

A PACLITAXEL CITOTOXIKUS HATÁSÁNAK ÉS A FEHÉRJÉK O-GLIKOZILÁCIÓJÁNAK SEJTCIKLUSFÜGGŐ VÁLTOZÁSAI

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Fisi Viktória

Doktori Iskola Vezetője: Prof. Dr. Kovács L. Gábor

Programvezető: Prof. Dr. Miseta Attila

Témavezető: Prof. Dr. Miseta Attila, Dr. Nagy Tamás

Laboratóriumi Medicina Intézet

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar



Pécs, 2018.

TARTALOM

ÖSSZEFOGLALÁS	5
I. BEVEZETÉS	6
I.1. Daganatos megbetegedések	6
I.2. Az eukarióta sejtciklus	7
I.3. Sejtszinkronizációs módszerek	9
I.4. Paclitaxel	12
I.4.1. A paclitaxel alkalmazása	12
I.4.2. A paclitaxel szerkezete, hatásmechanizmusa	13
I.5. O-glikoziláció a sejtciklusban	14
I.5.1. Poszttranszlációs módosulások a sejtciklus szabályozásában	14
I.5.2. A fehérjék O-típusú glikozilációja	15
I.5.3. Az O-glikoziláció jelentősége a sejtciklus során	18
II. CÉLKITŰZÉSEK	20
III. ANYAG ÉS MÓDSZER	22
III.1. Sejtkultúrák	22
III.2. Sejtszinkronizálás	22
III.2.1. Paclitaxelkezelés	22
III.2.2. Dupla timidin blokk	23
III.2.3. Mitotikus lerázás	23
III.3. Sejtszámlálási módszerek	24
III.4. Sejtciklus-analízis	25
III.5. Western blot, Immunprecipitáció	26
III.6. Immunfluoreszcencia	27
III.7. Adatelemzés	28
IV. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	29

IV.1. Citotoxikus hatás optimalizálása sejtciklus-függő, időzített kezeléssel.....	29
IV.1.1. Eredmények.....	29
IV.1.2. Megbeszélés	37
IV.2. Az O-glikoziláció változásai mitotikus HeLa sejtekben.....	41
IV.2.1. Eredmények.....	41
IV.2.2. Megbeszélés	53
IRODALOMJEGYZÉK	58
PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK	73
A disszertáció alapjául szolgáló publikációk	73
Egyéb eredeti közlemények.....	74
Idézhető absztraktok.....	76
Köszönetnyilvánítás	77

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADP	Adenozin-difoszfát
BrdU	Bróm-dezoxiuridin
BSA	Borjú szérum-albumin
Cdk	Ciklin-dependens kináz
CHD1	Kromodomén-helikáz-DNS-kötő protein 1
DNS	Dezoxiribonukleinsav
EDTA	Etiléndiamin-tetraecetsav
EGTA	Etilénglikol-tetraecetsav
EMEM	Eagle-féle minimális esszenciális médium
FBS	Fötális borjúsérum
FDA	Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerellenőrző Hatóság
Fruktóz-6-P	Fruktóz-6-foszfát
FS	Előreirányuló fényszórás (Forward Scatter)
GFP	Zöld fluoreszcens fehérje
G ₀ fázis	Nyugvó fázis (0. gap fázis)
G ₁ fázis	1-es növekedési fázis (1-es gap fázis)
G ₂ fázis	2-es növekedési fázis (2-es gap fázis)
GlcNAc	N-acetilglükózamin
Glükóz-6-P	Glükóz-6-foszfát
Glükózamin-6-P	Glükózamin-6-foszfát
GLUT	Glükóz transzporter
HBP	Hexózamin bioszintézis útvonal
IP	Immunprecipitáció
MAPK	Mitogén-aktivált proteinkináz
M fázis	Mitózis fázis
MRI	Mágneses rezonancia képalkotás
mRNS	Hírvivő ribonukleinsav
NCI	Amerikai Nemzeti Rákkutató Intézet (National Cancer Institute)
Nup	Magpórusfehérje
OGA	O-GlcNAcáz
O-GlcNAc	O-β-N-acetilglükózamin
OGT	O-GlcNAc Transzferáz
PBS	Foszfát pufferes sóoldat
PI	Propídium-jodid
PI3K	Foszfatidil-inozitol-3-kináz

PVDF	Polivinil-difluorid
RCF	Relatív centrifugális erő
RIPA	Radioimmunprecipitációs assay puffer
rpm	Percenkénti fordulatszám
Ser	Szerin
S fázis	Szintézis fázis
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát
SUMO	Ubikvitinszerű módosító fehérje (small ubiquitin-like modifier)
T_d	Késlekedési idő
$T_{fázis}$	Fázisidő (egy sejtre vonatkoztatva)
Thr	Treonin
T_{pot}	Potenciális duplikációs idő
T_{total}	Teljes sejtpopuláció fázisideje
UDP-GlcNAc	Uridin-difoszfát-N-acetilglükózamin
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

ÖSSZEFOGLALÁS

A sejtciklus zavarainak jelentősége számos betegség pathogenezisében került leírásra az elmúlt évek során, így a sejtciklusfüggő változások ismerete diagnosztikai és terápiás megközelítésből is igen lényegessé vált.

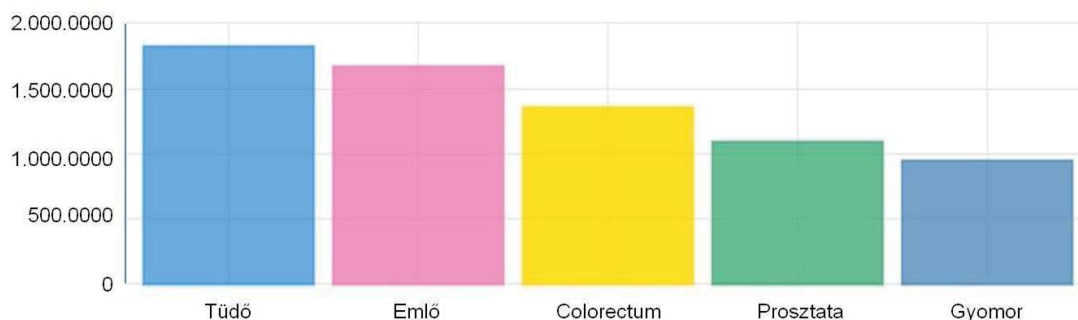
A terápiás hatás fokozása volt célunk a dolgozat alapját képező munka első felében, mely során egy napjainkban is alkalmazott kemoterápiás szer, a paclitaxel sejtciklusfüggő effektivitásbeli különbségeit vizsgáltuk. A paclitaxel a sejtek szinkronizációját okozza a mitózis (M) fázisban. Vizsgálatainkkal arra kerestük a választ, hogy fokozható-e a szer citotoxikus hatása, amennyiben a kezelni kívánt sejtvonal osztódási karakterisztikáját figyelembe véve időzített, ismétlődő kezeléseket alkalmazunk. Egy gyorsan szaporodó sejtvonal (Sp2) osztódási ciklusára alapozott kezelési séma kidolgozását követően kimutattuk, hogy a második kezelés hatékonysága a G₂/M fázisban a legmagasabb. Egy hosszabb duplikációs (generációs) idővel bíró sejtípussal (Jurkat) létrehozott kevert tenyészetet az Sp2-re optimalizált kezeléseknél kitéve képesek voltunk a két sejtvonalon eltérő hatás kifejtésére. Eredményeink azt mutatják, hogy az osztódási karakterisztika ismeretében a kemoterápiás hatékonyság növelhető. Megfelelően időzített kezelésekkal az egészséges testi sejteken okozott mellékhatás csökkenése mellett a tumorsejtekre kifejtett citotoxicitás fokozható.

A munka második részében a sejtciklus-szabályozásban szerepet játszó egyik poszttranszlációs módosulás, az O-típusú fehérjeglukoziláció (O-GlcNAc) változásait követtük végig a sejtciklus során, szinkronizált HeLa sejteken. Bár a módosulásnak a sejtciklus bizonyos mozzanataiban betöltött szerepe részletesen vizsgált, a globális O-glikozilációs státusz osztódás alatti változásairól szóló közlemények ellentmondásosak. Munkánk során kimutattuk, hogy a mitózis folyamán az O-GlcNAc szint jelentősen megemelkedik, western blottal ugyanekkor egy jellegzetes O-GlcNAc-mintázatbeli eltérést azonosítható, egy 100 kDa magasságban megjelenő jel formájában. A malignus sejtek magas tápanyagfelvételének és emelkedett O-glikozilációs státuszának ismerete mellett eredményünk, miszerint a mitózis alatt a „nutrient sensor” funkciót betöltő O-GlcNAc módosulás jelentősen megnő, tovább erősíti azt a korábbi feltételezést, hogy az O-glikoziláció és az azt reguláló enzimek a tumorképződés folyamatának fontos szereplői.

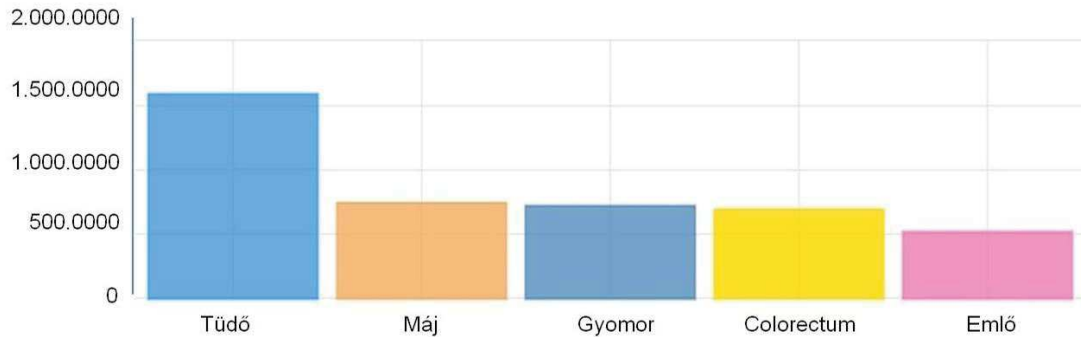
I. BEVEZETÉS

I.1. DAGANATOS MEGBETEGEDÉSEK

A daganatos megbetegedések a morbiditás és mortalitás szempontjából világszerte a statisztikák vezető helyén állnak, ezáltal az egyik legjelentősebb népegészségügyi problémát képviselve napjainkban. Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) adatai szerint 2012-ben az új tumoros megbetegedések száma hozzávetőlegesen évi 14.1 millióra nőtt, amely becslések szerint a következő két évtized során 22 millióra emelkedhet.¹ Ugyanezen időtartam alatt az évi 8.2 millió daganatos megbetegedésből eredő halálozás 13 millióra nőhet. A növekedés hátterében előregedő népességünk mellett fontos tényező a megváltozott életstílus, amely az ismert rizikófaktorok magasabb előfordulását (pl. dohányzás, túlsúly, mozgásszegény életmód) vonta magával. 2012-ben a világszerte leggyakrabban diagnosztizált daganatok a következők voltak: tüdő, emlő, vastagbél (**1. ábra**). A tumorból eredő mortalitás tekintetében ugyanakkor a tüdő-, máj- és gyomordaganatok álltak vezető helyen (**2. ábra**).²



1. ábra. Az 5 leggyakoribb daganatos megbetegedés incidenciája világszerte 2012-ben, a WHO adatai alapján. (Kép forrása: International Agency for Research on Cancer, 2018.)



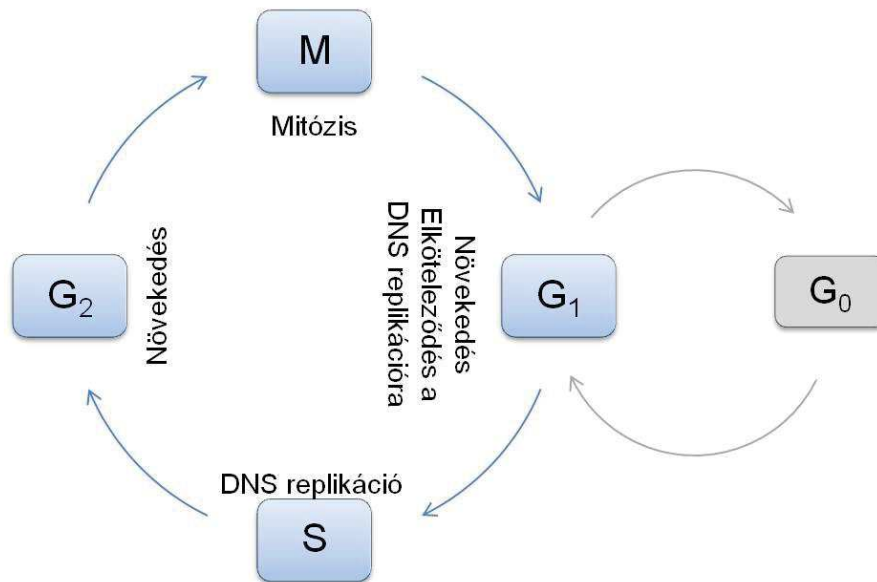
2. ábra. A daganatos megbetegedések mortalitása világszerte 2012-ben, a WHO adatai alapján. (Kép forrása: International Agency for Research on Cancer, 2018.)

I.2. AZ EUKARIÓTA SEJTCIKLUS

Az eukarióta sejtek osztódása rendkívül komplex, szigorúan szabályozott esemény. Jelentőségét többek között az organogenezis, a szöveti regeneráció, kóros esetekben hiperplázia, tumorképződés esetén láthatjuk. A folyamat során az anyasejt minden komponensét, beleértve genetikai állományát is, megduplázza. Fiziológias esetben végeredményként vele genetikailag megegyező két leánysejt képződik. A sejt ezalatt számos ellenőrzőponton halad át annak érdekében, hogy az osztódás megfelelő módon menjen végbe.

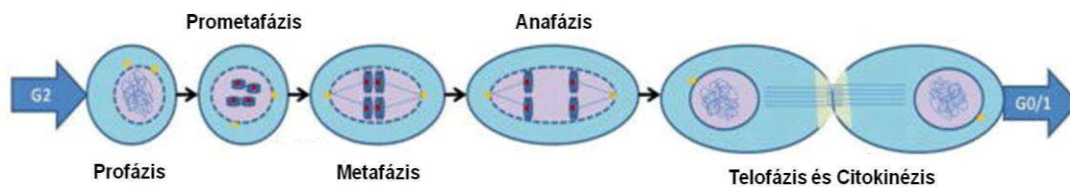
Eukarióta élőlényekben a sejtciklus négy fázisa különíthető el: G_1 , S, G_2 és M. A leánysejt először az úgynevezett G_1 fázisba kerül, melyben változó ideig tartózkodik. Amennyiben a sejt - a környezeti tényezőktől és mitotikus szignálok jelenlététől függően - az osztódás irányába elköteleződik, az első restrikciós ponton áthaladva az S (szintézis) fázisba lép.³ Az S fázis során történik a DNS replikációja, melynek sikeres megtörténte után a G_2 fázisban a sejt felkészül a kettéosztódásra. A G_1 , S és G_2 fázisokat együttesen interfázisnak nevezzük. Ebben tölti a sejt ideje túlnyomó részét. Bár általában a G_1 a sejtciklus leghosszabb szakasza, ennek időtartama a legváltozékonyabb is. Ebből a fázisból nem megfelelő környezeti körülmények esetén

(pl. tápanyagihiány) a sejt egy nyugvó, úgynevezett G_0 stádiumba léphet ki, melyből ideális környezeti tényezők esetén képes visszatérni a G_1 fázisba (3. ábra).



3. ábra. A sejtciklus folyamata vázlatosan. (Saját ábra.)

Az interfázist követően a sejt újabb ellenőrzőpontra halad át. Ennek feltétele a DNS hibátlan megkettőződése, melynek teljesülése esetén végbemegy a tényleges sejtosztás az M, azaz mitózis fázisában. Habár ez a szakasz a legrövidebb időtartamú, benne további négy alfázist különítünk el: pro-, meta-, ana- és telofázist; melyek során különböző események játszódnak le, szigorúan meghatározott sorrendben. A profázisban a maghártya dezintegrálódik, az örökítőanyag kromoszómákba szerveződik, a mitotikus orsó kialakulása megkezdődik. A metafázis során kifejlődik a mitotikus orsó, a kromoszómák a mikrotubulusok segítségével az osztódás egyenlítői síkjában sorakoznak fel, melynek lezajlása ismét egy ellenőrzőpontra való áthaladáshoz szükséges. A kromatidák anafázisban történő szétválása után a telofázis folyamán kialakulnak a pólusokban elhelyezkedő kromatidák körül az új maghártyák, majd megtörténik a leánysejtek tényleges szegregációja, a citokinézis (4. ábra).^{4,5}



4. ábra. *A mitózis szakaszai*
 (Kép forrása: Peterson E. A. és mtsai (2010) *Clin Genet.*)

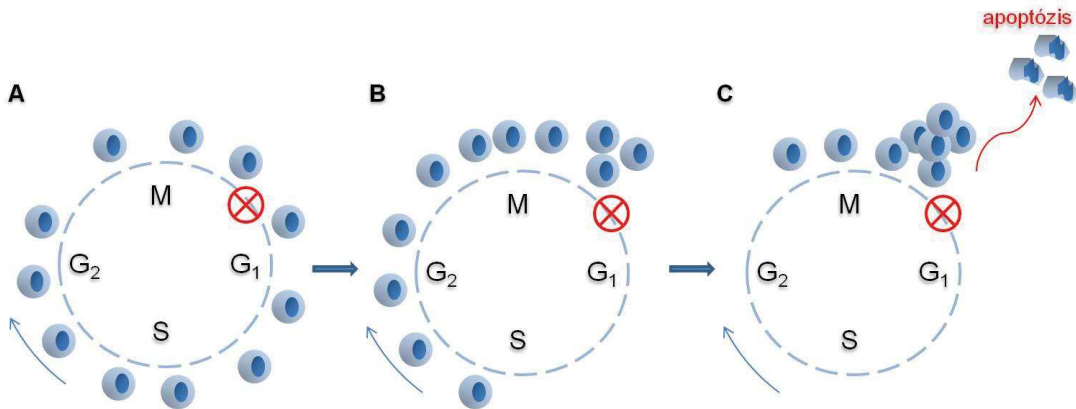
A teljes sejtciklus és az egyes fázisok időtartama sejtípustól függően nagymértékben változik. Gyorsan osztódó emberi sejt tipikus ciklusideje kb. 24 órát tesz ki (kb. 11 óra G₁, 8 óra S, 4 óra G₂, 1 óra M fázis), míg más sejtípusok ennél jóval gyorsabb osztódásra képesek. Így az élesztősejtek akár 90 perc alatt áthaladnak a teljes sejtcikluson, sőt, embrionális sejtek ennél rövidebb ciklusidővel is rendelkezhetnek.⁶

I.3. SEJTSZINKRONIZÁCIÓS MÓDSZEREK

Natív sejtkultúrában a sejtek aszinkronizáltak, egymástól független módon haladnak a sejtciklusban, egy adott pillanatban annak különböző fázisaiban találhatóak. Mivel az ilyen tenyészet vizsgálatával nem nyerhető érdemi információ a sejtciklusfüggő folyamatokról, szükség volt új módszerek kifejlesztésére az azonos fázisban levő sejt populációk, ún. fázis-homológ sejtcsoportok gyűjtéséhez. Ennek egyik módja a sejt szinkronizáció, melynek számos típusa ismert az irodalomban.

Sejtkultúrák szinkronizálása során a közös lépés, hogy egy-egy adott ponton felfüggesztjük a sejtciklus progresszióját. A sejt ezt a pontot elérve a ciklusban nem képes továbbhaladni. Idővel a populáció összes sejtje elér ehhez a pontot, így az összes sejt az adott fázisban szinkronizálódik. A gátlás feloldása után a sejtek továbbhaladhatnak ciklusukban, már egymással szinkronizált módon. Ezt követően meghatározott időpontokban mintát gyűjtve képesek vagyunk az adott fázisban lévő sejtcsoport ciklusfüggő paramétereit vizsgálni. A szinkronizálás nehézségei közé

tartozik, hogy a sejtciklus adott szakaszában blokkolt sejt bizonyos idő eltelte után az apoptózis útjára lép. Ezáltal tehát 100%-os szinkronizáltságot nehéz létrehozni, ugyanis mire az populáció utolsó sejtje is elérné azt a fázist, melyben a blokk történik, nagy esély van rá, hogy az oda elsőként jutott sejt már pusztulásnak indul. (6. ábra)



5. ábra. A sejtiszinkronizáció menete. *A.* Aszinkron populáció a G_1 fázis kezdetén alkalmazott blokk időpontjában. *B.* A ciklusidő egy részének eltelte után megkezdődik az akkumuláció G_1 fázis kezdetén. *C.* A legkorábban blokkolt sejtek apoptózisnak indulnak, míg a kezdetben G_1 és S fázisban levők még nem érték el a blokkolt pontot a sejtciklusban. (Saját ábra.)

Emiatt szükséges minden egyes sejtpopulációra és a vizsgálni kívánt fázisra optimalizálni a kezelések időtartamát, hogy a lehető legmagasabb szinkronizáltsági fokot érjük el, minél kevesebb apoptotikus sejt létrejöttével. Emellett a kezelések során problémát jelenthet a szinkronizációhoz használt szerek esetleges mellékhatása, illetve a tényezetek általában relatíve gyorsan történő ismételt aszinkronizálódása (általában néhány ciklus zajlik szinkronizált módon, az idő előrehaladtával az összehangoltság mértéke csökken), mely korlátozza a lehetséges vizsgálatok idejét, számát.

Általánosságban elmondható, hogy legcélszerűbb olyan szinkronizálási módszert választani, amely a vizsgálni kívánt fázis kezdetéhez lehető legközelebbi blokkot eredményez. A módszerek általában tápanyag (leggyakrabban szérum) megvonásán, vagy különböző kémiai gátlók alkalmazásán alapulnak. A legelterjedtebb kezeléseket az **1. táblázat**ban foglaltuk össze.

Fázis	Módszer
Korai G ₁	Tápanyag-megvonás
	Lovastatin
Késői G ₁	Mimozin
G ₁ /S	Afidikolin
	Hidroxiurea
	Timidin
G ₂ /M	Nocodazol
	Paclitaxel
M	Mitotikus lerázás

1. táblázat. *A leggyakrabban alkalmazott sejtszinkronizációs módszerek*

A tápanyag megvonása által a sejt a G₁ fázis kezdetén ragad, mivel nem képes áthaladni az első restriktív ponton. A lovastatinkezelés a p21 és p27 cdk inhibitorok sejten belüli akkumulációja révén szintén a korai G₁ fázisban eredményez blokkot.⁷ A késői G₁ fázisban akadályozza a sejtciklus-progressziót a mimozin, máig nem teljesen tisztázott mechanizmussal.⁸ A G₁/S fázis határán, a DNS szintézis gátlása révén állítja le a progressziót az afidikolin, a hidroxiurea, és a nagy mennyiségben alkalmazott timidinnel való kezelés.⁹ A mikrotubulusok megfelelő működésének gátlásával a G₂/M fázisok határán érhetünk el blokkot, melyre a leggyakrabban alkalmazott szerek a nocodazol és a paclitaxel.⁹ Végül, M fázisú populáció szelektív gyűjtésére az úgynevezett mitotikus lerázás által nyílik lehetőségünk. A módszer adherens tenyészetek esetén alkalmazható, melyek a mitózis során kerek formát vesznek fel, adhéziójuk csökken. A módszer során a sejteket előzetes szinkronizációt követően vagy anélkül mechanikai rázásnak tesszük ki, ezáltal a kerek, M fázisban levő sejtek szelektív gyűjtése történik.^{9,10}

I.4. PACLITAXEL

I.4.1. A paclitaxel alkalmazása

A daganatkezelés egyik legfőbb eszköze a sugár- és sebészeti kezelések mellett a kemoterápia. A citotoxikus szerek megjelenése nagy lépést jelentett az onkoterápia területén, mivel ez az egyetlen olyan módszer, amely a betegség szisztémás, egész szervezetet érintő jellegére képes hatni, így nem csupán a szolid tumorok metasztázis-kezelésének kérdésében eredményezett jelentős előrehaladást, hanem még inkább a disszeminált malignus betegségek (leukémiák, limfómák) terápiájában. Ennek ellenére a kemoterápiás szerek elterjedése, újabb ágensek kifejlesztése mellett az elmúlt 40 év során a daganatos megbetegedések mortalitása csupán körülbelül 13%-kal csökkent.¹¹

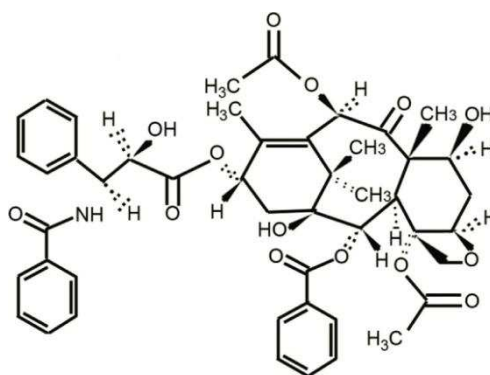
A paclitaxel (taxol) az egyik legismertebb természetes eredetű kemoterápiás szer, melyet elsőként a tiszafa (*Taxus brevifolia*) kérgéből izoláltak.¹² A növényből nyert minták tumorelles hatását felfedezése 1962-re tehető egy, az Egyesült Államokbeli Nemzeti Rákkutató Intézet (NCI, National Cancer Institute) által támogatott program keretein belül. A pontos hatóanyag azonosítása csak néhány évvel később történt meg, majd ezt követően kezdődhetett a paclitaxel biológiai hatásainak részletesebb tanulmányozása. 1977-ben az NCI képes volt igazolni a paclitaxel daganatellenes aktivitását B16 egér melanoma modellen, majd egyéb tumorokkal rendelkező xenograft modelleken is.¹³

