću i održavanju homeostaze (*Levine i Klionsky 2004; Klionsky 2005*). Definisane su tri forme autofagije: autofagija posredovana šaperonima, mikroautofagija i makroautofagija, koje se razlikuju po fiziološkoj funkciji i načinu isporuke sadržaja lizozomima. Mikroautofagija predstavlja neselektivan proces u kome se citosolni proteini isporučuju lizozomu invaginacijom lizosomalne membrane, dok u autofagiji posredovanoj šaperonima molekularni šaperoni, kao što je Hsc70 (*engl. heat shock cognate protein of 70 kDa*), prepoznaju proteine sa definisanom konsenzusnom sekvencom i selektivno ih predaju lizozomima. U procesu makroautofagije mali delovi citoplazme se pakuju u dvoslojnu membranu i tako formiraju autofagozom. Autofagozom se zatim fuzioniše sa lizozomom formirajući autofagolizozom u kome se makromolekulski sadržaj degradira pomoću kiselih proteaza (*Mizushima 2007; Yang i Klionsky 2009*). Termin autofagija se najčešće odnosi na makroautofagiju.

U uslovima stresa kao što je gladovanje, hipoksija, zračenje, ili tretman tumorskih ćelija različitim citostaticima, autofagija ima bitnu ulogu u uklanjanju oštećenih unutarćelijskih proteina, očuvanju energije čime omogućava preživljavanje ćelija (*Onodera i Ohsumi 2005; Maiuri, Zalckvar i sar., 2007; Apel, Herr i sar., 2008*). Sa druge strane, autofagija može predstavljati i mehanizam ćelijskog umiranja kod ćelija sa mutiranim genima za apoptozu, tokom razvića *D. melanogaster* ili u slučajevima kada je neadekvatno i preterano aktivirana (*Berry i Baehrecke 2007; Yang, Chee i sar., 2011*). Međutim, koncept „autofagne ćelijske smrti“ definisan na osnovu morfoloških karakteristika je nepotpun, i prisustvo autofagozoma u citoplazmi, ne može odrediti citoprotektivnu ili citotoksičnu ulogu autofagije kod ćelija koje umiru (*Boya, Gonzalez-Polo i sar., 2005*). U skladu sa tim determinisani su biohemijski i funkcionalni uslovi na osnovu kojih se može definisati autofagna ćelijska smrt, tj. programirana ćelijska smrt tipa II (*Gozuacik i Kimchi 2004*) : 1) ćelijska smrt ne sme biti praćena apoptozom, 2) u ćelijama koje umiru dolazi do povećanja autofagnog fluksa i 3) farmakološka i genetska supresija autofagije spasava ćelije od smrti (*Galluzzi, Vitale i sar., 2012*).

Autofagija je proces regulisan produktima ATG gena (*engl. autophagy related genes*), i može se opisati karakterističnim sledom faza: indukcija autofagije, stvaranje autofagozoma (nukleacija i elongacija), sazrevanje autofagozoma, fuzija autofagozoma i lizozoma, i razgradnja sadržaja (*Kung, Budina i sar., 2011*). Serin-treonin kinaza Atg1 (*engl. autophagy related gene-1*) kod kvasaca i homolozi ULK1 i ULK2 kinaze (*engl. Unc-51-like kinase*) kod sisara predstavljaju glavne molekule koji iniciraju autofagiju. Tokom ćelijskog i metaboličkog stresa inhibira se serin-treonin kinaza mTOR (*engl. mammalian target of rapamycin*), što omogućava aktivaciju ULK kinaze unutar ULK-Atg13-FIP200 kompleksa i inicijaciju autofagije. Dalje ULK kinaza fosforilacijom Ambra1 proteina (*engl. activating molecule in Beclin-1 autophagy 1*), stimuliše translokaciju PI3K kompleksa na membranu endoplazmatičnog retikuluma, mesto formiranja autofagozoma. Nukleacija i elongacija pre-autofagozomalne membrane, tj. fagofore kontrolisana je PI3K kompleksom koji obuhvata fosfoinozimid 3-kinazu klase III (PI3K), serin-treonin kinazu p150, Atg14 i beclin-1 (Atg6) protein. U kasnijem procesu rasta i sazrevanja autofagozoma učestvuju dva ubikvitinu-slična konjugaciona sistema, jedan koji čine Atg12-Atg5-Atg16 proteini, i drugi

sastavljen od proteaze Atg4 i LC3 proteina (*engl. microtubule-associated light chain-3*). LC3 (homolog Atg8) protein se proteolitički obrađuje Atg4 enzimom formirajući solubilnu formu LC3-I. Posredovano Atg12-Atg5-Atg16 kompleksom se dalje LC3-I konjuguje sa fosfatidilaminom, stvarajući LC3-II koji se specifično vezuje za autofagozomalnu membranu. Tokom procesa sazrevanja citoplazmatski sadržaj pakuje se u dvoslojni autofagozom. Kada je stvaranje autofagozoma završeno, on se spaja sa lizozomom stvarajući autofagolizom u kome se vrši digestija makromolekulskog sadržaja (*Mizushima, Yoshimori i sar., 2011; Wirawan, Vanden Berghe i sar., 2012*).

Iako se za autofagiju generalno smatra da je neselektivan način degradacije citoplazmatskog sadržaja, novija istraživanja su pokazala da autofagozomalna membrana specifično prepoznaje i pakuje substrate obeležene ubikvitinom. Kod sisara prepoznavanje citoplazmatskog sadržaja koji se selektivno pakuje u autofagozom posredovano je adaptorskim proteinima kao što su p62 protein (*engl. p62/sequestosome1-SQSTM1*) i NBR1 protein (*engl. the neighbour of BRCA1 gene*) (*Komatsu, Waguri i sar., 2007; Pankiv, Clausen i sar., 2007*). Oba proteina su specifični autofagni supstrati i receptori za citoplazmatski sadržaj obeležen ubikvitinom. Adaptorski proteini prepoznaju i vezuju ubikvitinom-obeleženi supstrat, istovremeno preko drugog domena, takozvanog LIR domena (LC3-interagujući domen), interaguju sa LC3-II proteinom koji je vezan za pre-autofagozomalnu membranu. Na taj način ovi proteini omogućavaju selektivno vezivanje supstrata za unutrašnju membranu fagofore i pakovanje tokom sazrevanja autofagozoma (*Johansen i Lamark 2011*). Postoje brojni primeri selektivne autofagije kao što je degradacija proteinskih agregata (*engl. aggregophagy*), mitohondrija (*engl. mitophagy*), peroksizoma (*engl. pexophagy*), ribozoma (*engl. ribophagy*), endoplazmatskog retikuluma (*engl. reticulophagy*) (*Kirkin, McEwan i sar., 2009; Dikic, Johansen i sar., 2010; Cuervo i Macian 2012*). Autofagija ima važnu ulogu i u procesima urođenog i stečenog imunskog odgovora, od ubijanja intracelularnih patogena (*engl. xenophagy*), prezentacije antigena do aktivacije limfocita (*Deretic 2011*). Selektivna degradacija proteinskih agregata, oštećenih organela i patogena autofagijom predstavlja važnu oblast istraživanja u cilju dizajniranja novog terapijskog pristupa u lečenju kancera, neurodegenerativnih bolesti i infekcija.

Autofagija je kompleksno regulisani proces čiju indukciju kontroliše veliki broj signalnih puteva i molekula. Ključni molekul u regulaciji autofagije je serin/treonin kinaza mTOR, čiji inhibitorni signali sprečavaju inicijaciju autofagije. mTOR put uključuje dva funkcionalna kompleksa, rapamicin zavisani Raptor-mTOR kompleks (mTOR1), koji reguliše autofagiju i rictor-mTOR kompleks (mTOR2) koji nije direktan autofagni regulator (Yang i Guan 2007). Aktivnost mTOR1 kontrolisana je integracijom različitih signala kao što su faktori rasta, amino kiseline, glukoza, energetski status i različite forme stresa. Dva glavna signalna puta koja regulišu aktivnost mTOR1 u sisarskim ćelijama su PI3K/Akt i AMPK/mTOR put (Jung, Ro i sar., 2010; Ravikumar, Sarkar i sar., 2010). Signal u mTOR zavisnoj autofagiji indukovanoj gladovanjem jeste limitirajuća količina aminokiselina (Meijer 2008). Odsutvo faktora rasta takođe predstavlja stres koji detektuje mTOR i indukuje autofagiju, i to uglavnom signalizacijom PI3K/Akt puta. Vezivanjem faktora rasta kao što je IGF (engl. *insulin growth factor*) za svoj receptor aktivira fosfatidilinozitol-3 kinazu (PI3K) koja zatim konvertuje inozitol-2 fosfat u inozitol-3 fosfat i aktivira Akt, koji dalje aktivira mTOR preko TSC1/TSC2 (engl. *tuberosis sclerosis complex*) kompleksa i inhibira autofagiju (Inoki, Li i sar., 2002). Za razliku od Akt kinaze koja je osnovni je aktivator mTOR, AMPK (adenozin monofosfatom aktivirana protein kinaza), sa druge strane, najvažniji inhibitor mTOR1 (Kimura, Tokunaga i sar., 2003). Nizak energetski status u ćeliji stimuliše aktivaciju AMPK, koja zatim fosforilacijom TSC1/TSC2 kompleksa i Raptora inhibira mTOR1 i indukuje autofagiju (Meley, Bauvy i sar., 2006). Iako mTOR1 ima ključnu ulogu u regulaciji autofagije u sisarskim ćelijama, autofagija takođe može biti aktivirana i nezavisno od mTOR1 puta. Lekovi kao što su litijum i karbamazepin smanjuju unutarćelijski inozitol i inozitol 1,4,5-trifosfat (IP3) i indukuju autofagiju nezavisno od aktivnosti mTOR1 puta (Sarkar, Floto i sar., 2005). Takođe inhibitori kalpaina i antagonisti Ca²⁺ kanala L-tipa smanjuju nivo unutarćelijskog cAMP i indukuju autofagiju nezavisno od aktivnosti mTOR1 puta (Williams, Sarkar i sar., 2008; Ding, Manley i sar., 2011).

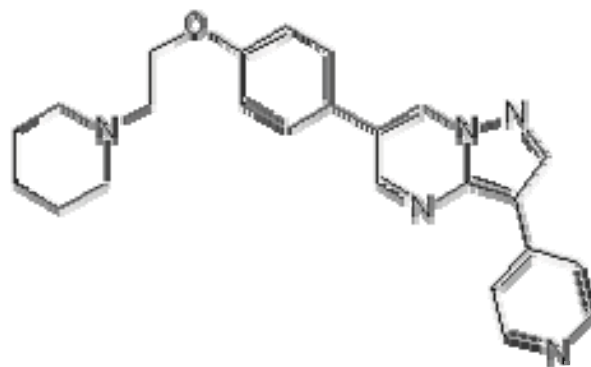
1.4 Protein-kinaza aktivirana adenozin-monofosfatom (AMPK)

AMPK ima centralnu ulogu u regulaciji intraćelijske energetske homeostaze i kontroliše metabolizam i energetske balans na nivou celog organizma. Poznata kao energetske senzor, aktivira se u uslovima niskog energetske statusa u ćeliji, kada je povećan odnos AMP/ATP (adenozin monofosfata/adenozin trifosfata) (*Witczak, Sharoff i sar., 2008*). U svom aktivnom stanju, AMPK čuva energiju tako što isključuje ATP-zavisne anaboličke procese, kao što su glukoneogeneza i sinteza proteina, glikogena, holesterola i masnih kiselina, a uključuje kataboličke procese koji generišu ATP, kao što su preuzimanje glukoze, glikoliza, oksidacija masnih kiselina i biogeneza mitohondrija. Svoj efekat ova kinaza ostvaruje direktnom fosforilacijom određenih metaboličkih enzima, ali i indirektno kontrolišući ekspresiju gena (*Hardie 2011; Mihaylova i Shaw 2011*). AMPK je evolutivno konzervirana serin/treonin protein kinaza i strukturno predstavlja heterotrimerni kompleks koga čine katalitička subjedinica (α) i dve regulatorne subjedinice (β i γ). Brojni geni kodiraju ove subjedinice tako da ova kinaza pokazuje tkivnu specifičnost i aktivnost. Fosforilacija treonina (Thr 172) u katalitičkom domenu uzvodnim kinazama je neophodan korak u aktivaciji AMPK i do danas su definisane tri AMPK-fosforilišuće kinaze: LKB1 (*engl. liver kinase B1*), Ca^{2+} /kalmodulin-zavisna kinaza i TAK1 (*engl. transforming growth factor-activated kinase-1*). Vezivanje AMP za γ regulatorni domen uzrokuje alosteričku aktivaciju enzima, promovise fosforilaciju AMPK-kinazama i sprečava defosforilaciju fosfatazama, na taj način AMP-zavisna alosterička aktivacija značajno povećava kinaznu aktivnost enzima (*Steinberg i Kemp 2009; Xiao, Sanders i sar., 2011; Oakhill, Scott i sar., 2012; Wang, Song i sar., 2012*).

AMPK funkcioniše kao metabolički tumor supresor koji održava metabolizam i rast ćelije na određenom nivou. U odgovoru na stres aktivacija AMPK menja program ćelijskog metabolizma, zaustavlja ćelijski ciklus preko mTOR, p53 i drugih modulatora ćelijskog rasta i preživljavanja, i indukuje autofagiju i/ili apoptozu (*Luo, Zang i sar., 2010*). Aktivacija AMPK takođe inhibira ACC1 (*engl. acetyl-CoA-carboxylase*) i sintezu FAS (*engl. fatty acid synthase*) što smanjuje *de novo* sintezu masnih kiselina i na taj način

negativno utiče na rast tumora (*Woods (Woods, Azzout-Marniche i sar., 2000; Chajes, Cambot i sar., 2006; Carling, Thornton i sar., 2012)*). Sve to ukazuje da modulacija aktivnosti AMPK može predstavljati obećavajući pristup u terapiji kancera, kao što je i uočeno u velikom broju studija gde prekomerna aktivacija AMPK inhibira proliferaciju i preživljavanje različitih tumorskih ćelijskih linija, i gde farmakološki aktivatori AMPK, metformin, fenformin, AICAR i A769662 inhibiraju ili usporavaju pojavu tumora u životinjskim modelima (*Campas, Lopez i sar., 2003; Isakovic, Harhaji i sar., 2007; Huang, Wullschleger i sar., 2008*). Sa druge strane, određeni nivo aktivnosti AMPK je neophodan za preživljavanje ćelija i optimalnu proliferaciju u uslovima stresa. U skladu sa tim, pokazano je da su ksenografti tumora dobijeni od Ras-transformisanih mišjih embrionalnih fibroblasta koji su AMPK deficijentni, nisu proliferisali u hipoksičnim uslovima, takođe i PC12 ćelije feohromocitoma transfektovane sa dominantno-negativnim AMPK umiru apoptozom u odsustvu glukoze (*Laderoute, Amin i sar., 2006; Shaw, Gurr i sar., 2007*). Ova situacija objašnjava kako AMPK i LKB1 deficijentne ćelije ne podležu onkogenoj transformaciji i tumorogenezi (*Svensson i Shaw*). U skladu sa ovim oprečnim rezultatima o ulozi AMPK u tumorima, dalja istraživanja su neophodna kako bi se definisao kontekst u kojima ovaj enzim ima funkciju supresije tumora, a u kojima ulogu promotora onkogeneze.

Iako je danas opšte prihvaćeno da aktivacija AMPK indukuje autofagiju kako je na primer pokazano kod kvasaca i različitih tumorskih ćelija (*Meijer i Codogno 2007*), postoje i podaci da aktivacija AMPK može dovesti do inhibicije autofagije, kao što je na primer slučaj u pacovskim hepatocitima (*Samari, Moller i sar., 2005*). Ako se uzme u obzir da je za preživljavanje tumorskih ćelija u uslovima stresa neophodna aktivacija AMPK, a da do sada nije ispitivano kako sama inhibicija AMPK utiče na autofagiju, početni cilj ove studije jeste da se ispita kako u odsustvu dodatnog stresa sama inhibicija AMPK utiče na indukciju apoptoze i autofagije, i kakva je kompleksna veza između ovih tipova ćelijske smrti.



Slika 1. Dorzomorfin (6-[4(2-piperidin-1-il-etoksi)-fenil]-3-piridin-4-il-pirazolo[1,5-a]-pirimidin]

Aktivnost AMPK u ovom radu je inhibirana pomoću male interferirajuće RNK za AMPK (*siRNA-small interfering RNA*) koja sprečava ekspresiju samog enzima, ili pomoću farmakološkog inhibitora AMPK, dorzomorfin. Dorzomorfin, (6-[4(2-piperidin-1-il-etoksi)-fenil]-3-piridin-4-il-pirazolo[1,5-a]-pirimidin]), poznat i kao supstanca C (*engl. compound C*) (slika 1), je derivat pirazolopirimidina, koji prolazi kroz plazma membranu, ulazi u ćelije i ponaša se kao jak, selektivni ATP-kompetitivni inhibitor AMPK (*Zhou, Myers i sar., 2001*).

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Inhibicija glavnog metaboličkog regulatora AMPK mogla bi smanjiti adaptivni odgovor tumorskih ćelija na stres, te biti iskorišćena u terapiji tumora. Sa druge strane, uloga AMPK u apoptozi i autofagiji još uvek je nedovoljno razjašnjena i kontraverzna. U skladu sa tim postavljeni su sledeći ciljevi ovog rada:

- Ispitati uticaj inhibicije AMPK na proliferaciju i vijabilnosti različitih tumorskih ćelijskih linija (humani gliom U251, pacovski astroцитom C6, mišji fibrosarkom L929 i mišji melanom B16)
- Ispitati koji tip ćelijske smrti (apoptoza, autofagija, nekroza) indukuje inhibicija AMPK u tumorskim ćelijama?
- Ispitati koji su mehanizmi odgovorni za indukciju ćelijske smrti inhibicijom AMPK?
- Determinisati kakve su međusobne veze između različitih tipova ćelijske smrti indukovanih inhibicijom AMPK, tj. da li blokadom jednog tipa ćelijske smrti može da se poveća antitumorski efekat inhibicije AMPK?

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ćelije i ćelijske kulture

Delovanja dorzomorfina ispitivano je na humanim i pacovskim ćelijskim linijama glioma, mišijoj ćelijskoj liniji fibrosarkoma i melanoma, kao i na primarnim pacovskim astrocitima. Ćelijske linije pacovskog astrocitoma C6 (ATCC CCL-107) i humanog glioma U251 dobijene su ljubaznošću Dr Pedra Tranque (Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Španija). Ćelije mišijeg fibrosarkoma L929 su dobijene od Evropske kolekcije ćelijskih kultura (*European Collection of Cell Cultures*, Salisbury, Velika Britanija), ćelije mišjeg melanoma B16 dobijene od Dr.Siniše Radulovića (Institut za Onkologiju i Radiologiju, Beograd, Srbija), dok su primarni pacovski astrociti su nabavljeni od Gibco (N7745-100, GIBCO, Paisley, Velika Britanija).

Ćelijske linije glioma, mišijeg melanoma i fibrosarkoma su gajene u inkubatoru u vlažnoj atmosferi sa 5 % CO₂, na temperaturi od 37 °C, u HEPES-om (20 mM) puferizovanom medijumu RPMI 1640 sa 5 % fetalnog goveđeg seruma, 2 mM L-glutamina i 1 % rastvora antibiotik/antimikotik (sve od PAA, Pasching, Austrija). Pacovski astrocitom je gajen u istim uslovima u DMEM (GIBCO, Paisley, Velika Britanija) medijumu sa 15% fetalnog goveđeg seruma, 2 mM L-glutamina i 1 % rastvora antibiotik/antimikotik (sve od PAA, Pasching, Austrija). Navedene ćelijske linije su po odmrzavanju iz tečnog azota propagirane u plastičnim bocama od 25 cm³. Po dostizanju konfluentnosti, ćelije su odlepljivane tripsinom i korišćene u eksperimentima. U cilju ispitivanja vijabiliteta i za ELISA test, ćelije su zasejavane u ploče sa 96 bunara (1x10⁴ ćelija/bunaru). Za analize na protočnom citofluorimetru,

ćelije su zasejavane u ploče sa 24 bunara (1×10^5 ćelija/bunaru), Za imunoblot analize ćelije su sađene u gustini od 1×10^6 ćelija u Petrijeve posude prečnika 10 cm i tretirane nakon dostizanja 80% konfluentnosti. Ploče sa bunarima i petri šolje su nabavljene od Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka. Sve ćelije su tretirane 24 sata nakon zasejavanja.

3.2. Rastvori i reagensi

U izradi ovog rada su korišćeni sledeći reagensi: serum fetusa govečeta (*engl.* fetal calf serum, FCS), medijumi za kultivaciju ćelija – DMEM (*engl.* Dulbecco's Modified Eagle Medium; GIBCO, Paisley, Velika Britanija), RPMI-1640 (*engl.* Roswell Park Memorial Institute Medium), rastvor antibiotika i antimikotika (PAA, Linz, Austrija), tripsin (Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), etilendiamino tetrasirćetna kiselina (EDTA), Tris, Tween 20, akrilamid/bisakrilamid (30% w/v), N,N,N',N'-tetrametiletilen-1,2-diamin (TEMED) (SERVA, Heidelberg, Nemačka), jodonitrotetrazolijum hlorid, mlečna kiselina, N-metilfenazonijum metilsulfat, β -nikotinamid adenin dinukleotid, triton X-100 (sve od Sigma-Aldrich), akridin oranž (Sigma-Aldrich), aneksin V-FITC, propidijum jodid (PI; BD Pharmingen, San Diego, SAD), ApoStat (R&D Systems, Minneapolis, SAD), dihidroetidijum (DHE), (Invitrogen), kaspazu-3 i kaspazu-8 (Vybrant Caspase, Invitrogen, Paisley, Velika Britanija) albumin iz seruma govečeta (*engl.* bovine serum albumin, BSA), RNaza, dimetilsulfoksid (DMSO), N-acetilcistein, metanol, MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid) (Sigma-Aldrich), kristal violet, etanol, glicerol (Zorka, Šabac, Srbija), tertrabutil amonijum hidrogen fosfat, fenil-metil-sulfonil-fluorid (PMSF), natrijum ortovanadat, natrijum fluorid, koktel inhibitora proteaza, NP-40, natrijum dodecil sulfat (*engl.* sodium dodecyl sulfate, SDS), bromfenol plavo, amonijumpersulfat, glicin, Coomassie Brilliant Blue G-250, Folin-Ciocalteu fenol reagens, 2,5-difeniloksazol (PPO) (Sigma-Aldrich), 1,4-bis-(5-feniloksazol-2-il)-benzen (POPOP) (Backman Instruments, Fullerton, SAD), odmašćeno mleko u prahu (Carl Roth, Karlsruhe, Nemačka) antioksidativni agensi N-acetilcistein (NAC) i butilirani hidroksianizol (BHA) (oba su od

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), AMPK aktivator metformin hidrohlorid (99.9 %; Hemofarm, Vršac, Srbija), agonist AMPK aminoimidazol karboksamid ribonukleotid (AICAR), Akt inhibitor 10-[4'-(N,N-dietilamino) butil]-2-hlorofenoksazin hidrohlorid (10-DEBC hidrohlorid) i inhibitor fosfoinositid 3-kinaze (PI3K) 2-(4-morfolino)-8-fenil-4H-1-benzopiran-4-one (LY294002) (Tocris Bioscience, Ellisville, MO), inhibitori autofagije bafilomicin A1, amonijum hlorid i hlorokin (sve od Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Dorzomorfin, inhibitor AMPK, 6-[4-(2-Piperidin-1-iletoksi)fenil]-3-piridin-4-ilpirazolo[1,5-a]pirimidin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) je rastvaran u dimetil sulfoksidu (DMSO). Kontrola kultura tretiranih dorzomorfinom bile su ćelije tretirane sa identičnom koncentracijom DMSO čija finalna koncentracija nikada nije bila veća od 0,5 %. Vreme inkubacije i koncentracije navedenih agenasa je napomenuto na slikama ili legendama slika.

3.3. Testovi vijabiliteta

Uticaj dorzomorfina na vijabilitet ćelija je određivan kolorimetrijskim metodama zasnovanim na merenju aktivnosti mitohondrijalne dehidrogenaze, laktat dehidrogenaze i određivanjem adherentnosti ćelija kristal violet testom nakon 24 h, ili 48h tretmana ćelija glioma, fibrosarkoma, melanoma i primarnih astrocita.

3.3.1. MTT test

MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid) test je zasnovan na redukciji tetrazolijumske soli MTT dehidrogenazama ćelijskih mitohondrija. Pri ovome dolazi do cepanja tetrazolijumskog prstena i pojave formazana, koji poseduje karakterističnu boju. MTT mogu da redukuju samo aktivne mitohondrije živih ćelija te je

ovaj kolorimetrijski test pogodan za merenje broja vijabilnih ćelija, njihove aktivnosti i proliferacije.

Nakon završetka kultivacije i uklanjanja medijuma u bunare je nalivano po 50 µl rastvora MTT (0,5 mg/ml), da bi potom bila nastavljena inkubacija u periodu od 1 sata. Supernatanti su zatim odlivani, a ćelije lizirane sa DMSO. Ova tečnost je ujedno služila i za rastvaranje nagrađenog formazana, tako da se u bunarima razvijala karakteristična crveno-ljubičasta boja, čiji je intenzitet određivan na automatskom čitaču mikrotitarskih ploča pri talasnoj dužini svetlosti od 570 nm (Sunrise; Tecan, Dorset, Velika Britanija). Intenzitet razvijene boje i odgovarajuća vrednost apsorbancije proporcionalno su odgovarali broju živih ćelija.

3.3.2. *Kristal violet test*

Kristal violet test omogućava određivanje relativnog broja adherentnih ćelija (*Flick i Gifford 1984*). Nakon odgovarajućeg tretmana kulture su tri puta ispirane sa PBS da bi se odstranile neadherentne ćelije. Usledila je fiksacija zalepljenih ćelija metanolom 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom i bojenje tako fiksiranih ćelija rastvorom kristal violeta (1 %) u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga bunari su intenzivno ispirani vodom, da bi se odstranila boja koju nisu primile fiksirane ćelije. Boja ugrađena u ćelije koja je zaostajala nakon ovakvog pranja rastvarana je 33 % rastvorom sirćetne kiseline, a intenzitet oslobođene boje određivan je merenjem apsorbancije svetlosti od 570 nm na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju. Izmerene apsorbancije odgovarale su intenzitetu boje, a intenzitet boje broju adherentnih ćelija. Rezultati MTT i kristal violet testa su predstavljeni kao % vijabiliteta u odnosu na kontrolne kulture.

3.3.3. LDH test

Ćelijsku smrt okarakterisanu gubljenjem integriteta ćelijske membrane utvrđivali smo primenom testa koji meri aktivnost citosolnog enzima laktat dehidrogenaze (LDH). LDH se oslobađa iz citosola u medijum nakon oštećenja ćelijske membrane ili posle lize ćelija, što se može desiti i u toku apoptoze i u toku nekroze. Aktivnost LDH u medijumu za kultivaciju direktno je proporcionalna broju ćelija sa oštećenom membranom u kulturi i zato se može smatrati merom citotoksičnosti agensa koji je ta oštećenja izazvao. Za potrebe testa je bilo neophodno pored kontrole netretiranih ćelija (žive ćelije) obezbediti i pozitivnu kontrolu (100 % mrtve ćelije). Nju su činile ćelije lizirane nejonskim deterdžentom Triton X-100 (3 %) koje usled potpunog narušavanja integriteta ćelijske membrane maksimalno oslobađaju citosolnu LDH. Princip LDH testa se zasniva na dve oksido-redukcije. U prvoj se laktat oksiduje u piruvat, pri čemu se NAD^+ redukuje u $\text{NADH} + \text{H}^+$. U narednoj reakciji fenazin-metosulfat posreduje u reoksidaciji $\text{NADH} + \text{H}^+$ u NAD^+ pri čemu se tetrazolijum hlorid redukuje u obojeni formazan. Protokol ovog testa podrazumeva dodavanje 100 μl supstrata za LDH na 100 μl supernatanta. Za pripremu supstrata za LDH korišćen je 54 mM L(+) laktat, 0,66 mM tetrazolijum hlorid, 0,28 mM fenazin-metosulfat i 1,3 mM NAD^+ (sve od Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), koji su rastvoreni u 0,2 M Tris-puferu pH 8,2. Po isteku 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi, apsorbance su merene na talasnoj dužini od 570 nm na čitaču za mikrotitar ploče. Rezultati su predstavljeni u procentima citotoksičnosti u odnosu na ćelije lizirane sa Triton X-100 (pozitivna kontrola, 100% mrtve ćelije) koja je izračunata pomoću prikazane formule:

$$\% C = [(E-S)/(M-S)] \times 100, \text{ gde je:}$$

E – apsorbanca tretiranih ćelija

S – apsorbanca kontrolnih (netretiranih) ćelija

M – apsorbanca mrtvih ćelija dobijenih liziranjem sa Triton X-100

C – citotoksičnost (broj ćelija sa narušenim integritetom ćelijske membrane)

3.3.4. Fazno kontrastna mikroskopija

Morfološke promene humane glioma ćelijske linije U251 analizirane su na Leica DCF320 mikroskopu pri čemu je izabrano uveličanje od 20x.