A szer daganatellenes hatása napjainkban már igen széles körben igazolt. Az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerellenőrző Hatóság (U.S. Food and Drug Administration; FDA) engedélyezte a paclitaxel klinikai használatát emlő-, ovárium- és tüdőtumorkban, valamint Kaposi sarcoma kezelésében. Off-label módon használatos endometriális, cervix, prosztatata, gastro-oesophageális, illetve fej-nyaki tumorok esetén, valamint egyes sarcomákban, lymphomákban és leukaemiákban.¹⁴ Alkalmazása leggyakrabban 135 mg/m², illetve 175 mg/m² dózisban, 3 vagy 24 óra alatt beadott infúziókban történik, 21 vagy 7 napos kezelési ciklusokban. A taxánokat gyakran alkalmazzák kombinációs kezelésben egyéb kemoterápiás szerekkel vagy radioterápiával, pl. antracyclinekkel,

trastuzumabbal, cyclophosphamiddel vagy platinaalapú ágensekkel az emlőtumorok terápájában.¹⁵¹⁶¹⁷¹⁸

I.4.2. A paclitaxel szerkezete, hatásmechanizmusa

A paclitaxel szerkezetét tekintve egy diterpenoid pseudoalkaloid, melynek empirikus képlete $C_{47}H_{51}NO_{14}$ (**6. ábra**), molekulatömege 853.9 g/mol. A C_{13} atomon elhelyezkedő oldallánc képezi a molekula aktív részét, mely a mikrotubulusokhoz, elsősorban a β -tubulinhoz kötődik.¹³



6. ábra. A paclitaxel kémiai szerkezete

(Kép forrása: Zhang D. és mtsai (2014) *Drug Des Devel Ther.*)

A mikrotubulusok alfa- és béta-tubulindimér molekulákból felépülő polimerek. Elsődleges szerepük a mitotikus orsó felépítése a sejtosztódás során, de emellett vitális interfázis-funkciókban is részt vesznek, így a sejt alakjának fenntartásában, motilitásban, jelátviteli és intracelluláris transzportfolyamatokban.¹⁹ Más mikrotubulusokra ható szerekkel, pl. a kolhicinnel, vinkaalkaloidokkal - melyek a mikrotubulusok felépülését gátolják – ellentétben, a paclitaxel a tubulin-polimerizációt serkenti, illetve annak depolimerizációját gátolja. Az így képződő mikrotubulusok különösen stabilak és diszfunkcionálisak. A mitózishoz és a vitális interfázis-folyamatokhoz szükséges normál mikrotubulus-dinamika hiányának következtében a sejtek a meta/anafázis határán rekednek, majd elpusztulnak.^{19,20}

Mivel a sejtek mitózisban való továbbhaladása gátolt, a blokk a sejtciklus M fázisában következik be.^{1221,22} Amennyiben a blokádot feloldjuk, mielőtt az apoptózis folyamata elindulna, a paclitaxel okozta mitózis-megállást felépülés és a sejtciklusba való továbblépés követheti. Ezáltal érhető, hogy a taxol-indukálta sejthalálnak abszolút feltétele a mitózison való áthaladás.²³ Irodalmi adatok alapján azonban a taxol okozta apoptózis nemcsak a mitózis-megállás következtében, hanem interfázisban levő sejteken való hatás eredményeként is létrejöhet.^{24–26} A szer citotoxikus hatása mégis az M fázis során a legkifejezettebb.²⁷ Csupán 5 nM paclitaxel-koncentráció elég ahhoz, hogy az osztódásban megállítsa, illetve azt követően elpusztítsa a malignus sejteket. Az effektivitás, a szükséges koncentráció és a kezelési időtartam azonban nagymértékben függ a célzott sejtípustól.²⁷ A kezelésnek tehát a sejtciklus dinamikájához szükséges igazodnia. Wang és munkatársai 2013-ban kimutatták, hogy ovárium-sejtvonal szinkronizálása megszünteti a sejtek paclitaxellel szembeni rezisztenciáját.²¹ Emellett a paclitaxel okozta mitózis-megállás és szinkronizáció tumorsejtek radioterápiára való szenzitizációja céljából is hatásosnak bizonyult,^{28,29} ugyanis a G₂, illetve M a sugárterápia szempontjából is legérzékenyebb fázisok.³⁰

I.5. O-GLIKOZILÁCIÓ A SEJTCIKLUSBAN

I.5.1. Poszttranszlációs módosulások a sejtciklus szabályozásában

A sejtciklus folyamatainak összehangolt működése szigorú szabályozás következménye, melyben transzkripció, transzláció, poszttranszlációs, valamint lebomlási folyamatok egyaránt közreműködnek. A sejtciklus minden egyes lépése több száz regulátor befolyása alatt áll. E regulátorok működését intrinzik (mutáció) és extrinzik faktorok (környezeti tényezők, kemikáliák) egyaránt befolyásolhatják, esetenként akár súlyos következményekkel járva. Ilyen következmény lehet malignus tumor képződése, de szerepet tulajdonítanak a sejtciklus-szabályozás zavarainak az Alzheimer-kór, diabetes, illetve egyes autoimmun betegségek pathogenezisében is.^{31–33}

Központi szabályozók a csupán bizonyos fázisokban expresszálódó (ciklikusan kifejeződő) ciklin fehérjék, és a velük komplexet képező ciklin-dependens kinázok

(cdk-k).³⁴⁻³⁶ Ezek, a szintén számos regulátor (pl. p53, p21, p16, cdc25) befolyása alatt álló szerin/treonin kinázok a sejtciklus bizonyos pontjain aktiválódva koordinálják az egyes fázisok közti progressziót. A ciklin és cdk fehérjékkel tucatnyi egyéb kináz és foszfatáz áll kapcsolatban, melyek idő- és térbeli szabályozottságáról kiterjedt ismeretanyaggal rendelkezünk.^{33,37-39} Az utóbbi évtizedekben a foszforiláció mellett azonban egyéb poszttranszlációs módosulások is egyre nagyobb figyelmet kaptak. Így derült fény az ubikvitináció, a SUMOiláció, a poli-ADP-riboziláció, a hiszton-acetiláció és nem utolsósorban az N- és O-glikoziláció jelentőségére a sejtosztódás folyamatában.

40-46

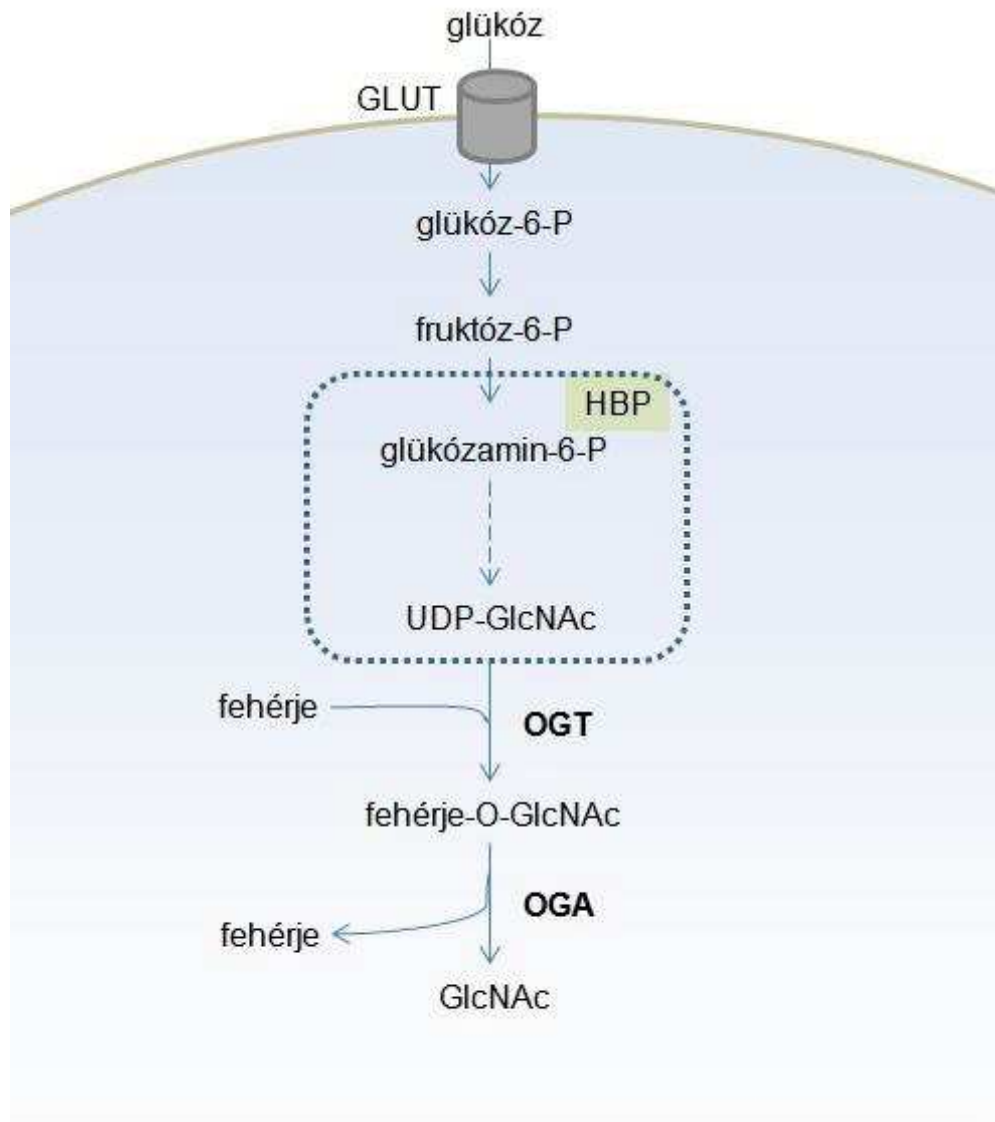
I.5.2. A fehérjék O-típusú glikozilációja

Az O-GlcNAc egy, a fehérjék szerin (Ser) és treonin (Thr) oldalláncait érintő, dinamikus poszttranszlációs módosulás. A folyamat során citoplazmatikus, nukleáris, valamint mitokondriális fehérjék Ser, illetve Thr aminosavainak hidroxilcsoportján keresztül egy O- β -N-acetilglükózamin (O-GlcNAc) kapcsolódás jön létre. Ez a látszólag egyszerű módosulás azonban igen jelentős szerepet tölt be fiziológiás és pathofiziológiás állapotokban egyaránt. Az általa érintett fehérjék száma az egyre javuló technikai feltételeknek köszönhetően (pl. tömegspektrometriai módszerek) az elmúlt néhány évben megsokszorozódott. Napjainkig több mint 3000 O-glikozilált fehérje került leírásra, melyek a génexpresszió, transzláció, fehérjedegradáció, szignál transzdukció, és többek között a sejtciklus-szabályozás szempontjából is kiemelkedő jelentőséggel bírnak.⁴⁷

A fehérjék O-típusú glikozilációjának az O-GlcNAc kapcsolódáson túl ismert formái az O-mannoziláció, O-fukoziláció, O-típusú glükóz-, galaktóz-, vagy N-acetilgalaktózamin(O-GalNAc)-kötés. Ezek egy része (O-mannoziláció, O-fukoziláció, O-GalNAc) ugyancsak Ser és Thr aminosavakat érint, más része azonban egyéb aminosavakon keresztüli kapcsolódást jelöl. A módosulások közt fontos eltérés a kapcsolódó cukoroldallanc típusa és a kötésben résztvevő aminosavak mellett a kötés különböző szubcelluláris kompartmentben való létrejötte is (pl. az O-GlcNAc-tól eltérő módon az O-típusú glükózkötés és az O-mannoziláció folyamata az endoplazmatikus

retikulumban kezdődik).^{48,49} A dolgozat további részében az O-glikoziláció kifejezés alatt az O-GlcNAc-módosulás értendő. Ezt a reakciót két enzim katalizálja: az O-GlcNAc transzferáz (OGT) és az O-GlcNAcáz (OGA). Előbbi felelős az O-GlcNAc oldallánc addíciójáért, utóbbi pedig annak eliminációjáért. A reakció szubsztátja az uridin-difoszfát-N-acetilglükózamin (UDP-GlcNAc), amely a hexózamin bioszintézis útvonal (HBP) végterméke (**7. ábra**). Ebbe, a glükóz-, aminosav-, zsírsav- és nukleotid-metabolizmust összekapcsoló útvonalba lép be a szervezetbe jutó glükóz 2-4%-a.⁵⁰

Az O-glikoziláció a fehérjék aktivitásának módosítása,⁵¹⁻⁵³ degradációtól való védelme,^{54,55} intracelluláris lokalizációjának vagy interakcióinak,⁵⁶⁻⁵⁹ esetleg hidrofobicitásának megváltoztatása révén fejti ki hatását.⁶⁰ Ezáltal számos szinten befolyásolja a sejt működését, így a transzkripcióra, az epigenetikára, vagy éppen a jelátviteli folyamatokra hatva.



7. ábra. A hexózamin bioszintézis útvonal (HBP) és az O-glikoziláció folyamata vázlatosan. (Saját ábra.)

Bár az OGA és OGT enzimek egyaránt megtalálhatók a citoplazmában és a nukleuszban, az OGT dominánsan nukleáris, míg az OGA döntően citoszolikus elhelyezkedésű. ⁶¹⁻⁶³ Nem meglepő ezáltal, hogy már korai tanulmányok a transzkripciós faktorok igen jelentős részének O-típusú glikozilációjáról számoltak be (például a jól ismert p53, c-myc vagy NFκB esetén).⁶⁴ Jelenlegi becslések alapján az O-GlcNAc által módosított fehérjéknek körülbelül 25%-a vesz részt a transzkripció szabályozásában.⁶⁴ A módosítás érintheti a faktor magba történő transzlokációját, DNS-

kötését, transzaktivációját, illetve stabilitását.⁶⁵ Az utóbbi években intenzív kutatások folytak az OGT epigenetikai regulátorokkal való interakcióinak vizsgálatára.^{66–68} Ennek köszönhetően leírásra került az O-glikoziláció hiszton-módosításokkal (acetiláció, metiláció, ubikvitináció) és DNS-metilációval való kapcsolata, bár a mögöttes interakciók részleteiben még nem ismertek.^{66–68} A naszcens polipeptidlánc translációval egy időben történő O-glikozilációja ugyancsak a képződő fehérjemennyiséget szabályozza az ubikvitinációtól, így az azonnali degradációtól védve.⁵⁵ Ugyanígy, a már érett fehérje stabilitásának, élettartamának növeléséhez járulhat hozzá az O-GlcNAc módosulás a poli-ubikvitináció gátlása révén.⁵⁷

A hatások jelentős része azonban nem a proteinszintézis, hanem az egyéb poszttranszlációs módosulások befolyásolása révén történik. Idetartozik az említett ubikvitinációra kifejtett hatás, azonban legrészletesebben az O-GlcNAc foszforilációval való versengése ismert. Létrejöhét kompetíció azonos szerin vagy treonin aminosavért (ún. Yin-Yang helyek), de egymáshoz közeli módosítási helyek is befolyásolhatják egymást (ún. „proximal site effect”).^{69,70} Az O-glikoziláció egyik fontos jellemzője a HBP útvonaltól való függése révén, hogy a sejt metabolikus állapotának befolyása alatt áll. Napjainkban a jelátviteli folyamatokban,⁶⁹ a stressz-adaptációban,⁷¹ de a sejtciklus-szabályozásban betöltött szerepét is számos tanulmány vizsgálja.^{72,73}

1.5.3. Az O-glikoziláció jelentősége a sejtciklus során

Irodalmi adatok alapján az O-GlcNAc státusz manipulálása a sejtciklus progressziójának zavaraihoz vezet.^{74–76} A módosulás optimális mértéke szükséges a megfelelő arányú hiszton-foszforilációhoz,^{77,78} a mitotikus orsó kialakulásához,⁷⁹ illetve a sejtciklusban szintén jelentős szerepet betöltő c-myc fehérje expressziójához is.⁸⁰ Emellett az egyik legmagasabb O-glikoziláltsági fokot mutató fehérjék a maghártyában elhelyezkedő nukleoporinok.^{81,82} Rajtuk keresztül, illetve a transzportálandó fehérjék módosítása révén az O-GlcNAc hatással bír a sejtmag be- illetve kifelé irányuló transzportfolyamataira. Többek között befolyásolja a béta-katenin nukleáris transzportját, mely a wnt jelátvitelben résztvevő transzkripciós koaktivátorként a génexpresszió egyik fontos regulátora, lényeges szerepet tölt be a sejtek

proliferációjában és inváziós képességeiben.⁵⁸ Irodalmi adatok alapján az O-glikoziláció inverz kapcsolatban áll a béta-katenin nukleáris lokalizációjával és transzkripciós aktivitásával. Magas transzkripciós aktivitású tumorsejtekben a fehérje minimálisra csökkent O-GlcNAc módosulását találták, míg egészséges sejtekben a béta-katenin jelentős mértékben O-glikozilált.⁵⁸ Az O-GlcNAc modifikáció hatásait írták le az NFκB aktivációjával és nukleáris transzlokációjával kapcsolatban is. Bár az egyes tanulmányokban eltérő hatásokat észleltek, valószínűsíthető, hogy ennek hátterében különböző glikozilációs helyek, s az általuk kiváltott eltérő hatások állnak.⁸³⁻⁸⁵

Összességében, bár az O-GlcNAc módosításnak a sejtciklus szabályozásában betöltött szerepe vitathatatlan, ezzel kapcsolatban részletes ismeretek még nem állnak rendelkezésre, a globális O-glikozilációs változások sejtciklus - illetve különösen a mitózis - alatti változásairól közölt eredmények pedig ellentmondásosak.^{76,78,86-90}

II. CÉLKITŰZÉSEK

1. A dolgozat alapját képező munka célja egy olyan citotoxikus kezelési séma kidolgozása volt, melyet specifikusan egy sejtvonatra optimalizálunk azért, hogy figyelembe vesszük annak osztódási karakterisztikáját. Az ehhez szükséges lépések a következők voltak:
 - a. Két különböző sejtvonala (Sp2, illetve Jurkat) osztódási ciklusának jellemzése, a duplikációs idő meghatározásán túl az egyes fázisok (különösképpen a G₂ és M fázis) időtartamának megállapítása.
 - b. Időzített, ismétlődő paclitaxelkezelések optimalizálása az Sp2 sejtek ciklusának megfelelően. A kezelések időtartamának és időpontjának meghatározása annak érdekében, hogy az első kezelés által a sejtek nagy hányada szinkronizálódjon, majd az ismételt kezelés minél hatásosabb legyen.
2. Eltérő effektivitás kimutatása az Sp2 és egy tőle eltérő duplikációs idővel rendelkező sejtvonala között, az előbbire optimalizált kezelés révén; a klinikai gyakorlatban megcélozni kívánt tumorsejtek és az eltérő osztódási kinetikával rendelkező egészséges testi sejtek analógiájaként:
 - a. Jurkat sejtvonala osztódási karakterisztikájának megállapítása.
 - b. Jurkat és Sp2 sejteket tartalmazó kokultúra ismétlődő, Sp2 sejtekre optimalizált kezelésének vizsgálata.
3. További cél volt, hogy az O-glikozilációs státusz változásait nyomon kövessük a sejtciklus során. Ennek céljából a következőket végeztük el:
 - a. Paclitaxellel szinkronizált HeLa sejtek O-GlcNAc mintázatának vizsgálata.

- b. Dupla timidin blokk alkalmazása után HeLa sejttenyészet O-glikozilációs státuszának detektálása a sejtciklus különböző fázisaiban, majd szelektív, mitotikus sejtpopulációban ugyanezen vizsgálatok elvégzése.
- c. Magpórusfehérjék O-glikozilációjának detekciója a mitózis során.
- d. Az O-GlcNAc módosulás sejten belüli eloszlásának, citoszkeletális fehérjékkel való esetleges kolokalizációjának analízise.

III. ANYAG ÉS MÓDSZER

III.1. SEJTKULTÚRÁK

Vizsgálatainkat HeLa (ATCC CCL-2 humán cervixcarcinomából származó epithelsejtek), Sp2 (ATCC CRL-1581 egér hybridoma), valamint zöld fluoreszcens proteint (GFP) tranziensen expresszáló Jurkat (ATCC TIB 152 humán akut T-sejtes leukaemia) sejtvonalakon végeztük. (A sejtvonalak a PTE Immunológiai és Biotechnológiai Intézetéből Dr. Balogh Péter és Dr. Boldizsár Ferenc ajándéka).

A tenyésztés EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) és Ham's F12 médiumok 1:1 arányú keverékében történt, mely 10% főtális borjúsérumot (FBS), 1% nem-esszenciális aminosavkeveréket, penicillint (100 U/ml) és streptomycint (100 µg/ml) tartalmazott. A kultúrákat 37 °C-os hőmérsékletű, 5% CO₂-t tartalmazó, párásított atmoszférájú termosztátban tenyésztettük. A sejtek passzálása 2-3 naponta történt. A kísérleteket 12-24 órával megelőzően a sejteken médiumcserét végeztünk.

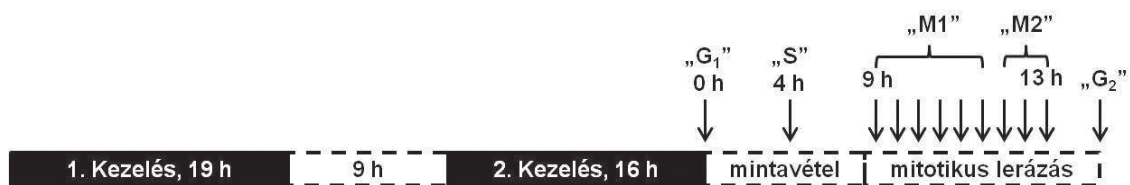
III.2. SEJTSZINKRONIZÁLÁS

III.2.1. Paclitaxelkezelés

A kezelésekhez friss, 6 mg/l-es paclitaxel törzsoldatot használtunk, melyet a kereskedelmi forgalomban levő, humán gyógyászatban alkalmazott 6 mg/ml-es paclitaxel oldatból (Teva Gyógyszergyár Zrt.) készítettünk. A kezelések komplett médiumban történtek 0.05 mg/l koncentrációjú paclitaxellel, 37°C-os, 5% CO₂-tartalmú, párásított levegőjű inkubátorban. Ezt követően a sejteket centrifugáltuk (500 RCF, 5 perc) és háromszor mostuk tiszta, paclitaxelmentes, teljes médiumban a citotoxikum maradéktalan eltávolítása céljából, majd teljes, paclitaxelmentes médiumban történő reszuszpendálás után a sejteket különböző ideig inkubáltuk. A kísérletek egy részében ezt egy második paclitaxelkezelés (0.05 mg/l, 8 órán át) követte, mely után ismételt regenerálódási fázis történt. (**12.A ábra**)

III.2.2. Dupla timidin blokk

Dupla timidin blokkal való szinkronizálás során adherens HeLa sejtenyészetet ~40%-os konfluencia elérésekor vetettünk alá kezelésnek. Ennek során 2 mM timidint adtunk a sejtenyésztő médiumhoz, melyet 19 órán át tartó inkubációs periódus követett 37 °C-on (8. ábra). Ezt követően a sejteket 9 órán át timidinmentes médiumban tartottuk. Végül ismét 2 mM timidintartalmú médiumban való inkubáció történt 16 órán át, majd a sejteket friss, komplett médiumban reszuszpendáltuk. A mintavételt a timidin blokk feloldása után közvetlenül, illetve 4 óra elteltével végeztük, hogy G₁ és S fázisú sejtpopulációkat gyűjtsünk. A szinkronizáció sikerességét propídium-jodiddal kombinált flow cytometriás analízissel ellenőriztük.



8. ábra. A dupla timidin blokk és a mitotikus lerázás sémája.
(Saját ábra.)

III.2.3. Mitotikus lerázás

Annak érdekében, hogy a mitózis fázisában levő, szelektívebb sejtcsoportot nyerjünk, a dupla timidin blokkot követő mitotikus lerázás módszerét választottuk. 9-13 órával a timidin blokk feloldása után 25 percenként erős mechanikus rázásnak tettük ki a tenyészetet, mely által a lekerekedett, mitotikus sejtek a tenyésztőflaskától elváltak és összegyűjtöttük őket. Az első 6 („M1”) és az utolsó 3 („M2”) frakciót pooloztuk, majd az utolsó lerázást követően a flaskában kitapadva maradt sejtek szolgáltatták a G₂ fázisú mintákat (8. ábra).

III.3. SEJTSZÁMLÁLÁSI MÓDSZEREK

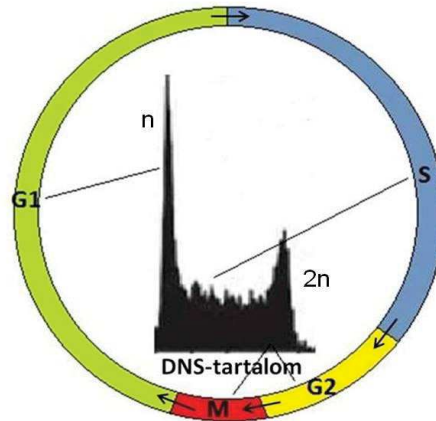
Méréseink során különböző sejtszámlálási módszereket használtunk. HeLa sejtek esetén a számlálás célja az volt, hogy különböző időpontokban meghatározzuk az éppen mitózisban lévő, lekerekedett sejtek mennyiségét. Ehhez a szinkronizált sejttenyészetben a dupla timidin blokk után a **8. ábrán** megjelölt időpontokban Leica DM IL inverz mikroszkóp alatt, 10x objektívet használva meghatároztuk a kerek sejtek számát legalább 5 látótérben. Minden számlálás után erőteljes rázással eltávolítottuk a lekerekedett sejteket a flaskából, így a következő időpontban csupán az újonnan mitózisba lépett sejtek kerültek a számlálásba.