3.4. Analiza parametara ćelijske smrti i produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta metodom protočne citofluorimetrije

Parametri ćelijske smrti su analizirani metodom protočne citometrije na aparatu FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Svaka analiza je obuhvatila 10 000 događaja tj. ćelija po pojedinačnom uzorku za tretmane koji su rađeni u duplikatu ili triplikatu. Dobijeni podaci su analizirani korišćenjem kompjuterskog programa BD Cell Quest Pro.

3.4.1. Određivanje faza ćelijskog ciklusa i fragmentacije DNK

Količina DNK u ćelijama je ispitivana protočnom citofluorimetrijom nakon fiksacije ćelija u etanolu i bojenja propidijum jodidom, po prethodno opisanom protokolu (*Raicevic, Mladenovic i sar., 2005*). Princip ove metode zasniva se na osobini PI da se umeće u dvolančani molekul nukleinskih kiselina i produkuje crvenu fluorescencu proporcionalnu sadržaju DNK u ćeliji. Ova metoda omogućava razlikovanje faza ćelijskog ciklusa, G₀/G₁ faza rasta ćelija, S faza replikacije DNK, G₂/M faza ćelijske deobe, a može se koristiti i za određivanje broja ćelija sa hipodiploidnim sadržajem DNK, odnosno fragmentisanom DNK u subG₀ fazi, kao parametrom apoptoze. Naime, u kasnoj fazi apoptoze endonukleaze razgrađuju DNK u male fragmente veličine oko 180 baznih parova,

koji se akumuliraju u ćeliji. Ovi oligomeri se mogu ukloniti fiksiranjem ćelija pomoću etanola i ispiranjem PBS-om, čime se smanjuje sadržaj DNK u ćeliji. S obzirom na manji sadržaj DNK, apoptotične ćelije se nakon bojenja sa PI i očitavanja crvene fluorescence na protočnom citofluorimetru distribuiraju ispred vijabilnih ćelija na histogramu formirajući zonu specifičnu za apoptozu koja se naziva sub-G₀/G₁ ili hipodiploidni region. Pošto se PI vezuje i za RNK neophodno je razgraditi RNK prisutnu u uzorku primenom RNAze. Ukratko, po isteku tretmana, ćelije su tripsinizirane, 2x oprane u 1 ml PBS i finalno resuspendovane u 300 µl PBS i 700 µl hladnog apsolutnog etanola. Sadržaj svake epruvete je zatim pažljivo resuspendovan, a epruvete ostavljene na +4 °C preko noći. Zatim su ćelije centrifugirane (800 g/5 minuta/22 °C), oprane 1x1 ml PBS, a talog ćelija je finalno resuspendovan u 300 µl PBS uz dodatak 0,1 % Triton X-100 i 1 mg/ml RNA-ze (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Po isteku 15 minuta inkubacije na 37 °C, u svaku epruvetu je dodavano 0,05 mg/ml PI. Nakon 30 minuta inkubacije na 37 °C, usledila je analiza na protočnom citometru. Ćelije sa hipodiploidnim sadržajem se na histogramu distribucije intenziteta FL2 fluorescence vide u sub-G₀ segmentu, koji prethodi G₀-G₁ fazi ćelijskog ciklusa. Rezultati su izraženi kao % ćelija u sub-G₀ fazi u odnosu na ukupan broj analiziranih ćelija.

3.4.2. Određivanje apoptoze i nekroze

Da bi se utvrdio udeo apoptotičnih i nekrotičnih ćelija u kulturi nakon odgovarajućih tretmana ćelije su bojene sa aneksin V-fluorescein izotiocijanatom (aneksin V-FITC) i propidijum jodidom (PI), a zatim analizirane na protočnom citofluorimetru. Aneksin V-FITC je protein mase 35-36 kDa obeležen fluorescein izotiocijanatom (FITC) koji nakon pobuđivanja svetlošću argonskog lasera FACSCalibur aparata (talasna dužina 488 nm) emituje zelenu fluorescencu (FL1). Aneksin V ima veliki afinitet za vezivanje za fosfatidilserin koji se nalazi u spoljašnjem delu fosfolipidnog dvosloja ćelijske membrane ćelija u apoptozi. PI je fluorescentna boja koja se umeće između nukleobaza dvolančane

DNK i po pobuđivanju laserskom svetlošću protočnog citofluorimetra emituje crvenu fluorescencu (FL2) koja je proporcionalna sadržaju DNK u ćeliji. PI ne može da prođe kroz očuvanu ćelijsku membranu, međutim u nekrozi dolazi do oštećenja ćelijske membrane tako da PI može da uđe u ćeliju i reaguje sa DNK. Dvostrukim bojenjem sa aneksin V-FITC i PI se mogu razlikovati populacije ćelija koje se na tačkastom dijagramu prikazuju u kvadratnoj raspodeli kao: zdrave (aneksin⁻/PI⁻), apoptotične (aneksin⁺/PI⁻) i nekrotične ćelije (aneksin⁺/PI⁺). Ukratko, bojenje ćelija je sprovedeno prema instrukcijama proizvođača (BD Pharmingen, San Diego, CA). Po isteku inkubacije, ćelije su iz bunara ploče sa 24 bunara su tripsinizirane, prebacivane u odgovarajuće FACS epruvete. Nakon centrifugiranja (500 g/5 min) i pranja (1 ml PBS), talog ćelija je resuspendovan u 100 µl 10x razblaženog originalnog pufera (aneksin-vezujući pufer) u koji je dodato 10 µl PI i 0,2 µl aneksin V-FITC. Po završetku inkubacije (30 minuta, 37 °C), u svaku epruvetu je dodato po 400 µl razblaženog pufera. Svaki uzorak je zatim analiziran korišćenjem CellQuest Pro softvera (BD, Heidelberg, Nemačka). Rezultati su izraženi kao udeo odgovarajućih ćelijskih populacija u ukupnom broju analiziranih ćelija.

3.4.3. Određivanje aktivacije kaspaza

Aktivacija kaspaza, enzima odgovornih za pokretanje i izvršavanje apoptotskog mehanizma ćelijske smrti, ispitivana je na protočnom citofluorimetru nakon bojenja ćelija fluorescentno obeleženim pankaspaznim inhibitorom, koji se specifično vezuje za aktivirane kaspaze, prema instrukcijama proizvođača (ApoStat; R&D Systems, Minneapolis, MN), ili selektivni reagensi na kaspazu-3 i kaspazu-8 (Vybrant Caspase, Invitrogen, Paisley, Velika Britanija). Ukratko, nakon odgovarajućih tretmana ćelije su tripsinizirane, centrifugirane (500 g/5 minuta/22 °C) i oprane u PBS. Zatim je talog ćelija resuspendovan u 300 µl medijuma koji je sadržao 3 µl fluorescentno obeleženog (FITC) pan-kaspaznog inhibitora (finalna koncentracija 0.5 µg/ml, čitanje u FL1). Po isteku 30 minuta inkubacije na 37 °C, ćelije su oprane i finalno resuspendovane u 500 µl PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u obliku histograma

raspodele intenziteta FL1 fluorescence, i prikazani su kao % ćelija u kojima su aktivirane kaspaze.

3.4.4. Određivanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta

Da bi se odredila ukupna produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta ćelije (RKV) su bojene neselektivnim redoks senzitivnim bojama dihidrorodamin 123 (DHR) (Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), dok je za detekciju produkcije superoksidnog anjona korišćena fluorescentna boja dihidroetidijumom (DHE; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Obe boje slobodno ulaze u ćeliju, DHR nakon reakcije sa reaktivnim vrstama kiseonika oksiduje se u katjonski rodamin koji fluorescira zeleno, a DHE nakon reakcije sa superoksidnim anjon radikalom daje crveni fluorescentni produkt etidijum, koji se interkalira u DNK. Ćelije su bojene prema instrukcijama proizvođača. Ukratko, DHR je dodavan u ćelijsku kulturu na početku tretmana i to u finalnoj koncentraciji 2 μM , dok je DHE po isteku tretmana dodavan u finalnoj koncentraciji 20 μM i inkubiran 30 minuta na 37°C. Nakon toga, ćelije su tripsinizirane, prebačene u odgovarajuće epruvete i centrifugirane (500 g/5 minuta/22 °C), a zatim oprane sa 1 ml PBS. Ćelije su finalno resuspendovane u 500 μl PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u obliku histograma raspodele intenziteta fluorescence (FL1 za DHR bojenje, a FL2 za DHE bojenje), pri čemu pomeraj histograma tretiranih ćelija udesno u odnosu na kontrolu ukazuje na povećanje produkcije RKV, odnosno superoksidnog anjona.

3.4.5. Određivanje autofagije u ćelijama obojenim akridin oranžom

Zakišeljavanje citoplazme kao pokazatelj porasta broja ili zapremine kiselih vezikula autofagolizozoma, analiziran je na fluorescentnom mikroskopu i protočnom citometrijom nakon bojenja ćelija pH senzitivnom bojom akridin oranžom. Akridin oranž emituje narandžasto-crvenu fluorescencu (FL3) u kontaktu sa kiselim autofagolizozomima,

dok na neutralnom pH kakav je u citoplazmi fluorescira zeleno (FL1). Ukratko, po isteku tretmana ćelije su oprane sa 0.5 ml PBS, i zatim inkubirane 30 min na 37 °C sa 1 µM bojom akridin-oranž (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Po isteku inkubacije ćelije su oprane PBS i analizirane na invertnom fluorescentnom mikroskopu (Leica Microsystems DMIL, Wetzlar, Nemačka) koristeći Leica Microsystems DFC320 kameru i Leica Application Suite software. Autofagni lizozomi se vide kao crvene ili narandžaste fluorescentne citoplazmatične vezikule, dok se jedro boji zeleno na neutralnom pH. Da bi se ćelije analizirale na protočnom citofluorimetru tripsinizirane su, centrifugirane (500 g/5 min/22 °C), i talog ćelija je zatim resuspendovan u 500 µl PBS. Izračunavanjem relativnog odnosa intenziteta narandžasto-crvene i zelene fluorescence (FL3/FL1) prema njihovom odnosu u kontrolnim ćelijama (arbitrarno uzet za jedan) procenjuje se da li je došlo do zakišeljavanja citoplazme, odnosno autofagije.

3.5. Imunoblot analiza

Aktivnost i ekspresija proteina je određena iz ukupnog ćelijskog ekstrakta imunoblot analizom nakon elektroforetskog razdvajanja proteina. Po isteku odgovarajućih tretmana U251, C6 i L929 ćelije su lizirane u odgovarajućem puferu (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM PMSF i 10 µl proteaza inhibitornog koktela) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) na ledu, u trajanju od 30 minuta, centrifugirane na 14 000 g/15 minuta/+4°C, a supernatanti su izdvojeni za dalju analizu.

Sadržaj proteina u svakom uzorku utvrđivan je metodom po Bradfordu. Princip ove metode je da proteini reaguju sa bojom *Coomassie Brilliant Blue* i prevode je u anjonski oblik, što uzrokuje promenu boje od smeđe-crvene u plavu. Apsorbanca je očitavana na čitaču za mikrotitarske ploče na 570 nm. Intenzitet dobijene plave boje je proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku, pri čemu je koncentracije proteina u uzorcima određene su na osnovu standardne krive. Standardna kriva je konstruisana nakon očitavanja apsorbanci

iz reakcije standardnih rastvora albumina iz seruma govečeta (engl. *bovine serum albumin*; BSA) u koncentracijama: 5, 10, 15 i 20 mg/ml sa bojom. Uzorci za elektroforezu su pripremljeni kuvanjem (5 min, 100°C) određene zapremine ukupnog ćelijskog ekstrakta sa odgovarajućom zapreminom redukujućeg pufera za pripremu uzorka (finalne koncentracije sastojaka pufera nakon kuvanja uzorka su bile: 2% SDS, 10% glicerol, 2 mM 2-merkaptotanol, 0.002% bromfenol plavo, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8). U ovom koraku proteini su denaturisani i obloženi negativno naelektrisanim SDS molekulima. Dodatkom 2-merkaptotanela u pufer sprečeno je formiranje disulfidnih veza u denaturisanim proteinima. Zahvaljujući SDS-u svi proteini u uzorku postali su negativno naelektrisani i razlikovali su se međusobno samo po molekulskim masama.

Ista količina proteina iz svakog uzorka je razdvojena osnovu razlika u molekulskim masama tehnikom denaturišuće gel elektroforeze (SDS-PAGE) na 10-12 % gelu od poliakrilamida (4% akrilamid/0.14% bisakrilamid, 0.1% SDS, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8), koji je prethodno naslojen na gel za razdvajanje proteina (10% akrilamid/0.34% bisakrilamid ili 12% akrilamid/0.41% bisakrilamid, 0.1% SDS, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8). Kao katalizatori polimerizacije gelova korišćeni su 0,05% amonijumpersulfat i 0,033% TEMED. Pufer za rezervoare u kojem je tekla elektroforeza se sastojao od 192 mM glicina, 0.1% SDS i 25m M Tris-HCl, pH 8.3. Elektroforetsko razdvajanje je trajalo oko 90 min pri konstantnom naponu. U cilju određivanja molekulskih težina na svaki gel je naneta i smeša referentnih proteina poznatih molekulskih masa (10 - 250 kDa, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; BioRad, Marnes-la-Coquette, Francuska). Po završetku elektroforeze proteini sa gela su odmah transferisani na nitrocelulozne membrane (Hybond C; GE Healthcare, Little Chalfont, Velika Britanija) pomoću aparature za polusuvi transfer (TE 70 Semi-dry transfer unit, Amersham Biosciences). Nitrocelulozne membrane su inkubirane 1-2 minuta u puferu za transfer (192 mM glicin, 20% metanol i 25 mM Tris-HCl, pH 8.3) i postavljene u aparaturu na visoko adsorbujući filter papir, koji je prethodno natopljen transfer puferom. Gelovi su isprani malom količinom istog pufera i postavljeni pažljivo na membrane, a preko gela je smešten još jedan sloj visoko adsorbujućeg filter papira natopljenog puferom. Membrana je bila okrenuta ka pozitivnoj, a

gel ka negativnoj elektrodi čime je omogućeno da pod dejstvom struje konstantne jačine (0.8 mA/cm^2 membrane) negativno naelektrisani proteini putuju sa gela ka pozitivnoj elektrodi. Na putu ka anodi proteini su zaustavljeni od strane membrane, koja ih je vezivala za sebe. Transfer se odvijao na sobnoj temperaturi i trajao je ukupno 90 minuta. Po završetku transfera delovi membrane sa proteinima od interesa su inkubirani 60 minuta na sobnoj temperaturi u 5% rastvoru odmašćenog mleka u Tris puferu (20mM Tris, 137mM NaCl, pH 7.6) sa 0.05% Tween 20 deterdženta (u kasnijem tekstu TBST). Na taj način su blokirana nespecifična mesta vezivanja proteina na membranama.

Nakon blokiranja preko noći membrane su inkubirane na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ sa primarnim zečjim antitelima na LC3B (1:900), fosfo-Akt (1:1000), Akt (1:1000), fosfo-AMPK (1:1000), AMPK (1:1000), fosfo-mTOR (1:1000), mTOR (1:1000), fosfo-Raptor (1:1000), Raptor (1:1000), fosfo-p70S6K (1:1000), p70S6K (1:1000), Beklin 1 (1:1000), kaspaza-3 (1:500) (sve od Cell Signaling Technology, Beverly, MA), ili fosfo-Src (1:1000), Src (1:1000) i β - aktin (1:5000) (Abcam, Cambridge, MA), i p62 (1:3000) (Biolegend, San Diego, CA). . Nakon 3 ispiranja u TBST-u, membrane su inkubirane 75 minuta sa HRP obeleženim anti-zečjim IgG antitelom (1:5000; od Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, SAD). Po isteku inkubacije membrane su ponovo isprane 3 puta u TBST-u i prelivane 3 minuta sa supstratom za peroksidazu rena (ECL; GE Healthcare). U ovom koraku peroksidaza, koja je vezana za sekundarno antitelo, je razgrađivala H_2O_2 iz supstrata do kiseonika i vode. Kiseonik je reagovao sa luminolom iz supstrata uz nastanak 3-aminofalata, koji je emitovao foton. Nastala svetlost je zabeležena na rendgenskom filmu (Hyperfilm™ ECL; GE Healthcare), a intenzitet hemiluminiscence je bio direktno proporcionalan količini proteina vezanog za membranu. Ekspresija proteina kvantifikovana je denzitometrijom pomoću ImageJ softvera i izražena relativno u odnosu na β -aktin (LC3-II, beklin-1, p62, kaspaza-3) ili odgovarajuće totalne proteine (AMPK, Akt, mTOR, Raptor, p70S6K i Src). Rezultati su predstavljeni u odnosu na kontrolu kojoj je arbitarno dodeljena vrednost jedinice.

3.6. Elisa test

ELISA test (engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) zasniva se na interakciji antigena i antitela, i određuje nivo određenog antigena prisutnog u supernatantu kulture, lizatu ćelija ili telesnoj tečnosti. Nivo Bax i Bcl-2 proteina u ćelijskim lizatima je meren korišćenjem ELISA kita (R&D Systems, Minneapolis, MN). Po isteku odgovarajućih tertmana 1×10^6 U251 ćelija je lizirano odgovarajućim puferom (1mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 10 μ g/ml leupeptin u PBS, 10 μ g/ml pepstatin u PBS i 100 μ M PMSF), centrifugirano na 2000 g/5 minuta i uzeti su supernatanti. Za izvođenje ove metode, korišćene su ploče sa 96 mesta u čije bunarčiče je sipano rastvoreno u PBS mišje anti-humano antitelo, koncentracije 4 μ g/ml (anti-Bcl-2) ili 2 μ g/ml (anti-Bax α). Ploča je prelepljena i ostavljena da se inkubira preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije ploča je isprana 3 puta u 0,1 % rastvoru Tritona X-100 u PBS (u daljem tekstu PBST), i zatim blokirana dodavanjem odgovarajućeg pufera (1% BSA, 0.05% NaN₃ u PBS pH 7.2) u trajanju od 2 sata. Ploča je ponovo isprana 3 puta PBST. Nakon ispiranja sipano je po 100 μ l uzorka ili standarda i inkubirano 2 sata na sobnoj temperaturi. Sledilo je pranje ploče 3 puta PBST i zatim je sipano 0.5 μ g/ml biotin-vezano mišje anti-humano Bcl-2 ili Bax antitelo rastvoreno u 1% BSA PBS. Antitela su inkubirana 2 sata na sobnoj temperaturi. Ploča je oprana i naliven je streptavidin za koji je konjugovan enzim peroksidaza rena, i inkubirano 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 4 pranja sa PBST, u bunarčiče je nalivan supstrat za peroksidazu rena – tetrametilbenzidin i vodonik peroksid u odnosu 1:1. Substrat je sipan u mraku i inkubiran dok se boja nije razvila. Reakcija je prekinuta sa 2M HCl i apsorbancija merena na 450 nm na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju. Rezultati su prikazani kao relativna koncentracija proteina (Bcl-2, Bax) u odnosu na vrednost kontrole koja je podešena kao 1.

Modifikacija ovog testa je Elisa test za adherentne ćelije (engl. *cell-based ELISA*), i sastoji se u tome što ćelije, zalepljene za dno bunarčiča ploča za kultivaciju ćelija, fiksiraju se i direktno izlažu odgovarajućim antitelima (*Versteeg, Nijhuis i sar., 2000*). Na ovaj način se mogu određivati relativne količine antigena vezanih za ćelije (membranski ili

unutarćelijski molekuli). Za izvođenje ove metode, korišćene su ploče sa 96 mesta (Maxisorp, Nunc, Rochild, Danska). Konfluentne U251 ćelije su tretirane određenom dozom dorzomorfina, sa ili bez metformina u terminima naznačenim u rezultatima, a zatim je usledila fiksacija. Fiksacija ćelija je vršena izlaganjem 4 % paraformaldehidu u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi. Ćelije su potom prane 3 puta u 0,1 % rastvoru Tritona X-100 u PBS (u daljem tekstu PBST), da bi se ćelije permeabilizovale i tako obezbedilo bojenje unutar ćelija, te su nakon toga izlagane 1 % rastvoru H₂O₂ u PBST u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi. Time je blokirano dejstvo endogenih peroksidaza. Nakon toga ćelije su opet oprane tri puta sa PBST, a zatim blokirane sa 10 % rastvorom FCS u PBST u trajanju od 3 sata na sobnoj temperaturi. Sledilo je pranje sa PBST, a potom i izlaganje primarnom antitelu na fosfo-acetil-CoA karboksilazu (fosfo-ACC), koje je trajalo 1 sat na 37 °C. Potom su ćelije 4 puta prane sa PBST, i izlagane odgovarajućem sekundarnom antitelu vezanom sa peroksidazom rena, specifičnom za primarno antitelo, opet u trajanju od 1 sat na 37 °C. Nakon 4 pranja sa PBST, u bunarčice je nalivan supstrat za peroksidazu rena - TMB. Nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku, sledilo je zaustavljanje reakcije sa 0,1 M HCl. Absorbancija je merena na 450 nm na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju. Absorbancija očitana u kulturama koje su izlagane samo sekundarnom, a ne i primarnom antitelu, smatrana je nespecifičnom i oduzimana je od odgovarajućih vrednosti apsorbancije u kulturama izloženim i primarnom i sekundarnom antitelu. Konačno, krajnji rezultat je predstavljao ekspresiju konkretnog proteina u ćeliji iskazanu indeksom apsorbancije i relativnog broja živih ćelija u kulturi dobijenog kristal violet testom. Primarno antitelo primenjivano je u koncentraciji 1:250 za anti-fosfo-ACC, (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD). Sekundarno antitelo bilo je konjugovano sa peroksidazom rena (HRP) i primenjivano je u sledećoj anti-zečiji IgG 1:1000 (SouthernBiotech, Birmingham, AL, SAD).

3.7. Ultrastrukturna analiza ćelija na transmisionom elektronskom mikroskopu (TEM)

Analiza strukture i prisustvo vakuola u ćelijama tretiranim dorzomorfinom rađeno je na transmisionom elektronskom mikroskopu. Ćelije su sađene u 60mm petri šolje i nakon što su se zalepile tretirane su dorzomorfinom. Po isteku 24 sata inkubacije sa dorzomorfinom ćelije su tripsinizirane, prebačene u odgovarajuće epruvete i centrifugirane (500 g/5 minuta/22 °C), a zatim oprane sa 1 ml PBS. Poslednje pranje ćelija bilo je na manjoj brzini (200 g/10 minuta/22 °C) i nakon toga su fiksirane 3% glutaraldehidom. Zatim su ispirane u kakodilatnom puferu 30 minuta. Sledeći korak u obradi ćelija je fiksiranje osmijum tetroksidom sat vremena. Ćelije se opet ispiraju kakodilatnim puferom i ostavljaju se u uranil acetatu preko noći. Nakon 24 sata se vrši dehidratacija u alkoholima rastuće koncentracije i propilenoksidu, i počinje se sa kalupljenjem EPON-u. Kada je kalup gotov, vadi se iz ependorfice, i seče se na ultramikrotomu. Prvo se pravi semi-tanki isečak koji se boji toluidin-plavim i na njemu se bira deo koji će biti sečen za ultratanke isečke. Zatim se ultratanki isecci hvataju na bakarne mrežice i kontrastiraju uranil acetatom i olovo citratom, i analiziraju elektronskim mikroskopom (Morgagni 268D, FEI, Hillsboro, SAD).

3.8. Određivanje nivoa ekspresije iRNK za Bax i Bcl-2

3.8.1. Izolacija RNK

Da bi se iz U251 ćelija izolovala RNK tumorske ćelije su lizirane RNA Isolator-om (Invitrogen, Paisley, Velika Britanija). Iz kultura je odlivan supernatant, a ćelije prelivane sa 250 µl izolatora u kome su resuspendovane provlačenjem nekoliko puta kroz nastavak pipete. Dobijeni ćelijski lizati skupljani su u plastične epruvete (1,5 ml), a nakon 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi dodavano im je po 50 µL hloroforma. Nakon intenzivnog

vorteksiranja uzorci su inkubirani 10 minuta na +4 °C, a zatim centrifugirani 15 minuta na 12000 g na + 4 °C. Nakon centrifugiranja jasno su se izdvajale gornja vodena faza koja je sadržavala RNK, donja hloroformska faza sa proteinima i lipidima, i intermedijarna faza sa DNK. Vodena faza je skupljana u plastične epruvete, a zatim joj je dodavana istovetna zapremina izopropanola. Nakon mešanja sadržaja epruveta, ćelije su inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirane 15 minuta na 12000 g na + 4 °C. Posle centrifugiranja na dnu epruveta formirao se talog RNK. Supernatant je odlivan, a talog opran dva puta po 5 minuta na 7500 g u 1 ml 70 % etanola. Nakon odlivanja etanola, pipetom je skupljan preostali etanol. Talog RNK sušen je oko 5 minuta (dok ne ispari sav etanol), i konačno rastvaran u 20 µl destilovane vode.

3.8.2. Reverzna transkripcija

Nakon merenja RNK koncentracije na Gene Quant kolorimetru 1 µg RNK rastvaran je u 15 µl vode sa 0,2 µg nasumičnih prajmera (Fermentas, Vilnius, Litvanija) i dNTP (Fermentas, Vilnius, Litvanija) u finalnoj koncentraciji 1 mM. Kao kontrola za eventualnu kontaminaciju služila je voda korišćena umesto RNK. Rastvori su inkubirani 10 minuta na 70 °C pri čemu su se heksamerni nasumično vezivali za RNK, posle čega su uzorci stavljeni 5 minuta na led. Nakon toga u uzorke je dodavano po 4 µl pufera za reverznu transkripciju (5 x First Strand Buffer, Fermentas, Vilnius, Litvanija) i 1 µl (200 U/µl, Fermentas, Vilnius, Litvanija) M-MuLV reverzne transkriptaze, a zatim su uzorci inkubirani 10 minuta na 25 °C, pa 60 minuta na temperaturi 42 °C na kojoj se odigravala reakcija reverzne transkripcije. Reakcija je prekinuta inkubacijom uzoraka 10 minuta na 70 °C. Na ovaj način dobijana je cDNK koja je u rastvorenom stanju čuvana na + 4 °C do upotrebe u reakciji lančanog umnožavanja.

3.8.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (RT-PCR, real time polymerase chain reaction)

Real-time PCR rađen je na aparatu ABI Prism 7500 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reakcije su pripremane prema standardnom protokolu za QuantiTectSYBR Green RT-PCR u jednom koraku (Applied Biosystems, Cheshire, Velika Britanija), koristeći komercijalno dostupne prajmere za Bax- α i Bcl-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN). Prajmeri za β aktin (sens 5'-TCCTTCTTGGGTATGG-3' i antisens 5'-ACGCAGCTCAGTAACAG-3') su dizajnirani koristeći Primer Express® software v2.0 (Applied Biosystems, Cheshire, Velika Britanija). Inicijalni korak RT-PCR je bio 2 minuta na 50 °C koji je praćen zadržavanjem od 10 minuta na 95 °C. U reakciji je bilo 40 ciklusa koji su se sastojali od 15 s topljenja na 95 °C, za kojim je sledio 1 minut vezivanja prajmera za DNK i sinteze DNK lanaca na 60 °C. Završni korak je bio inkubacija na 60 °C u trajanju od 1 minuta. Sve reakcije su rađene u triplikatu. Prag analize ciklusa (Ct, *cycle of threshold*) je bio podešen na 0.1 relativnih fluorescentnih jedinica. Prosečne Ct vrednosti kontrolnih triplikata (aktin) su oduzete od prosečnih Ct vrednosti triplikata gena od interesa i na taj način je dobijen Δ Ct, dok je relativna ekspresija gena izražena kao $2^{-\Delta Ct}$. Rezultati su prikazani kao relativni u odnosu na kontrolu, koja je arbitrarno podešena na 1. Vrednosti standardnih devijacija za Bax/Bcl-2 odnos su izračunate na sledeći način: $Cx\sqrt{(a^2/A^2+b^2/B^2)}$, gde je C=Bax/Bcl-2 odnos, dok je a standardna devijacija vrednosti Bax (A) i b standardna devijacija Bcl-2 vrednosti (B).

3.9. Transfekcija sa malom interferirajućom RNK - siRNA (engl. small interfering RNA)

Da bi se inhibirala ekspresija AMPK enzima u U251 ćelijama rađena je transfekcija sa malom interferirajućom RNK - siRNA (*engl. small interfering RNA*) za obe forme AMPK enzima ($\alpha 1/\alpha 2$). U251 ćelije su gajene u 90 mm petri šolji u RPMI medijumu sa 5% goveđeg seruma, bez antibiotika. Nakon 24 sata kada su ćelije bile 60% konfluentne

transfektovane su sa AMPK siRNA i kontrolnom siRNA (Santa Cruz Biotechnology, CA, SAD). Oligomeri siRNA su prethodno rastvoreni u Opti-MEM medijumu sa redukovanim serumom u odsustvu antibiotika i inkubirani 5 minuta. Lipofektamin 2000 (Invitrogen, CA, SAD) je takođe inkubiran 5 minuta u Opti-MEM medijumu sa redukovanim serumom u odsustvu antibiotika. Zatim su iste zapremine razblaženog lipofektamina i siRNA pomešane i inkubirane 20 minuta radi formiranja oligomer-lipofektamin kompleksa. Čelijama je promenjen medijum (RPMI+5% seruma) i dodat siRNA-lipofektamin 2000 kompleks, tako da je finalna koncentracija siRNA bila 100nM a lipofektamin je 600 puta razblažen, kako je preporučeno od strane proizvođača. Čelije su inkubirane 8 sati sa medijumom za transfekciju i nakon toga je promenjen medijum i sipan normalan medijum za kultivaciju ćelija (RPMI+5% goveđeg seruma+antibiotici). 24 sata od početka transfekcije ćelije su presađene u ploče sa 96 i 24 bunara kao i u 60 mm petri šolje i ostavljene još 24 sata. Nakon toga određivana je ekspresija AMPK i drugih proteina AMPK/Akt/mTOR signalnog puta imunoblot analizom, vijabilitet i broj ćelija kristal violet i MTT testom, ćelijski ciklus, aktivacija kaspaza i indukcija apoptoze i nekroze, kao i produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta analizom na protočnom citofluorimetru.

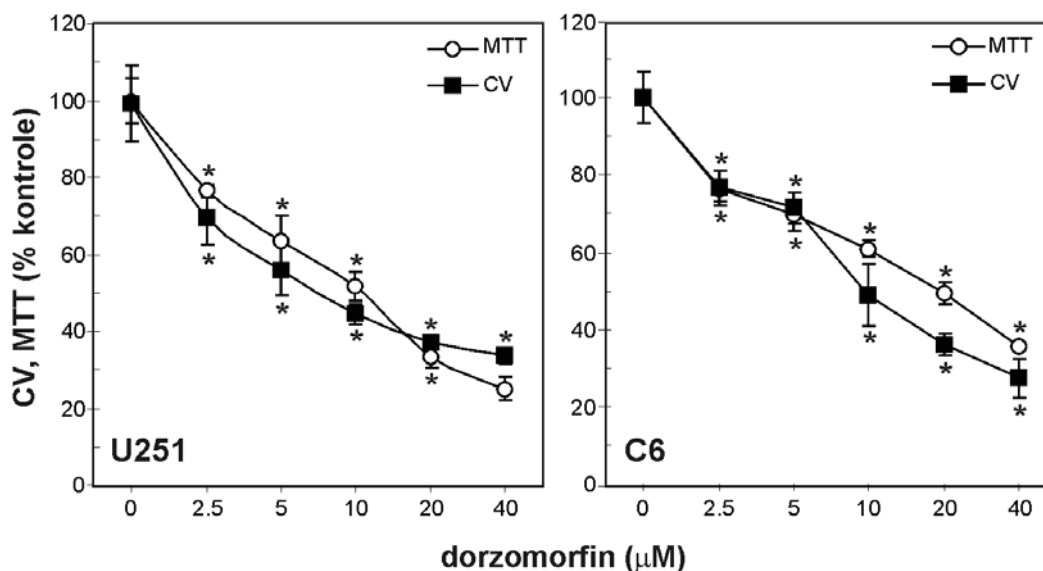
3.11. Statistička analiza

U statističkoj obradi podataka korišćene su metode analitičke statistike. Za procenu značajnosti razlike nezavisnih uzoraka korišćeni su parametarski test – Studentov t-test, a za analizu statističke značajnosti razlike između rezultata dobijenih različitim tretmanima triplikata kultura, korišćena je analiza varijanse (ANOVA), praćena Student-Newman-Keuls-ovim testom za višestruka poređenja. Vrednost $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom.

4. REZULTATI

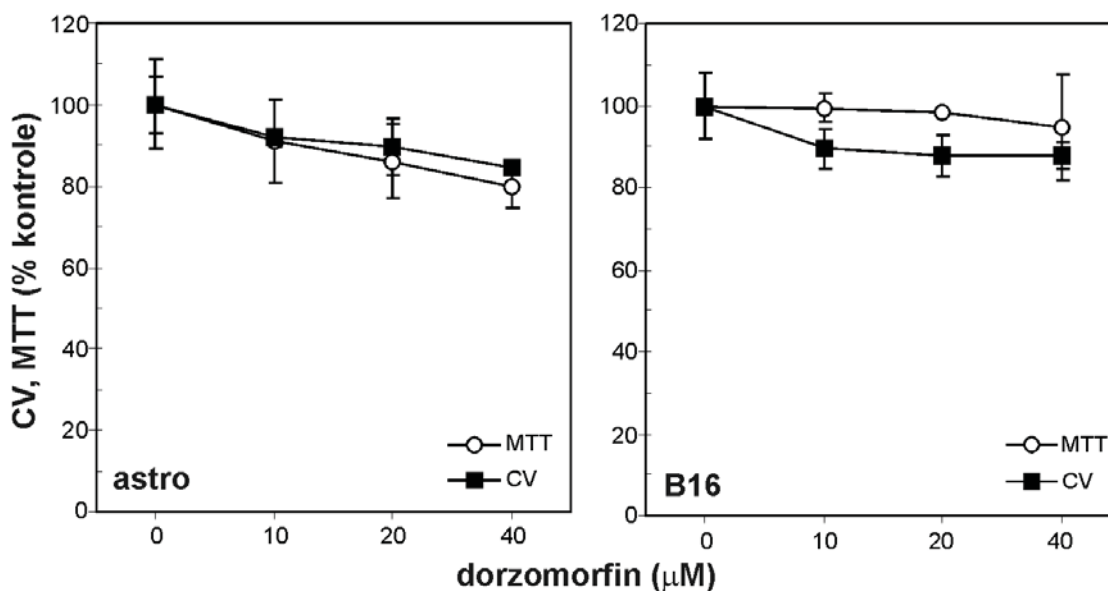
4.1 Dorzomorfina smanjuje vijabilitet C6 i U251 glioma ćelija, ali ne B16 melanoma ćelija i primarnih astrocita

Poznato je da i aktivacija i inhibicija AMPK mogu inhibirati rast različitih tumorskih ćelija. U cilju ispitivanja uticaja inhibicije AMPK na vijabilitet ćelija humanog glioma U251 i pacovskog glioma C6, tumorske ćelije su inkubirane u prisustvu farmakološkog inhibitora AMPK dorzomorfina. Nakon 48 sati primene dorzomorfina je na dozno zavisni način smanjio vijabilitet C6 i U251 ćelija, što je pokazano posredno određivanjem broja adherentnih ćelija kristal violet testom (slika 2) i merenjem mitohondrijalne aktivnosti MTT testom.



Slika 2. Dorzomorfina smanjuje vijabilitet ćelija glioma. Astrocitomske ćelijske linije U251 i C6, inkubirane su 48h u prisustvu različitih koncentracija dorzomorfina. Vijabilnost ćelija je određivana kristal violet (CV) i MTT testom. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ triplikata kultura. (* $p < 0,05$ označava statističku značajnost razlike u odnosu na odgovarajuće kulture kultivisane u odsustvu dorzomorfina, u standardnom medijumu).

Da bi se utvrdilo da li je toksični efekat dorzomorfina specifičan za glioma ćelije, ispitivan je i uticaj ove supstance na vijabilitet primarnih pacovskih astrocita i B16 ćelija mišjeg melanoma (slika 3). Pošto tretman sa dorzomorfinom nije značajno smanjio niti vijabilitet primarnih astrocita niti vijabilitet B16 ćelija, moglo se zaključiti da je ovaj citotoksični/antiproliferativni efekat inhibitora AMPK specifičan upravo za ćelije glioma.



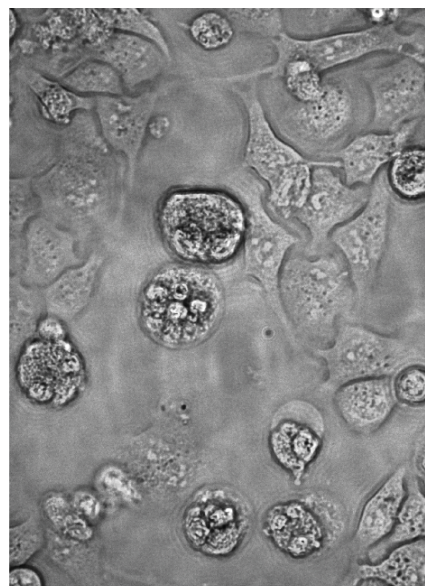
Slika 3. Dorzomorfin ne utiče na vijabilitet primarnih pacovskih astrocita i B16 ćelija mišjeg melanoma. Primarni astrociti i B16 ćelije inkubirane su u prisustvu različitih koncentracija dorzomorfina. Nakon 48h određivana je vijabilnost ćelija kristal violet (CV) i MTT testom. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ triplikata kultura. (* $p < 0,05$ označava statističku značajnost razlike u odnosu na odgovarajuće kulture kultivisane u odsustvu dorzomorfina).

4.2 Dorzomorfin menja morfologiju U251 ćelija

U cilju ispitivanja uticaja dorzomorfin na gustinu i morfologiju U251 ćelija, ćelije su nakon 24 sata inkubacije u prisustvu inhibitora AMPK analizirane svetlosnim mikroskopom. Korišćena je toksična doza od 20 μ M. Pokazano je da tretman sa dorzomorfinom smanjuje gustinu i da menja morfologiju ovih tumorskih ćelija. Ćelije su izgubile svoj poligonalni oblik, nastavci su se povukli, a ćelije zaokruglile (slika 4). U skladu sa indukcijom ćelijske smrti zaokrugljene ćelije, smanjenog volumena su se odlepljivale od plastične podloge. Takođe je u kulturi stimulisanih ćelija na određenom broju zaokrugljenih ćelija uočeno bubrenje membrane („*blebbing*“), promena koja predstavlja značajnu morfološku karakteristiku apoptoze.



kontrola

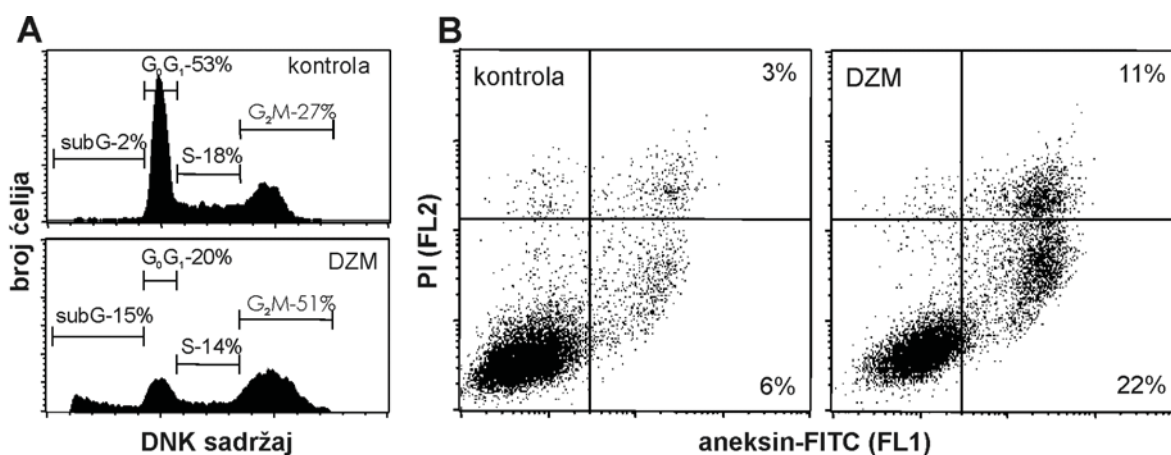


dorzomorfin

Slika 4. Dorzomorfin menja morfologiju ćelija glioma. U251 ćelije su inkubirane 24h u prisustvu dorzomorfin (20 μ M) . Morfologija ćelija je analizirana pod svetlosnim mikroskopom.

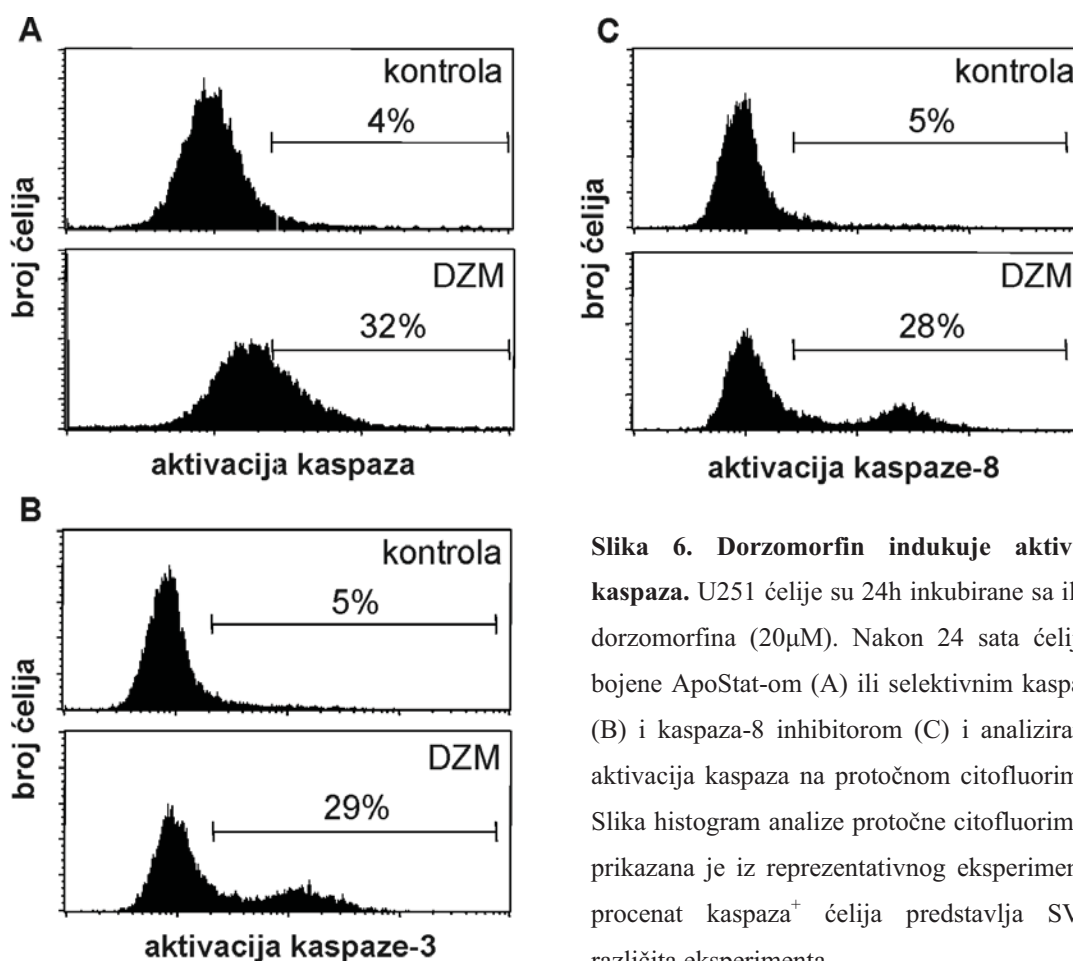
4.3 Dorzomorfin indukuje blokadu ćelijskog ciklusa i apoptozu ćelija glioma

U skladu sa smanjenjem vijabiliteta i opisanim morfološkim promenama ćelija glioma nastalim pod uticajem dorzomorfin, dalje je ispitivan uticaj tretmana ovim inhibitorom na ćelijski ciklus i smrt ćelije. Analiza ćelijskog ciklusa pokazala je da 24 časovni tretman inhibitorom AMPK (20 μ M) zaustavlja proliferaciju ćelija glioma u G₂/M fazi ciklusa. Istom analizom pokazano je i da dorzomorfin povećava broj ćelija u subG₀/G₁ fazi ćelijskog ciklusa, odnosno da indukuje fragmentaciju DNK koja karakteriše apoptozu (slika 5A). Analiza na protočnom citofluorimetru ćelija obojenih aneksinom V-FITC (vezuje za eksternalizovani fosfatidilserin apoptotičnih ćelija) i propidijum jodidom (boji samo u ćelije sa dezintegrisanom ćelijskom membranom), potvrdila je da dorzomorfin indukuje kako ranu apoptozu (aneksin⁺/PI⁻), tako i kasnu apoptozu (aneksin⁺/PI⁺) U251 ćelija (slika 5B).



Slika 5. Dorzomorfin zaustavlja ćelijski ciklus i indukuje apoptozu. U251 ćelije su tretirane dorzomorfinom (DZM; 20 μ M). Posle 24h ćelije su bojene propidijum jodidom i aneksinom V-FITC i analiziran je ćelijski ciklus i procenat apoptotičnih (aneksin⁺) ćelija na protočnom citofluorimetru. Slika (dot plot) analize protočne citofluorimetrije prikazana je iz reprezentativnog eksperimenta, a procenat apoptotičnih i nekrotičnih ćelija predstavlja SV tri različita eksperimenta.

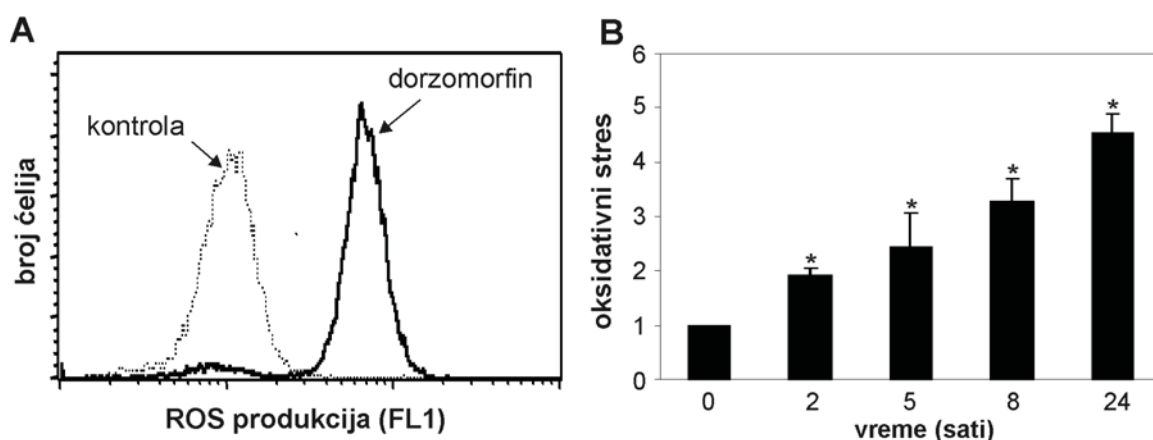
Pošto je pokazana indukcija apoptoze, dalje je ispitivana aktivacija kaspaza, enzima familije cistein-proteaza koji predstavljaju ključne egzekutore apoptotskog procesa. Citofluorimetrijska analiza je pokazala da dorzomorfin indukuje kako ukupnu aktivaciju kaspaza (slika 6A), tako i posebno aktivaciju inicijatorske kaspaze-8 i efektorske kaspaze-3 (slika 6B, 6C). Dakle, dorzomorfin zaustavlja proliferaciju U251 tumorskih ćelija u G₂/M fazi i indukuje njihovu apoptozu koja je zavisna od kaspaza.

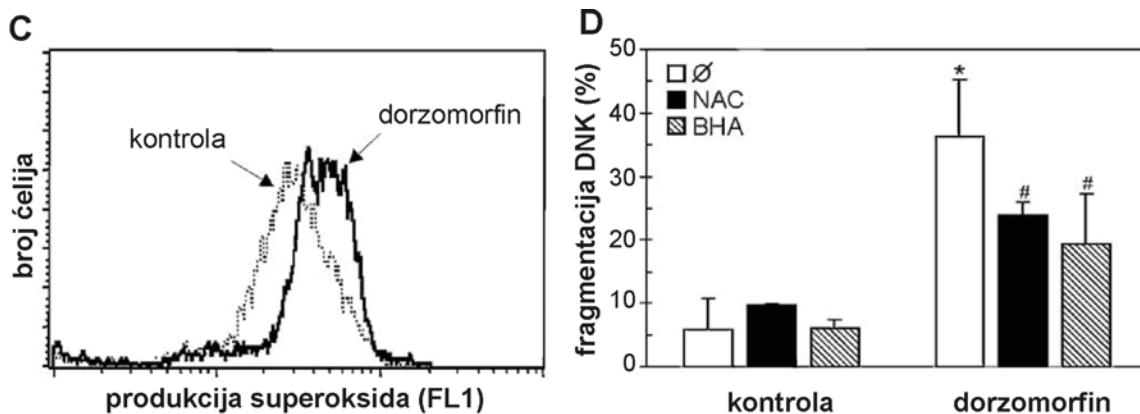


Slika 6. Dorzomorfin indukuje aktivaciju kaspaza. U251 ćelije su 24h inkubirane sa ili bez dorzomorfin (20 μ M). Nakon 24 sata ćelije su bojene ApoStat-om (A) ili selektivnim kaspaza-3 (B) i kaspaza-8 inhibitorom (C) i analizirana je aktivacija kaspaza na protočnom citofluorimetru. Slika histogram analize protočne citofluorimetrije prikazana je iz reprezentativnog eksperimenta, a procenat kaspaza⁺ ćelija predstavlja SV tri različita eksperimenta.

4.4 Dorzomorfin stimuliše produkciju reaktivnih vrsta kiseonika u ćelijama glioma

Imajući u vidu da je oksidativni stres potentan induktor apoptoze, ispitivali smo da li dorzomorfin indukuje produkciju reaktivnih vrsta kiseonika-RVS (*engl. reactive oxygen species*) u ćelijama glioma. Analizom na protočnom citofluorimetru ćelija obojenih redoks-senzitivnom bojom dihidrorodaminom (DHR) uočeno je povećanje produkcije RVS kod U251 ćelija tretiranih sa dorzomorfinom, i to već nakon 2 sata (slika 7A). Oksidativni stres generisan ovim tretmanom pokazivao je vremenski zavisani profil (slika 7B). Osim toga, analizom ćelija obojenih sa dihidroetidijumom (DHE), fluorescentnom bojom selektivnom za superoksid, potvrđeno je da bar deo produkovanih RVS potiče od superoksid anjon radikala (slika 7C). Da bi se ispitalo da li pokazani oksidativni stres učestvuje u ubijanju glioma ćelija dorzomorfinom, U251 ćelije stimulisane ovim AMPK inhibitorom bile istovremeno tretirane sa antioksidansima N-acetilcisteinom (NAC) ili butiliranim hidroksianizolom (BHA). Protektivan efekat antioksidanata, pokazan kao smanjenje fragmentacije DNK, potvrdio je da je citotoksičnost dorzomorfina u kulturi ćelija glioma zavisna od indukcije oksidativnog stresa (slika 7D). Slični rezultati kao na U251 ćelijama dobijeni su i na C6 pacovskim ćelijama glioma.



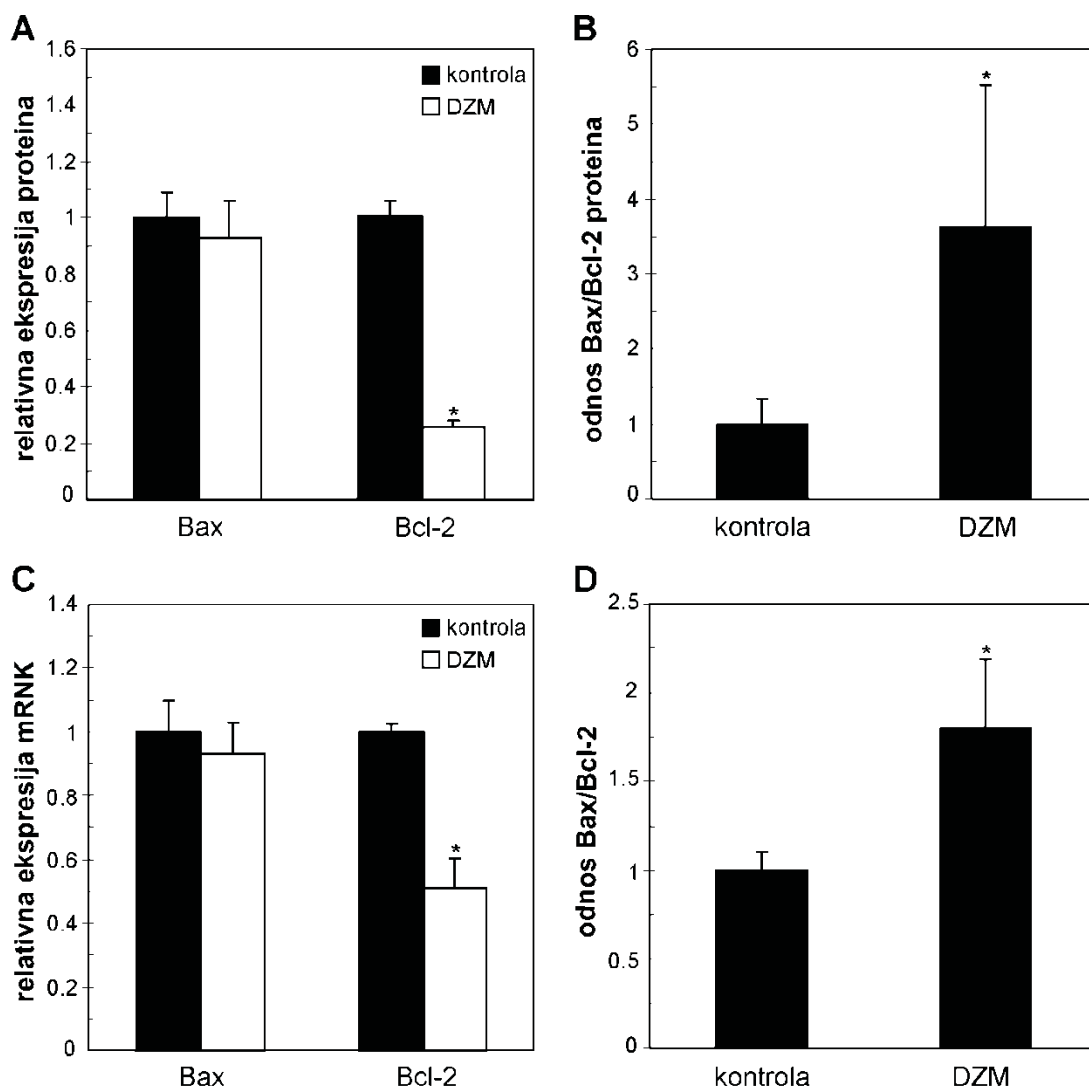


Slika 7. Dorzomorfin indukuje oksidativni stres. U251 su tretirane dorzomorfinom (20 μ M) 24h (A i C) ili naznačeni vremenski period (B). Protočnom citofluorimetrijom određivana je intracelularna produkcija RVS u DHR obojenim ćelijama (A, B), ili superoksid anjon radikala u DHE obojenim ćelijama (C). U251 su inkubirane sa dorzomorfinom (20 μ M) u odsustvu ili prisustvu antioksidanata N-acetilcisteina (NAC; 2mM), butiliraniog hidroksianizola (BHA; 50 μ M). DNK fragmentacija određivana je protočnom citofluorimetrijom nakon 24h (bojenje ćelija propidijum jodidom). Reprezentativni histogrami sa protočne citofluorimetrije su prikazani na slikama (A i C), dok su podaci na slikama (B i D) srednja vrednost +SD tri nezavisna eksperimenta.