Paclitaxellel végzett kísérleteink során a számlálás célja az élő sejtek mennyiségének meghatározása, illetve kokultúrában a Jurkat és Sp2 sejtek arányának megállapítása volt. Ennek megfelelően a sejtszámokat a kiindulási időpontban, majd a kísérletek során tripánkéék festék segítségével, haemocytométerrel határoztuk meg, sztereomikroszkóp alatt. Röviden, 90 μ l homogén sejtszuszpenzióhoz kevertünk 10 μ l 2% tripánkéeket tartalmazó 0.9%-os nátriumklorid-oldatot, majd a sejteket azonnal megszámláltuk haemocytométer segítségével. Azokat a sejteket tekintettük élőknek, melyek a tripánkéeket nem vették fel. A sejtszámokat a haemocytométer legalább 18 régiójából származó értékek átlagaként határoztuk meg, melyet elosztottunk a kísérlet kezdetén kapott átlagos sejtszámmal.

A Jurkat és Sp2 kokultúrában történt vizsgálatok során a két sejttípus arányát homogén sejtszuszpenzióban, flow cytometriával (Cytomics FC 500 flow cytometer, Beckman Coulter) mértük. A GFP-pozitív Jurkat-sejtek Sp2-sejtektől való elkülönítése az előre irányuló fényszórás (forward scatter, mely arányos a sejt mérettel), valamint az 525 nm-en (FL1 csatorna) mért fluoreszcenciaintenzitás szimultán detekciójával történt. Minden kísérletben azonos szelekciós régiókat használunk és 10000 partikulumot detektáltunk.

III.4. SEJTCIKLUS-ANALÍZIS

A sejtciklus vizsgálatát flow cytometria segítségével végeztük permeabilizált sejteken, propídium-jodiddal (PI) való jelölést követően. Ez a fluoreszcens festék a DNS-t kvantitatívan festi. Az így megjelölt sejtek megfelelő hullámhosszon mért fluoreszcenciaintenzitása tehát korrelál azok DNS-tartalmával. Mivel a DNS-mennyiség megkettőződése az S fázis során történik, a G_0 és G_1 fázisban levő sejtek aránya jól elkülöníthető a G_2 és M fázisban levőkéitől a módszer segítségével. A G_0/G_1 , illetve G_2/M fázisokon belüli további differenciálás azonban nem lehetséges. A G_2/M fázisú sejtek fluoreszcenciája kétszerese lesz a G_0/G_1 fázisú sejtekének (9. ábra).



9. ábra. A DNS-mennyiség változása a sejtciklus során propídium-jodid jelölés alapján. (Saját ábra)

A méréshez adherens sejtek esetében először a tenyésztőflaskától való elválasztásra volt szükség, amely 0.25% tripszint és 0.5 mM EDTA-t tartalmazó foszfát pufferes sóoldatban (PBS) való 3 perces kezeléssel történt 37°C-on. Ezután a tripszin neutralizálása céljából a reszuszpendált sejteket komplett médiumban mostuk. Az ezt követő lépések az adherens és a szuszpenziós kultúrák esetén megegyeztek. PBS oldattal történő mosás után körülbelül 10^6 sejthez cseppenként 1 ml jéghideg, 97%-os etanolt adtunk alapos vortexelés közben. Az etanollal fixált sejteket 4 °C-ra helyeztük legalább 15 percig, majd háromszori PBS-es mosást követően propídium-jodid (PI)

oldatban (PBS, 0.1% Triton-X 100, 20 µg/ml PI, 0.2 mg/ml RNáz A) reszuszpendáltuk őket. Szobahőmérsékleten, sötétben történő 30 perces inkubáció után a fluoreszcenciaintenzitást Cytomics FC 500 flow cytometerrel, 620 nm hullámhosszon (FL3 csatorna) detektáltuk. A kapuzási beállítások és a régiók (G₀/G₁, S és G₂/M fázis) aszinkron sejteken történő kijelölése után minden minta esetén azonos beállításokat alkalmaztunk.

III.5. WESTERN BLOT, IMMUNPRECIPITÁCIÓ

Western blot vizsgálatainkhoz HeLa sejteket PBS oldatos mosást követően jégen tartott RIPA pufferbe gyűjtöttünk össze (10 mM Tris pH 7.2, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% SDS, 1% Triton-X 100, 0.5% dezoxikolat, 10% glicerol, proteáz inhibitor cocktail: 1 tabletta/10 ml (Roche)). A mintákat 30 perces inkubáció után 10 percig, 4°C-on, 3000 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk. A felülúszó fehérjetartalmának meghatározását Bio-Rad DC Assay Kit segítségével végeztük el, majd a lizátumokat Laemmli-pufferrel kiegészítve (4x törzsoldat: 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8, 40 v/v% glicerol, 27.74 mM SDS, 8 v/v% β-merkapto-etanol, 0.01 v/v% brómfenolkék) 5 percig forraltuk. Az immunprecipitációs vizsgálatra szánt sejtek lízise IP pufferben történt (25 mM Tris pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X 100, 5% glycerol, 1 tabletta/10 ml proteáz inhibitor cocktail, 0,05% Na-azid és 100 µM O-(2-acetamido-2-deoxi-D-glukopiranozilidén)-amino-N-fenilkarbamát (PUGNAc)). Az immunprecipitáció során a lizátumot egy éjszakán át, 4°C-on MAb414, magpórusfehérjék ellen termeltetett egér monoklonális antitesttel inkubáltuk, majd az elegyhez Protein A szefaróz gyöngyöket (Sigma-Aldrich) adtunk. Három órán át történő további inkubációt követően a gyöngyöket centrifugálással összegyűjtöttük, a nem kötődött fehérjéket mosással eltávolítottuk. A kikötődött fehérjéket végül 0.1 M, pH 2.8 glicinoldattal eluáltuk, és a mintákhoz 4x Laemmli-puffert adtunk.

A fehérjéket ezután SDS-tartalmú, 8%-os poliakrilamid gélelektroforézissel szeparáltuk, majd polivinil-difluorid (PVDF) membránra elektroblottoltuk (Millipore). A membránok összfehérje-jelölése SYPRO Ruby Protein Blot Stain (BioRad) segítségével

történt a gyártó utasításainak megfelelően. A membránokat blokkolást követően O-GlcNAc ellenes CTD110.6 (egér monoklonális IgM, 1:2000, Sigma-Aldrich), szintén O-GlcNAc ellenes RL2 (egér monoklonális IgG, 1:1000, Thermo Fisher Scientific), MAb414 (1:1000, Biolegend), illetve anti-aktin (nyúl poliklonális ellenanyag, 1:1500, Sigma-Aldrich) elsődleges antitestekkel jelöltük, a gyártók által javasolt protokoll szerint. Végül, a megfelelő, tormagyökér peroxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel (1:2500) való inkubáció történt. Az előhívást Femto kemilumineszcens szubsztráttal (Thermo Fisher Scientific) végeztük, Kodak Image Station 2000r készülékkel vizualizálva. A kapott jeleket Kodak 1D és ImageJ analízis szoftverrel értékeltük ki.

III.6. IMMUNFLUORESZCENCIA

HeLa sejteket ~50% konfluencia eléréséig fedőlemezeken tenyésztettünk, kétszer jéghideg PBS oldattal mostuk, majd 10% formaldehid-tartalmú PBS-ben, 30 percen át fixáltuk őket. Ezután a formaldehid autofluoreszcenciájának kioltása céljából 10 percig, 50 mM ammónium-klorid-oldatban való inkubáció következett, majd a sejteket 0.25% Triton-X 100 oldattal permeabilizáltuk.

A nem-specifikus kötőhelyeket 5% borjú szérum albumint tartalmazó PBS oldattal blokkoltuk 30 percig. Az elsődleges ellenanyagokkal való jelölés (CTD110.6 (1:200), RL2 (1:100), anti- α -tubulin (Sigma-Aldrich, 1:100)) 5% BSA/PBS-ben, 2 órán át történt szobahőmérsékleten. Háromszori PBS-es mosást követően a másodlagos antitestes jelölést 1 órán át, sötétben végeztük. Az aktin láthatóvá tételéhez phalloidin-Alexa Fluor 488 konjugátumot (Thermo Fisher Scientific, 1:20), a magfestéshez Hoechst festéket (0,24 μ g/ml, 15 min) használtunk. Végül a fedőemezeket Vectashield (Vector Laboratories) fedőmédiával tárgylemezeken rögzítettük.

A fotókat CellID (Olympus) szoftverrel felszerelt Zeiss Axiovert 35 inverz fluoreszcens mikroszkóppal készítettük, a konfokális képeket pedig Zeiss LSM 710 konfokális lézer scanning mikroszkóp és ZEN szoftver segítségével, 63x objektívvel.

III.7. ADATELEMZÉS

Eredményeinket GraphPad Prism szoftverrel értékeltük ki. A statisztikai analízist Student-féle t-próbával, többszörös összehasonlítások esetén pedig egyutas ANOVA-t követő Bonferroni poszt-hoc teszttel végeztük. A csoportok közötti eltéréseket $p < 0.05$ érték esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

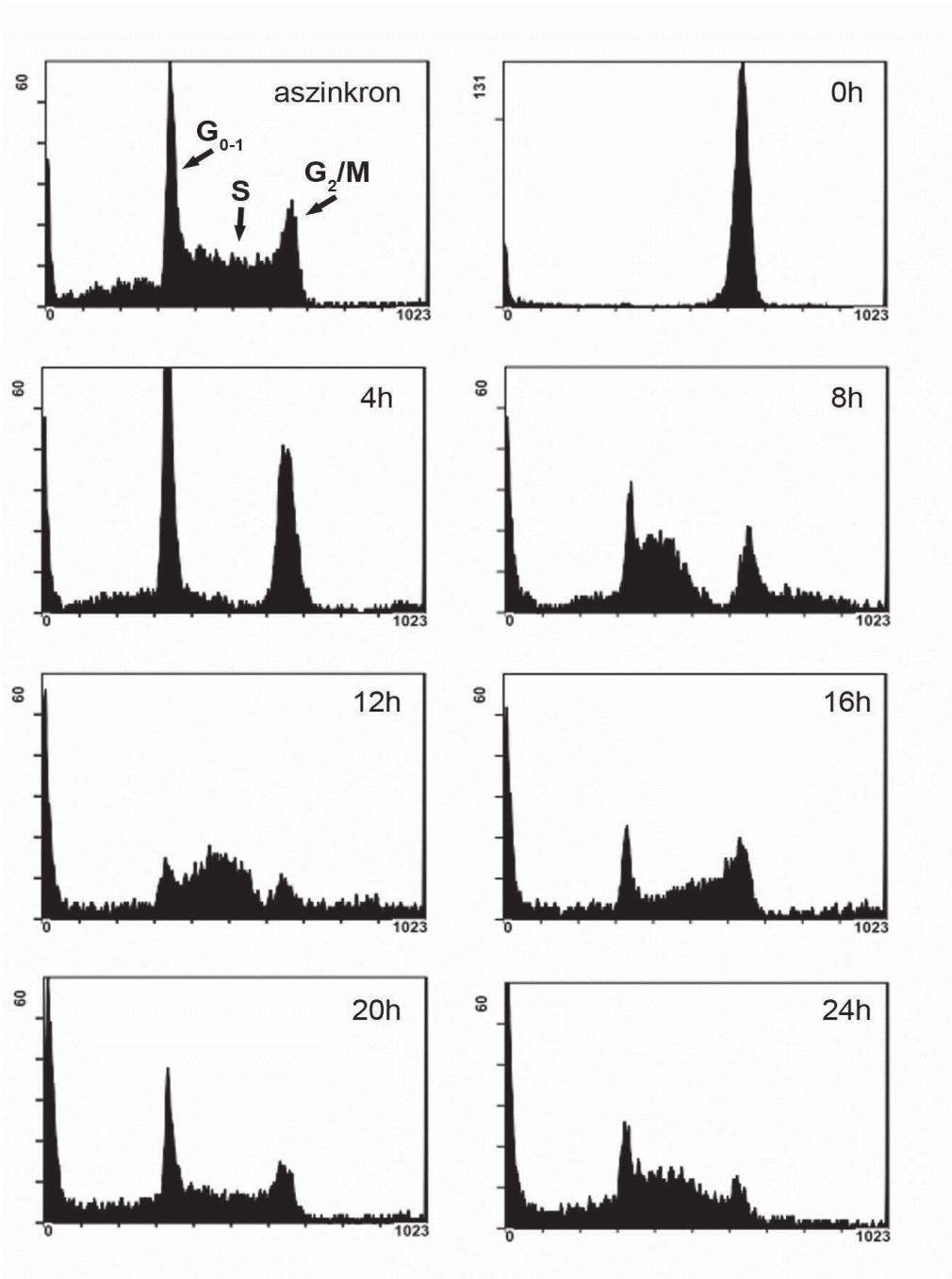
IV. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

IV.1. CITOTOXIKUS HATÁS OPTIMALIZÁLÁSA SEJTCIKLUS- FÜGGŐ, IDŐZÍTETT KEZELÉSSSEL

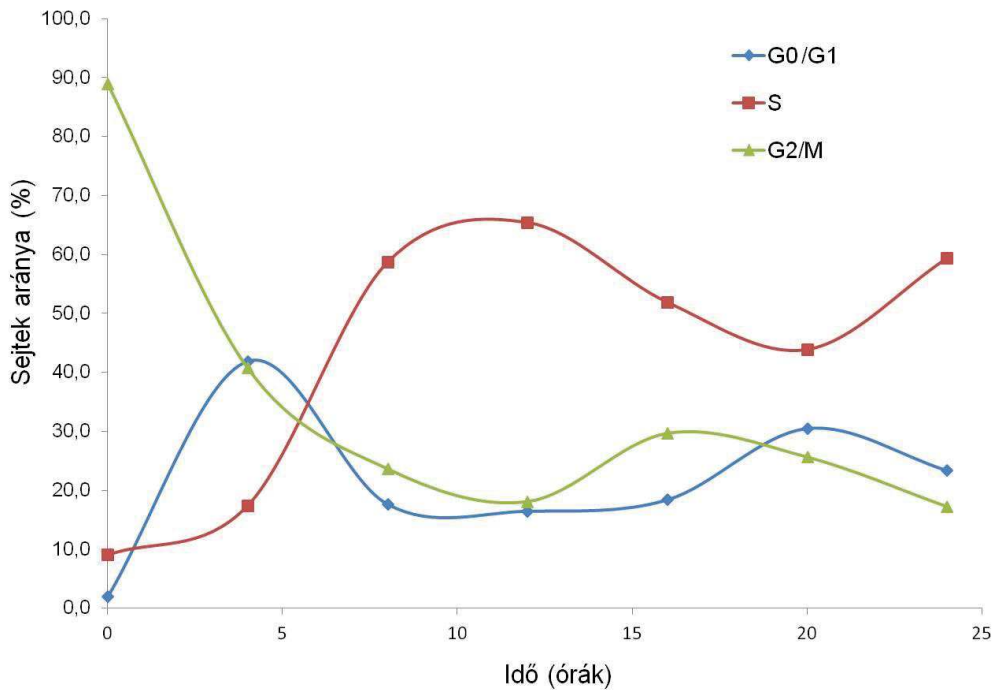
IV.1.1. Eredmények

IV.1.1.1. Sp2 sejtek szinkronizálása paclitaxellel

Előzetes kísérleteink során 0.03-0.1 mg/l koncentrációjú, 12-15 óra időtartamú paclitaxelkezelés elegendőnek bizonyult ahhoz, hogy az Sp2 sejtek a G₂/M fázisban rekedjenek anélkül, hogy elindulna az apoptózis. Ezért vizsgálatainkhoz 0.05 mg/l koncentrációjú paclitaxelkezeléseket alkalmaztunk, 14 órán át. Ezáltal átmenetileg blokkoltuk a sejteket a G₂/M fázisban, majd a szer alapos kimosásával a blokádot feloldottuk. A kísérletek szempontjából ezt tekintettük kiindulási időpontnak (0 h). Amint az a **10. és 11. ábrákon** látható, az alkalmazott kísérleti beállítás komplett, átmeneti blokkot eredményezett a G₂/M fázisban, és annak megszüntetését követően a sejtek képesek voltak továbbhaladni a következő sejtciklusba. A szinkronizációt követően a G₀/G₁, S, illetve G₂/M fázisban levő sejtek arányát 4 óránként meghatároztuk. A propídium-jodiddal jelölt fixált sejtek fluoreszcenciaintenzitását flow cytometer FL3 csatornáján mértük, melynek eredménye a **10. és 11. ábrán** látható.



10. ábra. Paclitaxel-szinkronizációt követő sejtciklus-analízis. A kezelés után 4 óránként vett sejtminták propidium-jodiddal való jelölése és flow cytometriás vizsgálata (FL3 csatornán mért fluoreszcenciaintenzitás)



11. ábra. Az Sp2 sejtek aránya a G₀/G₁, S és G₂/M fázisban a szinkronizáció utáni időszakban.

Mivel az egymást követő azonos fázisokat (pl. S-S vagy G₂/M-G₂/M) jelölő csúcsok közt eltelt idő hozzávetőlegesen 16 óra volt, az Sp2 sejtek teljes sejtciklusának ideje is körülbelül 16 órára volt tehető. Teljes, szinkronizált sejt kultúra egyes fázisainak az időtartama azonban nem csupán egy-egy individuális sejtnek az adott fázisban eltöltött idejét jelenti. Megállapításánál ugyanis az ún. késlekedési időt (T_d , delay time) is figyelembe kell venni, mely a fázisba elsőként és utolsóként belépő sejt közt eltelt időtartamot fejezi ki. A teljes populációra vonatkoztatott fázisidőket (T_{total}) a következő képlet szerint határoztuk meg:

$$T_d + T_{fázis} = T_{total},$$

ahol $T_{fázis}$ az egy-egy sejt által a fázisban töltött átlagos idő. T_{total} a teljes időtartam, mely a populáció első sejtjének a fázisba való belépésétől az utolsónak abból való kilépéséig eltelik (ez utóbbi a flow cytometriás mérési csúcs kezdetétől a végéig eltelt idő is egyben, pl. 0-8 h a G₀/G₁ fázisban, **11. ábra**). A fenti képletet a sejtciklus minden

egyens fázisára alkalmazva a következő értékeket kaptuk: $G_0/G_1 \approx 1.5$ óra, $S \approx 9.5$ óra, $G_2/M \approx 5$ óra, $T_d \approx 6.5$ óra.

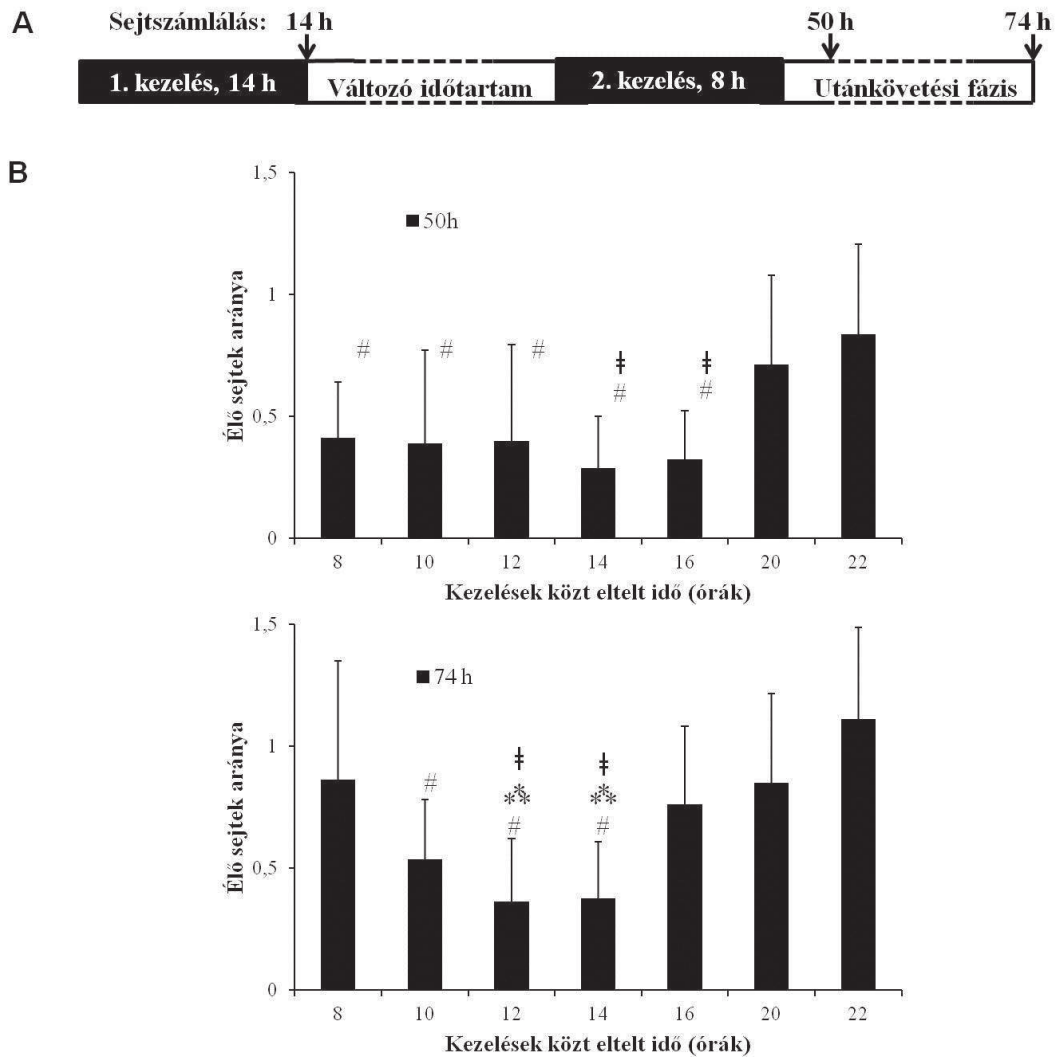
IV.1.1.2. Az időzítés jelentősége a paclitaxel citotoxikus hatásában

Mivel a paclitaxel főként a mitózis alatt fejt ki hatását, abból a feltételezésből indultunk ki, hogy létezik egy periódus a sejtek osztódási ciklusa során, mely alatt érzékenyebben reagálnak a következő kezelésre, nevezetesen a G_2/M fázis körüli időszak. E hipotézis vizsgálatához Sp2 sejteket paclitaxellel szinkronizáltunk, majd egy megfelelő időtartamú és optimálisan (a G_2/M fázis lezajlásakor) időzített második kezeléssel törekedtünk a legmagasabb citotoxikus hatás elérésére.

A második kezelés időtartamának meghatározásakor figyelembe kellett venni, hogy annak éppen elég hosszú ideig kell tartania ahhoz, hogy a legtöbb sejt belépjen a G_2/M fázisba (a számított 6.5 órás T_d értéknél hosszabb) és ott megállva időt töltsön. Feleslegesen hosszú kezelési idő azonban a későbbi, más sejtípussal egy időben történő kezeléseket miatt is kerülendő volt. Az így választott 8 órás időtartam a vizsgálatok szempontjából megfelelőnek bizonyult. A második kezelés optimális időpontjának megállapításához azonos kiindulási sejtszámú kultúrákon különböző kezelési sémák hatékonyságát hasonlítottuk össze. Az első, szinkronizáló kezelés minden esetben 0.05 mg/l paclitaxellel történt, 14 órán át. Mivel ~ 16 óra elteltével volt várható a következő G_2/M fázis időpontja, a szinkronizált sejteket 8-22 óra közötti időtartamra hagytuk ciklusukban továbbhaladni paclitaxelmentes médiumban, majd tettük ki őket a második kezelésnek (0,05 mg/l, 8 órán át). Végül a sejtek ismét citosztatikummentes médiumba kerültek, melyből a kiindulási időponttól számított 50. órában, majd 24 óra elteltével (74. óra) tripánkék exklúziós festék segítségével meghatároztuk az élő sejtek számát (**12.A és B ábra**).

Eredményeink alapján a második kezelés akkor volt a leghatásosabb, ha $\approx 12-14$ órával az első kezelés végét követően indult és 20-22 órával azután fejeződött be. Ezzel szemben, amennyiben a második kezelés az első követő 22-30 órával - vagyis számításaink alapján a következő G_2/M fázis lezajlása után - történt, szignifikánsan több

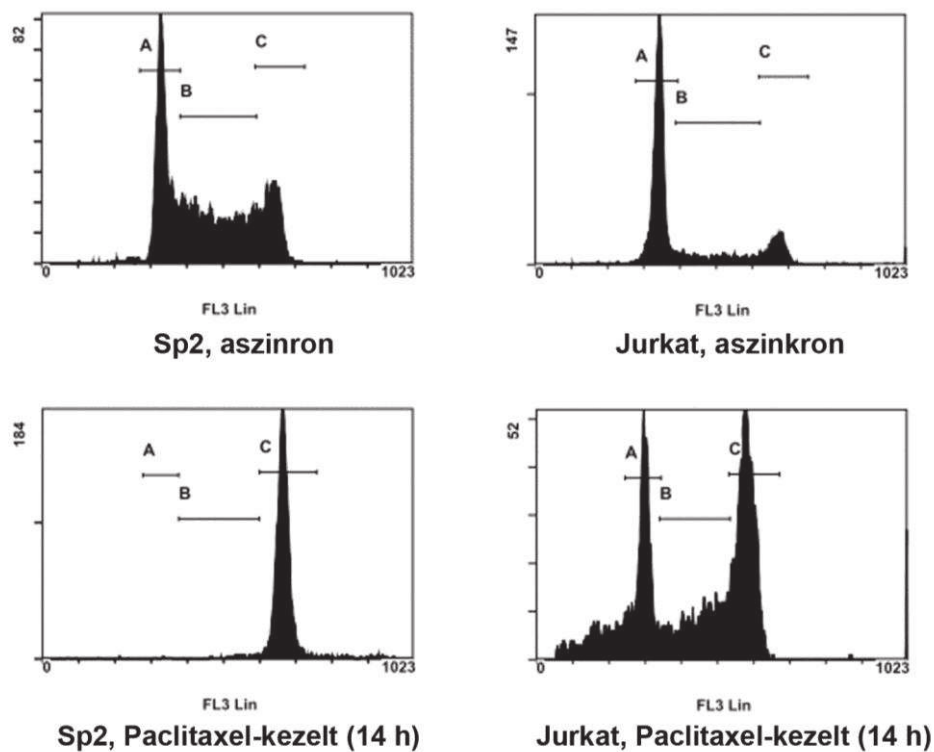
túlélő sejt maradt. Az optimális és szuboptimális időzítés közti különbség a kezeléseket követő 2 napon keresztül továbbkövethető maradt. (12.B ábra)



12. ábra. Az időzítés hatása az *Sp2* sejteken végzett, ismétlődő paclitaxelkezelés hatékonyságára. (A) A kísérleti protokoll sémája. (B) Az élő sejtek aránya 50 és 74 órás időpontban a különböző (8-22 óra) késleltetési idejű kísérletekben. Az adatok három független kísérlet átlagai \pm SD. * $p < 0.05$ a 8 órás késleltetési idejű kísérlettel szemben, ** $p < 0.05$ a 16 órás, † $p < 0.05$ a 20 órás, †† $p < 0.05$ a 22 órás késleltetési idejű kísérlethez képest.

IV.1.1.3. Sejtvonalak differenciálása ismételt, időzített kezelések által

Kísérletsorozatunk utolsó lépéseként megvizsgáltuk, hogy egymást követő paclitaxelkezelések segítségével elérhető-e effektívitasbeli különbség két, eltérő sejtciklus-karakterisztikával bíró sejtvonal között. E célból Jurkat sejteket kevertünk össze az Sp2 sejtvonallal. Előzetes vizsgálatok alapján a Jurkat sejtek ciklusideje hozzávetőlegesen 24-36 órának bizonyult az Sp2 sejtekével megegyező tenyésztési körülmények között (az adatokat nem tüntettük fel). A két sejtvonal egymástól való könnyebb elkülönítése céljából olyan Jurkat sejtvonalat használtunk, mely zöld fluoreszcens proteint (GFP-t) expresszál. Elsőként a két sejtvonal aszinkron tenyészetének sejtciklus-jellemzőit hasonlítottuk össze, majd ugyanezt elvégeztük 14 óra időtartamú, 0.05 mg/l paclitaxelkezelést követően (mely az Sp2 sejtvonal számára optimális, **13. ábra**).



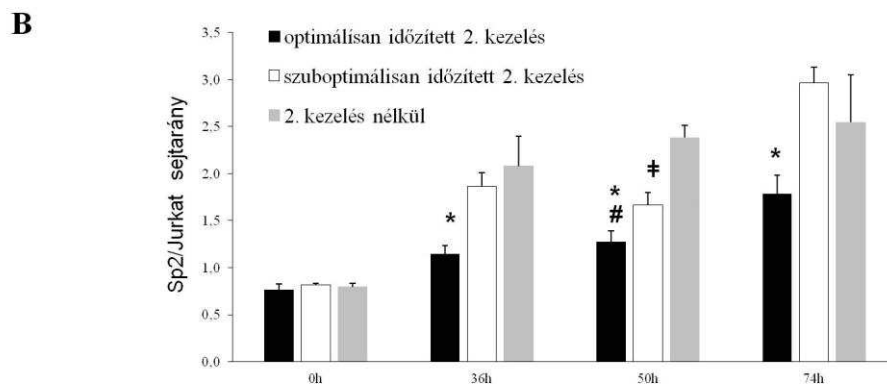
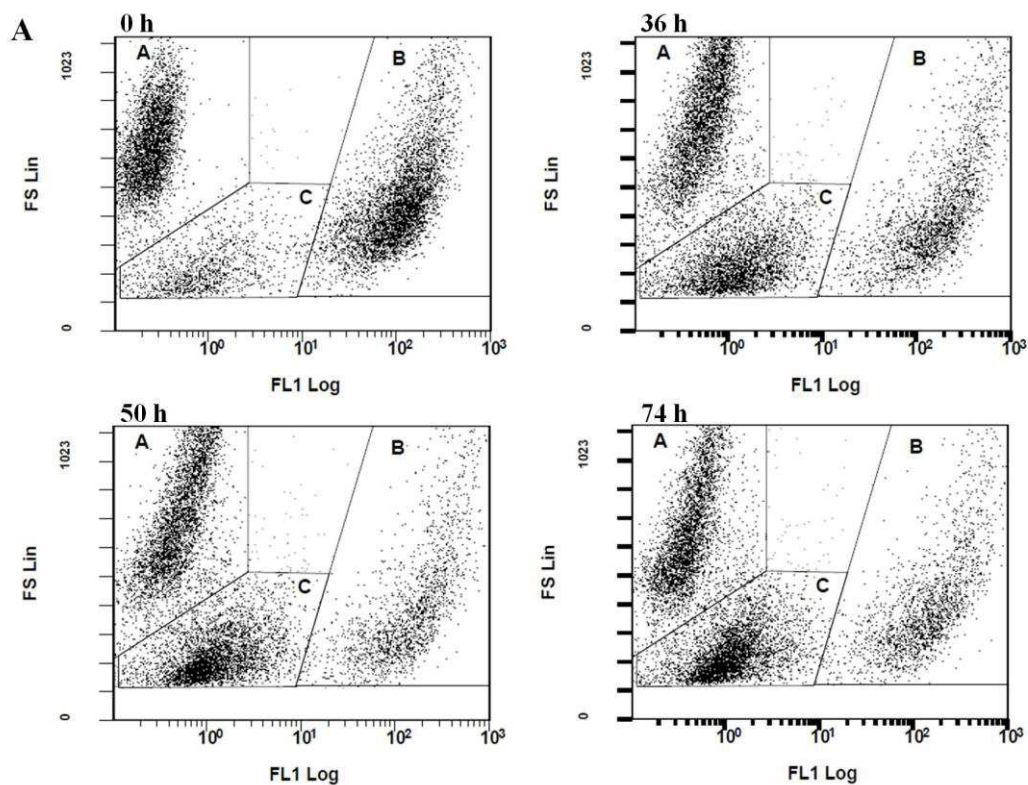
13. ábra. Azonos időtartamú paclitaxelkezelés szinkronizációs hatása két különböző sejtvonalon. A sejtciklus-analízis a fixált sejtek propidium-jodidos jelölését követően flow cytometriával történt. Fent látható a sejtfázisok aszinkron állapotú megoszlása, az alsó sorban pedig a 14 órás kezelést követő mintázat. A régiók jelölése minden ábrán a következő: G_0/G_1 (A), S (B), G_2/M fázis (C).

A Jurkat sejtek esetén a gyorsan osztódó Sp2 sejtekre optimalizált 14 órás kezelés hatékonysága alacsonyabb volt, csak kismértékű szinkronitást eredményezett. A különböző fázisú sejtek arányát aszinkron állapotban, illetve a 14 órás paclitaxelkezelést követően a **2. táblázat**ban foglaltuk össze.

Fázis	Sp2		Jurkat	
	Aszinkron	Kezelt	Aszinkron	Kezelt
G ₀ /G ₁	37.7 (±1.4) %	2.5 (±0.9) %	55 (±3.4) %	34.4 (±3.8) %
S	40.2 (±5.2) %	5 (±0.8) %	23.5 (±4.3) %	24.3 (±3.6) %
G ₂ /M	22.5 (±3.8) %	92.4 (±1.5) %	21.5 (±1.5) %	41.3 (±7.4) %

2. táblázat. Sp2 és Jurkat sejtek megoszlása a különböző fázisok között aszinkron állapotban, illetve 14 órás 0.05 mg/l paclitaxelkezelést követően.

Ezt követően az Sp2 és Jurkat sejtvonalat kezdetben (0h) 1:1 arányban elegyítettük egymással és szintén 14 órán át 0.05 mg/l koncentrációjú paclitaxelkezelésnek vetettük alá, majd a szer kimosását követően a sejteket hagytuk felépülni. A két sejttípus mennyiségének követése céljából ismételt, fixálás nélküli flow cytometriás méréseket végeztünk a kezelés kezdetétől számított 36., 50. és 74. órában. A két sejttípust az előreirányuló fényszórás (forward scatter, FS) és a zöld fluoreszcenciaintenzitás (FL1 csatorna, GFP) alapján különítettük el egymástól. Abban az esetben, amikor az első kezelést nem követte újabb paclitaxelterápia, az Sp2 sejtek gyorsan túlnőtték a Jurkat sejteket (**14.A és B ábra**). A második kezelés a korábbi mérésekre alapozva 22 órával az első végét követően kezdődött, hogy az „szuboptimális” legyen, míg az „optimális” időzítés 14 óra elteltével történt. A szuboptimális időszakban alkalmazott kezelés után az Sp2/Jurkat sejtarány a második kezelés nélküli eredményeket közelítette. Ugyanakkor, ha az első paclitaxellel történő inkubációt optimálisan időzített ismételt kezelés követte, az Sp2/Jurkat sejtarány az Sp2 sejtek gyorsabb osztódása ellenére az utánkövetési idő végéig szignifikánsan alacsonyabb maradt.



14. ábra. Ismétlődő paclitaxelkezelés időzítésének hatása eltérő sejtciklus-karakterisztikával bíró sejtvonalakra. (A) Egyszeri paclitaxelkezelés hatása az 1:1 arányban kevert Sp2 és GFP⁺ Jurkat sejtek elegyére. Az ábrákon „A”-val jelzett régióban láthatók az Sp2 sejtek, a „B” régióknak felelnek meg a GFP-t expresszáló Jurkat sejtek, a „C”-vel jelzett terület a sejtörmeléket reprezentálja. (B) Ismétlődő paclitaxelkezelés optimális és szuboptimális időzítésének hatása az Sp2 és GFP⁺ Jurkat sejtek 1:1 arányú kokultúrájára. Az eredményeket átlag ±SD-ként tüntettük fel. * $p < 0.05$: optimális versus szuboptimális kezelés, # $p < 0.05$: optimális versus 2. kezelés nélkül, † $p < 0.05$: szuboptimális versus 2. kezelés nélkül.

IV.1.2. Megbeszélés

A jelenlegi onkológiai kezelések adott diagnózissal bíró betegek esetében meghatározott, azonos időzítésű és időtartamú kezelési protokollok alapján történnek. Munkánk során paclitaxelt alkalmazva mind a sejtciklusban való szinkronizáció, mind a citotoxikus hatás elérése céljából, egy ismétlődő, időzített kezelési tervet dolgoztunk ki az Sp2 sejtvonal osztódási dinamikájára alapozva. Ennek segítségével jelentős mértékben javítani tudtuk a paclitaxel által kifejtett citotoxikus hatást.

A kidolgozott kezelési séma segítségével ezután szelektíven céloztuk az Sp2 sejteket a hosszabb duplikációs idejű Jurkat sejtvonallal való kokultúrában. Kimutattuk, hogy az ismétlődő kezelések optimális időzítése révén két különböző osztódási kinetikával rendelkező sejtvonal között különbség tehető. Az Sp2 sejtvonalra optimalizált, megfelelően időzített, ismétlődő paclitaxelkezelés jelentősen hatékonyabbnak bizonyult, mint a Jurkat sejtek ellen. Eredményeink szerint a malignus sejtek osztódási ciklusának analízise és az erre alapulóan tervezett kemoterápiás rezsimek segítségével javítható volna a tumorelles terápia hatékonysága.

A daganatellenes terápia kimenetelének jóslására több sejtciklus-kinetikát leíró paraméter alkalmazhatóságának vizsgálata szerepel az irodalomban. Az eddigi tanulmányok azonban leginkább a radioterápia hatékonyságával, annak esetleges fokozásával kapcsolatban történtek. A vizsgált paraméterek közé tartozik például a bróm-dezoxiuridin (BrdU)-jelölődési index és a belőle származtatott potenciális duplikációs idő (potential doubling time – T_{pot}). Ez utóbbi a tumorsejtek elméleti duplikációs idejét jelenti, amely abban az esetben állna fenn, ha nem lenne sejtpusztulás, vagyis minden sejt osztódna.^{91,92} Eredményeink szintén azt mutatják, hogy a citotoxikus kezelés hatékonyságát a sejtciklus-jellemzők (duplikációs idő, sejtek megoszlása az egyes fázisok között, illetve a fázisok időtartama) jelentős mértékben befolyásolják. A jelenlegi onkoterápiás gyakorlat e tényezőket még figyelmen kívül hagyja, bár nagy valószínűséggel igen hasznos volna a kezelések megkezdése előtt az adott tumor sejtciklus-analízise, majd egyénre szabott kezelési sémák alkalmazása.

A sejtciklus-jellemzők mérésére napjainkban már számos módszer áll rendelkezésre. *In vivo* BrdU beadását követő késleltetett biopszia lehetővé teszi a malignus sejtek

potenciális duplikációs idejének (Tpot) becslését.⁹² A módszer azon alapul, hogy a BrdU mint pirimidinanalóg, az S fázisban történő DNS-szintézis során inkorporálódik a sejtmagba. Ezáltal *in vivo* BrdU-infúziót követő flow cytometriás analízis alapján nemcsak az aktuálisan DNS-t szintetizáló sejtek aránya határozható meg, hanem számítások alapján a DNS-szintézis idejéről is nyerhető információ.⁹³ Biopsziás mintából vett sejtek sejtciklus-analízise a DNS-mennyiség alapján, DNS-festék, pl. propídium-jodid használata és flow cytometria vagy mikroszkópia segítségével szintén lehetséges volna. Ugyanakkor noninvazív technikák mint pl. MRI is használható lenne az osztódó sejtek arányának megítélésére.⁹⁴ Igaz, a felsorolt módszerek mindegyike rendelkezik limitációkkal. A BrdU esetleges mellékhatásairól, sejtciklus-karakterisztikát módosító tulajdonságairól az utóbbi évek kutatásai számoltak be.⁹⁵ Emellett ahhoz, hogy a DNS-mennyiség analízise flow cytometriával kivitelezhető legyen, különálló tumorsejtek szuszpenzióját szükséges előállítani, amely bizonyos tumorszövetek esetében nehézkes. Izolált sejtek *in vitro* tenyésztése által növelhető volna az analizálható tumorsejtek száma, azonban az így nyert sejtciklus-tulajdonságok nem feltétlenül tükrözik az *in vivo* körülmények közötti jellemzőket. Talán a legnagyobb nehézséget viszont a tumorszövetek inhomogenitása jelenti, mivel a tumortömeg egy része akár nekrotikus, más területen lassabban növekvő lehet, mint amire a Tpot értékből következtethetnénk.⁹⁶ Így a teljes tumor szempontjából reprezentatív biopsziás mintagyűjtés vagy az noninvazív képalkotó technikák továbbfejlesztése igen fontos volna annak érdekében, hogy javítani tudjuk az intratumorális sejtciklus-analízis lehetőségeit.

A tumorterápia következtében létrejövő bizonyos fokú sejtszinkronizáció régóta ismert. Már az 1970-es években történtek olyan próbálkozások, melyek célja a sejtciklus manipulációja, a sejtszinkronizáció volt.⁹⁷ Az elmúlt évek kutatásai során azonban sokkal inkább előtérbe került az új kemoterápiás ágensek fejlesztése, pl. egyéb sejtciklusra ható szereké, melyek közül több a ciklin-dependens kináz inhibitorok közé sorolható.⁹⁸ Az eddigi terápiás megközelítésekben a sejtosztódásra ható szereket leginkább differenciálódást fokozó ágensekkel⁹⁹ vagy radioterápiával kombinálták.¹⁰⁰ A paclitaxelt eredményesen használták malignus sejtek szinkronizációjához, azok radioterápiára való szenzitizációja céljából.²⁹ Sőt, Wang és munkatársai a paclitaxelkezelést megelőző sejtszinkronizáció hatásait is vizsgálták, kimutatva, hogy a

szinkronizáció csökkenti a paclitaxelrezisztenciát sejtkultúras modellen.²¹ Tudomásunk szerint azonban jelenleg nincs olyan klinikai vagy preklinikai terápia, mely felhasználná a sejtciklus-analízisből nyert specifikus adatokat.

Munkánk során a paclitaxelt mind a szinkronizálás, mind a malignus sejtek elpusztítása céljából azonos, 0.05 mg/l-es, azaz 60 nmol/l koncentrációban alkalmaztuk. A humán gyógyászatban használt kezelések során a szer plazmakoncentrációja ennél jóval magasabb, 80-500 nmol/l közötti, de az intracelluláris koncentráció az 1-9 $\mu\text{mol/l}$ -t is elérheti.^{14,101} A kísérleteinkben alkalmazott koncentráció tehát a terápiás tartomány alsó értékével hasonlítható össze. Az irodalomból ugyancsak ismert, hogy a paclitaxel hatása gyorsabban szaporodó sejtek esetén kifejezettebb.²⁷ Ez a tény a szer hatásmechanizmusával, annak mitózisban kifejtett hatásával összhangban áll. Az Sp2 egy gyorsan osztódó sejttípus, átlagos populációs duplikációs ideje 16 óra, így kifejezetten alkalmas az ismétlődő kezelések vizsgálatára. Az általunk választott sejtvonalak jól modellezhetik tehát a gyorsan osztódó tumoros sejteket a lassabban osztódó, egészséges testi sejtek mellett. A körülbelül egy napos sejtciklus-idejűvel bíró tumorok^{102,103} mellett azonban léteznek daganatok, melyek populációs duplikációs ideje néhány naptól néhány hónapig is terjedhet, tehát növekedési ütemük igen eltérő lehet.¹⁰⁴ Ilyen esetben a páciens elméletileg hosszabb idő alatt is részesülhetne a paclitaxelkezelésben, mely révén több malignus sejt lépne be, majd rekedne a sejtciklus G₂/M fázisában, azonban a hosszabb expozíció a nem-malignus sejtekben okozott citotoxikus károsodást is fokozná. Ez, a hagyományos daganatellenes kezeléseket érintő hátrány az ismételt kezelési módszereket is érinti, azonban az első kezelés sikeressége vagy sikertelensége a szinkronizációt illetően nagymértékben meghatározza a soron következő, időzített kezelések effektivitását, melyek időtartama azonban már rövidíthető az első kezeléshez képest.

Fontos megjegyezni azt is, hogy a tumorok növekedése nemcsak a malignus sejtek sejtciklus-kinetikájától függ. A tumor mérete és elhelyezkedése, a tápanyagok hozzáférhetetlensége miatt bekövetkező nekrozis, az immunrendszer tumorelles kapacitása stb. egyaránt jelentősen befolyásolja. A daganat látszólagos növekedése tehát nem feltétlenül reprezentálja jól a sejtek osztódási gyorsaságát. A kezelések egy másik nehezítő tényezője az, hogy a daganatsejteknek gyakran jelentős hányada nyugvó

állapotban (G_0 fázisban) van, ezáltal rezisztens a kemoterápiára és a szinkronizációra. Ennek kiküszöbölésére számos technikát próbáltak alkalmazni, melyek révén a nyugvó állapotban lévő sejtek a G_1 fázis restriktív pontjának átlépésére bírhatók. Metionináz-kezelés, telomeráz-dependens adenovírus- vagy *Salmonella typhimurium* A1R-terápia egyaránt hatásosnak bizonyult a malignus sejt vonalak sejt ciklusba való mobilizálása szempontjából.^{105–107}

A módszer ezen korlátozásai ellenére úgy gondoljuk, hogy az ismétlődő, időzített kezelési technika által nyújtott akár csak kismértékű javulás is hasznos volna az onkoterápiában. A jövőben további vizsgálatok segítségével néhány limitáció kiküszöbölhetővé válna. Növelhetné a módszer alkalmazhatóságát a paclitaxel egyéb szerekkel való kombinációja, így például a szinkronizáció rekombináns metioninázzal való kivitelezése. Ez a viszonylag új szer ugyanis a metionin depléciója révén képes szelektíven a daganatsejteket blokkolni az S/ G_2 fázisban.^{108,109} Alkalmazható volna tehát szinkronizáció céljára, szelektivitása miatt valószínűleg kevesebb mellékhatás elérése mellett. Ezáltal az említett lassan, illetve eltérő ütemben osztódó tumorok hosszabb szinkronizációs ideje kisebb problémát jelentene.

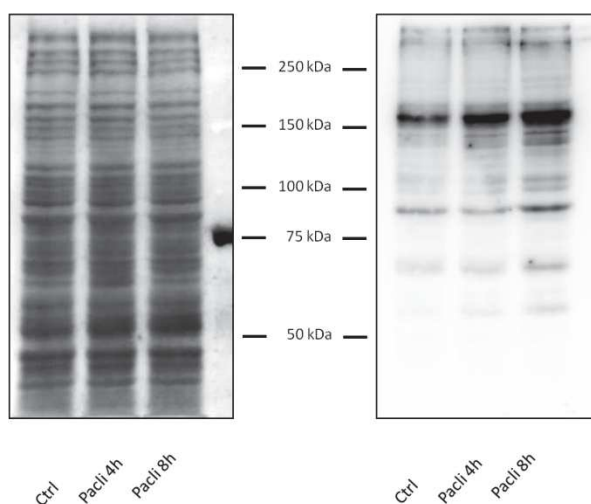
Összegezve, kísérleteink alapján adott sejt típus ciklusanalíziséből nyert információk segítségével megfelelően időzített citotoxikus kezelés hatékonysága növelhető. Sikeresen használtunk egy szert, a paclitaxelt ismétlődő, terápiásan releváns dózisokban malignus sejtek szinkronizációjára, majd azt követő elpusztítására sejt kultúras modellben. Ezen túlmenően, megfelelően kiválasztott kezelési időpontok segítségével fokozni tudtuk a kezelés szelektivitását egy adott sejt típusra nézve, míg a másik sejt vonalat érintő, „kollaterális” károsodás csökkent. A klinikai gyakorlatban történő alkalmazáshoz további vizsgálatok szükségesek, valamint a tumorsejtek ciklusanalízisének kidolgozása, melyre ígéretes módszer lehet a noninvazív MRI technika.

IV.2. AZ O-GLIKOZILÁCIÓ VÁLTOZÁSAI MITOTIKUS HELA SEJTEKBEN

IV.2.1. Eredmények

IV.2.1.1. O-glikoziláció paclitaxel-szinkronizációt követően

Paclitaxellel végzett szinkronizációs kezeléseink során összehasonlítottuk HeLa sejtek O-glikozilációs mintázatát aszinkron és paclitaxellel szinkronizált sejtcsoportok esetén. Ehhez western blot módszert alkalmaztunk, a fehérjéket CTD110.6 anti-O-GlcNAc antitesttel jelölve. Amint a **15. ábrán** látható, egy enyhe O-glikoziláció-fokozódás volt tapasztalható 4, illetve 8 órás paclitaxelkezelés befejeztekor.



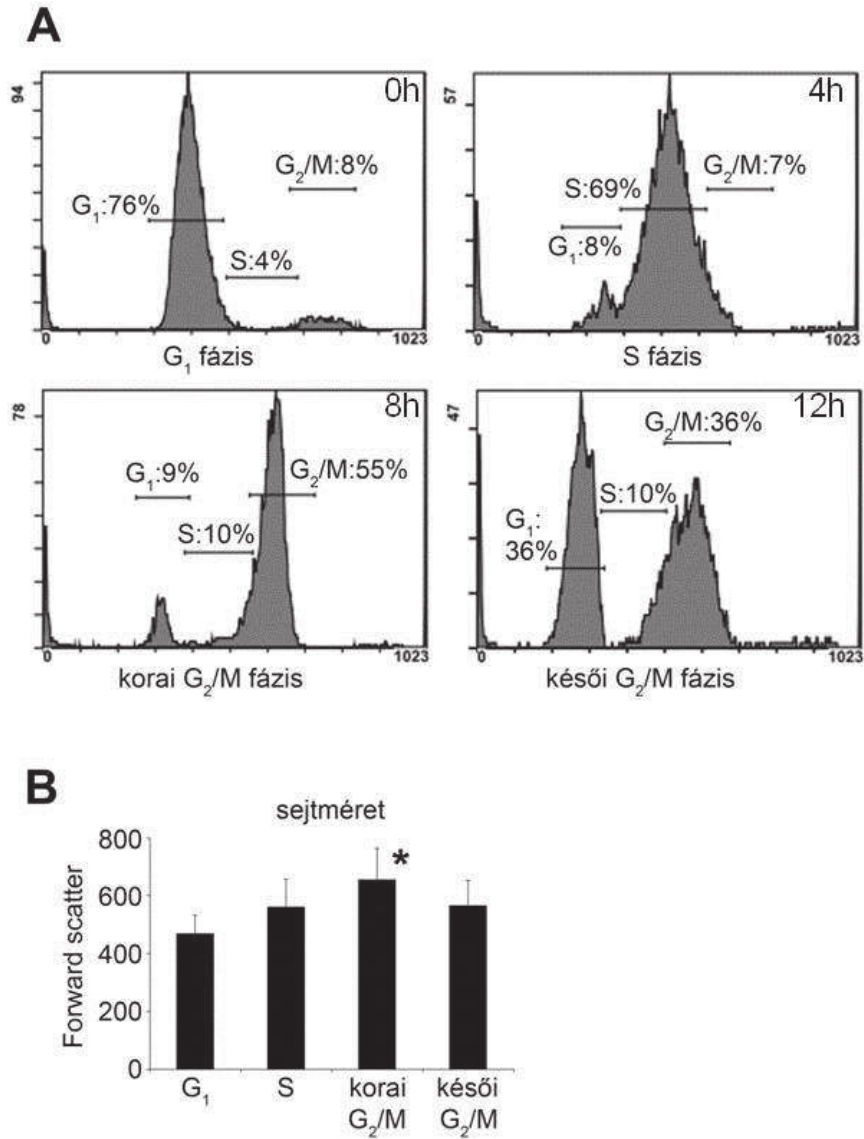
15. ábra. Aszinkron (Ctrl), 4 órán át (Pacli 4h), illetve 8 órán át paclitaxellel kezelt (Pacli 8h), HeLa sejtek összfehérje- (bal oldalon), illetve O-glikozilációs mintázata CTD110.6 antitesttel detektálva (jobb oldalon).