4.5 Dorzomorfin smanjuje ekspresiju Bcl-2, ali ne utiče na ekspresiju Bax proteina

Bax i Bcl-2 su proteini uključeni u regulaciju apoptoze. Bax je proapoptotski molekul koji indukuje permeabilizaciju spoljašne membrane mitohondrija (Ola, Nawaz i sar., 2011), dok je Bcl-2 antiapoptotski molekul koji inhibira delovanje Bax. Međusobni odnos koncentracija ova dva proteina Bax/Bcl-2 determiniše apoptozu i naziva se proapoptotski potencijal. Efekat dorzomorfin na koncentraciju ova dva proteina ispitan je ELISA testom. Pokazano je da se koncentracija Bcl-2 proteina nakon 18 sati inkubacije sa dorzomorfinom dramatično smanjuje. Sa druge strane promene u koncentraciji Bax proteina nisu bile uočene, što je zaključno rezultovalo povećanjem Bax/Bcl-2 odnosa u tretiranim U251 ćelijama (slika 8A, B). U skladu sa rezultatima dobijenim ELISA testom, RT-PCR metodom nakon 8 časova inkubacije detektovano je značajno smanjenje nivoa

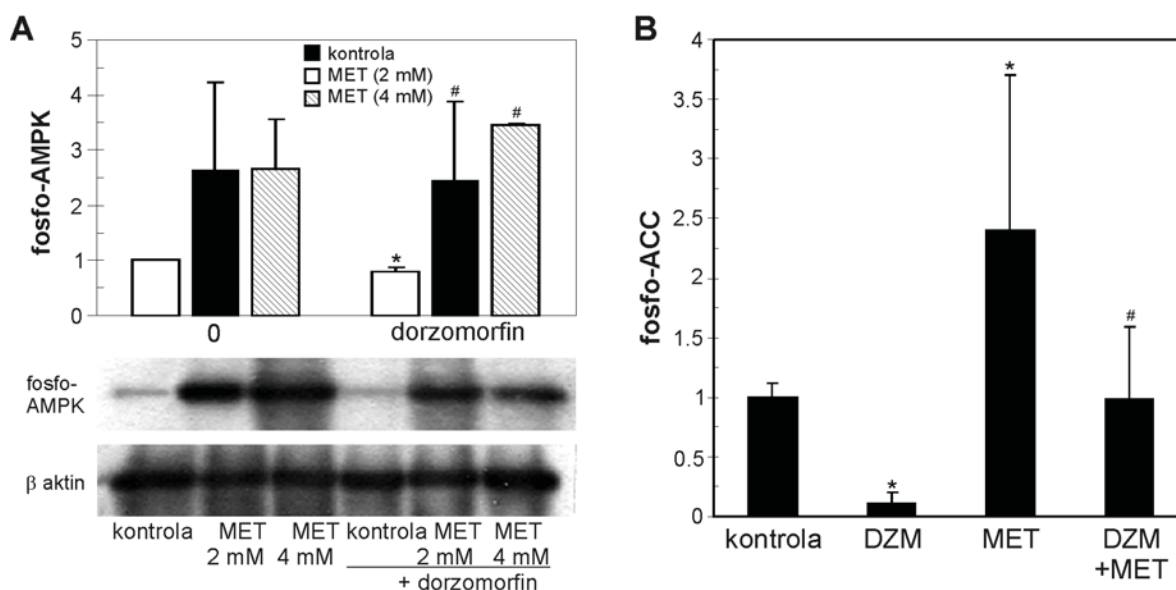
iRNK za Bcl-2 u ćelijama, bez promena u nivou iRNK za Bax (slika 8C, D). Povećanje odnosa Bax/Bcl-2 iRNK u ćelijama kao i posledično povećanje odnosa njihovih proteina, potvrđuje da je apoptoza indukovana dorzomorfinom asocirana sa smanjenjem Bcl-2, odnosno sa aktivacijom Bax proteina.



Slika 8. Dorzomorfin povećava odnos Bax/Bcl-2 u ćelijama glioma. Nivo Bax i Bcl-2 proteina (A) u U251 ćelijama tretiranim dorzomorfinom određivan je ELISA testom nakon 18h inkubacije, a nivo mRNK (C) *real-time* RT-PCR nakon 8 sati. Odnos Bax/Bcl-2 proteina (B) i iRNK (D) je izračunat. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ tri različita eksperimenta, (* $p < 0,05$ označava statističku značajnost razlike u odnosu na odgovarajuće kulture kultivisane u odsustvu dorzomorfinu).

4.6 Metformin blokira inhibiciju AMPK indukovanu dorzomorfinom

U daljem setu eksperimenata ispitivano je da li su pokazani antiproliferativni i proapoptotski efekti dorzomorfinu posredovani inhibicijom aktivnosti AMPK. U cilju poništavanja inhibicije aktivnosti ovog enzima indukovane dorzomorfinom ćelije su tretirane aktivatorom AMPK metforminom, biguanidinskim jedinjenjem koje se koristi u terapiji *diabetes mellitus* tipa 2 (Dunn i Peters 1995).



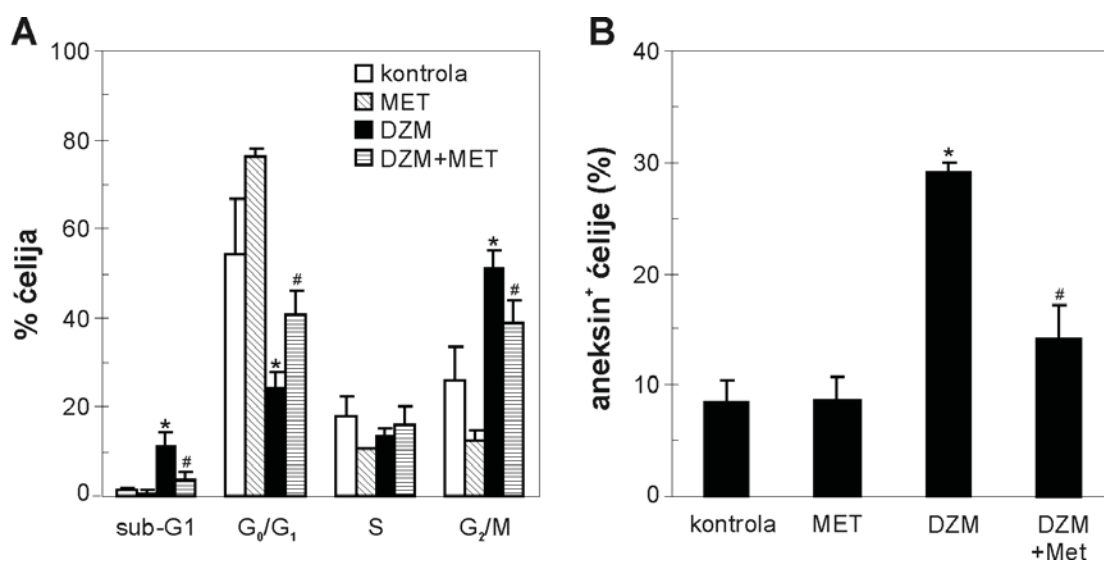
Slika 9. Metformin poništava inhibiciju AMPK indukovanu dorzomorfinom. U251 ćelije su inkubirane sa dorzomorfinom (20 μ M), u prisustvu ili odsustvu određenih koncentracija (A) ili 2mM (B) metformina. Koncentracija fosfo-AMPK (A) i fosfo-ACC (B) determinisana je nakon 8h Western blot analizom (A) ili ELISA testom na fiksiranim ćelijama (B). Rezultati su prikazani kao SV \pm SD tri različita eksperimenta, (* $p < 0,05$ i # $p < 0,05$ označava statističku značajnost razlike u odnosu na netretirane i ćelije tretirane dorzomorfinom).

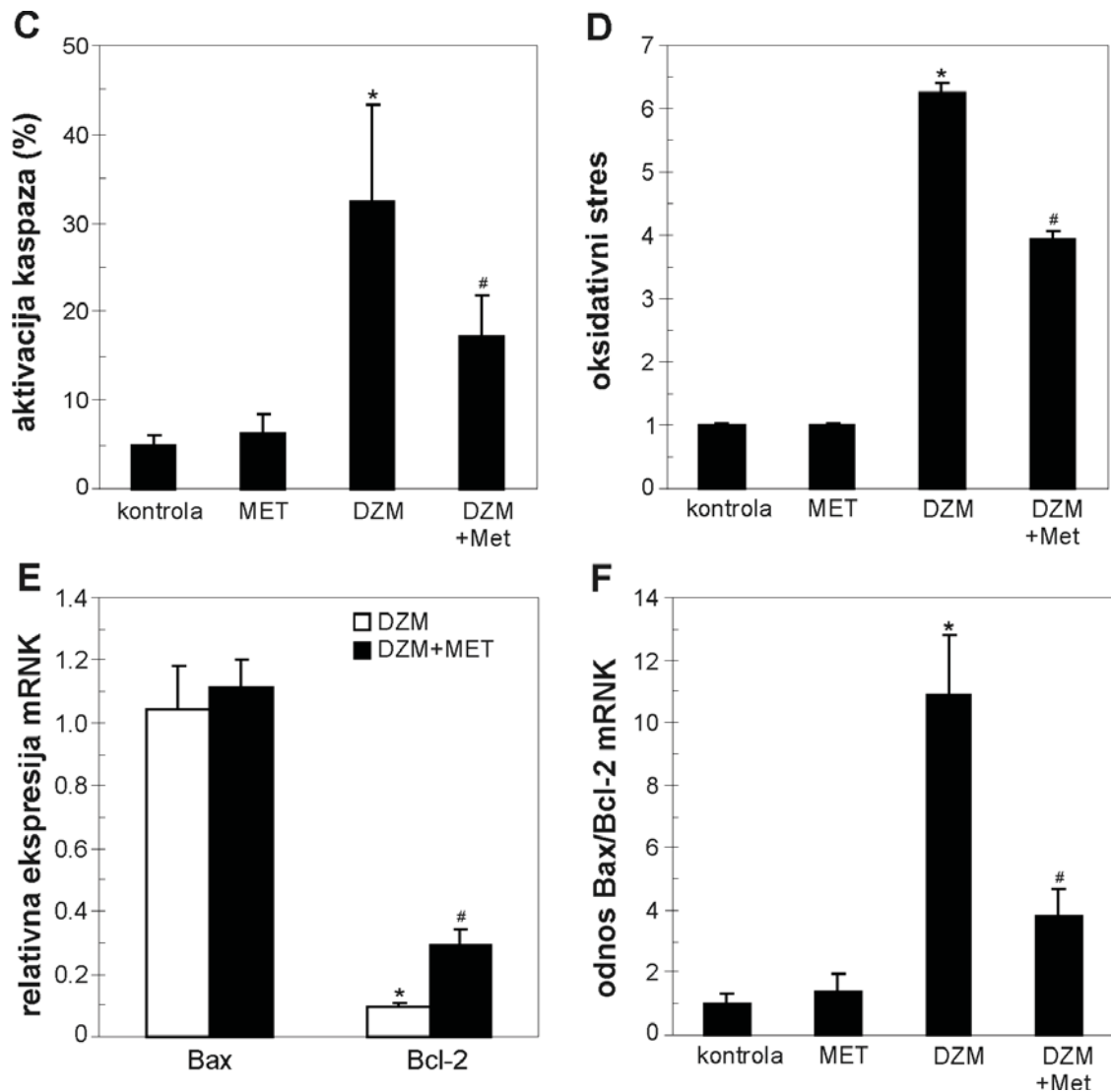
Da bi se ispitalo da li u našim eksperimentalnim uslovima dorzomorfin zaista inhibira aktivaciju AMPK i da li metformin može da poništi ovu inhibiciju, nakon tretmana ćelija sa dorzomorfinom ili kombinacijom dorzomorfinu i metformina, rađena je Western

blot analiza fosforilacije AMPK u aktivnoj poziciji, na treoninu-172. Dorzomorfin je nakon 8 sati inkubacije zaista smanjio fosforilaciju AMPK u kulturi U251 ćelija za oko 30%, sa druge strane metformin je dozno-zavisno aktivirao AMPK, i potpuno poništio inhibiciju fosforilacije AMPK indukovanu dorzomorfinom (slika 9A). U skladu sa rezultatima inhibicije aktivacije AMPK bili su i rezultati ELISA testa na fiksiranim ćelijama koji su pokazali da dorzomorfin skoro potpuno guši enzimsku aktivnost AMPK, odnosno fosforilaciju njenog supstrata fosfo acetil-CoA karboksilaze (ACC) (slika 9B). Metformin je kao i u slučaju aktivacije AMPK uspešno neutralisao inhibiciju fosforilacije ACC, potvrđujući da dorzomorfin ostvaruje svoje dejstvo kao farmakološki inhibitor sprečavajući aktivaciju i enzimatsku aktivnost AMPK.

4.7 Metformin smanjuje blokadu ćelijskog ciklusa i apoptozu indukovane dorzomorfinom

Pošto je utvrđeno da dorzomorfin zaista inhibira aktivnost AMPK, a da metformin uspešno poništava ovu inhibiciju, dalje je ispitivano kako metformin utiče na antiproliferativno i proapoptotsko delovanje dorzomorfinom, odnosno da li je antitumorsko delovanje dorzomorfinom AMPK zavisno. Analiza ćelijskog ciklusa je pokazala da sam metformin (2mM) zaustavlja ćelijski ciklus u G₀/G₁ fazi, i da uspešno sprečava G₂/M blokadu izazvanu dorzomorfinom, ukazujući da je antiproliferativni efekat dorzomorfinom AMPK zavisno (slika 10A). Osim toga, metformin je smanjio fragmentaciju DNK izazvanu dorzomorfinom, detektovanu kao sub-G frakciju u C6 ćelijama glioma (slika 10A). Sa tim u skladu, procenat (aneksin⁺) apoptotičnih ćelija (slika 10B), aktivacija kaspaza (slika 10C), oksidativni stres (slika 10D) i smanjenje antiapoptotskog proteina Bcl-2 (slika 10E), odnosno povećanje proapoptotskog potencijala Bax/Bcl-2 (slika 10F) bili su takođe značajno redukovani metforminom u kulturi C6 ćelija tretiranoj dorzomorfinom, dok sam metformin u nije indukovao navedene apoptotske promene. Dakle, blokada ćelijskog ciklusa, indukcija oksidativnog stresa, povećanje odnosa Bax/Bcl-2, aktivacija kaspaza i indukcija apoptoze od strane dorzomorfinom zaista su bili posredovani inhibicijom AMPK.



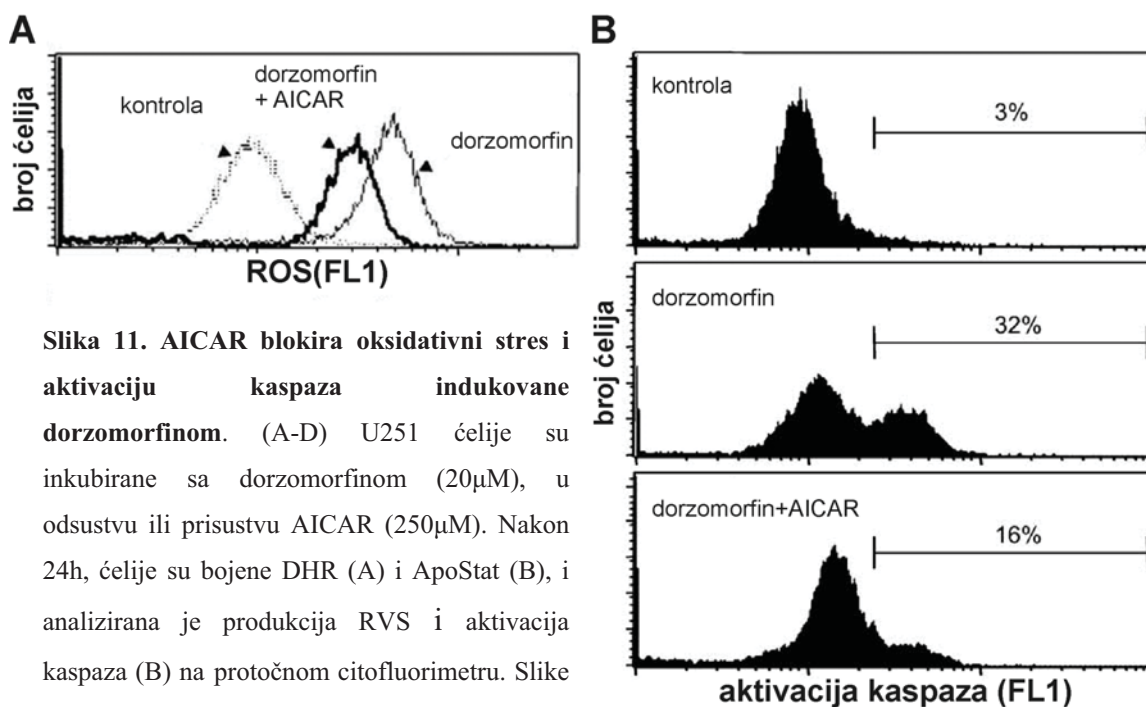


Slika 10. Metformin smanjuje anti-proliferativno, pro-apoptotsko i oksidativno dejstvo dorzomorfina.

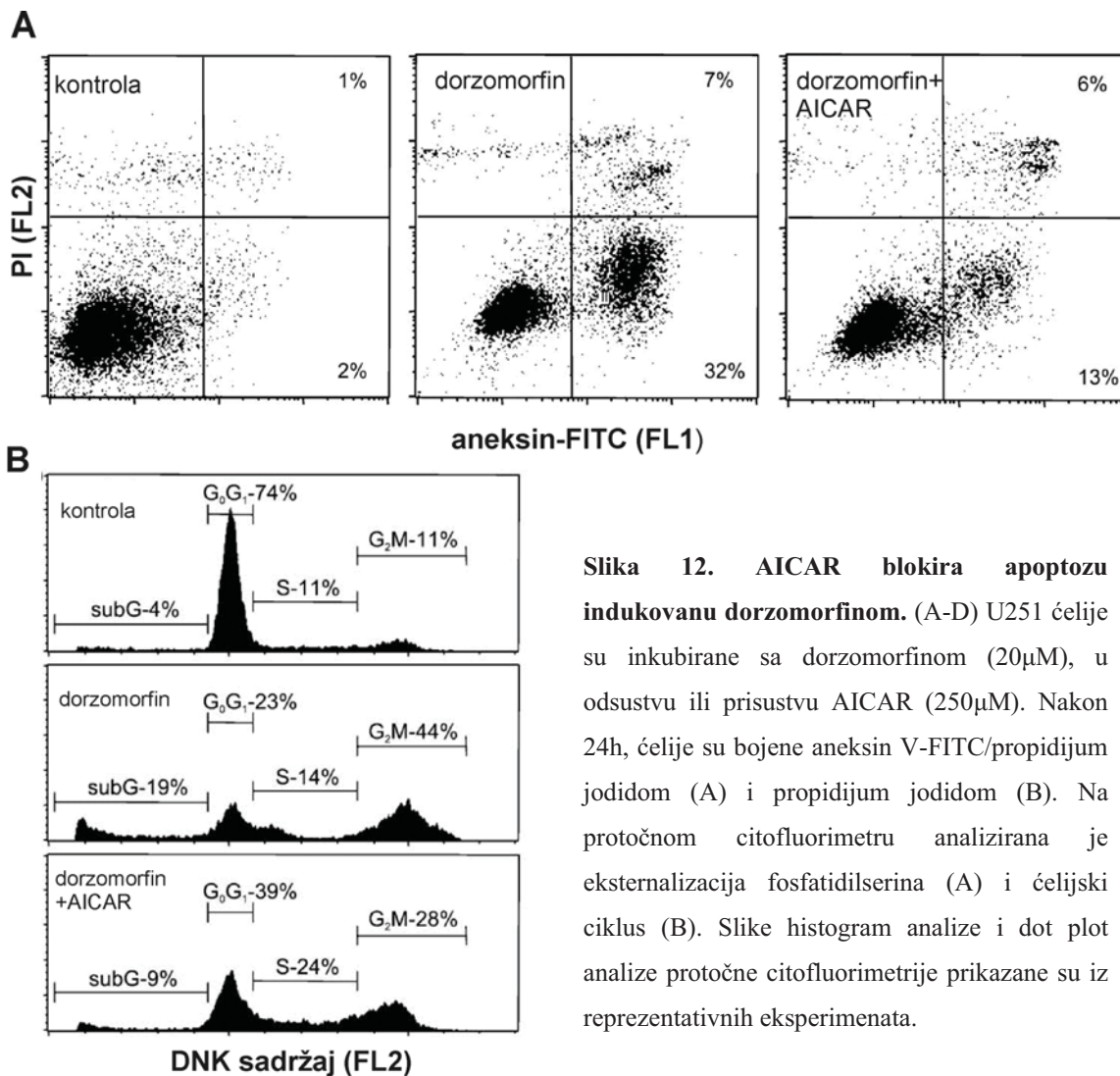
(A-F) C6 ćelije su inkubirane sa dorzomorfinom (20 μ M), u odsustvu ili prisustvu 2mM metformina. Nakon 24h ćelije su bojene propidijum jodidom (A), aneksinV-FITC/propidijum jodid (B), ApoStat (C), ili DHR (D) i ćelijski ciklus (A), eksternalizacija fosfatidilserina (B), aktivacija kaspaza (C) ili produkcija slobodnih radikala (D) je analizirana na protočnom citofluorimetru. Nivo Bax i Bcl-2 mRNA određivan je real-time PCR nakon 8h inkubacije (E) i odnos Bax/Bcl-2 mRNA je izračunat (F). Rezultati su prikazani kao SV \pm SD četiri različita eksperimenta (A) ili tri različita eksperimenta (B-D), ili srednja vrednost triplikata iz jednog ili dva eksperimenta sa sličnim rezultatima (E, F) (* $p < 0,05$ i # $p < 0,05$ označava statističku značajnost razlike u odnosu na netretirane i ćelije tretirane dorzomorfinom).

4.8 AICAR inhibira apoptozu indukovanu dorzomorfinom u ćelijama glioma

Pošto je pokazano da metformin inhibira antigliomsko delovanje dorzomorfinom, dalje je ispitivano da li se slično ponaša i drugi AMPK aktivator AICAR, nukleozid koji se u ćeliji prevodi u ZMP, analog AMP, i tako stimuliše aktivaciju AMPK (Sakoda, Ogihara i sar., 2002). Analizom na protočnom citofluorimetru pokazano je da AICAR takođe efikasno redukuje produkciju RVS (slika 11A), aktivaciju kaspaza (slika 11B), G₂/M blokadu ćelijskog ciklusa i fragmentaciju DNK (slika 12A), kao i eksternalizaciju fosfatidilserina (slika 12B) u U251 ćelijama tretiranim dorzomorfinom. Sam tretman U251 ćelija sa 250µM AICAR nije imao efekta na ćelijski ciklus, produkciju RVS i indukciju apoptoze. Dakle, sposobnost oba AMPK aktivatora, metformina i AICAR, da redukuju apoptozu i blokadu proliferacije indukovanu dorzomorfinom ukazuju na bitnu ulogu inhibicije AMPK u antitumorskom delovanju dorzomorfinom.



Slika 11. AICAR blokira oksidativni stres i aktivaciju kaspaza indukovane dorzomorfinom. (A-D) U251 ćelije su inkubirane sa dorzomorfinom (20µM), u odsustvu ili prisustvu AICAR (250µM). Nakon 24h, ćelije su bojene DHR (A) i ApoStat (B), i analizirana je produkcija RVS i aktivacija kaspaza (B) na protočnom citofluorimetru. Slike histogram analize protočne citofluorimetrije prikazane su iz reprezentativnih eksperimenata.

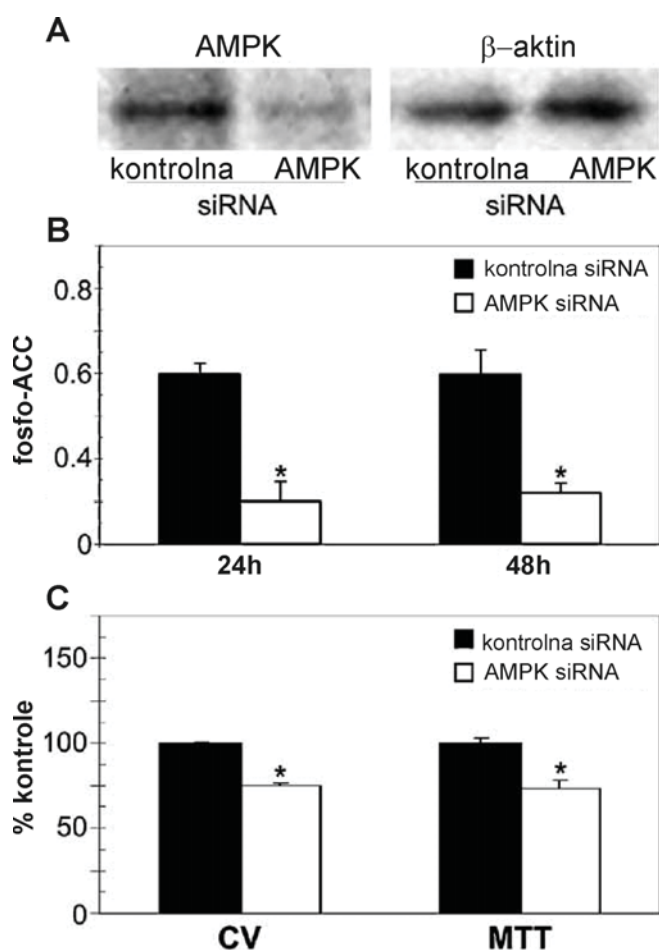


Slika 12. AICAR blokira apoptozu indukovanu dorzomorfinom. (A-D) U251 ćelije su inkubirane sa dorzomorfinom (20 μ M), u odsustvu ili prisustvu AICAR (250 μ M). Nakon 24h, ćelije su bojene aneksin V-FITC/propidijum jodidom (A) i propidijum jodidom (B). Na protočnom citofluorimetru analizirana je eksternalizacija fosfatidilserina (A) i ćelijski ciklus (B). Slike histogram analize i dot plot analize protočne citofluorimetrije prikazane su iz reprezentativnih eksperimenata.

4.9 Inhibicija AMPK nije dovoljna za indukciju oksidativnog stresa i apoptoze

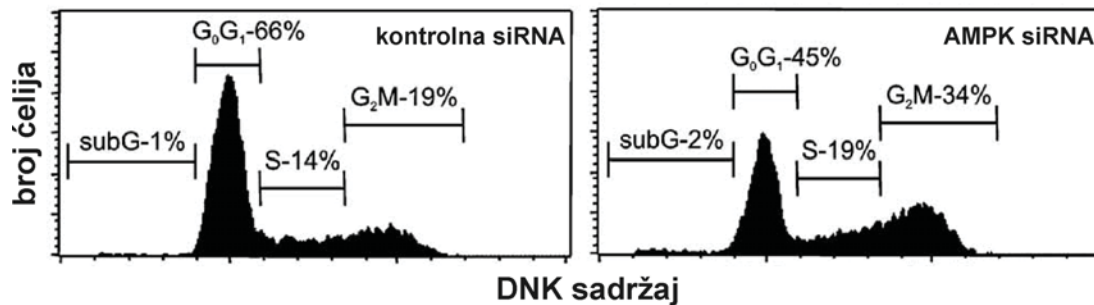
Na osnovu rezultata dobijenih sa AMPK aktivatorima, metforminom i AICAR, antigliomski efekat dorzomorfina mogao bi se pripisati inhibiciji AMPK. Da bi se ova hipoteza dalje ispitala ekspresija AMPK je poništena u U251 ćelijama transfekcijom sa malom interferirajućom RNK - siRNA (*engl. small interfering RNA*) za obe forme AMPK enzima ($\alpha 1/\alpha 2$), a zatim su ispitivani različiti parametri apoptoze. Western blot analizom

pokazano je da transfekcija sa siRNA uspešno inhibira ekspresiju AMPK enzima u U251 ćelijama (slika 13A). Odsustvo eksprimiranog AMPK enzima u ćeliji rezultovalo je značajno suprimiranom fosforilacijom ACC, u trajanju od 48 časova od transfekcije ćelija (slika 13B). MTT i kristal violet testom pokazano je da je vijabilitet U251 ćelija kod kojih je ekspresija AMPK blokirana specifičnom siRNA bio manji od vijabiliteta ćelija transfektovanih sa kontrolnom siRNA (slika 13C).



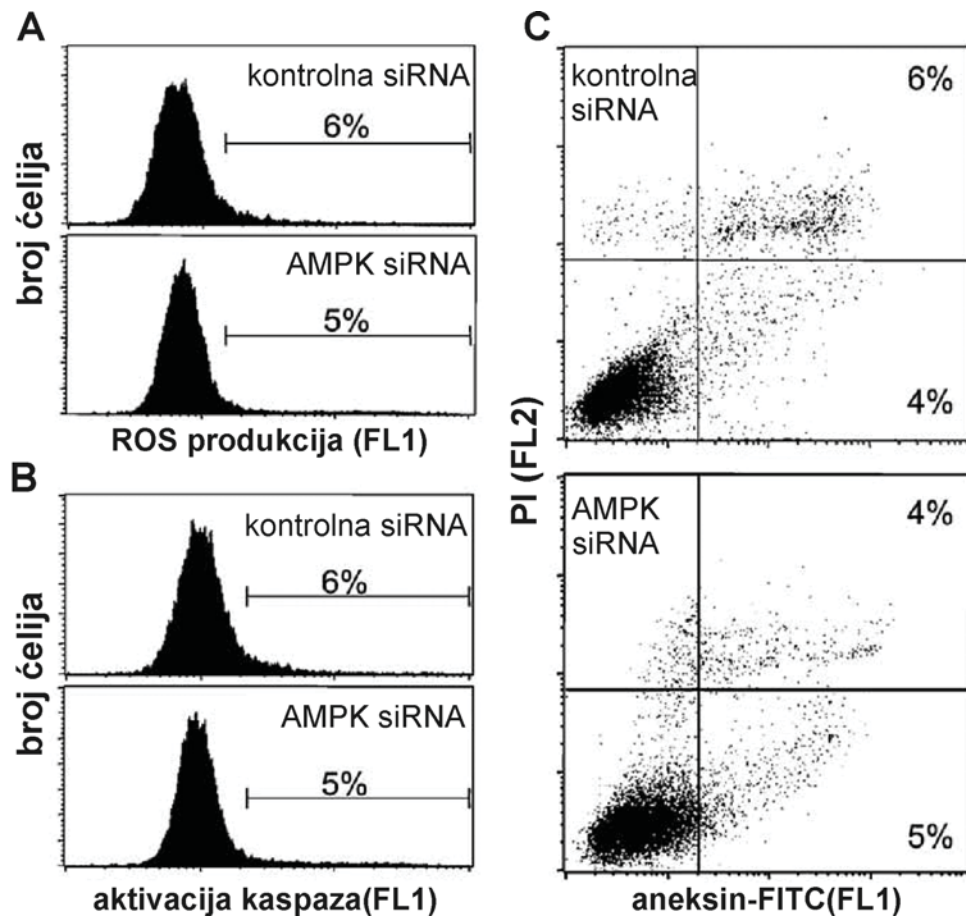
Slika 13. siRNA izaziva inhibiciju ekspresije AMPK i smanjuje vijabilitet. U251 ćelije su transfektovane kontrolnom i AMPK siRNA. Intracelularni nivo AMPK je determinisan Western blot analizom nakon 24h (A), ELISA testom na fiksiranim ćelijama meren je nivo fosfo-ACC u ćeliji nakon 24 i 48h (B) dok je kristal violet i MTT testom analiziran vijabilitet nakon 72h od ponovnog zasejavanja ćelija. Rezultati Western blot analize su reprezentativni iz dva nezavisna ekperimenta, dok rezultati (B i C) su srednja vrednost + SD triplikata (* $p < 0,05$).

Analiza distribucije ćelija kroz faze ćelijskog ciklusa nakon transfekcije (bojenje propidijum jodidom) pokazala je da inhibicija AMPK ekspresije specifičnom siRNA zaustavlja proliferaciju ćelija u G_2/M fazi ciklusa (slika 14).



Slika 14. AMPK inhibicija posredovana siRNA blokira ćelijski ciklus. U215 ćelije su transfektovane kontrolnom i AMPK siRNA. Nakon 48h od ponovnog zasejavanja ćelija analiziran je ćelijski ciklus (PI bojenje). Slika histogram analize protočne citofluorimetrije prikazana je iz reprezentativnog eksperimenta.

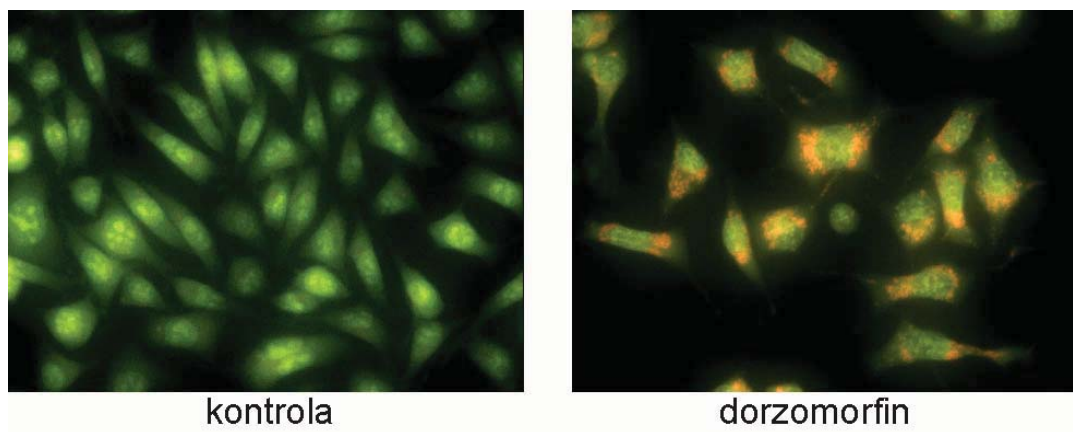
Sa druge strane inhibicija aktivnosti AMPK enzima posredovana specifičnom siRNA nije stimulisala produkciju RVS (slika 15A) i aktivaciju kaspaza (slika 15B). Takođe procenat apoptotičnih ćelija (aneksin⁺) nije povećan transfekcijom U251 ćelija siRNA za AMPK (slika 15C), niti je uočena fragmentacija DNK (slika 14). Oksidativni stres i apoptotski parametri mereni su nakon 48 časova od zasejavanja transfektovanih ćelija, dok je ekspresija AMPK još uvek bila suprimirana, što je isključilo mogućnost da je indukcija apoptoze izostala usled ponovne aktivacije AMPK. Dakle, iako inhibicija AMPK učestvuje u indukciji apoptoze glioma ćelija ona sama predstavlja nedovoljno jak stres u ćeliji koji bi mogao da izazove apoptozu. Sa druge strane, pošto je pokazano da transfekcija sa AMPK siRNA izaziva G₂/M blokadu ćelijskog ciklusa može se zaključiti da inhibicija AMPK je dovoljna da inhibira proliferaciju ćelija glioma.



Slika 15. Inhibicija AMPK pomoću specifične siRNA ne indukuje produkciju RVS, aktivaciju kaspaza i apoptozu. U215 ćelije su transfektovane kontrolnom i AMPK siRNA. Nakon 48h od ponovnog zasejavanja ćelija analizirana je produkcija RVS (DHR bojenje; A), aktivacija kaspaza (ApoStat bojenje; B) i apoptoza (anexin-FITC/PI bojenje; C). Slike analiza protočne citofluorimetrije prikazane su iz reprezentativnih eksperimenata.

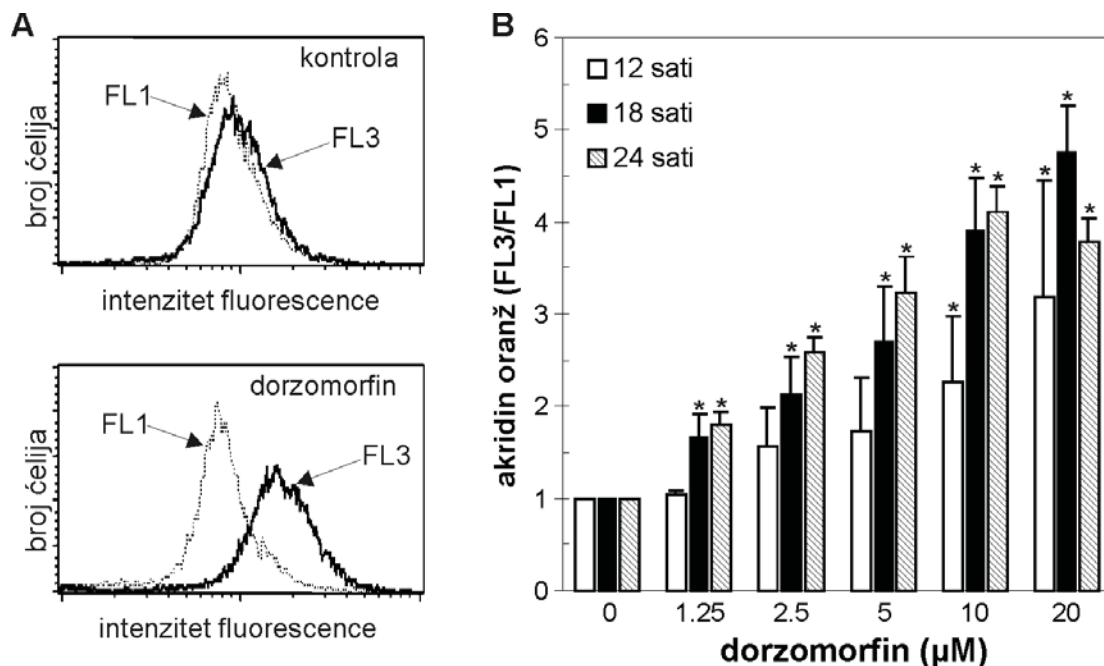
4.10 Dorzomorfin indukuje autofagiju u U251 ćelijama

Pošto je pokazano da dorzomorfin indukuje apoptozu ili programiranu ćelijsku smrt tipa 1 i utvrđeni mehanizmi uključeni u njenu indukciju u ćelijama glioma, u daljem nizu eksperimenata ispitivano je da li ovaj AMPK inhibitor indukuje i programiranu smrt tipa 2 ili autofagiju. Autofagija je autokanibalistički proces u kome se proteinski agregati i oštećene organele razgrađuju u autofagolizozomima (*Mizushima 2007*). Formiranje autofagolizozoma može se detektovati na fluorescentnom mikroskopu ili protočnom citofluorimetru analizom ćelija obojenih akridin oranžom, fluorescentnom bojom koja na niskom pH kakav je u autofagolizozomima prelazi iz zelene u crvenu. Nakon 24 sati inkubacije U251 ćelija sa 10 μ M dorzomorfinom na fluorescentnom mikroskopu je uočeno prisustvo velikog broja crvenih vezikula, odnosno autofagolizozoma (slika 16). Sa druge strane jedro i citoplazma kontrolnih ćelija bili su obojeni fluorescentno zeleno (slika 16).



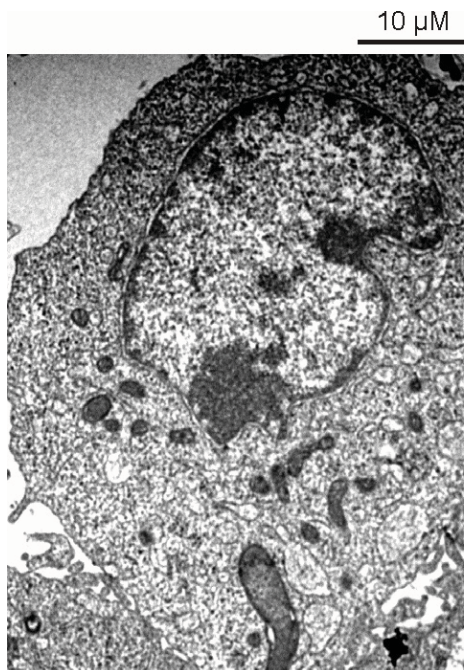
Slika 16. Dorzomorfin indukuje stvaranje kiselih vezikula u U251 ćelijama glioma – analiza fluorescentnom mikroskopijom. U251 ćelije su 24h inkubirane sa ili bez dorzomorfin (10 μ M). Prisustvo kiselih, crvenih autofagnih vezikula u akridin oranž bojenim ćelijama analizirano je na fluorescentnom mikroskopu.

U skladu sa tim, analiza ovih ćelija na protočnom citofluorimetru pokazala je porast crvene u odnosu na zelenu fluorescencu (FL3/FL1) kod ćelija tretiranih inhibitorom AMPK (slika 17A). Porast odnosa crvene i zelene fluorescence je bio dozno i vremenski zavisian (slika 17B).

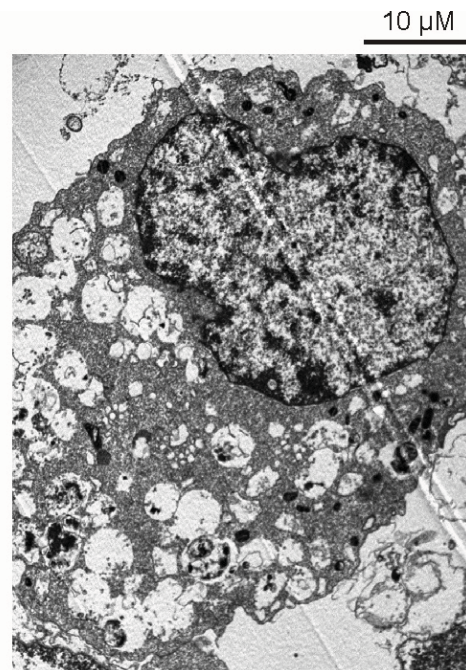


Slika 17. Dorzomorfine indukuje dozno i vremenski zavisnu akumulaciju kiselih vezikula. U251 ćelije su inkubirane sa ili bez dorzomorfina ($10\mu\text{M}$) 24h (A), ili sa različitim koncentracijama dorzomorfina 12, 18 ili 24h (B). Prisustvo autofagolizozoma u akridin oranž obojenim ćelijama je potvrđeno protočnom citofluorimetrijom kao porast inteziteta crvene u odnosu na zelenu fluorescencu (FL3/FL1) (A). Autofagija je kvantifikovana kao srednja vrednost FL3/FL1 odnosa (prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost + SD iz tri eksperimenta, * $p < 0,05$) (B).

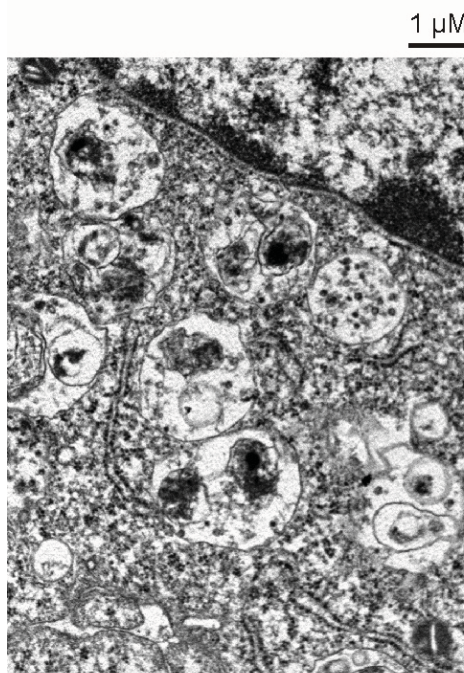
Sposobnost dorzomorfina da indukuje autofagiju potvrđena je i ultrastrukturnom analizom na transmisionom elektronskom mikroskopu (TEM). U citoplazmi ćelija tretiranih sa dorzomorfinom uočeno je prisustvo velikog broja vakuola u kojima se nalaze digestovane ćelijske organele, što je morfološka karakteristika autofagolizozoma (slika 18).



kontrola



dorzomorfin

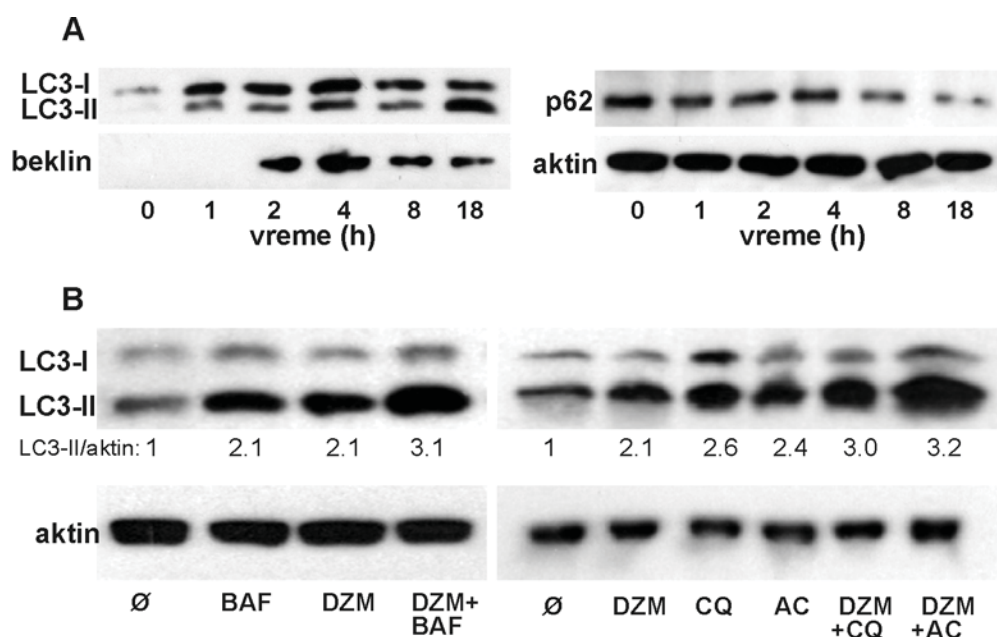


dorzomorfin

Slika 18. Dorzomorfin indukuje pojavu ćelijskih vakuola sa digestovanim ćelijskim sadržajem. TEM analiza ($10\mu\text{M}$) ćelija tretiranih dorzomorfinom nakon 24h pokazala je intenzivnu vakuolizaciju (slika desno) i vezikule koje liče na autofagolizosome u kojima je ćelijski sadržaj degradiran (donja slika levo).

Osim toga, Western blot analiza pokazala je da tretman inhibitorom AMPK indukuje vremenski zavisnu konverziju proteina LC3-I u LC3-II, koja karakteriše stvaranje autofagolizozoma, i porast ekspresije esencijalnog regulatora autofagije beklina-1 (slika

19A). Međutim, beclin-1 protein nema samo ulogu u indukciji autofagije, on takođe učestvuje u regulaciji apoptoze (*Kang, Zeh i sar., 2011*). Osim toga, porast nivoa LC3-II u ćeliji može biti posledica smanjene autofagne proteolize. Iz tog razloga je u ćelijama tretiranim dorzomorfinom analiziran nivo LC3-II proteina u prisustvu inhibitora proteolize: bafilomicina A1, hlorokina i amonijum hlorida. Blokirajući zakišeljavanje lizozoma u tretmanu ovim inhibitorima očekivano je povećan nivo LC3-II proteina u ćeliji, dok je sa dorzomorfinom dodatno porasla konverzija LC3 proteina (slika 19B). Ovaj rezultat ukazuje da tretman dorzomorfinom povećava autofagni fluks u ćelijama glioma. U skladu sa tim je i to da dorzomorfin smanjuje nivo p62 proteina (slika 19A) za koji je poznato da se selektivno degradira autofagijom (*Pankiv, Clausen i sar., 2007*). Dakle, prikazani rezultati nedvosmisleno pokazuju da dorzomorfin indukuje autofagiju u ćelijama glioma.

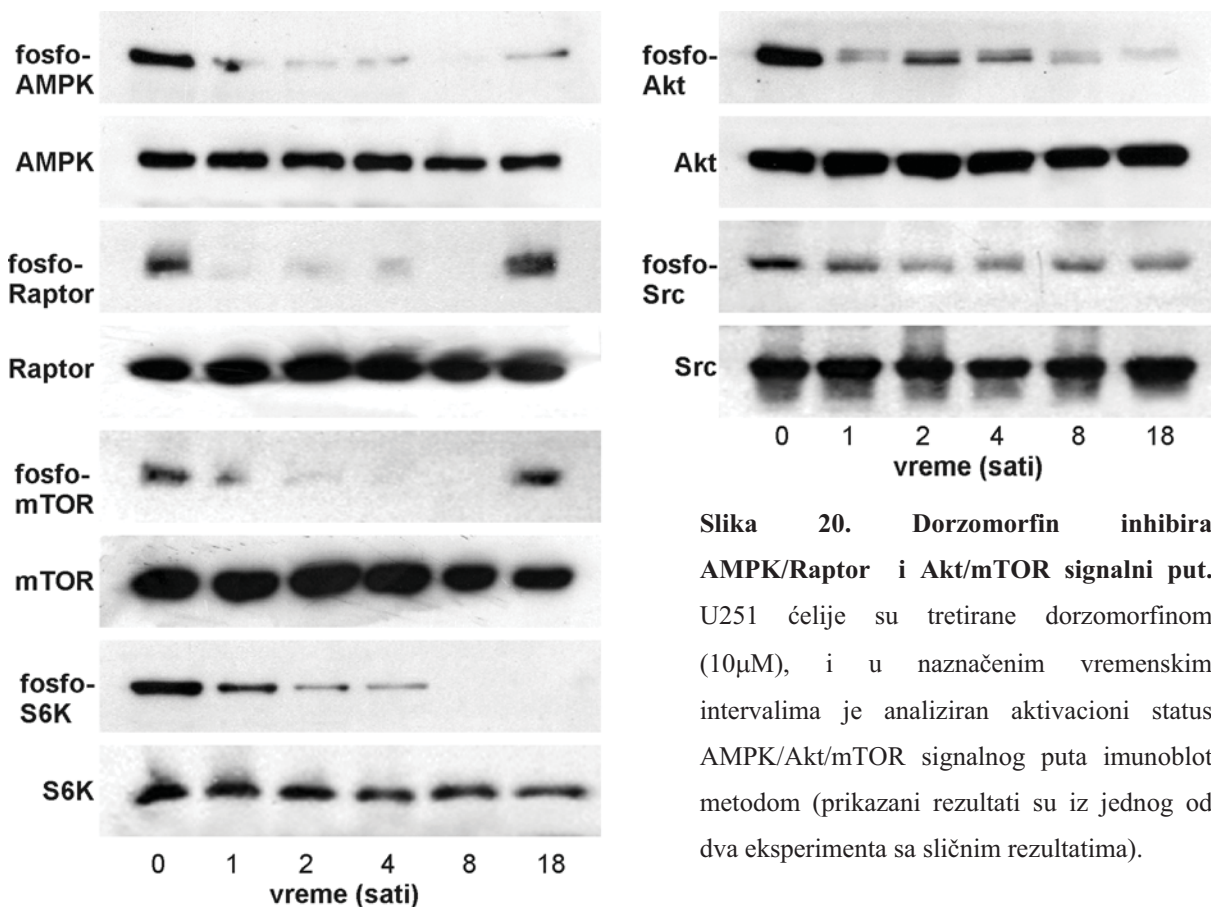


Slika 19. Dorzomorfin indukuje konverziju LC3-I u LC3-II, ekspresiju beclin-1 i degradaciju p62 proteina. Konverzija LC3 proteina, nivo beclin-1 i p62 proteina u dorzomorfinom (10 μ M) tretiranim U251 ćelijama determinisana je imunoblot analizom u naznačenim vremenskim intervalima (A). Imunoblot analiza konverzije LC3-I u LC3-II U251 ćelija tretiranih dorzomorfinom (DZM; 10 μ M) 6h u prisustvu ili odsustvu bafilomicina (BAF; 50nM), hlorokina (CQ; 50 μ M) i amonijum hlorida (AC; 25mM). (prikazani rezultati su iz jednog ili dva eksperimenta sa sličnim rezultatima).

4.11 Dorzomorfin izaziva inhibiciju AMPK proteina i Akt/mTOR signalnog puta

Pošto je pokazano da dorzomorfin indukuje autofagiju u ćelijama glioma, dalje su ispitivani unutarćelijski mehanizmi odgovorni za ovu indukciju. U tom cilju ispitivan je aktivacioni status proteina dva osnovna signalna puta uključena u regulaciju autofagije AMPK/mTOR and Akt/mTOR. Kao što je očekivano Western blot analizom uočena je inhibicija fosforilacije AMPK U251 ćelija tretiranih sa dorzomorfinom, i to već nakon 1 sata inkubacije (slika 20). Inhibicija aktivnosti AMPK bila je u skladu sa smanjenjem fosforilacije njenog supstrata Raptor (slika 20), koji je poznati inhibitor mTOR. Sa smanjenom aktivnošću Raptor bi se dakle očekivalo povećanje aktivnosti mTOR (*Shaw 2009*). Međutim, Western blot analizom je detektovana inhibicija mTOR u tretmanu U251 ćelija sa dorzomorfinom (slika 20). Sniženi aktivacioni status mTOR praćen je i redukcijom fosforilacije njegovog direktnog nizvodnog substrata, p70S6 kinaze (slika 20).

Nesklad između aktivacionog statusa AMPK/Raptor sa jedne strane i mTOR/p70S6K sa druge strane, nagnao nas je da ispitamo kakav je uticaj dorzomorfina na aktivator mTOR, Akt. Western blot analizom pokazano je da je dorzomorfin značajno suprimirao fosforilaciju Akt u U251 ćelijama već nakon 1 sata tretmana. Nakon ove brze inhibicije Akt sledila je delimična reaktivacija, a zatim ponovna inhibicija sa skoro potpunim poništavanjem aktivnosti Akt nakon 18 časova (slika 20). Reaktivacija mTOR nakon 18 sati inkubacije nije asocirana sa povećanjem S6K i Akt fosforilacije (slika 20), što ukazuje da aktivnost mTOR i S6K mogu biti regulisani nezavisno od Akt i mTOR, respektivno. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da dorzomorfin pored svog glavnog inhibitorynog efekta na AMPK, indukuje i inhibiciju Akt proteina, što je najverovatnije uzrok pokazane inhibicije mTOR.

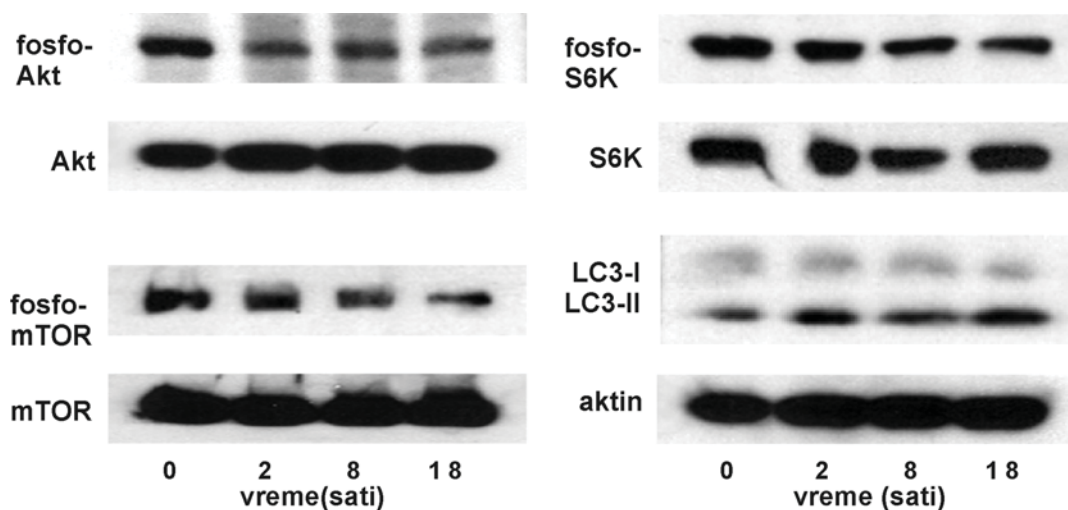


Slika 20. Dorzomorfin inhibira AMPK/Raptor i Akt/mTOR signalni put. U251 ćelije su tretirane dorzomorfinom (10 μ M), i u naznačenim vremenskim intervalima je analiziran aktivacioni status AMPK/Akt/mTOR signalnog puta imunoblot metodom (prikazani rezultati su iz jednog od dva eksperimenta sa sličnim rezultatima).

4.12 Mehanizam autofagije indukovane dorzomorfinom posredovan je inhibicijom Akt/mTOR signalnog puta

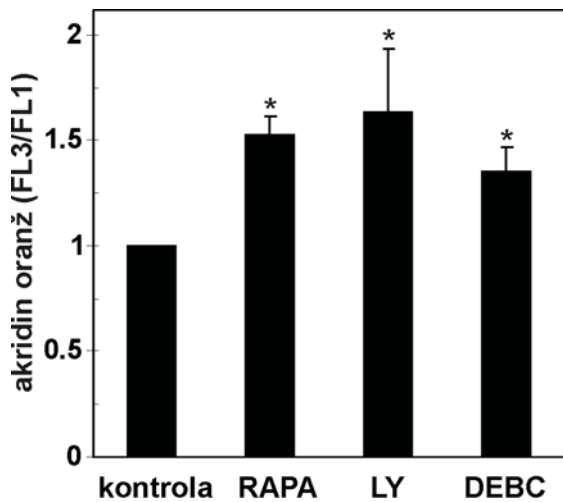
Pošto je pokazano da dorzomorfin indukuje autofagiju i smanjuje aktivnost Akt i mTOR, dalje je ispitivano da li je inhibicija Akt/mTOR signalnog puta odgovorna za indukciju autofagije u našim eksperimentalnim uslovima. U tu svrhu U251 ćelije su tretirane sa DEBC selektivnim inhibitorom Akt, nakon čega je Western blotom određivana aktivnost različitih proteina uključenih u indukciju autofagije. Pokazano je da DEBC zaista inhibira aktivnost Akt što posledično izaziva supresiju mTOR i njegovog substrata p70S6K kao i porast konverzije LC3-I u LC3-II protein, odnosno da indukuje autofagiju (slika 21).

Zanimljivo je da su svi napomenuti efekti ovog inhibitora, uključujući i smanjenje aktivnosti Akt bili mnogo slabije izraženi u odnosu na delovanje dorzomorfina, ukazujući da je ovaj AMPK inhibitor zapravo veoma snažan inhibitor Akt.



Slika 21. Autofagija indukovana dorzomorfinom zavisi od inhibicije AKT/mTOR signalnog puta. U251 ćelije su tretirane DEBC (20 μ M) i u naznačenim vremenskim intervalima je analiziran aktivacioni status Akt/mTOR signalnog puta imunoblot metodom (prikazani rezultati su iz jednog od dva eksperimenta sa sličnim rezultatima).

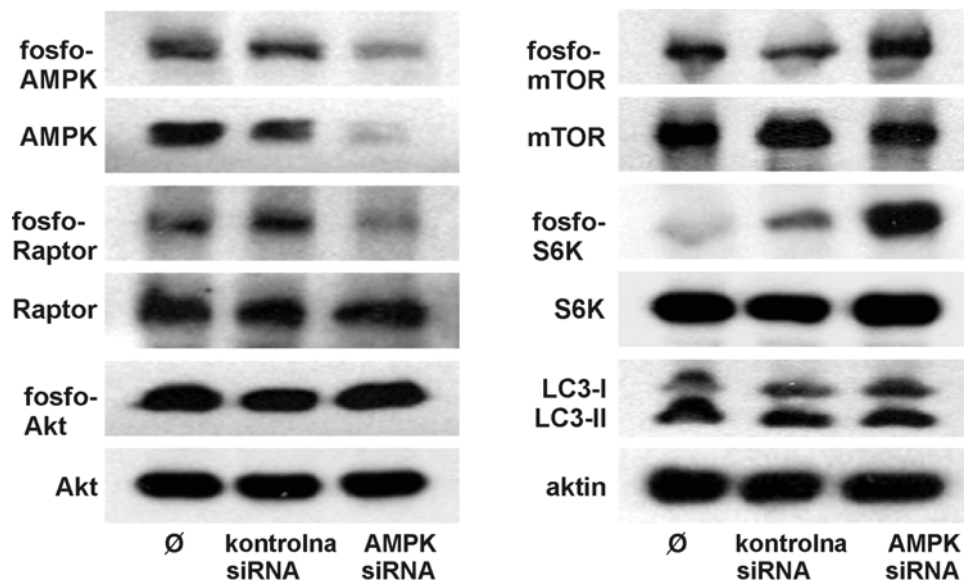
Takođe, tretmani ćelija mTOR inhibitorom rapamicinom, PI3K/Akt inhibitorom LY294002 i već pomenutim specifičnim Akt inhibitorom DEBC indukovali su autofagiju izmerenu na protočnom citofluorimetru kao porast odnosa FL3/FL1 (slika 22). Dakle imajući u vidu da inhibicija Akt i mTOR indukuje autofagiju glioma ćelija, moglo bi se pretpostaviti i da dorzomorfina indukuje autofagiju u ovim ćelijama upravo inhibicijom Akt/mTOR signalnog puta.