IV.2.1.2. HeLa sejtek szinkronizálása dupla timidin blokkal

Az O-glikozilációs mintázat sejtciklus során történő változásainak további vizsgálata céljából olyan szinkronizációs módszer alkalmazására törekedtünk, mely kevés potenciális mellékhatással jár, minél inkább a fiziológias állapotot közelíti. Ezért a

következőkben a dupla timidin blokkal való szinkronizálást választottuk. Aszinkron és szinkron populációk helyett pedig az egyes fázisokban elkülönítve vizsgáltuk az O-glikozilációs mintázatot.

Dupla timidin blokkal való szinkronizálás során a G_1/S átmenet gátlása történik.^{110,111} Ennek megfelelően, a módszert HeLa sejteken alkalmazva túlnyomórészt G_1 fázisú sejtpopulációt nyertünk (**16.A ábra**). Szinkronizáció után a HeLa sejteket komplett médiumba helyeztük. Ezután 4 óránként mintát gyűjtve a propídium-jodiddal jelölt, fixált sejtek DNS-tartalmát flow cytometer FL3 csatornán mért fluoreszcenciaintenzitása alapján elemeztük. Az eredmények azt mutatták, hogy 4 óra elteltével a sejtek továbbhaladtak a ciklus S fázisába, 8 óra után pedig jelentős részük elérte a G_2/M fázist. A kezelés után 12 órával a sejtek körülbelül fele a mitózison is áthaladt. Ennek megfelelően a mérések során megkülönböztettünk „korai” és „késői” G_2/M fázist. Méréseink során a G_1 és S fázisok mellett korai és késői G_2/M fázist különítettünk el. A „korai G_2/M ” jelöli azt az időszakot, melyben a populáció nagyobb része még a G_2 fázisban található, míg a „késői G_2/M ” az a periódus, amelyben a sejteknek egy jelentős része már áthaladt a mitózison, míg a fennmaradó hányad annak kezdetén tart. Ezek a jelzők tehát a teljes populáció fázison belüli átlagos elhelyezkedésére vonatkoznak, nem pedig az egyes sejtek állapotát jelölik.

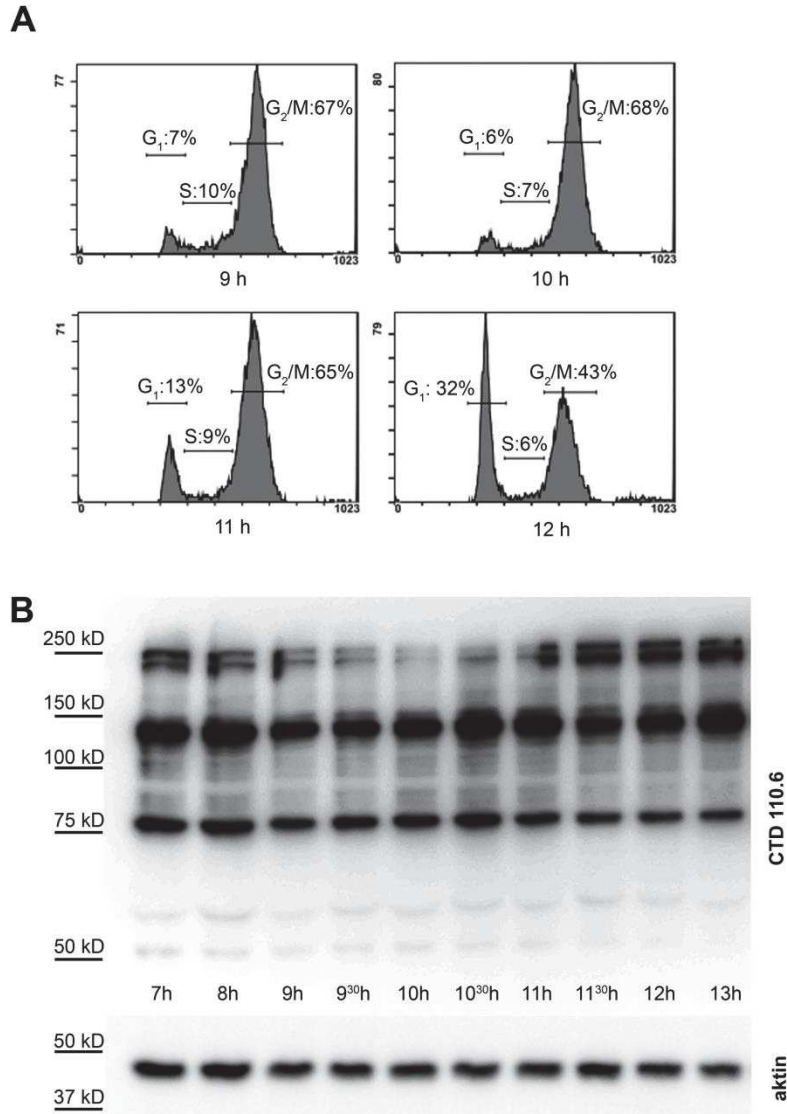


16. ábra. A sejtciklus jellemzése dupla timidin blokkot követően. (A) Propidium-jodiddal jelölt sejtek DNS-tartalmának flow cytometriás elemzése a szinkronizáció végétől mért 0, 4, 8 és 12 órás időpontokban. (B) Azonos időpontokban az átlagos sejt méretet változása az előreirányuló fényszórás (forward scatter, FS) által detektálva. Az adatokat legalább 3 független mérésből származó átlag \pm SD értékek. * $p < 0.05$.

A megadott időpontokban a sejt mérettel korreláló forward scatter (FS) értéket ugyancsak megvizsgálva megállapítható volt, hogy az a korai G₂/M fázis időpontjában érte el a maximumot, majd a késői G₂/M során ismét lecsökkent, alátámasztva ezzel a sejtek időközben bekövetkezett kettéosztódását (16.B ábra).

IV.2.1.3. A szinkronizáció önmagában nem alkalmas az O-glikozilációs változások detekciójára a G₂/M - G₁ átmenet során

A G₂/M fázisból a G₁-be való átmenet vizsgálatához dupla timidin blokk feloldását követően 9, 10, 11 és 12 órával gyűjtöttünk mintákat. Méréseink alapján a mitózis ~10-11 óra elteltével kezdődött, 12 óra után pedig a populáció körülbelül fele már átesett az osztódáson (10h időpontban a sejtek csupán 6%-a, míg 12h elteltével már 32%-a volt G₁ fázisban; 10h időpontban 68%, míg 12h elteltével már csak 43% tartózkodott G₂/M fázisban; **17.A ábra**).



17. ábra. Globális *O*-GlcNAc mintázat a *G*₂/*M* fázis lefolyása során. (A) A DNS mennyiség változása a *G*₂/*M* – *G*₁ fázisok közti átmenet idején (timidin blokk megszüntetése utáni 9., 10., 11. és 12. órában). (B) Reprerzentatív western blot membrán a fehérjék *O*-glikozilációs mintázatáról a szinkronizálás utáni feltüntetett időpontokban.

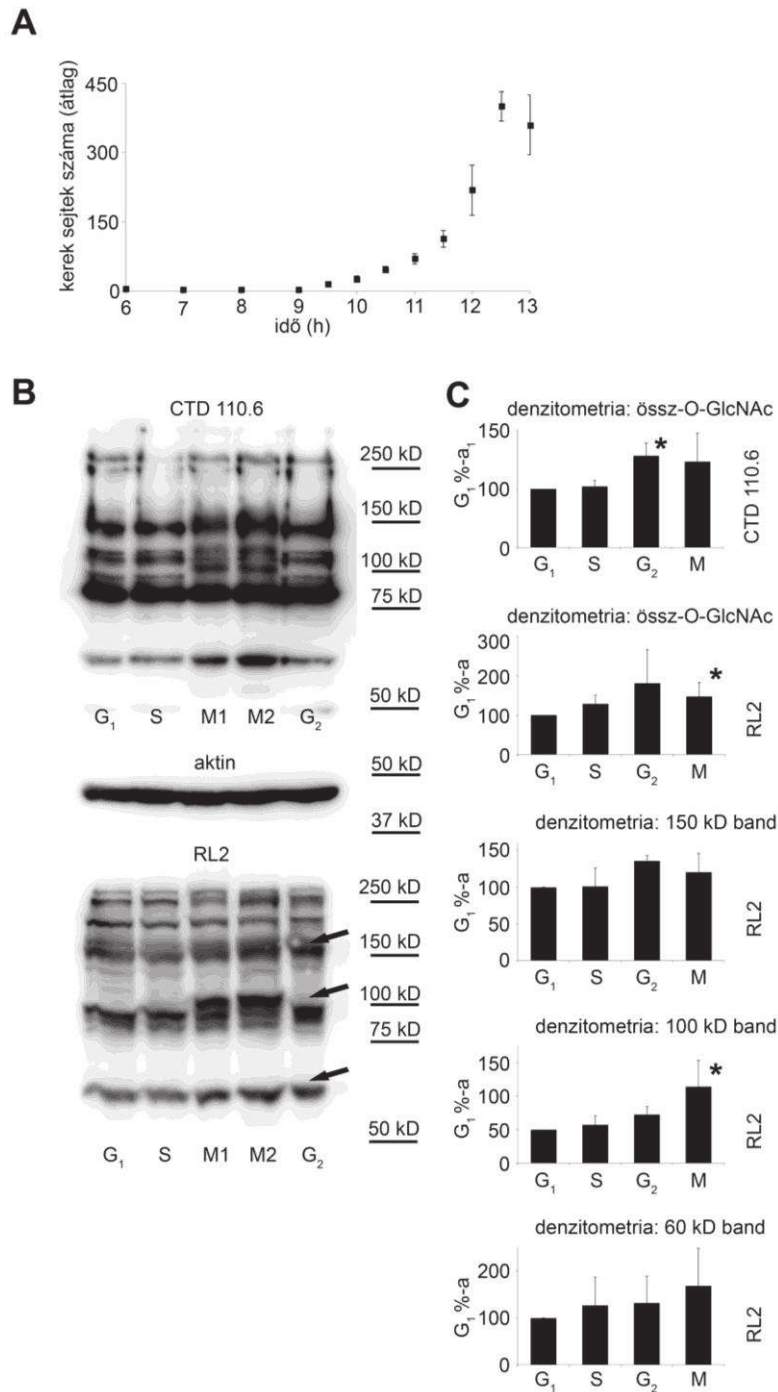
Ezek alapján a mitózis szempontjából kritikus időszaknak a poszt-szinkronizációs 8-13. órát tekintettük, így következő lépésként ebben az intervallumban végeztünk frakcionált mintavételezést. A mintákból az *O*-GlcNAc-módosított fehérjék mennyiségét és mintázatát western blot módszerrel, CTD110.6 anti-*O*-GlcNAc antitest segítségével

végeztük. Amint a **17.B ábrán** látható, a $G_2/M - G_1$ átmenetnek megfelelő időintervallum során az O-glikozilációt illetően lényegi változást ezzel a módszerrel nem tudtunk detektálni.

IV.2.1.4. Szelektív, mitotikus sejtgűjtéssel detektálható O-GlcNAc-mintázatbeli eltérések

Habár a szinkronizációval nyert mintákban a sejtek csaknem 70%-a a ciklus azonos fázisában tartózkodott, a mitózison belüli egyes, rövid ideig tartó történések eltérő időpontokban zajlottak. Ahhoz, hogy egy szűkebb sejtpopulációt nyerjünk, lekerekedett sejteket gyűjtöttünk szinkronizált HeLa kultúrákból. Ennek érdekében a mitózis lezajlása körüli időszakban rendszeresen meghatároztuk a kerek sejtek mennyiségét. Számuk a 9. poszt-szinkronizációs órát követően kezdett emelkedni, majd 12-13 óra között tetőzött (**18.A ábra**).

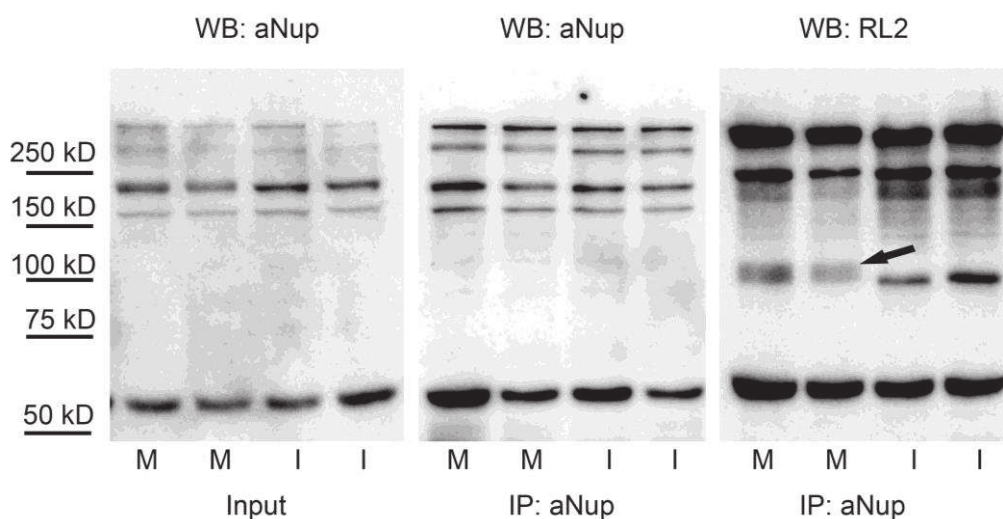
Ennek fényében módosítottuk western blothoz használt mintavételezési protokollunkat a következők szerint: a dupla timidin blokkot követő 9. és 13. óra között 25 perces időközökben mitotikus lerázással gyűjtöttük össze a lekerekedett sejteket (**8. ábra**). Az első 6 („M1”) és az utolsó 3 („M2”) frakciót pooloztuk, majd G_1 , S és G_2 fázisú sejtekkel együtt western blot vizsgálatnak vetettük alá a mintákat. A jelölést ismét a CTD110.6, illetve a szintén O-GlcNAc oldalláncokat felismerő RL2 antitest segítségével végeztük. Ezen kísérleteink során a minták feldolgozását annyiban módosítottuk, hogy a sejtek lízisét követő centrifugálási lépést kihagytuk, tehát teljes sejtlizátumokkal dolgoztunk annak érdekében, hogy egyáltalán ne veszítsünk fehérjét mintáinkból. A mitotikus, illetve a G_1 fázisú fehérjemintákat ebben a kísérleti beállításban összehasonlítva, mindkét ellenanyag által eltérő mintázatot észleltünk. Az egyik legszembetűnőbb különbség a 100 kDa magasságban megjele sáv volt a mitotikus sejtek esetében (**18.B ábra**).



18. ábra. *O*-glikozilált fehérjék a sejtciklus fázisaiban. (A) Lekerekedett sejtek számának változása a timidin blokk feloldását követően. (B) Reprezentatív western blot a különböző fázisokról CTD110.6 és RL2 *O*-GlcNAc-et felismerő antitestek segítségével. (C) A teljes jelölődés és 3 különböző sáv (~150, 100 and 60 kDa magasságban, a B. ábrán nyíllal jelölve) densitometriás analízise az egyes fázisokban. A feltüntetett adatok legalább 3 független vizsgálat átlag \pm SD értékei, * $p < 0.05$ versus G_1 .

IV.2.1.5. Az O-glikozilációs változások vizsgálata magpórusfehérjék immunprecipitációjával

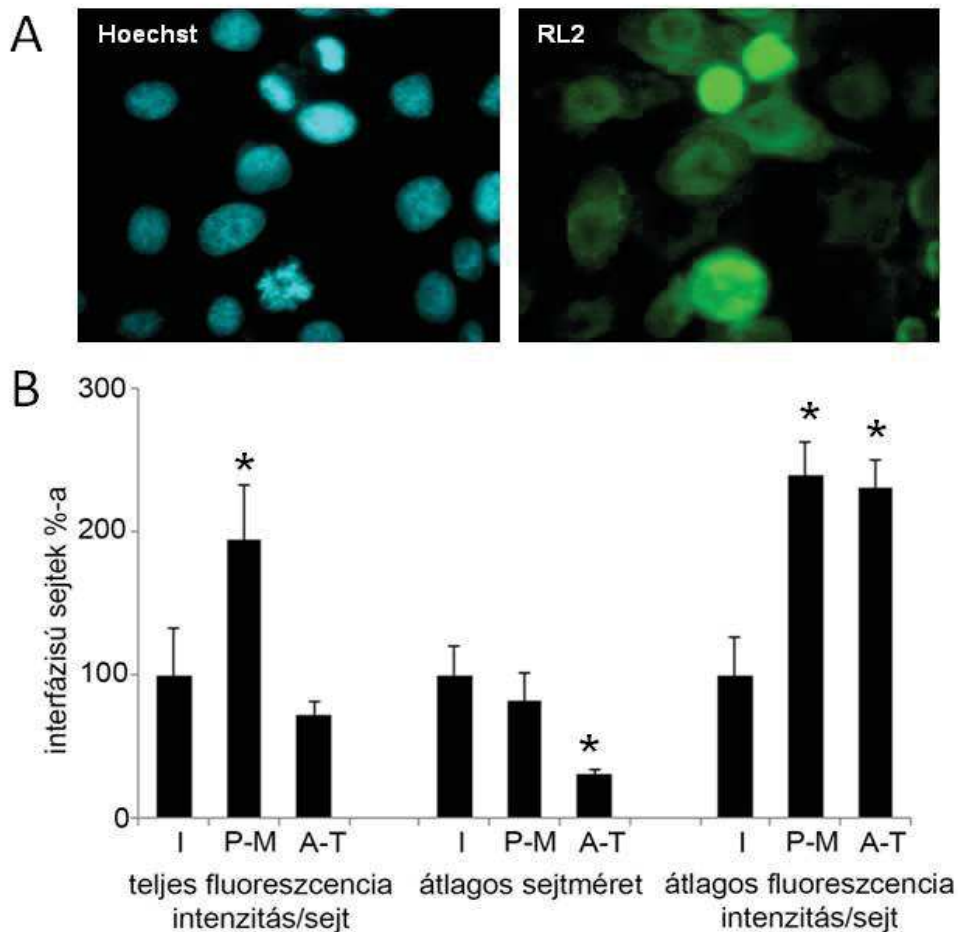
A magpórusfehérjék (Nup, Nuclear pore protein) habár az egyik legmagasabb O-glikoziláltságot mutató fehérjék közé tartoznak, a sejtciklus során történő glikozilációs változásaikról kevés ismerettel rendelkezünk. Ezért következő lépésben mitotikus lerázással gyűjtött sejtek és interfázisú minták immunprecipitációját végeztük a több magpórusfehérjét felismerő, MAb414 elnevezésű, monoklonális ellenanyaggal. Az O-glikozilációs mintázatokat RL2 antitesttel detektáltuk (**19. ábra**). Az immunprecipitáció hatékonyságát az anti-Nup antitesttel végzett western blottal ellenőriztük. Eredményeink az irodalomnak megfelelően erős O-GlcNAc jelölődést mutattak a Nup fehérjéken. Emellett a mitózis során a teljes sejtizátumban észlelt, 100 kDa magasságában megjelenő O-glikozilációs mintázatbeli változás is fellelhető volt (**19. ábra**, nyíl), melyet az a-Nup ellenanyag nem detektált.



19. ábra. A magpórusfehérjék O-glikozilációs változásai mitotikus (M) és interfázisú (I) sejtekben. A bal oldali western blot a teljes sejtizátumok (Input) anti-Nup detekcióját ábrázolja. A középső és jobb oldali ábra az anti-Nup ellenanyaggal kapott immunprecipitátumok (IP: aNup) anti-Nup és RL2 jelöléssel kapott képe.

IV.2.1.6. Az O-glikozilációs változások detektálása immunfluoreszcenciával mitotikus HeLa sejtekben

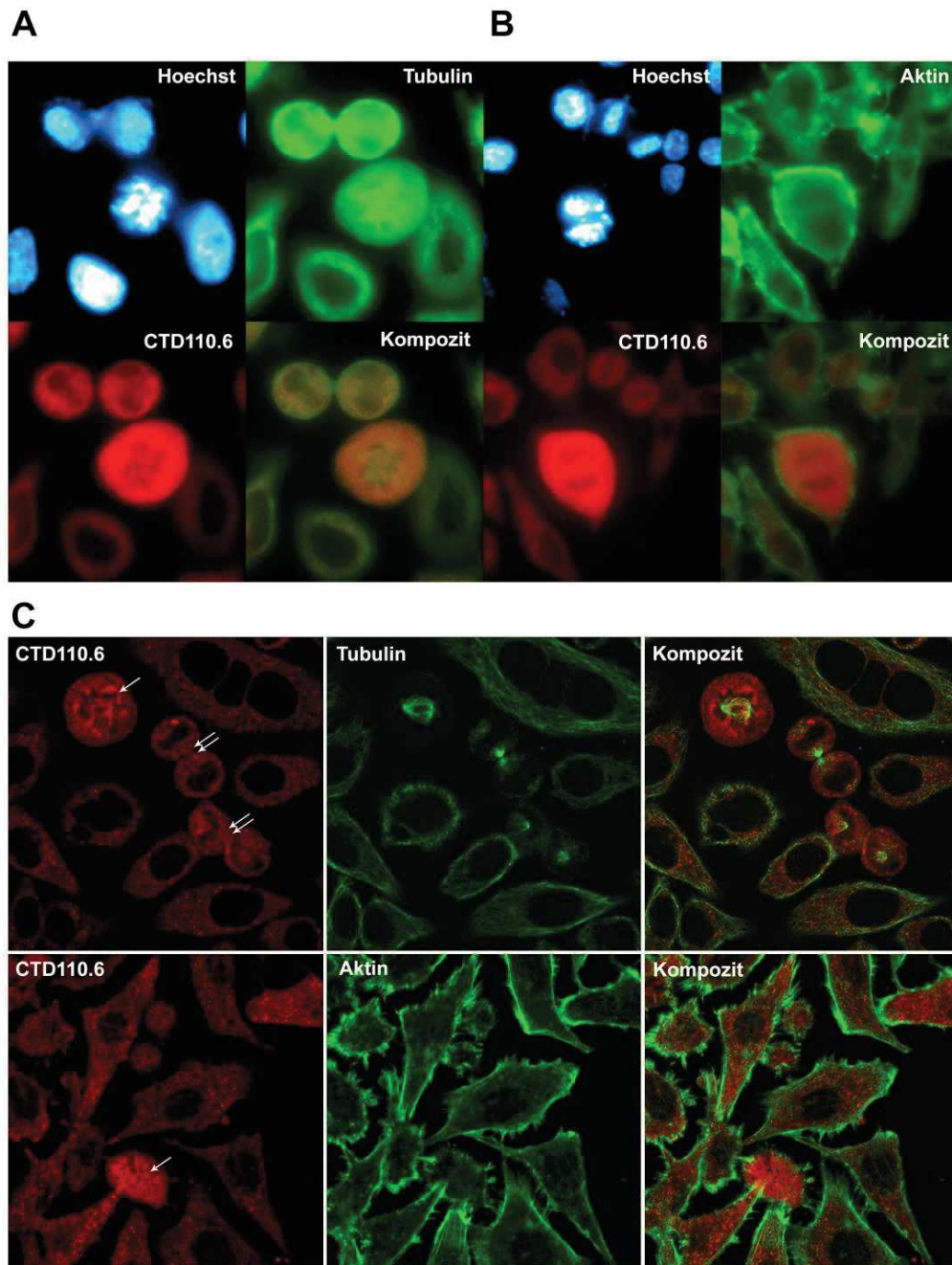
Annak érdekében, hogy az O-GlcNAc-módosított fehérjék mennyiségét ne csupán a populáció szintjén, hanem sejtszinten detektálhassuk, illetve azok szubcelluláris eloszlását megvizsgáljuk, aszinkron HeLa sejteket fedőlemezekben tenyésztettünk, majd formalin-fixálást követően O-GlcNAc ellenes RL2 antitesttel jelöltük. A mitózisban lévő sejteket Hoechst-féle nukleáris jelölés révén azonosítottuk. Az osztódó sejteket morfológiájuk alapján korai (pro- és metafázisú (*P-M*)) és késői (ana- és telofázisú (*A-T*)) mitotikus csoportokba soroltuk. Az osztódás alatt álló sejtekben szembetűnően fokozott O-GlcNAc jelölődés volt észlelhető. Az eredmények számszerűsítése céljából az interfázisú és a mitotikus sejtek fluoreszcenciaintenzitását megmértük és összehasonlítottuk. Utóbbiak esetében szignifikánsan magasabb fluoreszcenciaintenzitás értékeket kaptunk az interfázisú sejtekhez képest. A késői mitózisban azonban jelentős csökkenést tapasztaltunk. Ennek háttérében az osztódás során történő sejt méretváltozások hatását feltételeztük (a leánysejtek nagysága kb. 50%-a a mitózis kezdetéhez viszonyítva). Ezért az összehasonlítást ismételten elvégeztük a sejtek méretére normalizált fluoreszcenciaértékekkel, amely a két mitotikus csoport közt tapasztalt különbség megszűnését eredményezte (**20. ábra**).



20. ábra. *O*-glikozilált fehérjék megoszlása immunfluoreszens vizsgálattal. (A) HeLa sejtek RL2 (zöld) és Hoechst-féle (kék) jelölése, reprezentatív fotók. (B) A sejtek teljes fluoreszcenciaintenzitása, a sejtméret és az átlagos, méretre normalizált fluoreszcenciaintenzitás változásai interfázisú (I), pro- és metafázisú (P-M), illetve ana- és telofázisú (A-T) sejtekben. Az adatokat az interfázisú sejtekhez viszonyítva (%) ábrázoltuk. Minden oszlop minimum 50 interfázisú, illetve minimum 10 P-M és A-T sejtől származó mérésből ered. Az adatokat átlag \pm SD értékeként tüntettük fel, * $p < 0.05$ az interfázisú sejtekhez hasonlítva.