Slika 22. Inhibicija PI3K/Akt, Akt i/ili mTOR indukuje autofagiju. U251 ćelije su 24sata inkubirane sa mTOR inhibitorom rapamicinom (RAPA; 10nM), PI3K/Akt inhibitorom LY294002 (LY; 50 μ M) ili 10-DEBC (DEBC; 20 μ M) i autofagija je analizirana na protočnom citofluorimetru kao porast crvene u odnosu na zelenu fluorescencu (FL3/FL1) (rezultati su srednja vrednost + SD iz tri eksperimenta, * $p < 0,05$)

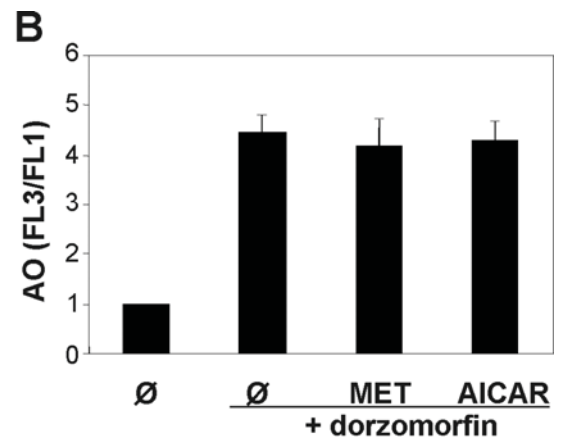
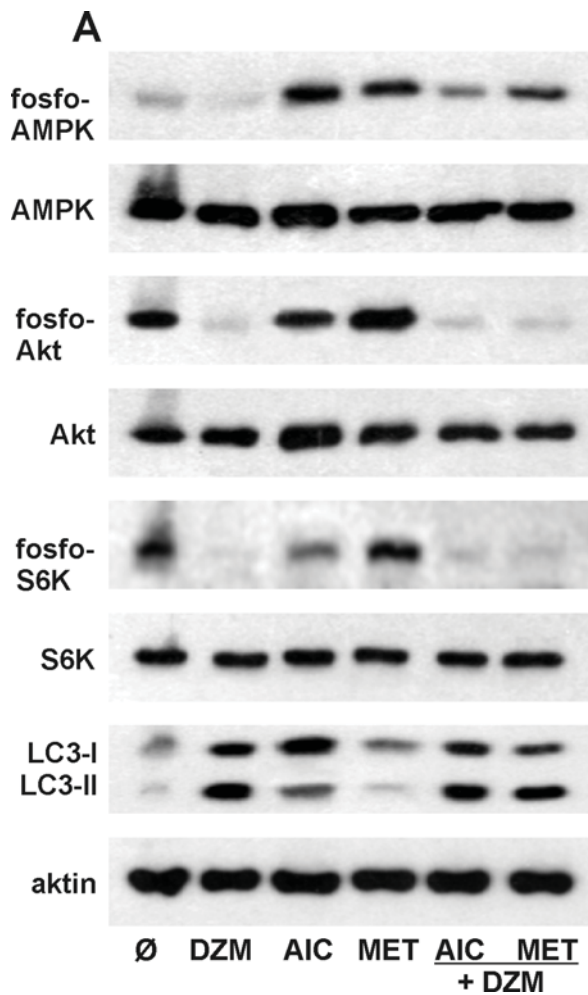
4.13 Autofagija indukovana dorzomorfinom ne zavisi od inhibicije AMPK

Da bi ispitali da li su supresija AKT/mTOR puta i/ili autofagija indukovani dorzomorfinom zavisi od AMPK inhibicije, u U251 ćelijama je blokirana ekspresija obe katalitičke forme AMPK enzima ($\alpha 1/\alpha 2$) transfekcijom sa malom interferirajućom RNK, siRNA. Imunoblotom analizom pokazan je redukovani nivo fosforilisanе i totalne forme AMPK u transfektovanim ćelijama, što je potvrdilo efikasnost procesa transfekcije (slika 23). U skladu sa inhibicijom ekspresije AMPK, 48 sati nakon transfekcije ćelija bila je suprimirana i fosforilacija AMPK supstrata Raptora (slika 23). Sa druge strane, inhibicija ekspresije AMPK proteina transfekcijom nije poput dorzomorfina smanjivala aktivnost Akt (slika 23). Suprotno od efekta dorzomorfina, a u skladu sa inhibicijom AMPK i redukovanom fosforilacijom Raptora, transfekcija U251 ćelija sa siRNA za AMPK indukovala je povećanje fosforilacije mTOR i njegovog supstrata p70S6 kinaze i shodno tome nije indukovala konverziju LC3 I u LC3 II, odnosno autofagiju (slika 23).



Slika 23. siRNA zavisna inhibicija AMPK ne blokira Akt/mTOR signalni put i ne indukuje autofagiju. Aktivacioni status AMPK/Akt/mTOR signalnih puteva i konverzija LC3 proteina analizirana je 48h nakon transfekcije imunoblot metodom u netransfektovanim, transfektovanim kontrolnom siRNA i transfektovanim AMPK siRNA U251 ćelijama (prikazani rezultati su iz jednog od dva eksperimenta sa sličnim rezultatima).

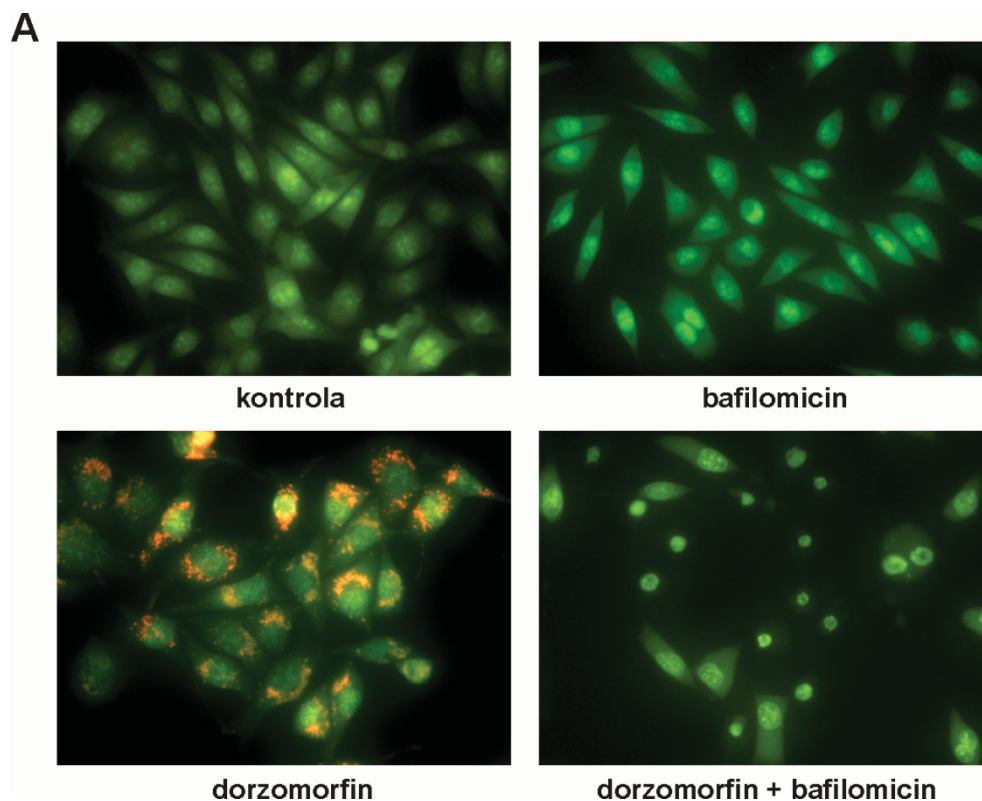
Prethodnim rezultatima je pokazano da inhibitori AMPK metformin i AICAR redukuju oksidativni stres i apoptozu indukovane visokom koncentracijom dorzomorfina (20 μ M). Sa druge strane, niti metformin niti AICAR u koncentracijama koje efikasno smanjuju apoptozu (2mM metformina i 20 μ M AICAR) iako su uspeli da oporave aktivnost AMPK, nisu uticali na inhibiciju Akt/mTOR signalnog puta indukovanu dorzomorfinom (slika 24). Takođe nisu bili u stanju da inhibiraju autofagiju izmerenu kao povećanje konverzije LC3-I u LC3-II i kao odnos FL3/FL1 u ćelijama tretiranim dorzomorfinom (slika 24). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da inhibicija AKT/mTOR signalnog puta i autofagija indukovani dorzomorfinom, za razliku od apoptoze, nisu zavisni od inhibicije AMPK.

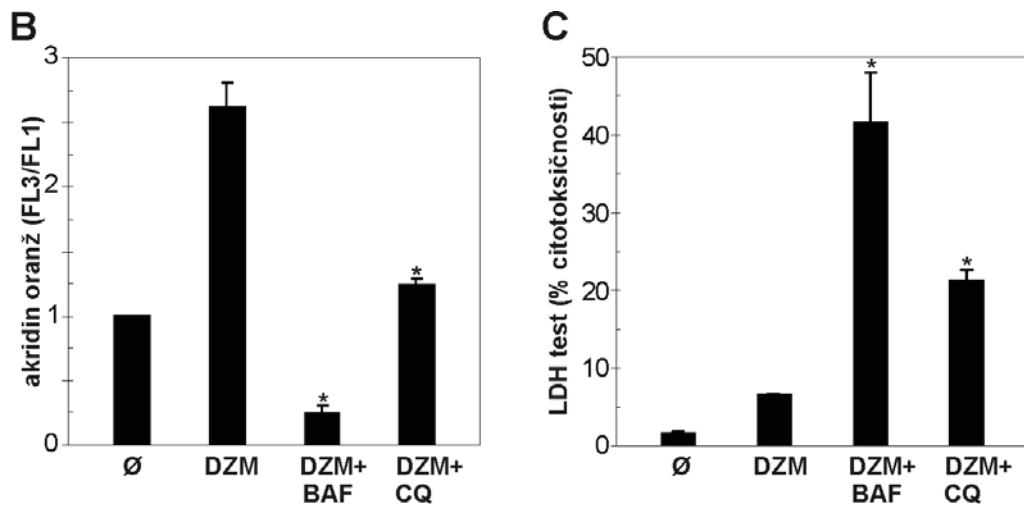


Slika 24. Autofagija indukovana dorzomorfinom ne zavisi od inhibicije AMPK. U251 ćelije su 2h pretretirane AMPK aktivatorima metforminom (MET; 2mM) i AICAR (0.25mM) i nakon toga inkubirane sa dorzomorfinom (10 μ M). Aktivacija AMPK/Akt/mTOR puta kao i konverzija LC3 proteina analizirana je imunoblotom nakon 8h (A), dok je porast kiselih autofagnih vezikula meren protočnom citofluorimetrijom u akridin oranž bojenim ćelijama nakon 24h (B). (prikazani rezultati su iz jednog od dva eksperimenta sa sličnim rezultatima (A), ili su srednja vrednost +SD iz tri eksperimenta (B)).

4.14 Autofagija štiti U251 ćelije glioma od apoptoze indukovane dorzomorfinom

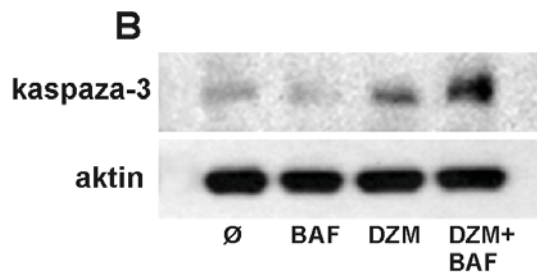
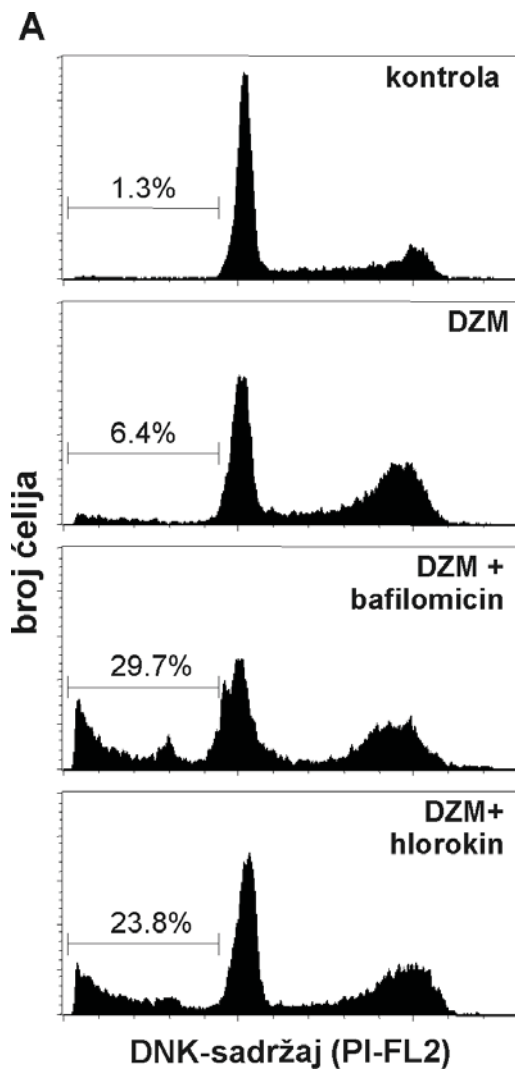
U nekim okolnostima autofagija predstavlja adaptaciju na stres kojim se izbegava ćelijska smrt, tj. suprimira apoptozu, dok u drugim okolnostima ona predstavlja alternativni put ćelijske smrti (Berry i Baehrecke 2007; Yang, Chee i sar., 2011). U cilju analize uloge autofagije indukovane dorzomorfinom ćelije su tretirane inhibitorom autofagije bafilomicinom A1, a zatim su ispitivani različiti parametri apoptoze. Analiza ćelija obojenih akridin oranžom na fluorescentnom mikroskopu pokazala je da kod ćelija inkubiranih sa dorzomorfinom, bafilomicin A1 pored toga što značajno smanjuje pojavu crvenih autofagnih vezikula, istovremeno povećava i broj apoptotičnih ćelija sa piknotičnim jedrom (slika 25A). Sa tim u skladu, pokazano je da bafilomicin A1, ali i drugi inhibitor autofagije lizozomalni inhibitor hlorokin, koji uspešno inhibiraju autofagiju detektovanu kao odnos FL3/FL1 (slika 25B), istovremeno povećavaju oslobađanje laktat dehidrogenaze, odnosno povećavaju citotoksičnost dorzomorfin (slika 25C).





Slika 25. Inhibicija autofagije povećava citotoksičnost dorzomorfina prema U251 ćelijama. (A) U251 ćelije su tretirane dorzomorfinom (10 μ M) i/ili bafilomicinom A1 (50nM). Na fluorescentnom mikroskopu nakon 24h analizirana je morfologija jedra i prisustvo kiselih vezikula kod ćelija bojenih akridin oranžom (A). (B, C) U251 ćelije su inkubirane 24h sa dorzomorfinom (DZM; 10 μ M), u prisustvu ili odsustvu autofagnih inhibitora bafilomicina A1 (BAF; 50nM) ili hlorokina (CQ; 50 μ M). Prisustvo kiselih vezikula analizirano je protočnom citofluorimetrijom ćelija bojenih akridin oranžom (B, levo; rezultati su SV \pm SD tri različita eksperimenta, *p < 0,05), dok ćelijska smrt je determinisana testom oslobađanja laktat dehidrogenaze (LDH test; B, desno; rezultati su SV \pm SD triplikata iz reprezentativnog eksperimenta, *p < 0,05).

Za razliku od tretmana dorzomorfinom kojim je indukovana apoptoza (20 μ M doza u trajanju od 48 sati inkubacije), doza kojim je stimulirana autofagija (10 μ M u trajanju od 24 sati inkubacije) neznatno je povećala broj hipodiploidnih ćelija sa fragmentisanom DNK. Sa druge strane, farmakološkom inhibicijom autofagije, broj ćelija sa fragmentisanom DNK se značajno povećao u tretmanu dorzomorfinom (slika 26A), ponovo potvrđujući protektivni efekat autofagije. Konačno, imunoblot analizom je potvrđena antiapoptotska uloga autofagije s obzirom da je bafilomicin A1 značajno povećao aktivaciju kaspaze-3 (koncentraciju njenog aktivnog fragmenta) u U251 ćelijama tretiranim dorzomorfinom (slika 26B). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da autofagija indukovana dorzomorfinom štiti U251 ćelije od apoptoze.

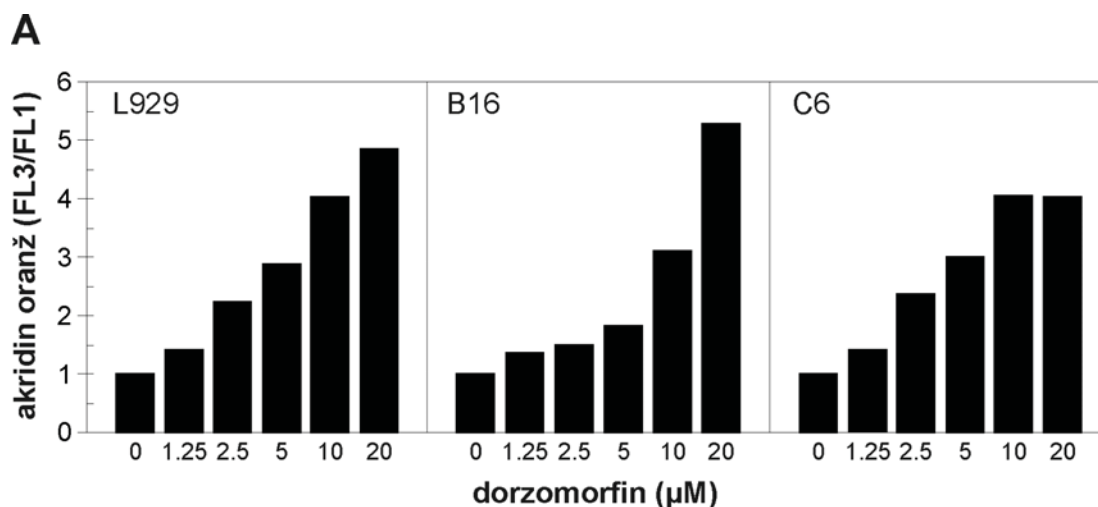


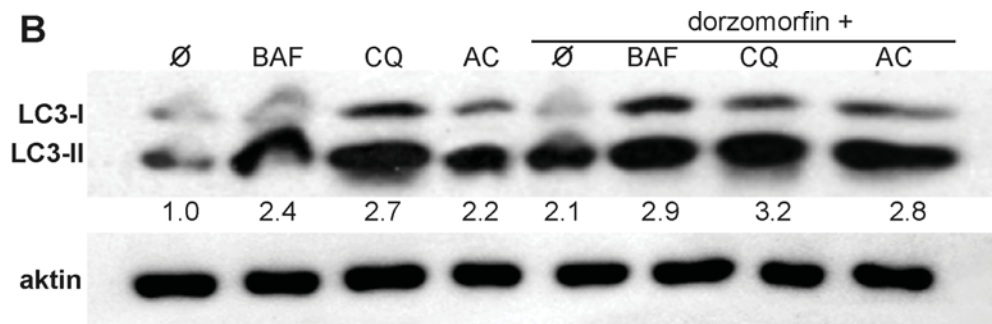
Slika 26. Autofagija indukovana dorzomorfinom ima antiapoptotsku ulogu.

U251 ćelije su inkubirane sa dorzomorfinom (DZM; 10 μ M), u prisustvu ili odsustvu autofagnih inhibitora bafilomicina A1 (BAF; 50nM) ili hlorokina (CQ; 50 μ M) 24h. Reprezentativni histogrami protočne citofluorimetrije koji pokazuju procenat PI-bojenih ćelija sa fragmentisanom DNK (sub-G) prikazani su na slici (A). (B) U251 ćelije su tretirane dorzomorfinom (10 μ M) i/ili bafilomicinom A1 (50nM) i imunoblot analizom je determinisan intracelularni nivo aktivnog fragmenta kaspaze-3. (prikazani rezultati su iz jednog ili dva eksperimenta sa sličnim rezultatima).

4.15 Dorzomorfin indukuje protektivnu autofagiju u različitim ćelijskim linijama kancera

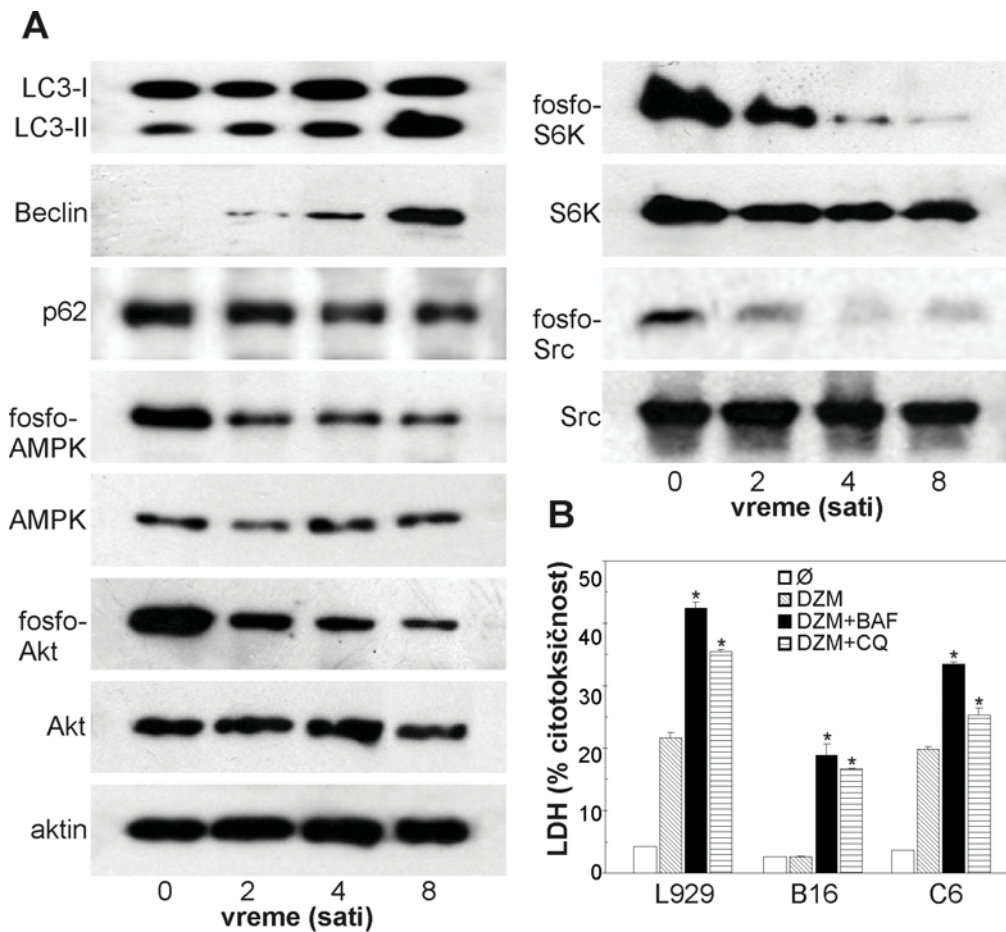
Da bi se ispitalo da li je sposobnost dorzomorfin da indukuje autofagiju ograničena samo na U251 ćelije ili se autofagija javlja i kod drugih ćelijskih linija, ćelije mišjeg fibrosarkoma L929, mišjeg melanoma B16 i pacovskog glioma C6 su tretirane dorzomorfinom i nakon 16 sati inkubacije analizirana je autofagija na protočnom citofluorimetru. Odnos FL3/FL1 fluorescence bio je dozno zavisno povećan u sve tri ćelijske linije bojene akridin oranžom (slika 27A), pokazujući da autofagni odgovor tretmana dorzomorfinom nije isključiv za U251 ćelijsku liniju. Pored porasta FL3/FL1 fluorescence u akridin oranž bojenim ćelijama, sposobnost dorzomorfin da indukuje autofagiju u L929 tumorskim ćelijama dokazana je i povećanjem konverzije LC3-I u LC3-II u prisustvu proteoliznih inhibitora (slika 27B), smanjenjem nivoa p62 proteina i povećanjem u ekspresiji beclin-1 proteina (slika 28A).





Slika 27. Dorzomorfin indukuje autofagiju u različitim tumorskim ćelijskim linijama. (A) L929 mišje fibrosarkomske, B16 mišje melanomske i C6 pacovske gliomske ćelije inkubirane su 24h sa različitim dozama dorzomorfin. Prisustvo autofagolizozoma u akridin oranž obojenim ćelijama je potvrđeno protočnom citofluorimetrijom kao porast inteziteta crvene u odnosu na zelenu fluorescencu (FL3/FL1). (B) Konverzija LC3 proteina u L929 ćelijama tretiranim 6h sa dorzomorfinom (10 μ M) i/ili proteoliznim inhibitorima bafilomicinom-A1 (BAF; 50nM), hlorokinom (CQ; 50 μ M) i amonijum hloridom (AC; 25mM) analizirana je imunoblot analizom. (prikazani rezultati su iz jednog od dva eksperimenta sa sličnim rezultatima).

Mehanizam indukcije autofagije prethodno pokazan za U251 ćelije bio je isti i za L929 ćelije, s obzirom da je tretman dorzomorfinom izazvao pored AMPK inhibicije i vremenski zavisnu inhibiciju Akt i p70S6K kinaze (slika 28A). I konačno inhibicijom autofagije bafilomicinom A1 ili hlorokinom, povećano je oslobađanje laktat dehidrogenaze (slika 28B), potvrđujući protektivni karakter autofagije indukovane dorzomorfinom u sve tri ćelijske linije. Stoga se može zaključiti da sposobnost dorzomorfin da indukuje protektivnu autofagiju nije specifična kako za tip ćelijske linije tako ni za vrstu od koje ćelijska linija potiče.



Slika 28. Autofagija zavisna od Akt/mTOR inhibicije štiti tumorske ćelije od apoptoze indukovane dorzomorfinom. (A) L929 ćelije su tretirane dorzomorfinom (10 μ M) i u naznačenim vremenskim terminima rađena je imunoblot analiza LC3 konverzije, nivoa beklina-1, nivoa p62 proteina i aktivacija AMPK/AKT/mTOR puta. (prikazani rezultati su iz jednog od dva eksperimenta sa sličnim rezultatima). (B) L929, B16 i C6 ćelije su inkubirane 24h sa dorzomorfinom (DZM; 10 μ M) u prisustvu ili odsustvu autofagnih inhibitora bafilomicina A1 (BAF; 50nM) ili hlorokina (CQ; 50 μ M) i ćelijska smrt je determinisana testom oslobađanja laktat dehidrogenaze. (LDH test; rezultati su SV \pm SD triplikata iz reprezentativnog eksperimenta, *p < 0,05).

5. DISKUSIJA

U ovoj studiji je po prvi put pokazano da farmakološki inhibitor AMPK dorzomorfin, inhibira proliferaciju, indukuje apoptozu i autofagiju u U251 i C6 ćelijama glioma. Dok je za blokadu proliferacije odgovorna prevashodno inhibicija AMPK, u indukciju oksidativnog stresa, inhibiciju antiapoptotskog Bcl-2, aktivaciju kaspaza i sledstvenu apoptozu uključeni su i AMPK zavisni i AMPK nezavisni mehanizmi. Sa druge strane, pokazano je da dorzomorfin indukuje protektivnu autofagiju u ćelijama glioma represijom Akt/mTOR signalnog puta, potpuno nezavisno od inhibicije AMPK.

Brojna istraživanja pokazala su da aktivacija AMPK inhibira proliferaciju i dovodi do umiranja različitih primarnih i malignih ćelija u *in vitro* uslovima (Kefas, Cai i sar., 2004; Saitoh, Nagai i sar., 2004; Rattan, Giri i sar., 2005; Isakovic, Harhaji i sar., 2007; Zhou, Han i sar., 2007; Janjetovic, Harhaji-Trajkovic i sar., 2011). Osim toga, poznato je i da farmakološki aktivatori AMPK kao što su metformin, AICAR i A769662 inhibiraju ili usporavaju pojavu tumora u životinjskim modelima (Huang, Wullschleger i sar., 2008; Guo, Hildebrandt i sar., 2009; Janjetovic, Harhaji-Trajkovic i sar., 2011; Petti, Vegetti i sar., 2012; Theodoropoulou, Brodowska i sar., 2013). Sa druge strane, zna se da je osnovna uloga AMPK da inhibicijom anaboličkih i aktivacijom kataboličkih procesa u ćeliji obezbedi dovoljno energije za preživljavanje ćelija u uslovima niskog energetskog statusa, kao što su gladovanje i hipoksija (Laderoute, Amin i sar., 2006; Shaw, Gurr i sar., 2007). Takođe, pokazano je da aktivacija ovog enzima može inhibirati apoptozu indukovanu različitim konvencionalnim i eksperimentalnim hemoterapeuticima kao što su cisplatin (Kim, Hwang i sar., 2008; Harhaji-Trajkovic, Vilimanovich i sar., 2009), antocijanin (Choe, Ha i sar., 2012), titanocijanin Y (Olszewski, Deally i sar., 2012), simvastatin

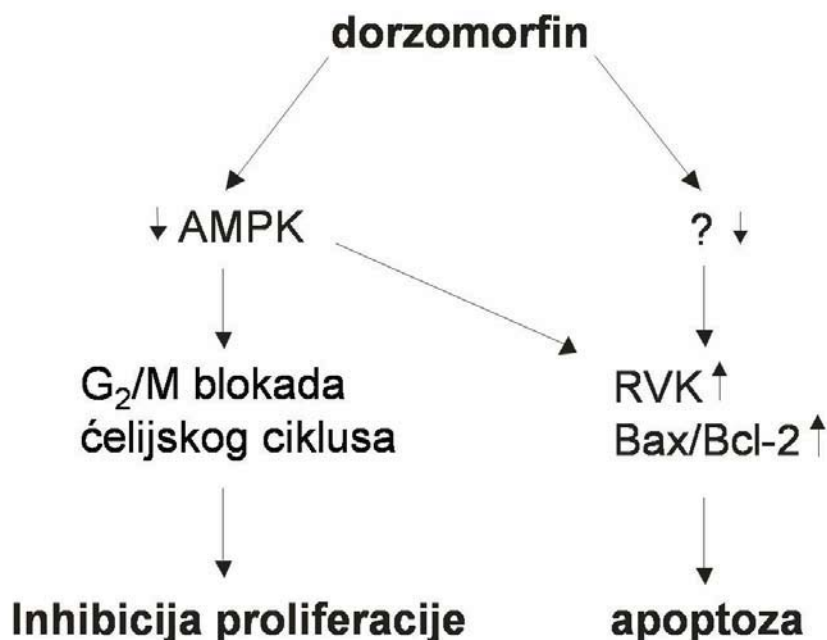
(Misirkic, Janjetovic i sar., 2012), fenetil ester (Yu, Kao i sar., 2011). Osim toga, transfekcija sa dominantno-negativnim AMPK ćelija bubrega i PC12 ćelija feohromocitoma, u odsustvu bilo kakvog stresa, dovoljna je da se smanji proliferacija ćelija (Shaw, Gurr i sar., 2007). Ovi na izgled kontradiktorni podaci, koji govore da i aktivacija i inhibicija AMPK dovode do zaustavljanja deobe i umiranja tumorskih ćelija, mogli bi se pomiriti ako se pretpostavi da je zapravo optimalna aktivnost ovog enzima neophodna za rast tumora. U skladu sa tim i rezultati ove studije pokazuju da je aktivnost AMPK potrebna za proliferaciju U251 i C6 ćelija glioma, pošto njena inhibicija dorzomorfonom i AMPK siRNA zaustavljaju ćelijski ciklus u G₂/M fazi. Interesanto je međutim da su za razliku od ćelija glioma pacovski primarni astrociti i B16 melanoma ćelije otporne na antiproliferativno delovanje dorzomorfina. Mehanizam koji je u osnovi ove rezistencije nije poznat, ali moguće je da primarni astrociti i ćelije melanoma imaju veću bazalnu aktivnost AMPK u odnosu na ćelije glioma, ili da uticaj AMPK na proliferaciju zavisi od tipa ćelija. U tom smislu važno je istaći da potrebe za glikolizom kao glavnim izvorom energije nisu iste kod svih tumora. Imajući u vidu da ćelije glioma neophodnu energiju obezbeđuju prevashodno glikolizom (Ziegler, von Kienlin i sar., 2001; Jelluma, Yang i sar., 2006), kao i činjenicu da je AMPK važan aktivator glikolize (Marsin, Bouzin i sar., 2002), logično je pretpostaviti da su ove ćelije veoma osetljive na tretman inhibitorom AMPK enzima.

Osim blokadom proliferacije tumorskih ćelija, rezultati ove studije pokazali su da je antiglioma delovanje dorzomorfina posredovano i indukcijom apoptoze. Budući da je tretman tumorskih ćelija dorzomorfonom asociran sa snažnim oksidativnim stresom i da antioksidansi NAC i BHA smanjuju citotoksično delovanje dorzomorfina, može se pretpostaviti da je glavni mehanizam kojim dorzomorfin indukuje smrt ćelija glioma u ovoj studiji upravo povećana produkcija reaktivnih vrsta kiseonika. U prilog ovakvoj hipotezi govore i istraživanja Janga i saradnika u kojima je pokazano da dorzomorfin stimulacijom oksidativnog stresa inhibira c-FLIP i Mcl-1 i time specifično povećava citotoksičnost TRAIL u humanim renalnim tumorskim ćelijama (Jang, Lee i sar., 2010). Pored direktne toksičnosti reaktivnih vrsta kiseonika koja uzrokuje oštećenja mitohondrija, oksidaciju lipida, proteina i DNK (Moreira, Smith i sar., 2005), zna se da oksidativni stres može modulirati odnos proapoptotskih i antiapoptotskih proteina Bcl-2 familije na

transkripcionom i post-transkripcionom nivou (*Li, Ueta i sar., 2004; Gao, Xu i sar., 2007*). Sa tim u skladu, u ovoj disertaciji je pokazano da je oksidativni stres indukovani dorzomorfinom praćen drastičnim smanjenjem koncentracije iRNK za Bcl-2 kao i Bcl-2 proteina, dok na ekspresiju proapoptotskog Bax nema uticaja, što rezultira povećanjem nivoa Bax u odnosu na Bcl-2. Međusobni odnos ova dva proteina Bax/Bcl-2 determiniše apoptozu i naziva se proapoptotski potencijal (*Korsmeyer, Shutter i sar., 1993*). Sličan efekat dorzomorfina ima i u ćelijama multiplog mijeloma u kojima smanjuje nivo antiapoptotskih članova Bcl-x1 i Mcl-1 (*Baumann, Mandl-Weber i sar., 2007*). Kao posledica sniženog nivoa Bcl-2, koji se nalazi na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani, onemogućeno je formiranje heterodimera Bax-Bcl-2 i neutralizacija aktivnosti proapoptotskog Bax proteina. Slobodni Bax se oligomerizuje i izaziva permeabilizaciju spoljašnje mitohondrijalne membrane i oslobađanje u citoplazmu proapoptotskih proteina kao što su: citohrom c, indukujući faktor apoptoze (AIF) i Smac/DIABLO (*Ola, Nawaz i sar., 2011*). Citohrom c u citoplazmi zajedno sa Apaf-1 i kaspazom-9 formira apoptozom kompleks koji aktivira efektorsku kaspazu-3 (*Elmore 2007*). U skladu sa ovakvim scenarijem detektovana je stimulacija kaspaze-3 dorzomorfinom, što potvrđuje mitohondrijalni put aktivacije apoptoze. Sa druge strane, uočena je i aktivacija kaspaze-8, koja predstavlja inicijatorsku kaspazu spoljašnjeg receptorskog puta. Iako kaspaza-8 učestvuje u spoljašnjem putu ili “putu receptora smrti”, smatra se da je interlančana kaskadna proteoliza kaspaze-8 kaspazama mitohondrijalnog puta, kao što su na primer kaspaza-3 ili 6, dovoljna da aktivira ovaj enzim čak i u odsustvu dimerizacije indukovane vezivanjem liganda za receptor smrti (*Sohn, Schulze-Osthoff i sar., 2005*).

Sposobnost AMPK aktivatora, metformina i AICAR, da redukuju antiproliferativno i proapoptotsko delovanje dorzomorfina ukazuje na bitnu ulogu inhibicije AMPK u antitumorskom delovanju dorzomorfina. Međutim, inhibicija AMPK ekspresije transfekcijom sa siRNA za AMPK koja zaustavlja proliferaciju ćelija u G₂/M fazi, ne indukuje oksidativni stres i apoptozu. Slični rezultati su dobijeni i transfekcijom BHK ćelija (*engl. baby hamster kidney cells*) i PC12 ćelija neuroblastoma sa dominantno-negativnim AMPK plazmidom (*Shaw, Gurr i sar., 2007*), što u saglasnosti sa rezultatima ove studije, ukazuje da inaktivacija AMPK nije dovoljna za indukciju apoptoze već samo za inhibiciju

ćelijske deobe. Sa druge strane, aktivatori AMPK metformin i AICAR smanjuju oksidativni stres, odnos Bax/Bcl-2 proteina i finalno procenat apoptotičnih ćelija. Iako je pokazano da u ćelijama melanoma metformin menja mitohondrijalni membranski potencijal nezavisno od AMPK (Janjetovic, Harhaji-Trajkovic i sar., 2011), malo je verovatno da oba AMPK aktivatora, i metformin i AICAR spasavaju ćelije glioma od toksičnosti dorzomorfina nezavisno od aktivacije ovog enzima. To navodi na zaključak da dorzomorfin najverovatnije izaziva apoptozu ćelija kroz kooperaciju dva mehanizma AMPK-zavisnog i AMPK-nezavisnog, odnosno da je inhibicija AMPK potreban, ali ne i dovoljan uslov za indukciju apoptoze dorzomorfinom, sto se shematski može prikazati slikom 29. Imajući u vidu ovde pokazano AMPK-nezavisno delovanje dorzomorfina, zaključuje se da treba biti oprezan pri interpretaciji rezultata eksperimenata u kojima se dorzomorfin koristi kao inhibitor AMPK, naročito ako se ispituju citotoksični ili citoprotektivni efekti. Bilo kako bilo, pokazana AMPK-zavisna komponenta proapoptotskog delovanja dorzomorfina, koja je u saglasnosti sa ulogom AMPK u održavanju vijabiliteta i rasta ćelija glioma, sugerise da bi se farmakološka inhibicija ovog enzima mogla koristiti u terapiji tumora.



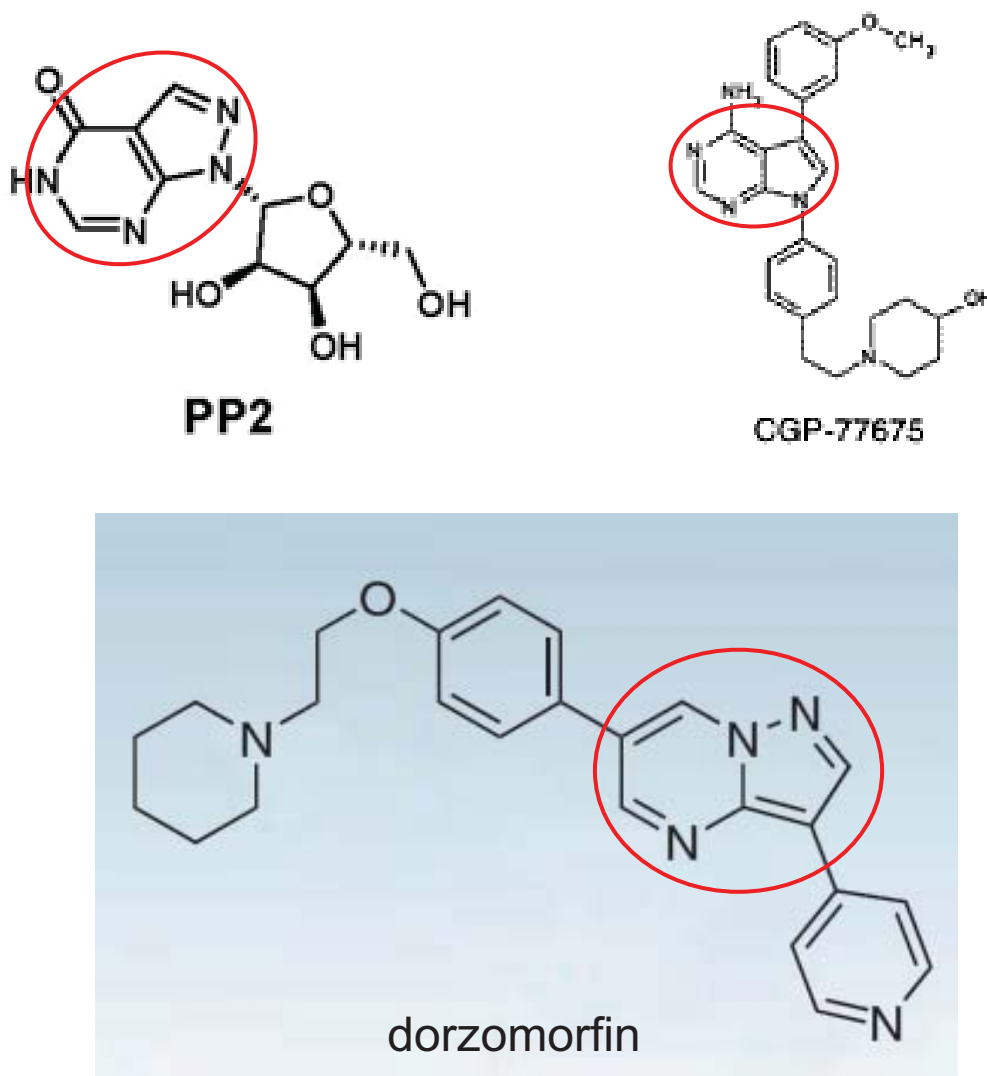
Slika 29. Pretpostavljeni mehanizam dejstva dorzomorfina na vijabilitet i proliferaciju ćelija

Osim što ima sposobnost da zaustavlja proliferaciju i izaziva apoptozu, u drugom delu ove doktorske disertacije pokazano je da dorzomorfina indukuje autofagiju u ćelijama glioma. Poznato je da se oštećenja u ćeliji izazvana oksidativnim stresom uklanjaju razgradnjom u autofagolizozomima i da proces autofagije može biti adaptacija na stres (Hah, Noh i sar., 2012; Lee, Giordano i sar., 2012). U skladu sa tim pokazano je da dorzomorfina indukuje i oksidativni stres i autofagiju u ćelijama glioma. Opšte je prihvaćeno da aktivacija AMPK dovodi do inhibicije mTOR i indukcije autofagije (Matsui, Takagi i sar., 2007; Pattingre, Espert i sar., 2008; Harhaji-Trajkovic, Vilimanovich i sar., 2009; Arsić, Kravac-Stevović i sar., 2012). Takođe, tretman ćelija AMPK inhibitorom dorzomorfina redukuje AMPK zavisnu autofagiju koja nastaje kao posledica tretmana hepatocita pacova, HT-29 humanih ćelija kancera debelog creva i HeLa ćelija kancera cerviksa gladovanjem, tretmana humanih ćelija osteosarkoma avicinom, i tretmana svinjskih endotelijalnih ćelija (PAE) troglitazonom (Meley, Bauvy i sar., 2006; Xu, Liang i sar., 2007; Yan, Yang i sar., 2010). Preliminarni rezultati takođe pokazuju da u UV zračenju izloženim U251 ćelijama niže koncentracije dorzomorfina ($\leq 1 \mu\text{M}$) mogu suprimirati autofagiju zavisnu od AMPK. Nasuprot tome, u ovoj studiji je nedvosmisleno pokazano da tretman U251 ćelija humanog glioma dorzomorfina indukuje autofagiju. Ovaj kontradiktorni uticaj dorzomorfina na indukciju autofagije, mogao bi biti objašnjen različitim primenjenim dozama AMPK inhibitora, različitim vrstama ćelija, kao i različitim eksperimentalnim uslovima u ovoj i studijama drugih autora. Međutim, inhibicija ekspresije AMPK transfekcijom sa AMPK siRNA ne indukuje autofagiju, niti AMPK aktivatori, metformin i AICAR poništavaju autofagiju indukovanu dorzomorfina u U251 ćelijama, što sugeriše da inhibicija AMPK nije neophodna za indukciju autofagije dorzomorfina, kao što je neophodan uslov za indukciju apoptoze. S obzirom da je prethodno pokazano da nepoznati AMPK-nezavisni mehanizam izaziva oksidativni stres i sinergizuje sa inhibicijom AMPK u indukciji apoptoze, moglo bi se pretpostaviti da bi to mogao biti isti mehanizam kojim ova supstanca indukuje autofagiju u ćelijama glioma. Ovakvo AMPK nezavisno ponašanje dorzomorfina nije novo imajući u vidu da dorzomorfina vrši i brojne druge AMPK-nezavisne biološke efekte, kao što su inhibicija signalnog puta koštanog morfogenetskog proteina (BMP) (Yu, Hong i sar., 2008), blokada aktivacije hipoksijom

indukovanog faktora-1 (HIF-1) (Emerling, Viollet i sar., 2007), indukcija regulatora ćelijskog ciklusa p21 (Nam, Lee i sar., 2008), inhibicija tirozin kinaze receptora faktor rasta trombocitnog porekla (PDGFR) (Kwon, Kim i sar., 2013), stimulacija ekspresije hem-oksigenaze-1 (HO-1) (Liu, Peyton i sar., 2011), supresija transkripcije gena uključenih u regulaciji konformacije (*engl. unfolded protein response genes*, UPR-genes) (Saito, Furuno i sar., 2012), i inhibicija TNF- α stimulisane ekspresije ICAM-1 i VCAM-1 gena (Kim, Kim i sar., 2011). Dakle, u skladu sa ovim rezultatima, i rezultati ove studije sugerišu da dorzomorfin ispoljava plejotropni efekat.

Da bi se otkrilo koji to AMPK nezavisni mehanizmi dovode do indukcije autofagije u tretmanu dorzomorfinom, pošlo se od činjenice da je ključni molekul u regulaciji autofagije serin/treonin kinaza mTOR, čija inhibicija efikasno indukuje autofagiju u sisarskim ćelijama (Kim, Mutter i sar., 2006; Iwamaru, Kondo i sar., 2007). U skladu sa ovom pretpostavkom mTOR inhibitor rapamicin poput dorzomorfina doveo je do indukcije autofagije. Takođe, pokazano je i da dorzomorfin dovodi do snažne inhibicije mTOR/p70S6K signalnog puta. S obzirom da se zna da je pored AMPK/Raptor, osnovni signalni put uključen u regulaciju mTOR PI3K/Akt dalje se ispitivalo kako dorzomorfin utiče na njegovu aktivnost. U saglasnosti sa brojnim studijama koje pokazuju da autofagija može biti indukovana inhibicijom Akt kinaze, (Degtyarev (Fujiwara, Iwado i sar., 2007; Degtyarev, De Maziere i sar., 2009), rezultati ove studije pokazuju da Akt inhibitor 10-DEBC hidrohlorid i PI3K/Akt inhibitor LY294002 indukuju autofagiju u ćelijama glioma. Pri tome, važno je naglasiti da inhibitor LY294002 korišćen u dozi u kojoj prevashodno inhibira klasu I PI3K kinaze signalnog puta PI3K/Akt, a ne utiče u velikoj meri na aktivnost klase III PI3K kinaze, čija je aktivnost na indukciju autofagije suprotna od klase I (Kong, Dan i sar., 2010). U ovoj doktorskoj disertaciji pokazano je da dorzomorfin zaista inhibira aktivnost Akt kinaze, te se pretpostavilo da je u tretmanu ćelija glioma dorzomorfinom autofagija indukovana upravo inhibicijom Akt/mTOR signalnog puta. Ovakva pretpostavka podržana je prethodno pokazanom sposobnošću dorzomorfina da suprimira aktivaciju Akt izazvanu vaskularnim endotelnim faktorom rasta u endotelnim ćelijama (Youn, Wang i sar., 2009), kao i insulin zavisnu aktivaciju Akt u skeletnim mišićnim ćelijama (Li, Ge i sar., 2008). Osim toga, poznato je dorzomorfin pripada

pirazolopirimidinskoj klasi molekula od kojih je za neke kao što su Src inhibitor PP2 i CGP-77675 poznato da snažno redukuju Akt fosforilaciju preko blokade uzvodne Src kinaze (Slika 30) (Kassenbrock, Hunter i sar., 2002; Tatton, Morley i sar., 2003). U skladu sa tim su i rezultati ove studije koji pokazuju da je fosforilacija Src kinaze takođe smanjena u ćelijama tretiranim dorzomorfinom, što navodi na zaključak da inhibicija ove tirozin kinaze bar delom utiče na supresiju Akt kinaze i posledičnu indukciju autofagije.



Slika 30. Strukturne formule različitih molekula pirazolopirimidinske klase

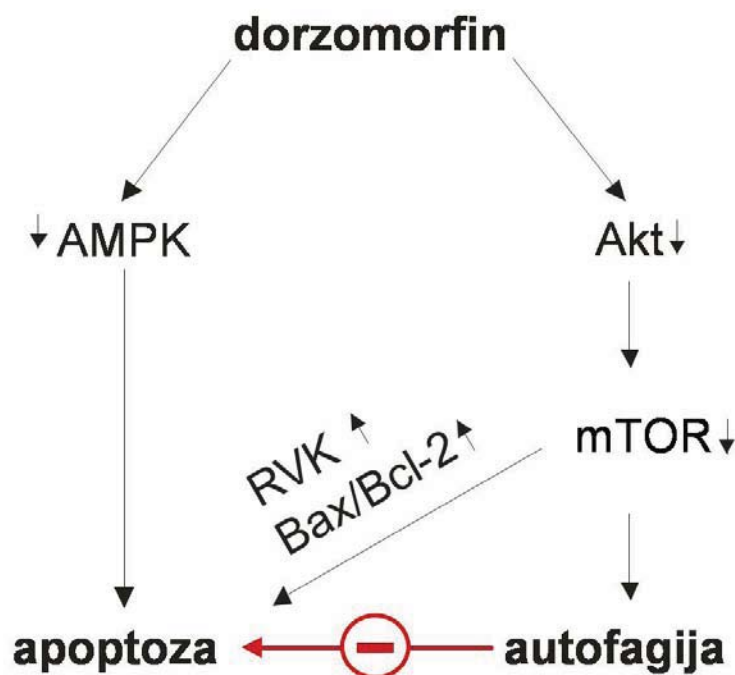
Iako se generalno smatra da su aktivnosti AMPK i Akt kinaza nezavisno regulisane (*Sarbassov, Ali i sar., 2005; Memmott i Dennis 2009*), neki noviji podaci ukazuju na vezu između ova dva signalna puta. Tako je na primer pokazano da AMPK aktivirana adiponektinom stimuliše defosforilaciju Akt kinaze u ćelijama kancera dojke (*Kim, Baek i sar., 2009*). Sa druge strane, adiponektin ili vaskularni endotelni faktor rasta zavisi od AMPK stimulišu aktivaciju Akt kinaze u endotelnim ćelijama (*Levine, Li i sar., 2007*). Dakle ovi rezultati ukazuju da u određenim uslovima AMPK može stimulisati ili inhibirati Akt kinazu. Međutim, u ovoj studiji AMPK ne moduliše aktivnost Akt signalnog puta, pošto blokiranje ekspresije AMPK enzima siRNA transfekcijom očekivano izaziva inaktivaciju Raptor i posleđičnu aktivaciju mTOR/p70S6 kinaze, ali nema uticaja na fosforilaciju Akt kinaze u ćelijama glioma. Osim toga AMPK aktivatori, metformin i AICAR reaktivirali su AMPK, ali nisu uspeli da povećaju Akt/S6K fosforilaciju.

Da bi se objasnilo kako je moguće da inhibitor AMPK dorzomorfin dovodi do supresije mTOR i sledstvene autofagije, pretpostavljeno je da supresija Akt signalnog puta stimulisana dorzomorfinom nadjačava stimulatorni efekat AMPK/Raptor blokade na aktivnost mTOR. Dakle, iako je dorzomorfin farmakološki inhibitor AMPK i očekivano je da njegovi biološki efekti zavise od interakcije sa ovim enzimom, u ovom radu je pokazano da je autofagija indukovana dorzomorfinom potpuno nezavisna od aktivnosti AMPK. Delovanje dorzomorfina nezavisno od AMPK na indukciju autofagije, kao i u slučaju njegove proapoptotske aktivnosti, sugerije da ova supstanca ispoljava brojne AMPK nezavisne efekte, te da rezultate dobijene u eksperimentima u kojima je dorzomorfin korišćen kao inhibitor AMPK treba analizirati sa rezervom.

Mišljenja o funkciji autofagije u tumorima su kontradiktorna. Ranije se prevashodno smatralo da je autofagija način borbe protiv tumora rezistentnih na indukciju apoptoze (*Gozuacik i Kimchi 2004*). Pokazano je da je autofagija izazvana tamoksifenom, rapamicinom, arsenik trioksidom, temozolomidom, brevininom ili fulerenima citotoksična za tumorske ćelije (*Bursch, Ellinger i sar., 1996; Bursch, Hochegger i sar., 2000; Kanzawa, Kondo i sar., 2003; Kanzawa, Germano i sar., 2004; Harhaji, Mijatovic i sar.,*

2007; Iwamaru, Kondo i sar., 2007; Ghavami, Asoodeh i sar., 2008). Sa druge strane, sve je više dokaza koji podržavaju hipotezu da u određenim uslovima autofagiju tumorske ćelije koriste da bi izbegle apoptozu indukovanu antitumorskim terapijama. Tako na primer, inhibicija autofagije, naročito na kasnim stupnjevima, može učiniti tumorske ćelije osetljivim na apoptozu indukovanu metaboličkim stresom, cisplatinom, jonizujućim zračenjem, hipertermijom, alkilirajućim agensima, inhibitorima histon deacetilaze, imatinibom, tamoksifenom, erlotinibom, TNF-om i TRAIL-om (Paglin, Hollister i sar., 2001; Komata, Kanzawa i sar., 2004; Abedin, Wang i sar., 2007; Amaravadi, Yu i sar., 2007; Carew, Nawrocki i sar., 2007; Harhaji, Mijatovic i sar., 2007; Han, Hou i sar., 2008; de Medina, Silvente-Poirot i sar., 2009; Harhaji-Trajkovic, Vilimanovich i sar., 2009; Shingu, Fujiwara i sar., 2009; Filomeni, Desideri i sar., 2010; Zou, Ling i sar., 2013). Čak je i autofagni inhibitor hlorokin, zajedno sa konvencionalnim terapijama u kliničkoj fazi ispitivanja značajno poboljšao stanje pacijenata (Briceno, Reyes i sar., 2003; Amaravadi, Lippincott-Schwartz i sar., 2011). U skladu sa tim, u ovoj studiji antiapoptotska uloga autofagije je jasno pokazana farmakološkom inhibicijom autofagije bafilomicinom A1 i hlorokinom, koja je stimulisala ubijanje U251 ćelijama dorzomorfinom. Osim toga, inhibicija autofagije dovela je do povećane aktivacije kaspaza za kojom je usledila fragmentacija DNK, tj. smrt ćelija apoptozom. Tačan mehanizam koji je u osnovi antiapoptotske akcije autofagije indukovane dorzomorfinom, tek treba utvrditi, ali je opravdano pretpostaviti da autofagija indukovana dorzomorfinom sprečava oksidativni stres, pošto je poznato da protektivna autofagija predstavlja drugi nivo antioksidativne zaštite u ćeliji, odnosno da u ovom procesu dolazi do degradacije oksidovanih proteina u autofagolizomima (Kiffin, Bandyopadhyay i sar., 2006; Moore 2008). U prethodnoj studiji pokazano je da farmakološka inhibicija autofagije indukovane cisplatinom povećava Bax/Bcl-2 odnos i oksidativni stres (Harhaji-Trajkovic, Vilimanovich i sar., 2009). Slični mehanizam mogao bi biti odgovoran i za autofagijom posredovanu zaštitu od dorzomorfina imajući u vidu da je pokazano da je apoptoza izazvana dorzomorfinom posredovana oksidativnim stresom i povećanjem Bax/Bcl-2 proapoptotskog potencijala.

Prethodno su rezultati ove studije utvrdili da su za indukciju apoptoze dorzomorfinom odgovorni AMPK zavisni i AMPK nezavisni put. Ako se uzme u obzir da je pokazano da je za indukciju autofagije dorzomorfinom odgovorna inhibicija Akt, i da je Akt/mTOR opšte poznati signal za preživljavanje (*Sarbassov, Ali i sar., 2005*) može se pretpostaviti da i AMPK-nezavisna inhibicija Akt/mTOR signalnog puta izaziva apoptozu ćelija glioma. Stoga finalni zaključak ove studije je da supresija AMPK i blokada Akt koja je nezavisna od inhibicije AMPK posreduju u apoptozi izazvanoj dorzomorfinom, dok drugi mehanizam zajedno sa sledstvenom inhibicijom mTOR dovodi do istovremene indukcije autofagije, koja sa druge strane ograničava odigravanje procesa apoptoze. Ovakva pretpostavka može se shematski prikazati slikom 31. Međutim, imajući u vidu brojne mehanizme na koje utiče dorzomorfin nezavisno od inhibicije AMPK, supresija Akt/mTOR signalnog puta ne mora biti jedini mehanizam koji doprinosi indukciji apoptoze.