Mivel a citoskeletális fehérjék közül a tubulin és az aktin az O-GlcNAc proteom részeként, illetve a sejtciklusban betöltött szerepükről egyaránt ismertek, következő lépésként az O-GlcNAc módosulásnak az említett fehérjékkel való kapcsolatát vizsgáltuk.^{112,113} Ehhez aszinkron HeLa tenyészetben CTD110.6 és anti-tubulin, illetve az aktin detektálásához phalloidin-Alexa Fluor 488 kettős jelöléseket végeztünk. A

CTD110.6 antitest az RL2-vel kapott képhez hasonló eredményezett. A mitotikus sejtek erős anti-O-GlcNAc jelölődésük alapján egyértelműen elkülöníthetőek voltak az interfázisú sejtektől. A tubulin-jelölés által láthatóvá vált mitotikus orsót tartalmazó sejtekben az emelkedett O-GlcNAc-szignál ugyancsak jelen volt, de epifluoreszcens mikroszkópia során tubulinnal vagy aktinnal való kolokalizációt nem észleltünk (**21. ábra**).



21. ábra. O-glikozilált fehérjék megoszlása a sejtciklus különböző fázisaiban levő HeLa sejtekben tubulin-, illetve aktin-jelölés mellett. Reprezentatív epifluoreszcens képek (A) CTD110.6 (piros), anti-tubulin (zöld) és Hoechst-féle magfestéssel (kék); (B) CTD110.6 (piros), phalloidin-Alexa Fluor 488 (aktin, zöld) és Hoechst-féle magfestéssel (kék). (C) Konfokális mikroszkóppal készült képek a megjelölt antitestek segítségével. A meta- és telofázisú sejteket az ábrán szimpla, illetve dupla nyíllal jelöltük.

Ezt követően, a pontosabb vizualizáció céljából az vizsgálatokat konfokális mikroszkópiával egészítettük ki (**21.C ábra**). Ennek során mind az interfázisú, mind a mitotikus sejtekben többnyire homogén, citoplazmatikus, granuláris O-GlcNAc-eloszlást tapasztaltuk. Osztódó sejtekben a kromoszómák régiójában CTD110.6 szignál nem volt látható, azonban ez az antitest interfázisú sejtekben sem mutat jelölődést a nukleusz területén (megjegyzendő, hogy az IgG típusú RL2-vel szemben a CTD110.6 IgM izotípusú ellenanyag, melynek következménye lehet, hogy utóbbi nem képes a magba penetrálni). A kettős jelölés azonban ez esetben sem mutatott érdemi kolokalizációt a fibrilláris megjelenésű, eltérő eloszlást mutató citoskeletális fehérjékkel.

IV.2.2. Megbeszélés

Kutatásunk során egy olyan fehérjemódosulás sejtciklus alatt történő változásait kívántuk elemezni, melynek az osztódás szabályozásában betöltött szerepével egyre több tanulmány foglalkozik. HeLa sejtek globális O-glikozilációs szintjének és mintázatának változásait detektáltuk tehát a sejtciklus különböző fázisai során, dupla timidin blokkot követően. Kimutattuk, hogy a sejtek általános O-GlcNAc mintázata a G₁ és S fázisok során változatlan, azonban az M fázisban szintje hirtelen megemelkedik, a mintázat jellegzetes változásaival együtt járva. Ezen változások rejtve maradtak a mitotikus lerázás módszerének alkalmazása nélkül, mely szelektív, csaknem tisztán mitotikus sejtgyűjtést tesz lehetővé.⁹⁰ Immunfluoreszcens eredményeink alapján ez a módosulás csupán rövid ideig tart a telofázisban, és a citokinézis idejére az O-GlcNAc-módosított fehérjék mennyisége csökkenni kezd.

Az O-GlcNAc módosulásnak a sejtciklus koordinációjában betöltött szerepét az elmúlt években számos tanulmány vizsgálta. Ennek során vált ismertté, hogy a G₀/G₁ átmenet idején az OGT mennyisége jelentősen megemelkedik. Sőt, feltételezések szerint a fokozott OGT-szintézis és az azt követő O-GlcNAc emelkedés elengedhetetlen a G₁ fázisba való belépéshez. Mivel az O-glikoziláció fontos szerepet tölt be a sejt tápláltsági állapotának érzékelésében, ez a lépés közvetítő szignálja lehet a sejtciklusba való belépés előfeltételének, a megfelelő tápanyag-ellátottságnak.^{32,114}

O'Donnell és munkatársai egér embrionális fibroblaszt modelleken vizsgálta az O-glikozilációs státusz csökkenésének hatásait. Ezek során különböző módon – gendelési vagy szubsztrátdepléción által – idézték elő az OGT enzim csökkent aktivitását. A kutatások eredményeként növekedésbeli elmaradást, a p27 ciklin dependens kináz inhibitor emelkedett expresszióját, illetve sejthalál bekövetkeztét tapasztalták.^{115,116} Néhány fontos sejtciklus-szabályozó fehérjét is sikerült azonosítani, melyekről kimutatták, hogy érzékeny az O-glikozilációs változásokra. Így például az OGT gátlása a mitogén jelátvitelben szerepet játszó PI3K és MAPK útvonalak csökkent aktivitását okozta, illetve gátolta a G₁ fázis kulcsregulátorának, a ciklin D1 expresszióját.^{117,118} Ismertté vált emellett, hogy mind a négy nukleoszomális hisztonfehérje (H2A, H2B, H3 és H4) sejtciklusfüggő mértékű O-glikoziláltsággal rendelkezik.^{119,120}

A G₂/M átmenet szempontjából kulcsfontosságú B1 ciklin expressziójának csökkenését írta le Fardini és munkatársai mind az OGA, mind az OGT gátlása esetén. Kimutatták ezáltal, hogy elengedhetetlen mindkét enzim megfelelő működése, így az optimális O-glikozilációs státusz fenntartása a sejtciklus megfelelő progressziójához.⁶⁴ A cdk1 mitózisban történő aktivációja ugyancsak O-GlcNAc szabályozás alatt áll. Ez a hatás feltételezhetően a gátló foszforilációs módosulásokkal való interakció révén valósul meg.⁴⁶ A sejtosztódás során az OGT először a mitotikus orsóhoz, majd a citokinézis idején az egyenlítői síkban elhelyezkedő középtesthez transzlokálódik.¹²¹ Utóbbi célja a középtest stabilitásának szabályozása. Ezt az OGT nem önmagában, hanem az OGA enzimmel együtt, illetve az Aurora B nevű mitotikus kinázzal és a protein foszfatáz 1-gyel komplexet képezve végzi.¹²¹ Az O-glikoziláció fokozódása az anafázisban a CHD1 aktivitására nézve is elengedhetetlennek bizonyult,¹²² de az említettekén kívül számos, a sejtosztódásban és a tumorigenezisben jelentős szereppel bíró transzkripciós faktor (pl. myc, p53, NFκB) is az O-GlcNAc befolyása alatt áll.⁶⁴

A globális O-GlcNAc státusz változásairól közölt adatok a sejtciklus során jelenleg ellentmondásosak az irodalomban. Számos kutatás számolt be a G₂ fázisban történő OGT expresszió és O-GlcNAc emelkedéséről, illetve ezek szükségességéről a G₂/M átmenethez.^{64,76,87,89,113,122} Ezt támasztja alá, hogy az OGT gátlása a G₂/M átmenet zavaraihoz vezet.⁸⁹ Yang és munkatársai azonban már az S fázisban elinduló, M fázisban tetőző O-glikoziláció fokozódásról számoltak be MEF és HEK293 sejteken

végzett kutatásaik alapján.⁸⁷ Ezzel szemben más szerzők egyáltalán nem észleltek változást, vagy éppen ellenkezőleg, csökkenést detektáltak az OGT expressziót és a globális fehérje O-glikozilációt illetően az M fázis során.^{74,90,123} Ezeknek az ellentmondó eredményeknek több tényező állhat a háttérében. Egyfelől az O-GlcNAc módosulás igen gyors, dinamikus természete, másik oldalról viszont a mitózisban lejátszódó, szintén rövid ideig zajló történések, melyek akár kismértékben eltérő szinkronizációs, időzítési vagy mintavételezési módszerek esetén különböző eredményekhez vezethetnek.

A sejtciklusfüggő változások vizsgálatára a bevezetőben említett számos szinkronizációs módszer került bevezetésre, többek között a szérum-megvonás, a dupla timidin blokk, vagy a sejtciklus progressziójának gátlása különböző kémiai ágensekkel, mint a nocodazol, illetve a paclitaxel.⁹ A fenti módszerek szinkronizálási hatékonysága nemcsak eltérő lehet, de az egyes szerek mellékhatásairól, toxicitásáról sem szabad elfeledkeznünk.^{9,46,123,124} Ezek ugyanis szintén befolyással lehetnek az O-GlcNAc módosulás változásaira.

Vizsgálatunk szempontjából a leginkább releváns tanulmány Sakabe és munkatársai nevéhez fűződik, akik éppen ellentétes, csökkent O-GlcNAc szinteket észleltek az M fázis során a G₁ fázishoz viszonyítva.⁹⁰ Az említett tanulmányban HeLa tenyészetet szinkronizáltak nocodazzal, majd mitotikus lerázással gyűjtött sejteket 1, 3 és 5 órára újra tenyésztőmédiumba helyeztek a végső mintagyűjtés időpontjáig. Jelentős különbség ehhez képest, hogy jelen munkánk során kerültük a potenciálisan toxikus kémiai ágens (nocodazol, paclitaxel) használatát, illetve a rövid időtartamú frakcionált sejtgyűjtések révén igyekeztünk minél homogénebb mintákat gyűjteni, melyeket további tenyésztés nélkül, azonnal feldolgoztunk. Tehát minden alkalommal a lekerekedett sejtek lízisért végeztük, ezáltal jelentős időbeli különbség áll fenn a további legalább 1 órás tenyésztéssel kapott sejtminthoz viszonyítva. Metodikai eltérést találhatunk a mintafeldolgozást illetően is. Kísérleteinkhez erős lízist követően a teljes sejtlyázatot felhasználtuk, míg Sakabe és munkatársai NP-40-nel történő lízisz után az inszolubilis frakciót eltávolították, mely a fehérjeösszetétel jelentős különbségét eredményezheti.

Korábbi közlemények szerint az O-GlcNAc a mitózis során hatással van a citoskeletális fehérjékre. M fázisú sejtekben azt találták, hogy az OGT a mitotikus orsóval kolokalizál, illetve a vimentin is az O-glikoziláció befolyása alatt áll.^{74,121} Munkánk során az O-GlcNAc két fontos citoskeletális fehérjével, aktinnal és tubulinnal való kapcsolatát vizsgáltuk, de kolokalizációt nem tudtunk detektálni. Nem zárható ki azonban az említett fehérjék kisebb mértékű érintettsége a módosulás által, amely rejtve maradhatott az általunk használt kísérleti beállítás során. Korlátozó tényező ugyanis az O-GlcNAc módosulás redundanciája a sejtben, mely nehezíti a kisebb mértékű morfológiai eltérések detektálását, illetve a konfokális mikroszkópia révén történő kolokalizációs vizsgálatot egyaránt. Valószínűbbnek tartjuk azonban az O-GlcNAc módosulás sejtben belüli megoszlása alapján, hogy a mitózis során bekövetkező emelkedés kevésbé a citoskeletális átrendeződéshez, inkább egyéb sejtben belüli mitotikus történéshez köthető.

Munkánk egyik limitáló tényezője az erősen O-glikozilált magpórusfehérjék jelenléte,¹²⁵ melyek az interfázisú sejtek immunfluoreszcens analízisét torzíthatják. Mivel azonban a magpórusfehérjék a mitózis során nem degradálódnak,^{126,127} ez a tényező nem okozhat jelentős eltolódást az interfázisú és a mitotikus sejtek összehasonlításában. Emellett western blot módszerrel a sejtek összfehérje-tartalmát vizsgálva ez az esetleges torzító hatás nem állt fenn, s az így kapott eredményeink az immunfluoreszcens elemzéssel megegyező irányú változást mutattak. Ezek alapján tehát nem valószínű, hogy a magpórusfehérjék módosulása jelentős mértékben torzította immunfluoreszcens mikroszkópiával nyert eredményeinket. Ezt támasztják alá az anti-Nup ellenanyaggal végzett immunprecipitációs vizsgálatok, melyek során a magpórusfehérjék erős glikoziláltságát detektáluk az irodalomnak megfelelően, de ezt illetően változást a mitotikus sejtmintákban nem észleltünk. Azonosítható volt azonban a mitotikus, immunprecipitált fehérjék O-GlcNAc mintázatában a teljes lizátumban is detektált, 100 kDa magasságban elhelyezkedő jel, mely anti-Nup antitesttel azonban nem mutatott jelölődést. Ezek alapján az adott O-GlcNAc jel feltételezhetően olyan fehérjéhez kapcsolódik, mely a MAb414 antitest által felismert Nup-fehérjék egyikéhez asszociálódik, így megjelent az immunprecipitációs mintákban. Korábbi tanulmányokból már ismert volt, hogy néhány Nup megfelelő expressziójához elengedhetetlen az O-GlcNAc jelenléte.¹²⁸ Emellett szintén leírásra került, hogy a

módosulás a magpórusok szerkezeti tulajdonságait, és a rajtuk keresztül folyó transzportfolyamatokat egyaránt befolyásolja.¹²⁹

Bár jelenlegi ismereteink még kezdetlegesek az O-glikoziláció sejtciklus-szabályozásban betöltött szerepéről, számos tanulmány bizonyítja, hogy a metabolizmus és a sejtosztódás szoros kapcsolatban áll egymással. A modern életvitel egyik jelentős rizikófaktora a tumoros megbetegedések szempontjából az excesszív táplálékbevitel.¹³⁰ Annak ismeretében, hogy az O-GlcNAc egy igen jelentős szignalizációs utat képvisel a tápláltsági állapot érzékelésében („nutrient sensing”), az O-glikoziláció a metabolikus változások egyik potenciális közvetítője a sejtciklus felé. Ezzel összecseng a malignus sejtek fokozott tápanyagfelvétele és emelkedett O-glikozilációs státusza.⁶⁴ A jövőben tehát az O-glikoziláció mértékének megállapítása hasznos diagnosztikai, illetve prognosztikai markerré válhat. Az OGT és OGA mRNS-szintjének vizeletben való kimutatására húgyhólyagtumor diagnosztikai eszközeként más szerzők már korábban javaslatot tettek.¹³¹ Ezen túlmenően az O-glikozilációhoz kapcsolódó fehérjék, így az OGA és OGT enzimek, de a O-glikozilált sejtciklus-regulátorok is ígéretes terápiás célponttá válhatnak a malignus daganatokkal szemben.⁷³

IRODALOMJEGYZÉK

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108. doi:10.3322/caac.21262.
2. WHO IARC. PRESS RELEASE N° 224. 2014.
3. Neganova I, Lako M. G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells. *J Anat.* 2008;213(1):30-44. doi:10.1111/j.1469-7580.2008.00931.x.
4. McIntosh JR, Molodtsov MI, Ataullakhanov FI. Biophysics of mitosis. *Q Rev Biophys.* 2012;45(2):147-207. doi:10.1017/S0033583512000017.
5. Cheeseman IM, Desai A. Molecular architecture of the kinetochore–microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):33-46. doi:10.1038/nrm2310.
6. Cooper GM. The Eukaryotic Cell Cycle. 2000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/>. Accessed January 14, 2018.
7. JavanMoghadam-Kamrani S, Keyomarsi K. Synchronization of the cell cycle using Lovastatin. *Cell Cycle.* 2008;7(15):2434-2440. doi:10.4161/cc.6364.
8. Kubota S, Fukumoto Y, Ishibashi K, et al. Activation of the prereplication complex is blocked by mimosine through reactive oxygen species-activated ataxia telangiectasia mutated (ATM) protein without DNA damage. *J Biol Chem.* 2014;289(9):5730-5746. doi:10.1074/jbc.M113.546655.
9. Jackman J, O'Connor PM. Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle. *Curr Protoc Cell Biol.* 2001;Chapter 8:Unit 8.3. doi:10.1002/0471143030.cb0803s00.
10. Yoshizawa-Sugata N, Masai H. Cell Cycle Synchronization and Flow Cytometry Analysis of Mammalian Cells. In: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. Vol 1170. ; 2014:279-293. doi:10.1007/978-1-4939-0888-2_13.
11. Crawford S. Is it time for a new paradigm for systemic cancer treatment? Lessons from a century of cancer chemotherapy. *Front Pharmacol.* 2013;4:68. doi:10.3389/fphar.2013.00068.

12. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc.* 1971;93(9):2325-2327. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5553076>. Accessed June 27, 2016.
13. Kampan NC, Madondo MT, McNally OM, Quinn M, Plebanski M. Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. *Biomed Res Int.* 2015;2015:413076. doi:10.1155/2015/413076.
14. Weaver B a. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2014;25(18):2677-2681. doi:10.1091/mbc.E14-04-0916.
15. Dyer M, Richardson J, Robertson J, Adam J. NICE guidance on bevacizumab in combination with paclitaxel and carboplatin for the first-line treatment of advanced ovarian cancer. *Lancet Oncol.* 2013.
16. Kumar A, Hoskins PJ, Tinker A V, et al. Dose-dense paclitaxel in advanced ovarian cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2015;27(1):40-47. doi:10.1016/j.clon.2014.10.001.
17. Seidman AD, Berry D, Cirrincione C, et al. Randomized phase III trial of weekly compared with every-3-weeks paclitaxel for metastatic breast cancer, with trastuzumab for all HER-2 overexpressors and random assignment to trastuzumab or not in HER-2 nonoverexpressors: Final results of cancer and leu. *J Clin Oncol.* 2008;26(10):1642-1649. doi:10.1200/JCO.2007.11.6699.
18. Markman M, Vergote I, Trope CG, et al. Current standards of care for chemotherapy of optimally cytoreduced advanced epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2013;131(1):241-245. doi:10.1016/j.ygyno.2013.05.029.
19. Rowinsky EK DR. Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med.* 1995;332(15):1004-1014. doi:10.1525/jlin.2007.17.1.130.130.
20. Parness J, Horwitz SB. Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *J Cell Biol.* 1981;91(2 I):479-487. doi:10.1083/jcb.91.2.479.
21. Wang X, Pan L, Mao N, Sun L, Qin X, Yin J. Cell-cycle synchronization reverses Taxol resistance of human ovarian cancer cell lines. *Cancer Cell Int.*

- 2013;13(1):77. doi:10.1186/1475-2867-13-77.
22. Hornick JE, Bader JR, Tribble EK, et al. Live-cell analysis of mitotic spindle formation in taxol-treated cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2008;65(8):595-613. doi:10.1002/cm.20283.
 23. Long BH, Fairchild CR. Paclitaxel inhibits progression of mitotic cells to G1 phase by interference with spindle formation without affecting other microtubule functions during anaphase and telephase. *Cancer Res*. 1994;54(16):4355-4361. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7913875>. Accessed June 27, 2016.
 24. Geard CR, Jones JM, Bajer AS, et al. Radiation and taxol effects on synchronized human cervical carcinoma cells. *Int J Radiat Oncol*. 1994;29(3):565-569. doi:10.1016/0360-3016(94)90457-X.
 25. Janssen A, Beerling E, Medema R, van Rheenen J. Intravital FRET imaging of tumor cell viability and mitosis during chemotherapy. *PLoS One*. 2013;8(5):e64029. doi:10.1371/journal.pone.0064029.
 26. Zasadil LM, Andersen KA, Yeum D, et al. Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. *Sci Transl Med*. 2014;6(229):229ra43. doi:10.1126/scitranslmed.3007965.
 27. Liebmann JE, Cook J a, Lipschultz C, Teague D, Fisher J, Mitchell JB. Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines. *Br J Cancer*. 1993;68(6):1104-1109. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1968657&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 28. Supiot S, Gouard S, Charrier J, et al. Mechanisms of cell sensitization to alpha radioimmunotherapy by doxorubicin or paclitaxel in multiple myeloma cell lines. *Clin Cancer Res*. 2005;11(19 Pt 2):7047s-7052s. doi:10.1158/1078-0432.CCR-1004-0021.
 29. Wenz F, Greiner S, Germa F, Mayer K, Latz D, Weber KJ. Radiochemotherapy with paclitaxel: Synchronization effects and the role of p53. *Strahlentherapie und Onkol*. 1999;175(S3):2-6. doi:10.1007/BF03215919.

30. Tishler R, Schiff P, Geard C, Hall E. Taxol: a novel radiation sensitizer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1992;77(3):613-617. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016\(92\)90888-O](http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016(92)90888-O).
31. Wang C, Wang Z. Studying the relationship between cell cycle and Alzheimer's disease by gold nanoparticle probes. *Anal Biochem.* 2015;489:32-37. doi:10.1016/j.ab.2015.08.014.
32. Slawson C, Copeland RJ, Hart GW. O-GlcNAc signaling: a metabolic link between diabetes and cancer? *Trends Biochem Sci.* 2010;35(10):547-555. doi:10.1016/j.tibs.2010.04.005.
33. Balomenos D, Martínez-A C. Cell-cycle regulation in immunity, tolerance and autoimmunity. *Immunol Today.* 2000;21(11):551-555. doi:10.1016/S0167-5699(00)01748-5.
34. Lee MG, Nurse P. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature.* 1987;327(6117):31-35. doi:10.1038/327031a0.
35. Nurse P, Thuriaux P, Nasmyth K. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet.* 1976;146(2):167-178. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/958201>. Accessed February 9, 2018.
36. Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell.* 1983;33(2):389-396. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6134587>. Accessed February 9, 2018.
37. Schafer KA. The Cell Cycle: A Review. *Vet Pathol.* 1998;35(6):461-478. doi:10.1177/030098589803500601.
38. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 2014;15(6):122. doi:10.1186/gb4184.
39. Malumbres M. Revisiting the "Cdk-Centric" View of the Mammalian Cell Cycle. *Cell Cycle.* 2005;4(2):209-213. doi:10.4161/cc.4.2.1410.
40. Darling S, Fielding AB, Sabat-Pośpiech D, Prior IA, Coulson JM. Regulation of

- the cell cycle and centrosome biology by deubiquitylases. *Biochem Soc Trans.* 2017;45(5):1125-1136. doi:10.1042/BST20170087.
41. Cooper JA, Kaneko T, Li SSC. Cell regulation by phosphotyrosine-targeted ubiquitin ligases. *Mol Cell Biol.* 2015;35(11):1886-1897. doi:10.1128/MCB.00098-15.
 42. Eifler K, Vertegaal ACO. SUMOylation-Mediated Regulation of Cell Cycle Progression and Cancer. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(12):779-793. doi:10.1016/j.tibs.2015.09.006.
 43. Leduc Y, Lawrence JJ, De Murcia G, Poirier GG. Cell cycle regulation of poly(ADP-ribose) synthetase in FR3T3 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1988;968(3):275-282. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3125857>. Accessed February 27, 2018.
 44. Miao J-F, Peng Y-F, Chen S, et al. A novel harmine derivative, N -(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-1-(4-methoxyphenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxamide (HBC), as histone deacetylase inhibitor: in vitro antiproliferation, apoptosis induction, cell cycle arrest, and antimetastatic effects. *Eur J Pharmacol.* 2018;824:78-88. doi:10.1016/j.ejphar.2018.02.004.
 45. Carlberg M, Larsson O. Role of N-linked glycosylation in cell-cycle progression and initiation of DNA synthesis in tumor-transformed human fibroblasts. *Anticancer Res.* 13(1):167-171. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8476209>. Accessed February 27, 2018.
 46. Lanza C, Tan EP, Zhang Z, et al. Reduced O-GlcNAcase expression promotes mitotic errors and spindle defects. *Cell Cycle.* 2016;15(10):1363-1375. doi:10.1080/15384101.2016.1167297.
 47. Zachara N, Akimoto Y, Hart GW. *The O-GlcNAc Modification*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015. doi:10.1101/GLYCOBIOLOGY.3E.019.
 48. Takeuchi H, Yu H, Hao H, et al. O-Glycosylation modulates the stability of epidermal growth factor-like repeats and thereby regulates Notch trafficking. *J Biol Chem.* 2017;292(38):15964-15973. doi:10.1074/jbc.M117.800102.

49. Loibl M, Strahl S. Protein O-mannosylation: What we have learned from baker's yeast. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2013;1833(11):2438-2446. doi:10.1016/J.BBAMCR.2013.02.008.
50. Goldberg HJ, Whiteside CI, Hart GW, Fantus IG. Posttranslational, reversible O-glycosylation is stimulated by high glucose and mediates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and Sp1 transcriptional activity in glomerular mesangial cells. *Endocrinology.* 2006;147(1):222-231. doi:10.1210/en.2005-0523.
51. Nagy T, Miseta A, Kovacs L. Protein-associated O-GlcNAc, a multifunctional mechanism in cell signaling and its role in the pathogenesis of diabetes, stress and malignant diseases. *Biochem Med.* 2007;17(2):162-177.
52. Butkinaree C, Park K, Hart GWW. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1800(2):96-106. doi:10.1016/j.bbagen.2009.07.018.
53. Eustice M, Bond MR, Hanover JA. O-GlcNAc cycling and the regulation of nucleocytoplasmic dynamics. *Biochem Soc Trans.* 2017;45(2):427-436. doi:10.1042/BST20160171.
54. Ruan H-B, Nie Y, Yang X. Regulation of protein degradation by O-GlcNAcylation: crosstalk with ubiquitination. *Mol Cell Proteomics.* July 2013:1-24. doi:10.1074/mcp.R113.029751.
55. Zhu Y, Liu T-W, Cecioni S, Eskandari R, Zandberg WF, Vocadlo DJ. O-GlcNAc occurs cotranslationally to stabilize nascent polypeptide chains. *Nat Chem Biol.* 2015;11(5):319-325. doi:10.1038/nchembio.1774.
56. Roos MD, Su K, Baker JR, Kudlow JE. O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol Cell Biol.* 1997;17(11):6472-6480. doi:10.1128/MCB.17.11.6472.
57. Yang X, Qian K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* May 2017. doi:10.1038/nrm.2017.22.