Slika 31. Pretpostavljeni mehanizam signalizacija i interakcije apoptoze i autofagije u dorzomorfinom tretiranim ćelijama.

Bilo kako bilo, rezultati ove studije pokazuju da dorzomorfin ima antiproliferativnu ulogu i citotoksični efekat prilično specifičan za ćelije glioma, i da se u kombinaciji sa inhibitorima autofagije postiže još efikasnije ubijanje ovih tumorskih ćelija. Ako se uzme u obzir da je hlorokin jedini inhibitor autofagije koji je klinički odobren (*Maycotte, Aryal i sar.*, 2012), da je u II fazi kliničkih ispitivanja za tretman tumora u kombinaciji sa ciklofosfamidom, bortezomibom i imanitibom (Trial #NCT01438177, ISCRTN No. 61568166), i da se zna da ovaj antimalarijski lek uspešno prolazi krvno moždanu barijeru (*Adelusi i Salako 1982*), upravo on bi bio dobar kandidat za kombinovanje sa dorzomorfinom. I pored intenzivnih napora koji se ulažu u pronalaženje efikasne terapije za obolele od glioma, zbog svog infiltrativnog načina rasta i nemogućnosti da budu hirurški odstranjeni, kao i zbog svoje rezistentnosti na apoptozu indukovanu tradicionalnim terapijama (zračenjem, hemoterapijom i imunoterapijom), ovi tumori se smatraju gotovo neizlečivim (*Kondo, Hollingsworth i sar.*, 2004). Dakle, rezultati ove studije sugerišu da je dorzomorfin, sam ili u saradnji sa inhibitorima autofagije, dobar kandidat za dalja proučavanja u cilju pronalaženja novih terapijskih pristupa u tretmanu ovih najčešćih i najopasnijih tumora mozga.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske teze, a na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Farmakološki inhibitor AMPK dorzomorfin inhibira proliferaciju i indukuje apoptotsku smrt gliomskih ćelijskih linija U251 i C6, ali ne i primarnih pacovskih astrocita, mehanizmima koji obuhvataju blokadu G₂/M faze ćelijskog ciklusa, indukciju oksidativnog stresa i smanjenje ekspresije antiapoptotskog proteina Bcl-2.
- Blokada ćelijskog ciklusa i inhibicija proliferacije gliomskih ćelija tretiranih dorzomorfinom zavise samo od inhibicije AMPK, dok indukcija apoptoze zavisi od saradnje AMPK-zavisnih i AMPK-nezavisnih mehanizama.
- AMPK-nezavisnom inhibicijom Akt/mTOR signalnog puta dorzomorfin izaziva citoprotektivnu autofagiju koja inhibira apoptotsku smrt ćelija U251 glioma, L929 fibrosarkoma i B16 melanoma.

7. LITERATURA

- Abedin, M. J., D. Wang, et al. (2007). "Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage." Cell Death Differ 14(3): 500-510.
- Adelusi, S. A. and L. A. Salako (1982). "Tissue and blood concentrations of chloroquine following chronic administration in the rat." J Pharm Pharmacol 34(11): 733-735.
- Amaravadi, R. K., J. Lippincott-Schwartz, et al. (2011). "Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment." Clin Cancer Res 17(4): 654-666.
- Amaravadi, R. K., D. Yu, et al. (2007). "Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma." J Clin Invest 117(2): 326-336.
- Apel, A., I. Herr, et al. (2008). "Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy." Cancer Res 68(5): 1485-1494.
- Arsikin, K., T. Kravic-Stevovic, et al. (2012). "Autophagy-dependent and -independent involvement of AMP-activated protein kinase in 6-hydroxydopamine toxicity to SH-SY5Y neuroblastoma cells." Biochim Biophys Acta 11(36): 16.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science 281(5381): 1305-1308.
- Baumann, P., S. Mandl-Weber, et al. (2007). "Inhibition of adenosine monophosphate-activated protein kinase induces apoptosis in multiple myeloma cells." Anticancer Drugs 18(4): 405-410.
- Berry, D. L. and E. H. Baehrecke (2007). "Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in Drosophila." Cell 131(6): 1137-1148.
- Boya, P., R. A. Gonzalez-Polo, et al. (2005). "Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis." Mol Cell Biol 25(3): 1025-1040.
- Bravo-Cordero, J. J., L. Hodgson, et al. (2012). "Directed cell invasion and migration during metastasis." Curr Opin Cell Biol 24(2): 277-283.

- Briceno, E., S. Reyes, et al. (2003). "Therapy of glioblastoma multiforme improved by the antimutagenic chloroquine." Neurosurg Focus 14(2).
- Brown, J. M. and L. D. Attardi (2005). "The role of apoptosis in cancer development and treatment response." Nat Rev Cancer 5(3): 231-237.
- Bursch, W., A. Ellinger, et al. (1996). "Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy." Carcinogenesis 17(8): 1595-1607.
- Bursch, W., K. Hochegger, et al. (2000). "Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments." J Cell Sci 113(Pt 7): 1189-1198.
- Cabal-Hierro, L. and P. S. Lazo (2012). "Signal transduction by tumor necrosis factor receptors." Cell Signal 24(6): 1297-1305.
- Cain, K., S. B. Bratton, et al. (2000). "Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes." J Biol Chem 275(9): 6067-6070.
- Campas, C., J. M. Lopez, et al. (2003). "Acadesine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes." Blood 101(9): 3674-3680.
- Carew, J. S., S. T. Nawrocki, et al. (2007). "Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance." Blood 110(1): 313-322.
- Carling, D., C. Thornton, et al. (2012). "AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles?" Biochem J 445(1): 11-27.
- Chajes, V., M. Cambot, et al. (2006). "Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival." Cancer Res 66(10): 5287-5294.
- Choe, Y. J., T. J. Ha, et al. (2012). "Anthocyanins in the black soybean (*Glycine max* L.) protect U2OS cells from apoptosis by inducing autophagy via the activation of adenosyl monophosphate-dependent protein kinase." Oncol Rep 28(6): 2049-2056.
- Cohen, G. M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." Biochem J 326(Pt 1): 1-16.

- Cuervo, A. M. and F. Macian (2012). "Autophagy, nutrition and immunology." Mol Aspects Med 33(1): 2-13.
- de Medina, P., S. Silvente-Poirot, et al. (2009). "Tamoxifen and AEBS ligands induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells through the stimulation of sterol accumulation." Autophagy 5(7): 1066-1067.
- Debatin, K. M. (2004). "Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy." Cancer Immunol Immunother 53(3): 153-159.
- Degtyarev, M., A. De Maziere, et al. (2009). "Autophagy, an Achilles' heel AKTing against cancer?" Autophagy 5(3): 415-418.
- Deretic, V. (2011). "Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes." Immunol Rev 240(1): 92-104.
- Dikic, I., T. Johansen, et al. (2010). "Selective autophagy in cancer development and therapy." Cancer Res 70(9): 3431-3434.
- Ding, W. X., S. Manley, et al. (2011). "The emerging role of autophagy in alcoholic liver disease." Exp Biol Med 236(5): 546-556.
- Dunn, C. J. and D. H. Peters (1995). "Metformin. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in non-insulin-dependent diabetes mellitus." Drugs 49(5): 721-749.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol 35(4): 495-516.
- Emerling, B. M., B. Viollet, et al. (2007). "Compound C inhibits hypoxic activation of HIF-1 independent of AMPK." FEBS Lett 581(29): 5727-5731.
- Filomeni, G., E. Desideri, et al. (2010). "Carcinoma cells activate AMP-activated protein kinase-dependent autophagy as survival response to kaempferol-mediated energetic impairment." Autophagy 6(2): 202-216.
- Flick, D. A. and G. E. Gifford (1984). "Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor." J Immunol Methods 68(1-2): 167-175.
- Fujiwara, K., E. Iwado, et al. (2007). "Akt inhibitor shows anticancer and radiosensitizing effects in malignant glioma cells by inducing autophagy." Int J Oncol 31(4): 753-760.

- Fulda, S. and K. M. Debatin (2004). "Targeting apoptosis pathways in cancer therapy." Curr Cancer Drug Targets 4(7): 569-576.
- Fulda, S. and K. M. Debatin (2006). "Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy." Oncogene 25(34): 4798-4811.
- Galluzzi, L., I. Vitale, et al. (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." Cell Death Differ 19(1): 107-120.
- Gao, X., X. Xu, et al. (2007). "NMDA receptor activation induces mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes." Physiol Res 56(5): 559-569.
- Ghavami, S., A. Asoodeh, et al. (2008). "Brevinin-2R(1) semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway." J Cell Mol Med 12(3): 1005-1022.
- Giese, A., R. Bjerkvig, et al. (2003). "Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment." J Clin Oncol 21(8): 1624-1636.
- Gozuacik, D. and A. Kimchi (2004). "Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism." Oncogene 23(16): 2891-2906.
- Guo, D., I. J. Hildebrandt, et al. (2009). "The AMPK agonist AICAR inhibits the growth of EGFRvIII-expressing glioblastomas by inhibiting lipogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A 106(31): 12932-12937.
- Hah, Y. S., H. S. Noh, et al. (2012). "Cathepsin D inhibits oxidative stress-induced cell death via activation of autophagy in cancer cells." Cancer Lett 323(2): 208-214.
- Han, J., W. Hou, et al. (2008). "Involvement of protective autophagy in TRAIL resistance of apoptosis-defective tumor cells." J Biol Chem 283(28): 19665-19677.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell 144(5): 646-674.
- Hardie, D. G. (2011). "AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function." Genes Dev 25(18): 1895-1908.
- Harhaji-Trajkovic, L., U. Vilimanovich, et al. (2009). "AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells." J Cell Mol Med 13(9B): 3644-3654.

- Harhaji, L., S. Mijatovic, et al. (2007). "Aloe emodin inhibits the cytotoxic action of tumor necrosis factor." Eur J Pharmacol 568(1-3): 248-259.
- Heeg, S., M. Doebele, et al. (2006). "In vitro transformation models: modeling human cancer." Cell Cycle 5(6): 630-634.
- Hsu, H., J. Xiong, et al. (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation." Cell 81(4): 495-504.
- Huang, X., S. Wullschleger, et al. (2008). "Important role of the LKB1-AMPK pathway in suppressing tumorigenesis in PTEN-deficient mice." Biochem J 412(2): 211-221.
- Inoki, K., Y. Li, et al. (2002). "TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling." Nat Cell Biol 4(9): 648-657.
- Isakovic, A., L. Harhaji, et al. (2007). "Dual antiglioma action of metformin: cell cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis." Cell Mol Life Sci 64(10): 1290-1302.
- Iwamaru, A., Y. Kondo, et al. (2007). "Silencing mammalian target of rapamycin signaling by small interfering RNA enhances rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells." Oncogene 26(13): 1840-1851.
- Jang, J. H., T. J. Lee, et al. (2010). "Compound C sensitizes Caki renal cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated down-regulation of c-FLIPL and Mcl-1." Exp Cell Res 316(13): 2194-2203.
- Janjetovic, K., L. Harhaji-Trajkovic, et al. (2011). "In vitro and in vivo anti-melanoma action of metformin." Eur J Pharmacol 668(3): 373-382.
- Jelluma, N., X. Yang, et al. (2006). "Glucose withdrawal induces oxidative stress followed by apoptosis in glioblastoma cells but not in normal human astrocytes." Mol Cancer Res 4(5): 319-330.
- Johansen, T. and T. Lamark (2011). "Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins." Autophagy 7(3): 279-296.
- Jones, T. S. and E. C. Holland (2011). "Molecular pathogenesis of malignant glial tumors." Toxicol Pathol 39(1): 158-166.
- Jung, C. H., S. H. Ro, et al. (2010). "mTOR regulation of autophagy." FEBS Lett 584(7): 1287-1295.

- Kang, R., H. J. Zeh, et al. (2011). "The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis." Cell Death Differ 18(4): 571-580.
- Kanzawa, T., I. M. Germano, et al. (2004). "Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells." Cell Death Differ 11(4): 448-457.
- Kanzawa, T., Y. Kondo, et al. (2003). "Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide." Cancer Res 63(9): 2103-2108.
- Kassenbrock, C. K., S. Hunter, et al. (2002). "Inhibition of Src family kinases blocks epidermal growth factor (EGF)-induced activation of Akt, phosphorylation of c-Cbl, and ubiquitination of the EGF receptor." J Biol Chem 277(28): 24967-24975.
- Kefas, B. A., Y. Cai, et al. (2004). "Metformin-induced stimulation of AMP-activated protein kinase in beta-cells impairs their glucose responsiveness and can lead to apoptosis." Biochem Pharmacol 68(3): 409-416.
- Kiffin, R., U. Bandyopadhyay, et al. (2006). "Oxidative stress and autophagy." Antioxid Redox Signal 8(1-2): 152-162.
- Kim, H. S., J. T. Hwang, et al. (2008). "Inhibition of AMP-activated protein kinase sensitizes cancer cells to cisplatin-induced apoptosis via hyper-induction of p53." J Biol Chem 283(7): 3731-3742.
- Kim, K. W., R. W. Mutter, et al. (2006). "Autophagy for cancer therapy through inhibition of pro-apoptotic proteins and mammalian target of rapamycin signaling." J Biol Chem 281(48): 36883-36890.
- Kim, K. Y., A. Baek, et al. (2009). "Adiponectin-activated AMPK stimulates dephosphorylation of AKT through protein phosphatase 2A activation." Cancer Res 69(9): 4018-4026.
- Kim, Y. M., M. Y. Kim, et al. (2011). "Compound C independent of AMPK inhibits ICAM-1 and VCAM-1 expression in inflammatory stimulants-activated endothelial cells in vitro and in vivo." Atherosclerosis 219(1): 57-64.
- Kimura, N., C. Tokunaga, et al. (2003). "A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway." Genes Cells 8(1): 65-79.

- Kirkin, V., D. G. McEwan, et al. (2009). "A role for ubiquitin in selective autophagy." Mol Cell 34(3): 259-269.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, et al. (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." Embo J 14(22): 5579-5588.
- Klionsky, D. J. (2005). "Autophagy." Curr Biol 15(8): R282-283.
- Komata, T., T. Kanzawa, et al. (2004). "Mild heat shock induces autophagic growth arrest, but not apoptosis in U251-MG and U87-MG human malignant glioma cells." J Neurooncol 68(2): 101-111.
- Komatsu, M., S. Waguri, et al. (2007). "Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice." Cell 131(6): 1149-1163.
- Kondo, Y., E. F. Hollingsworth, et al. (2004). "Molecular targeting for malignant gliomas (Review)." Int J Oncol 24(5): 1101-1109.
- Kong, D., S. Dan, et al. (2010). "Inhibition profiles of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors against PI3K superfamily and human cancer cell line panel JFCR39." Eur J Cancer 46(6): 1111-1121.
- Korsmeyer, S. J., J. R. Shutter, et al. (1993). "Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death." Semin Cancer Biol 4(6): 327-332.
- Krakstad, C. and M. Chekenya (2010). "Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics." Mol Cancer 9(135): 1476-4598.
- Kung, C. P., A. Budina, et al. (2011). "Autophagy in tumor suppression and cancer therapy." Crit Rev Eukaryot Gene Expr 21(1): 71-100.
- Kurosaka, K., M. Takahashi, et al. (2003). "Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages." J Immunol 171(9): 4672-4679.
- Kwon, H. J., G. E. Kim, et al. (2013). "Inhibition of platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase and downstream signaling pathways by Compound C." Cell Signal 25(4): 883-897.

- Laderoute, K. R., K. Amin, et al. (2006). "5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments." Mol Cell Biol 26(14): 5336-5347.
- Lavrik, I., A. Golks, et al. (2005). "Death receptor signaling." J Cell Sci 118(Pt 2): 265-267.
- Lee, J., S. Giordano, et al. (2012). "Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling." Biochem J 441(2): 523-540.
- Levine, B. and D. J. Klionsky (2004). "Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy." Dev Cell 6(4): 463-477.
- Levine, Y. C., G. K. Li, et al. (2007). "Agonist-modulated regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in endothelial cells. Evidence for an AMPK -> Rac1 -> Akt -> endothelial nitric-oxide synthase pathway." J Biol Chem 282(28): 20351-20364.
- Li, D., E. Ueta, et al. (2004). "Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination." Cancer Sci 95(8): 644-650.
- Li, H. B., Y. K. Ge, et al. (2008). "Salidroside stimulated glucose uptake in skeletal muscle cells by activating AMP-activated protein kinase." Eur J Pharmacol 588(2-3): 165-169.
- Lino, M. M. and A. Merlo (2011). "PI3Kinase signaling in glioblastoma." J Neurooncol 103(3): 417-427.
- Liu, X. M., K. J. Peyton, et al. (2011). "Compound C stimulates heme oxygenase-1 gene expression via the Nrf2-ARE pathway to preserve human endothelial cell survival." Biochem Pharmacol 82(4): 371-379.
- Locksley, R. M., N. Killeen, et al. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." Cell 104(4): 487-501.
- Luo, Z., M. Zang, et al. (2010). "AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth." Future Oncol 6(3): 457-470.
- Maiuri, M. C., E. Zalckvar, et al. (2007). "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol 8(9): 741-752.

- Marsin, A. S., C. Bouzin, et al. (2002). "The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase." J Biol Chem 277(34): 30778-30783.
- Matsui, Y., H. Takagi, et al. (2007). "Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy." Circ Res 100(6): 914-922.
- Maycotte, P., S. Aryal, et al. (2012). "Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy." Autophagy 8(2): 200-212.
- Meijer, A. J. (2008). "Amino acid regulation of autophagosome formation." Methods Mol Biol 445: 89-109.
- Meijer, A. J. and P. Codogno (2007). "AMP-activated protein kinase and autophagy." Autophagy 3(3): 238-240.
- Meley, D., C. Bauvy, et al. (2006). "AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis." J Biol Chem 281(46): 34870-34879.
- Memmott, R. M. and P. A. Dennis (2009). "Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer." Cell Signal 21(5): 656-664.
- Mihaylova, M. M. and R. J. Shaw (2011). "The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism." Nat Cell Biol 13(9): 1016-1023.
- Misirkić, M., K. Janjetović, et al. (2012). "Inhibition of AMPK-dependent autophagy enhances in vitro antiglioma effect of simvastatin." Pharmacol Res 65(1): 111-119.
- Mizushima, N. (2007). "Autophagy: process and function." Genes Dev 21(22): 2861-2873.
- Mizushima, N., T. Yoshimori, et al. (2011). "The role of Atg proteins in autophagosome formation." Annu Rev Cell Dev Biol 27: 107-132.
- Moore, M. N. (2008). "Autophagy as a second level protective process in conferring resistance to environmentally-induced oxidative stress." Autophagy 4(2): 254-256.
- Moreira, P. I., M. A. Smith, et al. (2005). "Oxidative stress and neurodegeneration." Ann N Y Acad Sci: 545-552.
- Nam, M., W. H. Lee, et al. (2008). "Compound C inhibits clonal expansion of preadipocytes by increasing p21 level irrespectively of AMPK inhibition." Arch Biochem Biophys 479(1): 74-81.

- Navis, A. C., M. van den Eijnden, et al. (2010). "Protein tyrosine phosphatases in glioma biology." Acta Neuropathol 119(2): 157-175.
- Nazarenko, I., S. M. Hede, et al. (2012). "PDGF and PDGF receptors in glioma." Ups J Med Sci 117(2): 99-112.
- Norbury, C. J. and I. D. Hickson (2001). "Cellular responses to DNA damage." Annu Rev Pharmacol Toxicol 41: 367-401.
- Oakhill, J. S., J. W. Scott, et al. (2012). "AMPK functions as an adenylate charge-regulated protein kinase." Trends Endocrinol Metab 23(3): 125-132.
- Ola, M. S., M. Nawaz, et al. (2011). "Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis." Mol Cell Biochem 351(1-2): 41-58.
- Olszewski, U., A. Deally, et al. (2012). "Alterations of phosphoproteins in NCI-H526 small cell lung cancer cells involved in cytotoxicity of cisplatin and titanocene Y." Neoplasia 14(9): 813-822.
- Onodera, J. and Y. Ohsumi (2005). "Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation." J Biol Chem 280(36): 31582-31586.
- Paglin, S., T. Hollister, et al. (2001). "A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles." Cancer Res 61(2): 439-444.
- Pankiv, S., T. H. Clausen, et al. (2007). "p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy." J Biol Chem 282(33): 24131-24145.
- Parney, I. F., C. Hao, et al. (2000). "Glioma immunology and immunotherapy." Neurosurgery 46(4): 778-791.
- Pattingre, S., L. Espert, et al. (2008). "Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes." Biochimie 90(2): 313-323.
- Petti, C., C. Vegetti, et al. (2012). "AMPK activators inhibit the proliferation of human melanomas bearing the activated MAPK pathway." Melanoma Res 22(5): 341-350.
- Raicevic, N., A. Mladenovic, et al. (2005). "Iron protects astrocytes from 6-hydroxydopamine toxicity." Neuropharmacology 48(5): 720-731.

- Rattan, R., S. Giri, et al. (2005). "5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein kinase." J Biol Chem 280(47): 39582-39593.
- Ravikumar, B., S. Sarkar, et al. (2010). "Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology." Physiol Rev 90(4): 1383-1435.
- Saelens, X., N. Festjens, et al. (2004). "Toxic proteins released from mitochondria in cell death." Oncogene 23(16): 2861-2874.
- Saito, S., A. Furuno, et al. (2012). "Compound C prevents the unfolded protein response during glucose deprivation through a mechanism independent of AMPK and BMP signaling." PLoS One 7(9): 24.
- Saitoh, M., K. Nagai, et al. (2004). "Adenosine induces apoptosis in the human gastric cancer cells via an intrinsic pathway relevant to activation of AMP-activated protein kinase." Biochem Pharmacol 67(10): 2005-2011.
- Sakoda, H., T. Ogihara, et al. (2002). "Activation of AMPK is essential for AICAR-induced glucose uptake by skeletal muscle but not adipocytes." Am J Physiol Endocrinol Metab 282(6): E1239-1244.
- Samari, H. R., M. T. Moller, et al. (2005). "Stimulation of hepatocytic AMP-activated protein kinase by okadaic acid and other autophagy-suppressive toxins." Biochem J 386(Pt 2): 237-244.
- Sarbassov, D. D., S. M. Ali, et al. (2005). "Growing roles for the mTOR pathway." Curr Opin Cell Biol 17(6): 596-603.
- Sarkar, S., R. A. Floto, et al. (2005). "Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase." J Cell Biol 170(7): 1101-1111.
- Shaw, M. M., W. K. Gurr, et al. (2007). "5'AMP-activated protein kinase alpha deficiency enhances stress-induced apoptosis in BHK and PC12 cells." J Cell Mol Med 11(2): 286-298.
- Shaw, R. J. (2009). "LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth." Acta Physiol 196(1): 65-80.
- Shingu, T., K. Fujiwara, et al. (2009). "Stage-specific effect of inhibition of autophagy on chemotherapy-induced cytotoxicity." Autophagy 5(4): 537-539.

- Sieber, O., K. Heinemann, et al. (2005). "Genomic stability and tumorigenesis." Semin Cancer Biol 15(1): 61-66.
- Slee, E. A., C. Adrain, et al. (2001). "Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis." J Biol Chem 276(10): 7320-7326.
- Sohn, D., K. Schulze-Osthoff, et al. (2005). "Caspase-8 can be activated by interchain proteolysis without receptor-triggered dimerization during drug-induced apoptosis." J Biol Chem 280(7): 5267-5273.
- Steinberg, G. R. and B. E. Kemp (2009). "AMPK in Health and Disease." Physiol Rev 89(3): 1025-1078.
- Svensson, R. U. and R. J. Shaw Cancer metabolism: Tumour friend or foe, Nature. 2012 May 31;485(7400):590-1. doi: 10.1038/485590a.
- Tatton, L., G. M. Morley, et al. (2003). "The Src-selective kinase inhibitor PP1 also inhibits Kit and Bcr-Abl tyrosine kinases." J Biol Chem 278(7): 4847-4853.
- Theodoropoulou, S., K. Brodowska, et al. (2013). "Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) inhibits the growth of retinoblastoma in vivo by decreasing angiogenesis and inducing apoptosis." PLoS One 8(1): 3.
- Tsujimoto, Y. and S. Shimizu (2000). "Bcl-2 family: life-or-death switch." FEBS Lett 466(1): 6-10.
- Versteeg, H. H., E. Nijhuis, et al. (2000). "A new phosphospecific cell-based ELISA for p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p38 MAPK, protein kinase B and cAMP-response-element-binding protein." Biochem J 3: 717-722.
- Wang, S., P. Song, et al. (2012). "AMP-activated protein kinase, stress responses and cardiovascular diseases." Clin Sci 122(12): 555-573.
- Westphal, M. and K. Lamszus (2011). "The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches." Nat Rev Neurosci 12(9): 495-508.
- Williams, A., S. Sarkar, et al. (2008). "Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway." Nat Chem Biol 4(5): 295-305.
- Wirawan, E., T. Vanden Berghe, et al. (2012). "Autophagy: for better or for worse." Cell Res 22(1): 43-61.

- Witczak, C. A., C. G. Sharoff, et al. (2008). "AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: from structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism." Cell Mol Life Sci 65(23): 3737-3755.
- Woods, A., D. Azzout-Marniche, et al. (2000). "Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase." Mol Cell Biol 20(18): 6704-6711.
- Xiao, B., M. J. Sanders, et al. (2011). "Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP." Nature 472(7342): 230-233.
- Xu, Z. X., J. Liang, et al. (2007). "A plant triterpenoid, avicin D, induces autophagy by activation of AMP-activated protein kinase." Cell Death Differ 14(11): 1948-1957.
- Yan, J., H. Yang, et al. (2010). "Autophagy augmented by troglitazone is independent of EGFR transactivation and correlated with AMP-activated protein kinase signaling." Autophagy 6(1): 67-73.
- Yang, Q. and K. L. Guan (2007). "Expanding mTOR signaling." Cell Res 17(8): 666-681.
- Yang, Z. and D. J. Klionsky (2009). "An overview of the molecular mechanism of autophagy." Curr Top Microbiol Immunol 335: 1-32.
- Yang, Z. J., C. E. Chee, et al. (2011). "The role of autophagy in cancer: therapeutic implications." Mol Cancer Ther 10(9): 1533-1541.
- Youn, J. Y., T. Wang, et al. (2009). "An ezrin/calpain/PI3K/AMPK/eNOSs1179 signaling cascade mediating VEGF-dependent endothelial nitric oxide production." Circ Res 104(1): 50-59.
- Yu, P. B., C. C. Hong, et al. (2008). "Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism." Nat Chem Biol 4(1): 33-41.
- Yu, S. H., Y. T. Kao, et al. (2011). "Inhibition of AMPK-associated autophagy enhances caffeic acid phenethyl ester-induced cell death in C6 glioma cells." Planta Med 77(9): 907-914.
- Yuan, J. and G. Kroemer (2010). "Alternative cell death mechanisms in development and beyond." Genes Dev 24(23): 2592-2602.

- Zhou, G., R. Myers, et al. (2001). "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." J Clin Invest 108(8): 1167-1174.
- Zhou, W., W. F. Han, et al. (2007). "Fatty acid synthase inhibition activates AMP-activated protein kinase in SKOV3 human ovarian cancer cells." Cancer Res 67(7): 2964-2971.
- Ziegler, A., M. von Kienlin, et al. (2001). "High glycolytic activity in rat glioma demonstrated in vivo by correlation peak 1H magnetic resonance imaging." Cancer Res 61(14): 5595-5600.
- Zou, Y., Y. H. Ling, et al. (2013). "The autophagy inhibitor chloroquine overcomes the innate resistance of wild-type EGFR non-small-cell lung cancer cells to erlotinib." J Thorac Oncol 8(6): 693-702.

BIOGRAFIJA

Ljubica M. Vučićević rođena je 13.06.1978. u Beogradu. Diplomirala je molekularnu biologiju i fiziologiju na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, 2005. godine sa prosečnom ocenom 9.4. Od oktobra 2006. godine radi u Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković" na Odeljenju za neurofiziologiju.

Naučno istraživački rad Ljubice Vučićević realizovan je kroz projekte finansirane od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. U periodu od 2006. do 2010. godine učestvovala je u realizaciji projekta "Citotoksični, citoprotektivni i imunomodulatorni efekti nanočestica" (evidencioni broj 145073, rukovodilac dr Vladimir Trajković). Od 2011. godine učesnik je 2 projekta "Uloga autofagije u regulaciji smrti tumorskih ćelija" (evidencioni broj 173053, rukovodilac dr Ljubica Harhaji-Trajković) i "Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja" (evidencioni broj 41025, rukovodilac Prof. dr Vladimir Trajković)

Koautor je 18 radova u međunarodnim časopisima.