58. Sayat R, Leber B, Grubac V, Wiltshire L, Persad S. O-GlcNAc-glycosylation of β -catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. *Exp Cell Res.* 2008;314(15):2774-2787. doi:10.1016/j.yexcr.2008.05.017.
59. Skorobogatko Y, Landicho A, Chalkley RJ, Kossenkov A V, Gallo G, Vosseller K. O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) site thr-87 regulates synapsin I localization to synapses and size of the reserve pool of synaptic vesicles. *J Biol Chem.* 2014;289(6):3602-3612. doi:10.1074/jbc.M113.512814.
60. Nagy T, Balasa A, Frank D, et al. O-GlcNAc modification of proteins affects volume regulation in Jurkat cells. *Eur Biophys J.* 2010;39(8):1207-1217. doi:10.1007/s00249-009-0573-3.
61. Wells L, Gao Y, Mahoney JA, et al. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *J Biol Chem.* 2002;277(3):1755-1761. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788610>. Accessed March 1, 2018.
62. Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem.* 1997;272(14):9308-9315. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9083067>. Accessed March 1, 2018.
63. Lubas WA, Frank DW, Krause M, Hanover JA. O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem.* 1997;272(14):9316-9324. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9083068>. Accessed March 1, 2018.
64. Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T, Issad T. O-GlcNAcylation: A New Cancer Hallmark? *Front Endocrinol.* 2013;4(August):99. doi:10.3389/fendo.2013.00099.
65. Ozcan S, Andrali SS, Cantrell JEL. Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1799(5-6):353-364. doi:10.1016/j.bbagr.2010.02.005.
66. Hanover JA, Krause MW, Love DC. Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* TL - 13.

- 2012;13 VN-r(5):312-321. doi:10.1038/nrm3334.
67. Singh JP, Zhang K, Wu J, Yang X. O-GlcNAc signaling in cancer metabolism and epigenetics. *Cancer Lett.* 2015;356(2):244-250. doi:10.1016/j.canlet.2014.04.014.
 68. Lewis BA, Hanover JA. O-GlcNAc and the Epigenetic Regulation of Gene Expression. *J Biol Chem.* 2014;289(50):34440-34448. doi:10.1074/jbc.R114.595439.
 69. Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem.* 2011;80:825-858. doi:10.1146/annurev-biochem-060608-102511.
 70. Kakade PS, Budnar S, Kalraiya RD, Vaidya MM. Functional Implications of O-GlcNAcylation-dependent Phosphorylation at a Proximal Site on Keratin 18. *J Biol Chem.* 2016;291(23):12003-12013. doi:10.1074/jbc.M116.728717.
 71. Kátai E, Pál J, Poór VS, Purewal R, Miseta A, Nagy T. Oxidative stress induces transient O-GlcNAc elevation and tau dephosphorylation in SH-SY5Y cells. *J Cell Mol Med.* 2016;20(12):2269-2277. doi:10.1111/jcmm.12910.
 72. de Queiroz RM, Carvalho E, Dias WB. O-GlcNAcylation: The Sweet Side of the Cancer. *Front Oncol.* 2014;4:132. doi:10.3389/fonc.2014.00132.
 73. Lefebvre T. O-GlcNAcylation: A sweet thorn in the spindle! *Cell Cycle.* 2016;15(15):1954-1955. doi:10.1080/15384101.2016.1192449.
 74. Slawson C, Zachara NE, Vosseller K, Cheung WD, Lane MD, Hart GW. Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J Biol Chem.* 2005;280(38):32944-32956. doi:10.1074/jbc.M503396200.
 75. Wang S, Huang X, Sun D, et al. Extensive Crosstalk between O-GlcNAcylation and Phosphorylation Regulates Akt Signaling. *PLoS One.* 2012;7(5):e37427. doi:10.1371/journal.pone.0037427.
 76. Dehennaut V, Hanouille X, Bodart J-F, et al. Microinjection of recombinant O-

- GlcNAc transferase potentiates *Xenopus* oocytes M-phase entry. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;369(2):539-546. doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.063.
77. Delporte A, De Zaeytijd J, De Storme N, et al. Cell cycle-dependent O-GlcNAc modification of tobacco histones and their interaction with the tobacco lectin. *Plant Physiol Biochem PPB / Société Fr Physiol végétale.* 2014;83:151-158. doi:10.1016/j.plaphy.2014.07.021.
78. Fong JJ, Nguyen BL, Bridger R, et al. β -N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) is a novel regulator of mitosis-specific phosphorylations on histone H3. *J Biol Chem.* 2012;287(15):12195-12203. doi:10.1074/jbc.M111.315804.
79. Tan EP, Caro S, Potnis A, Lanza C, Slawson C. O-linked N-acetylglucosamine cycling regulates mitotic spindle organization. *J Biol Chem.* August 2013. doi:10.1074/jbc.M113.470187.
80. Itkonen HM, Minner S, Guldvik IJ, et al. O-GlcNAc transferase integrates metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2013;73(16):5277-5287. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0549.
81. Hanover JA, Cohen CK, Willingham MC, Park MK. O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *J Biol Chem.* 1987;262(20):9887-9894. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3110163>. Accessed July 3, 2017.
82. Holt GD, Snow CM, Senior A, Haltiwanger RS, Gerace L, Hart GW. Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J Cell Biol.* 1987;104(5):1157-1164. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3571327>. Accessed July 5, 2017.
83. Yang WH, Park SY, Nam HW, et al. NF κ B activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(45):17345-17350. doi:10.1073/pnas.0806198105.
84. Zhang D, Cai Y, Chen M, Gao L, Shen Y, Huang Z. OGT-mediated O-GlcNAcylation promotes NF- κ B activation and inflammation in acute pancreatitis. *Inflamm Res.* 2015;64(12):943-952. doi:10.1007/s00011-015-0877-

- y.
85. Xing D, Gong K, Feng W, et al. O-GlcNAc modification of NF κ B p65 inhibits TNF- α -induced inflammatory mediator expression in rat aortic smooth muscle cells. *PLoS One*. 2011;6(8):e24021. doi:10.1371/journal.pone.0024021.
 86. Wang Z, Udeshi ND, Slawson C, et al. Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates cytokinesis. *Sci Signal*. 2010;3(104):ra2. doi:10.1126/scisignal.2000526.
 87. Yang YR, Song M, Lee H, et al. O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability. *Aging Cell*. 2012;11(3):439-448. doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00801.x.
 88. Lefebvre T, Baert F, Bodart JFJ-F, Flament S, Michalski J-CJC, Vilain J-PJP. Modulation of O-GlcNAc glycosylation during *Xenopus* oocyte maturation. *J Cell Biochem*. 2004;93(5):999-1010. doi:10.1002/jcb.20242.
 89. Dehennaut V, Lefebvre T, Sellier C, et al. O-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem*. 2007;282(17):12527-12536. doi:10.1074/jbc.M700444200.
 90. Sakabe K, Hart GW. O-GlcNAc transferase regulates mitotic chromatin dynamics. *J Biol Chem*. 2010;285(45):34460-34468. doi:10.1074/jbc.M110.158170.
 91. Begg AC, Haustermans K, Hart AAM, et al. The value of pretreatment cell kinetic parameters as predictors for radiotherapy outcome in head and neck cancer: a multicenter analysis. *Radiother Oncol*. 1999;50(1):13-23. doi:10.1016/S0167-8140(98)00147-9.
 92. Bertuzzi A, Gandolfi A, Sinisgalli C, Starace G, Ubezio P. Cell loss and the concept of potential doubling time. *Cytometry*. 1997;29(1):34-40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9298809>. Accessed June 27, 2016.
 93. Riccardi A, Danova M, Wilson G, et al. Cell kinetics in human malignancies studied with in vivo administration of bromodeoxyuridine and flow cytometry

- published erratum appears in *Cancer Res* 1993 Sep 1;53(17):4119. *Cancer Res.* 1988;48(21):6238-6245.
94. Xu J, Xie J, Jourquin J, et al. Influence of cell cycle phase on apparent diffusion coefficient in synchronized cells detected using temporal diffusion spectroscopy. *Magn Reson Med.* 2011;65(4):920-926. doi:10.1002/mrm.22704.
 95. Lehner B, Sandner B, Marschallinger J, et al. The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival. *Cell Tissue Res.* 2011;345(3):313-328. doi:10.1007/s00441-011-1213-7.
 96. Yano S, Zhang Y, Miwa S, et al. Spatial-temporal Fucci imaging of each cell in a tumor demonstrates locational dependence of cell cycle dynamics and chemoresponsiveness. *Cell Cycle.* 2014;13(13):2110-2119. doi:10.4161/cc.29156.
 97. Auersperg M, Soba E, Vraspir-Porenta O. Intravenous chemotherapy with syndronization in advanced cancer of oral cavity and oropharynx. *Zeitschrift für Krebsforsch und Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol.* 1977;90(2):149-159. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/74141>. Accessed June 27, 2016.
 98. Gelbert LM, Cai S, Lin X, et al. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Invest New Drugs.* 2014;32(5):825-837. doi:10.1007/s10637-014-0120-7.
 99. Verheul HMW, Qian DZ, Carducci MA, Pili R. Sequence-dependent antitumor effects of differentiation agents in combination with cell cycle-dependent cytotoxic drugs. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007;60(3):329-339. doi:10.1007/s00280-006-0379-2.
 100. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol.* 2004;59(4):928-942. doi:10.1016/j.ijrobp.2004.03.005.
 101. Rowinsky EK, Jiroutek M, Bonomi P, Johnson D, Baker SD. Paclitaxel steady-state plasma concentration as a determinant of disease outcome and toxicity in lung cancer patients treated with paclitaxel and cisplatin. *Clin Cancer Res.*

- 1999;5(4):767-774. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10213211>. Accessed March 17, 2014.
102. Kotelnikov VM, Coon JS I V, Haleem A, et al. Cell kinetics of head and neck cancers. *Clin Cancer Res.* 1995;1(5):527-537. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9816012>. Accessed June 15, 2018.
103. van Erp PE, Boezeman JB, Brons PP. Cell cycle kinetics in normal human skin by in vivo administration of iododeoxyuridine and application of a differentiation marker--implications for cell cycle kinetics in psoriatic skin. *Anal Cell Pathol.* 1996;11(1):43-54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8844104>. Accessed June 15, 2018.
104. Rew DA a, Wilson GDD. Cell production rates in human tissues and tumours and their significance. Part II: clinical data. *Eur J Surg Oncol.* 2000;26(4):405-417. doi:10.1053/ejso.1999.0907.
105. Yano S, Zhang Y, Zhao M, et al. Tumor-targeting salmonella typhimurium A1-R decoys quiescent cancer cells to cycle as visualized by FUCCI imaging and become sensitive to chemotherapy. *Cell Cycle.* 2014;13(24):3958-3963. doi:10.4161/15384101.2014.964115.
106. Yano S, Tazawa H, Hashimoto Y, et al. A genetically engineered oncolytic adenovirus decoys and lethally traps quiescent cancer stem-like cells in S/G2/M phases. *Clin Cancer Res.* 2013;19(23):6495-6505. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0742.
107. Yano S, Li S, Han Q, et al. Selective methioninase-induced trap of cancer cells in S/G2 phase visualized by FUCCI imaging confers chemosensitivity. *Oncotarget.* 2014;5(18):8729-8736. doi:10.18632/oncotarget.2369.
108. Stern PH, Hoffman RM. Enhanced in vitro selective toxicity of chemotherapeutic agents for human cancer cells based on a metabolic defect. *J Natl Cancer Inst.* 1986;76(4):629-639. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3457200>. Accessed June 28, 2016.
109. Hoffman RM. Development of recombinant methioninase to target the general cancer-specific metabolic defect of methionine dependence: a 40-year odyssey.

- Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(1):21-31. doi:10.1517/14712598.2015.963050.
110. Pederson T, Robbins E. A method for improving synchrony in the G2 phase of the cell cycle. *J Cell Biol.* 1971;49(3):942-945.
 111. Bostock CJ, Prescott DM, Kirkpatrick JB. An evaluation of the double thymidine block for synchronizing mammalian cells at the G1-S border. *Exp Cell Res.* 1971;68(1):163-168. doi:10.1016/0014-4827(71)90599-4.
 112. Walgren JLE, Vincent TS, Schey KL, Buse MG. High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(2):E424-34. doi:10.1152/ajpendo.00382.2002.
 113. Dehennaut V, Slomianny M-C, Page A, et al. Identification of structural and functional O-linked N-acetylglucosamine-bearing proteins in *Xenopus laevis* oocyte. *Mol Cell Proteomics.* 2008;7(11):2229-2245. doi:10.1074/mcp.M700494-MCP200.
 114. Butkinaree C, Park K, Hart GW. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1800(2):96-106. doi:10.1016/j.bbagen.2009.07.018.
 115. O'Donnell N, Zachara NE, Hart GW, Marth JD. Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol Cell Biol.* 2004;24(4):1680-1690. doi:10.1128/MCB.24.4.1680-1690.2004.
 116. Shafi R, Iyer SPN, Ellies LG, et al. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97(11):5735-5739. doi:10.1073/pnas.100471497.
 117. Olivier-Van Stichelen S, Drougat L, Dehennaut V, et al. Serum-stimulated cell cycle entry promotes ncOGT synthesis required for cyclin D expression. *Oncogenesis.* 2012;1(12):e36. doi:10.1038/oncsis.2012.36.

118. Kwei KA, Baker JB, Pelham RJ. Modulators of sensitivity and resistance to inhibition of PI3K identified in a pharmacogenomic screen of the NCI-60 human tumor cell line collection. *PLoS One*. 2012;7(9):e46518. doi:10.1371/journal.pone.0046518.
119. Slawson C, Hart GW. O-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(9):678-684. doi:10.1038/nrc3114.
120. Sakabe K, Wang Z, Hart GW. Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(46):19915-19920. doi:10.1073/pnas.1009023107.
121. Slawson C, Lakshmanan T, Knapp S, Hart GW. A mitotic GlcNAcylation/phosphorylation signaling complex alters the posttranslational state of the cytoskeletal protein vimentin. *Mol Biol Cell*. 2008;19(10):4130-4140. doi:10.1091/mbc.E07-11-1146.
122. Tian J, Geng Q, Ding Y, et al. O-GlcNAcylation antagonizes phosphorylation of CDH1 (CDC20 homologue 1). *J Biol Chem*. 2016;291(23):12136-12144. doi:10.1074/jbc.M116.717850.
123. Haltiwanger RS, Philipsberg GA. Mitotic Arrest with Nocodazole Induces Selective Changes in the Level of O-Linked N-Acetylglucosamine and Accumulation of Incompletely Processed N-Glycans on Proteins from HT29 Cells. *J Biol Chem*. 1997;272(13):8752-8758. doi:10.1074/jbc.272.13.8752.
124. SHEN Y, BETZENDAHL I, SUN F, TINNEBERG H, EICHENLAUBRITTER U. Non-invasive method to assess genotoxicity of nocodazole interfering with spindle formation in mammalian oocytes. *Reprod Toxicol*. 2005;19(4):459-471. doi:10.1016/j.reprotox.2004.09.007.
125. Hanover JA, Cohen CK, Willingham MC, Park MK. O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *J Biol Chem*. 1987;262(20):9887-9894. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3110163>. Accessed July 5, 2017.
126. Theisen U, Straube A, Steinberg G. Dynamic rearrangement of nucleoporins during fungal “open” mitosis. *Mol Biol Cell*. 2008;19(3):1230-1240.

- doi:10.1091/mbc.E07-02-0130.
127. Chatel G, Fahrenkrog B. Nucleoporins: leaving the nuclear pore complex for a successful mitosis. *Cell Signal.* 2011;23(10):1555-1562. doi:10.1016/j.cellsig.2011.05.023.
 128. Mizuguchi-Hata C, Ogawa Y, Oka M, Yoneda Y. Quantitative regulation of nuclear pore complex proteins by O-GlcNAcylation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2013;1833(12):2682-2689. doi:10.1016/J.BBAMCR.2013.06.008.
 129. Zhu Y, Liu T-W, Madden Z, et al. Post-translational O-GlcNAcylation is essential for nuclear pore integrity and maintenance of the pore selectivity filter. doi:10.1093/jmcb/mjv033.
 130. Dossus L, Kaaks R. Nutrition, metabolic factors and cancer risk. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22(4):551-571. doi:10.1016/j.beem.2008.08.003.
 131. Rozanski W, Krzeslak A, Forma E, et al. Prediction of bladder cancer based on urinary content of MGEA5 and OGT mRNA level. *Clin Lab.* 2012;58(5-6):579-583. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22783592>. Accessed February 27, 2017.

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

Fisi V, Katai E, Bogner P, Miseta A, Nagy T. *Timed, sequential administration of paclitaxel improves its cytotoxic effectiveness in a cell culture model*. Cell Cycle. 2016 May 2;15(9):1227-33.

IF: 3.53

Fisi V, Miseta A, Nagy T. *The Role of Stress-Induced O-GlcNAc Protein Modification in the Regulation of Membrane Transport*. Oxid Med Cell Longev. 2017:1308692.

IF:4.593

Fisi V, Katai E, Orban J, Dossena S, Miseta A, Nagy T. *O-linked N-acetylglucosamine transiently elevates in HeLa cells during mitosis*. Molecules. 2018 May 26;23(6).

IF: 2.861

Összesített impakt faktor: 10.984

EGYÉB EREDETI KÖZLEMÉNYEK

Nagy T, Kátai E, **Fisi V**, Takács TT, Stréda A, Wittmann I, Miseta A. *Protein O-GlcNAc Modification Increases in White Blood Cells After a Single Bout of Physical Exercise*. Front Immunol. 2018 May 3;9:970.

IF: 6.429

Szijártó IA, Molnár GA, Mikolás E, **Fisi V**, Cseh J, Laczy B, Kovács T, Böddi K, Takátsy A, Gollasch M, Koller A, Wittmann I. *Elevated Vascular Level of ortho-Tyrosine Contributes to the Impairment of Insulin-Induced Arterial Relaxation*. Horm Metab Res. 2014 Sep 10.

IF: 2.038

Kellermayer Z, **Fisi V**, Mihalj M, Berta G, Kóbor J, Balogh P. *Marginal Zone Macrophage Receptor MARCO Is Trapped in Conduits Formed by Follicular Dendritic Cells in the Spleen*. J Histochem Cytochem. 2014 Mar 26;62(6):436-449.

IF: 2.403

Szijártó IA, Molnár GA, Mikolás E, **Fisi V**, Laczy B, Gollasch M, Koller A, Wittmann I. *Increase in insulin-induced relaxation of consecutive arterial segments toward the periphery: Role of vascular oxidative state*. Free Radic Res. 2014 Jul;48(7):749-57.

IF: 2.989

Mikolás E, Cseh J, Pap M, Szijártó IA, Balogh A, Laczy B, Bekő V, **Fisi V**, Molnár GA, Mérei A, Szeberényi J, Wittmann I. *Effects of erythropoietin on glucose metabolism*. Horm Metab Res. 2012 Apr;44(4):279-85.

IF: 2.145

Fisi V, Mazák I, Degrell P, Halmai R, Molnár GA, Fehér E, Németh K, Pintér I, Kovács T, Wittmann I. *Histological diagnosis determines complications of percutaneous renal*

biopsy: a single-center experience in 353 patients. Kidney Blood Press Res. 2012;35(1):26-34.

IF: 1.596

Balogh P, Fisi V, Szakal AK. *Fibroblastic reticular cells of the peripheral lymphoid organs: unique features of a ubiquitous cell type.* Mol Immunol. 2008 Nov;46(1):1-7.

IF: 3.555

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: 32.139

IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK

Mikolas EZ, **Fisi V**, Cseh J, Pap M, Szijarto IA, Molnar GA, Beko V, Wittman I. *Effects of Erythropoietin on Glucose Metabolism*. *Kidney Blood Press Res*. 2010;33(6):425-426. Meeting Abstract: 24.

IF: 1.5

Szijarto IA, Merei A, **Fisi V**, Fesus G, Cseh J, Mikolas EZ, Molnar GA, Wittmann I. *Does Oxidative Stress Affect the Vasoactive Effect of Insulin?* *Kidney Blood Press Res*. 2010;33(6):434-435. Meeting Abstract: 42.

IF: 1.5

Kellermayer Z, **Fisi V**, Mihalj M, Kobor J, Balogh P. *Role of complement receptor in the acquisition and transport of marginal zone macrophage-associated MARCO scavenger receptor by follicular dendritic cells*. *Eur J Clin Invest* 2012 Apr; 42:7-7.

IF: 3.365

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőimnek, Dr. Nagy Tamásnak és Prof. Dr. Miseta Attilának az elmúlt évek alatt nyújtott rengeteg támogatásukat, türelmüket és megértésüket. Hálás vagyok kutató- és oktató munkám során kapott hasznos tanácsaikért, útmutatásukért.

Szívből köszönöm kolléganőmnek, Dr. Kátai Emesének, hogy bármikor számíthattam értékes szakmai segítségére, javaslataira és még értékesebb baráti tanácsaira.

Köszönetemet fejezem ki közvetlen munkatársaimnak, akikkel a Laboratóriumi Medicina Intézetben, illetve a Szentágothai Kutatóközpontban együtt dolgozhattam, különösen Dr. Czéh Boldizsárnak és munkacsoportjának a baráti légkörért.

Nagyon köszönöm Dr. Szabó-Meleg Edinának és Dr. Orbán Józsefnek a konfokális mikroszkópiában nyújtott segítségét. Hálás vagyok a sejtvonalak rendelkezésünkre bocsátásáért Dr. Boldizsár Ferencnek és Prof. Dr. Balogh Péternek, akinek ezen felül külön köszönöm kiváló példamutatását, melyben tudományos diákkörös éveim során részesülhettem.

Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok családomnak, akik lehetővé tették tanulmányaimat. Köszönöm megértésüket és biztatásukat, melyek nélkül dolgozatom nem születhetett volna meg. Igazán hálás vagyok barátaimnak, akik mellettem álltak az elmúlt évek során. Köszönöm páromnak a rengeteg türelmét, és hogy saját idejét nem kímélve segítette dolgozatom megírását. Nagyon köszönöm kislányom, Írisz megértő hozzáállását és szeretetét!

REPORT

 OPEN ACCESS

Timed, sequential administration of paclitaxel improves its cytotoxic effectiveness in a cell culture model

Viktória Fisi^a, Emese Kátai^a, Péter Bogner^b, Attila Miseta^a, and Tamás Nagy^a

^aDepartment of Laboratory Medicine, University of Pécs, Pécs, Hungary; ^bDepartment of Radiology, University of Pécs, Pécs, Hungary

ABSTRACT

Paclitaxel (taxol) is a chemotherapeutic agent frequently used in combination with other anti-neoplastic drugs. It is most effective during the M phase of the cell-cycle and tends to cause synchronization in malignant cells lines. In this study, we investigated whether timed, sequential treatment based on the cell-cycle characteristics could be exploited to enhance the cytotoxic effect of paclitaxel. We characterized the cell-cycle properties of a rapidly multiplying cell line (Sp2, mouse myeloma cells) by propidium-iodide DNA staining such as the lengths of various cell cycle phases and population duplication time. Based on this we designed a paclitaxel treatment protocol that comprised a primary and a secondary, timed treatment. We found that the first paclitaxel treatment synchronized the cells at the G2/M phase but releasing the block by stopping the treatment allowed a large number of cells to enter the next cell-cycle by a synchronized manner. The second treatment was most effective during the time when these cells approached the next G2/M phase and was least effective when it occurred after the peak time of this next G2/M phase. Moreover, we found that after mixing Sp2 cells with another, significantly slower multiplying cell type (Jurkat human T-cell leukemia) at an initial ratio of 1:1, the ratio of the two different cell types could be influenced by timed sequential paclitaxel treatment at will. Our results demonstrate that knowledge of the cell-cycle parameters of a specific malignant cell type could improve the effectivity of the chemotherapy. Implementing timed chemotherapeutic treatments could increase the cytotoxicity on the malignant cells but also decrease the side-effects since other, non-malignant cell types will have different cell-cycle characteristic and be out of synch during the treatment.

ARTICLE HISTORY

Received 19 November 2015
Revised 18 February 2016
Accepted 18 February 2016

KEYWORDS

cell cycle; cell synchronization; chemotherapy; mitotic arrest; paclitaxel

Introduction



Paclitaxel (taxol) is a chemotherapeutic agent that was first isolated from the bark of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*.¹ It has a broad spectrum of antitumor activity. It is approved by the Food and Drug Administration in the US for the therapy of breast, ovarian, and lung cancer, as well as Kaposi's sarcoma. It is used off-label to treat endometrial, cervical, prostate, gastro-esophageal, and head and neck tumors, in addition to sarcoma, lymphoma, and leukemia.² The most frequently used doses of paclitaxel are 135 mg/m² and 175 mg/m² and it is administered as 3 or 24 hours lasting infusions and repeated in multiple, 21 days cycles or 7 days cycles. Taxanes are often combined with other drugs or with radiotherapy, e.g. taxane with anthracyclin, trastuzumab or cyclophosphamide or with platinum-based agents in the therapy of breast cancer.^{3–7}

Paclitaxel's primary action is to bind to microtubules, especially β -tubulin, and prevent their depolymerization, thereby stabilizing mitotic spindle during mitosis.⁸ Inhibiting the transition through mitosis, it produces an arrest in the M phase of the cell cycle.^{1,9,10} Mitotic arrest caused by paclitaxel results in either prolonged arrest, apoptotic cell death or recovery and continued cycling if the blockade is released before the cells would initiate apoptosis. Although passage through mitosis is

an absolute requirement for Taxol-induced death,¹¹ it has been also suggested that cell death caused by taxol is not only due to mitotic arrest but it can also be the consequence of the action on interphase cells.^{12,13}

Despite that paclitaxel had been shown to affect cell viability in other cell cycle phases,¹⁴ its cytotoxic activity is most effective during M phase.¹⁵ As low as 5 nM of paclitaxel is enough to arrest and to subsequently kill malignant cells, but the effectiveness and the required concentration is highly dependent on the length of the treatment and the cell type.¹⁵ Namely, the treatment has to accommodate the cell cycle dynamics. Thus, proposals had been put forward to exploit paclitaxel's selectivity toward mitotic cells in cancer therapy. Wang et al. showed that synchronizing ovarium cancer cell lines reverses paclitaxel resistance.⁹ On the other hand, cell-cycle arrest and synchronization was also found to significantly contribute to cell sensitization by paclitaxel to radiotherapy.^{16,17}

The aim of the present study was to develop a cytotoxic treatment scheme that is tailored toward a specific cell line. Using paclitaxel as being both a cell cycle synchronizing and a cytotoxic drug, we employed a timed sequential treatment schedule that was based on the cell cycle characteristics of the Sp2 cell line. Moreover, applying the same treatment schedule,

CONTACT Tamás Nagy  nagy.tamas@pte.hu  Department of Laboratory Medicine, University of Pécs, H-7624, Ifjúság str. 13. Pécs, Hungary.

© 2016 Viktória Fisi, Emese Kátai, Péter Bogner, Attila Miseta, and Tamás Nagy. Published with license by Taylor & Francis.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The moral rights of the named author(s) have been asserted.

we selectively targeted this cell line in a mixture of Sp2 and an other cell line with a different cell cycle characteristic.

Results

Synchronization of Sp2 cells with paclitaxel

Our preliminary data showed that $\sim 0.03 - 0.1$ mg/L of paclitaxel treatment for 12–15 hours was sufficient to halt Sp2 cells at the G₂/M phase without causing immediate cell death (data not shown). Therefore we used 0.05 mg/L paclitaxel treatment for 14 hours to transiently block the cells in G₂/M phase, and then released the blockage by vigorously washing out paclitaxel

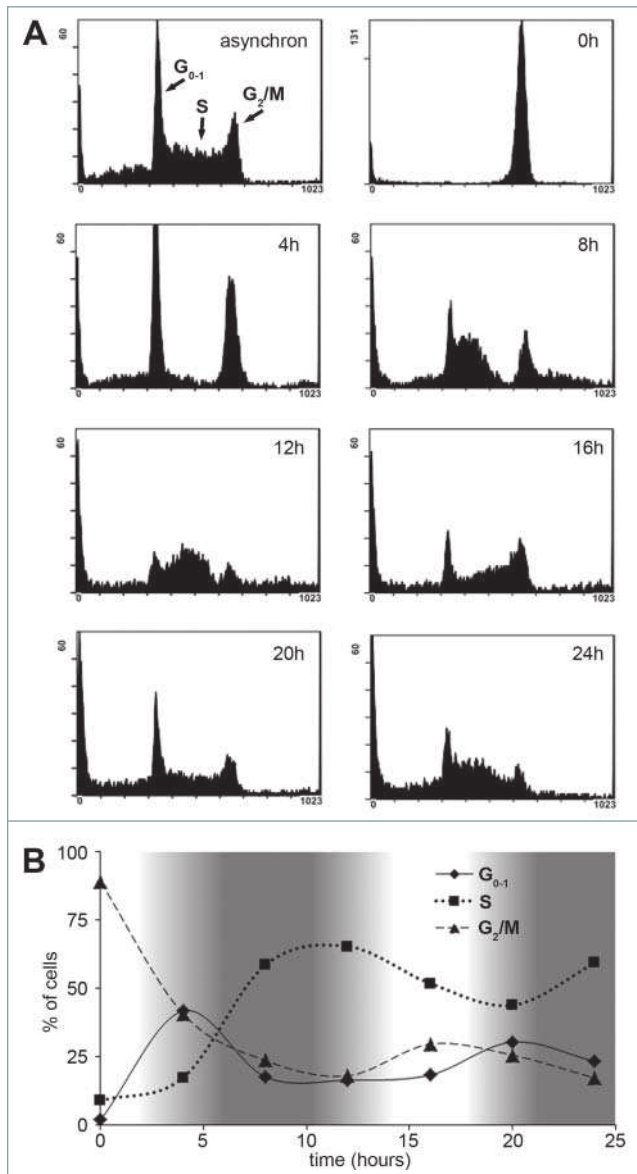


Figure 1. Characterization of Sp2 cells' cell cycle dynamics after synchronization with paclitaxel. (A) Sp2 cells were treated with 0.05 mg/L paclitaxel for 14 hours then allowed to recover from the blockage. Cell cycle distribution was monitored every 4 hours by flow cytometry and propidium-iodide staining after fixation of the cells. Cell cycle distributions are shown as histogram plots of the FL3 fluorescence channel. (B) The relative number of cells in G₀₋₁, S and G₂/M phase over time are shown. White areas on the graph indicate cell cycle phases when the cells are more susceptible (cells in the G₂/M phase are the most abundant) while darker areas indicate intervals when cells are least susceptible to a subsequent paclitaxel treatment.

from the cell culture medium. We monitored the cell cycle distribution of Sp2 cells for 24 hours by propidium-iodide staining. As shown in Figure 1A, this experimental setup caused a complete, temporary block at the G₂/M phase but once the blockade was raised, the cells entered the next cell cycle. Moreover, the cells remained relatively synchronized until the end of the monitoring; up to 24 hours after treatment.

The ratio of cells in G₀₋₁, S and G₂/M phase was calculated every 4 hours and plotted (Fig. 1B). The elapsed time between 2 consecutive peaks (e.g., S - S or G₂/M - G₂/M) was approximately 16 hours therefore the average time of one complete cell cycle of Sp2 cells lasted 16 hours. We have also estimated the duration of each cell cycle phases based on the following equation: $T_d + T_{phase} = T_{total\ Phase}$ where T_d is the delay between the first and the last cell entering a given cell cycle phase, T_{phase} is the average time a cell spends in that phase and $T_{total\ Phase}$ is the total time between the first cell entering and the last cell exiting the phase (the latter was measured as the time between the start and the end of a peak (e.g., 0 - 8 hours for G₀). Applying this equation for each cell cycle phases resulted in the following estimations for the duration of the cell cycle phases: G₀₋₁ ≈ 1.5 hours, S ≈ 9.5 hours, G₂/M ≈ 5 hours and $T_d \approx 6.5$ hours.

Timing of the second treatment significantly influences paclitaxel's cytotoxicity

Since paclitaxel mainly acts during mitosis, we assumed that synchronized Sp2 cells have a "sweet spot," a time period during their progress in the cell cycle when they are more susceptible for a subsequent treatment. These periods are shown as fading-in/fading-out white areas in Fig 1B when the largest amounts of cells are in G₂/M phase. To test this hypothesis, we synchronized Sp2 cells with paclitaxel then after various delay periods, we exposed them to a second paclitaxel treatment (Fig. 2A). The duration of the second treatment - 8 hours - proved to be a good compromise: long enough to cover most of the cells entering G₂/M phase but short enough that experiments with various delay periods would not overlap too much.

We have found that the second treatment was most effective when it occurred between $\sim 12-14$ and $20-22$ hours after the end of the first treatment. In contrast, if the second treatment occurred $22 - 30$ hours after the end of the first treatment, significantly more cells survived. This difference between optimal and sub-optimal timing could be followed up to 2 days after the experiments (Fig. 2B).

Timed sequential paclitaxel treatment can favor one cell type over another

We tested whether we could apply consecutive paclitaxel treatments to discriminate between two cell lines that have different cell cycle characteristics. For this reason, we have chosen Jurkat cells to pair with Sp2 cells. Based on preliminary experiments, the Jurkat cell line we used had an approx. 24–36 hours population doubling time under the same cell culture conditions used for Sp2 cells (data not shown). The Jurkat cell line we used was expressing GFP which was necessary to distinguish between the two cell lines. First, we compared the cell cycle characteristics of the two cell lines in asynchron cultures and also after

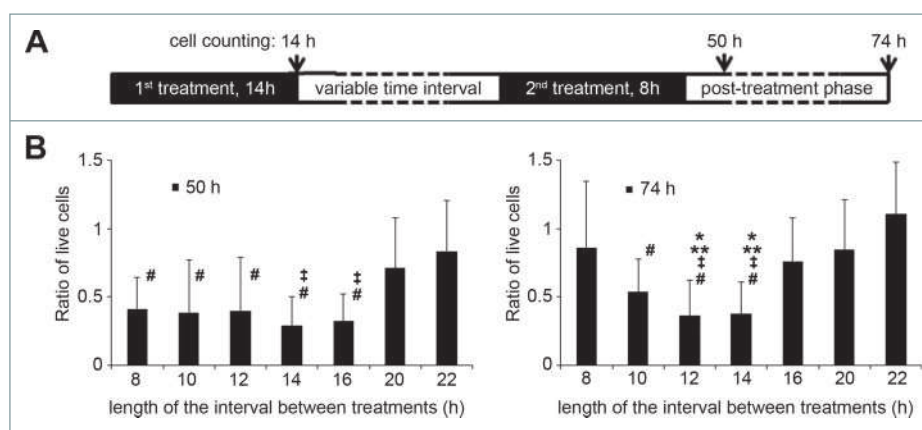


Figure 2. The efficiency of sequential paclitaxel treatments of Sp2 cells depends on the timing. (A) Design of the experimental protocol. Sp2 cells were treated with 0.05 mg/L of paclitaxel for 14 hours, then left to recover for various amounts of time (8–22 hours). A second, 0.05 mg/L paclitaxel treatment followed for 8 hours, then the cells were placed in paclitaxel-free, complete medium, and the number of live cells was counted by trypan-blue exclusion dye staining approx. two and three days (50 h and 74h) after the start of the experiments. (B) Ratio of live cells compared to the number of live cells counted at the 0 hour mark (end of the 1st paclitaxel treatment) at 50 and 74 hours. Bars are representing the average of a set of individual experiments where the interval times between sequential paclitaxel treatments were 8–22 hours. Data are shown as means \pm SD, *P < 0.05 vs. 8 hours interval time, **P < 0.05 vs. 16 hours, †P < vs 20 hours, ‡P < vs 22 hours.

14 hours of 0.05 mg/L paclitaxel treatment (optimal only for Sp2 cells) as shown in Figure 3.

The ratios of cells in the cell cycle phases were the followings: asynchron Sp2 cells: 37.3(\pm 1.4)% G0-1 phase, 40.2 (\pm 5.2)% S phase, 22.5(\pm 3.8)% G2/M phase. Asynchron Jurkat cells: 55(\pm 3.4)% G0-1 phase, 23.5(\pm 4.3)% S phase, 21.5 (\pm 1.5)% G2/M phase. Sp2 cells after 14 hours of 0.05mg/L paclitaxel treatment: 2.5(\pm 0.9)% G0-1 phase, 5(\pm 0.8)% S phase, 92.4(\pm 1.5)% G2/M phase. Jurkat cells after 14 hours of

0.05 mg/L paclitaxel treatment: 34.4(\pm 3.8)% G0-1 phase, 24.3 (\pm 3.6)% S phase, 41.3(\pm 7.4)% G2/M phase.

Next, we mixed Sp2 cells and Jurkat cells at 1:1 ratio and treated them for 14 hours with 0.05 mg/L paclitaxel, then measured the amount of cells by flow cytometry one, two or three days after the treatment. As shown in Figure 4A and Figure 4B, if no subsequent treatment followed Sp2 cells quickly overcame the number of Jurkat cells, despite that the first paclitaxel treatment was intended to be more effective on them than on Jurkat

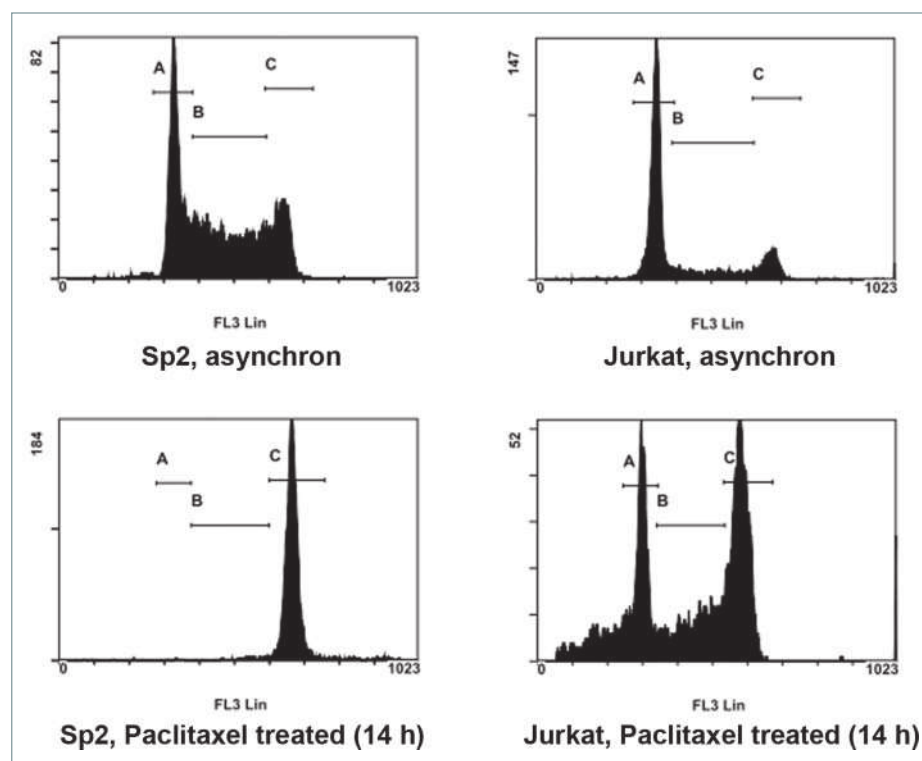


Figure 3. Synchronization efficiency of paclitaxel on Sp2 and Jurkat cells at a fixed duration time. Both Sp2 and Jurkat cells were exposed to the same paclitaxel treatment: 0.05 mg/L for 14 hours. Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry and propidium-iodide staining after fixation of the cells. Top row: histogram plot of cell cycle distribution without paclitaxel treatment. Bottom row: cell cycle distribution after 14 hours of 0.05 mg/L paclitaxel treatment. Regions indicated in all histogram plots are: G₀₋₁ (A), S (B) and G₂/M phase (C).

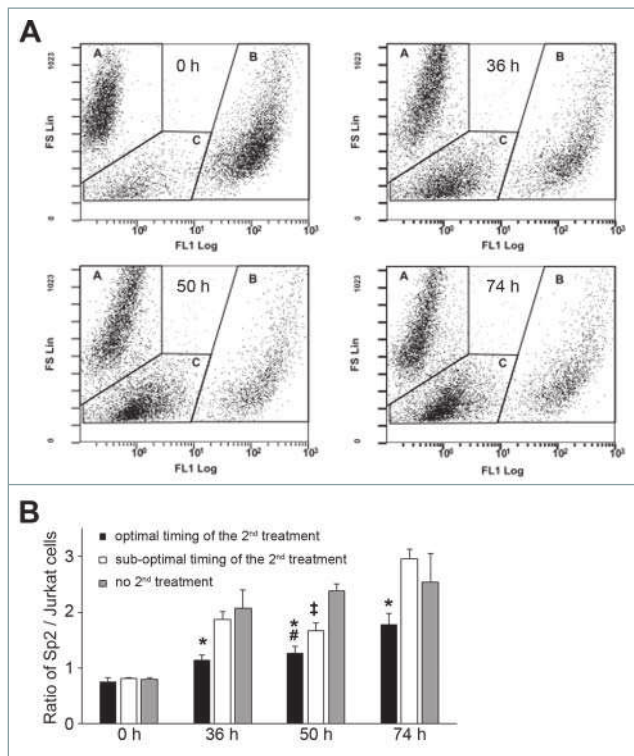


Figure 4. Timing of sequential paclitaxel treatment discriminates cell lines with different cell cycle properties. (A) Sp2 and GFP-expressing Jurkat cells were initially mixed at ~1:1 ratio (0h), treated for 14 hours with 0.05 mg/L paclitaxel then left to recover until the end of the experiments. The ratio of Sp2 and Jurkat was analyzed at the indicated times after the start of the experiments by counting cells with flow cytometry, without fixation. Data points are shown as a function of forward scatter (FS, ~cell size) and green fluorescence (FL1, GFP). In each plot, regions indicated with 'A' corresponds to Sp2 cells, regions indicated with 'B' corresponds to GFP-expressing Jurkat cells, while regions indicated with 'C' corresponds to cell debris. (B) Sp2 and GFP-expressing Jurkat cells were mixed at ~1:1 ratio and exposed to sequential paclitaxel treatment. Based on previous experiments (shown in Fig. 2), 'optimal timing' of the second paclitaxel started 14 hours after; while 'sub-optimal timing' started 22 hours after the end of the first treatment. The ratio of Sp2/Jurkat cells was counted at 0 hour, 36 hours, 50 hours and 74 hours after the start of the experiments. Data are shown as means \pm SD, *P < 0.05 optimal vs. sub-optimal, #P < 0.05 optimal vs. no 2nd treatment, †P < 0.05 sub-optimal vs. no 2nd treatment.

cells. Similarly, when a second treatment occurred at a sub-optimal time period, the ratio of Sp2 cells compared to Jurkat cells was almost as high as in the absence of the second treatment. On the other hand, if the first treatment was followed-up by a second, optimal timed paclitaxel treatment, the ratio of Sp2/Jurkat cells remained significantly lower.

Discussion

In the present study we demonstrated the effect of timed, sequential treatments with paclitaxel on Sp2 mouse hybridoma cell line. Based on the cell cycle data specific for Sp2, we could significantly improve the cytotoxic ability of paclitaxel. We have also shown that optimal timing of subsequent treatments could be used to differentiate between cell types with various cell cycle characteristics. In contrast to sub-optimal timing, sequential paclitaxel treatment targeted against Sp2 cells was significantly more effective than against Jurkat cells. These results suggest that analyzing the cell cycle properties of malignant cells and scheduling chemotherapeutic regimes based on

this information could improve the efficacy of anti-cancer therapy.

Several parameters describing cell cycle kinetics, including potential doubling time (Tpot) and bromodeoxyuridine (BrdU) labeling index have been tried to predict therapy outcome.^{18,19} Our present findings also indicate that cell cycle characteristics, such as population doubling time, the proportion and transit time of cells in various cell cycle phases are important factors influencing the effectiveness of cytotoxic treatment. We think that this information should be seriously considered during differential diagnosis and before anti-tumor intervention. Unfortunately, this happens very rarely in the clinical practice. There are a number of methods available to measure cell cycle properties. In vivo administration of BrdU followed by delayed biopsy allows the estimation of potential doubling time (Tpot) of malignant tumors because BrdU incorporates in the nuclei during DNA synthesis in S phase.¹⁹ Analyzing the amount of DNA and cell cycle distribution in cells from biopsies by flow cytometry or microscopy using DNA stains such as propidium-iodide is also an option. Non-invasive techniques such as MRI has been also used to estimate the proportion of dividing cells.²⁰ However none of these techniques are without limitations. E.g. analyzing DNA staining by flow cytometry requires individual cells to be released from the tumor mass and suspend in a buffer which might be challenging in some types of malignant tissues. In vitro culturing of isolated cells could increase the number of cells available to analyze, however in vitro cell cycle characteristics are not necessarily reflecting in vivo conditions. Probably the biggest difficulty is that cancer tissues are inhomogeneous most of the time, part of the tumor mass is necrotic, part of it is growing slower than Tpot would allow.²¹ Thus, collecting biopsies representative of the whole tumor or improving non-invasive imaging techniques are of utmost importance to enhance the intra-tumoral cell cycle analysis capabilities.

Some degree of cell synchronization is a long known consequence of cancer therapy and therapies specifically designed to manipulate cell cycle and to synchronize cells are dating back in the seventies.²² In more recent years, the focus in research and in development of new anti-cancer therapies shifted to cell cycle agents, many of them are cycline dependent kinase inhibitors.^{23,24} In these therapeutic approaches, cell differentiation agents are often used in combination with cytotoxic drugs²⁵ or with radiotherapy.^{26,27} Paclitaxel was also applied and found effective in synchronizing and sensitizing malignant cell lines against radiotherapy.¹⁶ Interestingly, Wang et al. demonstrated on cell cultures that synchronization prior to paclitaxel treatment also improved paclitaxel's cytotoxic potency.⁹ However, to our knowledge there is no current clinical or pre-clinical application of the combined use of cell cycle analysis and subsequent therapy which incorporates these specific cell cycle data.

In our experiments, we used paclitaxel to both synchronize and to kill malignant cells at 0.05 mg/L or ~60 nmol/L. In human therapy, the plasma concentration of paclitaxel ranges from around 80 nmol/L to 500 nmol/L, but the intracellular paclitaxel concentration was found to be much higher, up to 1–9 μ mol/L.^{2,28} Thus the conditions in our experiments are

comparable to the lower end of the therapeutic range. Sp2 cells are rapidly multiplying cells, with an average population doubling time of 16 hours. Paclitaxel has long been shown to be most effective against fast growing cells.¹⁵ Thus, Sp2 cell line is very suitable to test sequential treatment.

This technique could be proven more difficult to apply on a slower growing cell line. Cell production rate of cancers have a very wide range; population duplication can happen in a few days or in several months.²⁹ In theory, paclitaxel could be administered to patients over a long period of time to increase the amount of malignant cells entering and subsequently arresting at G2/M phase. However, longer exposure also increases the severity of cytotoxic damage done to non-malignant cells. This major limitation for the “traditional” anti-cancer therapies also hinders sequential treatments; the success or failure of the first treatment to synchronize the cells will greatly impact the effectivity of the subsequent, timed treatments. Moreover, tumor growth is not only determined by cell cycle kinetic, but by other factors as well, such as tumor size and location, necrosis due to inaccessibility to nutrients, the anti-cancer capacity of the immune system, etc. Another limitation is that in vivo, a large percentage of the cancer cells are quiescent (G0/G1 phase) and are resistant to chemotherapy and to synchronization. To circumvent this, a number of techniques have been proposed to force quiescent cells to pass the restriction point in G1. Treatment with methioninase, telomerase-dependent adenovirus or even infection with *Salmonella typhimurium* A1-R have been all shown to effectively mobilize the cell cycle in malignant cell lines.^{30–32} Despite these limitations, we think that even a slight improvement of the traditional treatment by sequential therapy would be welcomed in oncology. In the future, more extensive studies of sequential treatment could discover new strategies to overcome some of the limitations. E.g. the combination of paclitaxel with other drugs could improve or expand the applicability of this method significantly. Recombinant methioninase therapy, which is a promising tool in anti-cancer therapy could be applied in a sequential manner similar to our experimental design; instead of paclitaxel, methioninase could be used to selectively block and consequently synchronize malignant cells in S/G2 phase due to depletion of methionine.^{33–35} In our study, we used paclitaxel in a monotherapy model. Paclitaxel kills cells by mitotic arrest and a popular but controversial hypothesis is that the duration of mitotic arrest is predictive of cell death, thus cells being arrested for a longer time are more likely to die.² With the use of other cytotoxic agents, the time needed for mitotic arrest to onset cell death could be significantly reduced.

In summary, our experiments demonstrated that analyzing the cell cycle properties of an individual cell type and timing the therapy based on this information could improve the effectivity of the cytotoxic treatment. We successfully used a single drug, paclitaxel in sequential treatments at therapeutically relevant concentration to synchronize and subsequently kill cells in a cell culture model. Moreover, with careful choice of treatment times we could improve the selectivity of the treatment for a particular cell type and reduce the „collateral” damage done to a different cell type.

Materials and methods

Cell line and culture conditions

Jurkat cells (ATCC TIB 152 human acute T-cell leukemia) transformed to transiently express green fluorescence protein (GFP) and Sp2 cells (ATCC CRL-1581 mouse hybridoma) were the kind gift of F. Boldizsar and P. Balogh from the Dept. of Immunology and Biotechnology of the University of Pecs. Both cell lines were grown in a 1:1 mixture of EMEM and Ham’s F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% non-essential amino acids, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 μ g/mL). The cells were incubated at 37°C, 5% CO₂ in a humidified incubator. Subculturing was performed in every 2–3 days and fresh medium was replaced 12–24 h prior to each experiment.

Paclitaxel treatment

6 mg/L stock solution of Paclitaxel (120X) was freshly prepared before each experiment from commercially available, 6 mg/mL paclitaxel solution used in human medicine (Teva Magyarország Ltd.). Sp2 or Jurkat cells were treated with 0.05 mg/L Paclitaxel for 14 hours, in complete media. Next, the cells were centrifuged at 500 rcf for 5 min. and washed in complete media 3 times to remove any trace amount of paclitaxel then the cells were re-suspended in complete, paclitaxel-free media and left for various time periods to recover. In some of the experiments, a second paclitaxel treatment (0.05 mg/L for 8 hours) and a second recovery time occurred (Fig. 2A). Throughout the experiments, the cells were kept at 37°C, 5% CO₂ in a humidified incubator.

Cell counting

Cell numbers before and during the experiments were measured by trypan-blue exclusion dye staining in a hemocytometer. Briefly, 90 μ L of homogenous cell suspension was mixed with 10 μ L of 2% trypan-blue in 0.9% NaCl and immediately counted in a hemocytometer. Cells not stained by trypan-blue were considered living cells. Cell numbers were averaged from counting at least 18 separate regions of the hemocytometer and then divided by the average cell number measured at the start of the experiments.

In experiments when Jurkat and Sp2 cells were mixed in the same culture medium, we analyzed the relative number of cells by flow cytometry. Briefly, homogenous cell suspensions were prepared by vigorous pipetting and cell suspensions were subsequently measured by Cytomics FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter). To discriminate GFP-positive Jurkat cells, Sp2 cells and cell debris, forward scatter (proportional to cell size) and fluorescence intensity at 525 nm (FL1 channel) was simultaneously detected. The same selection of regions was used and 10000 particles were counted in all experiments. The relative number of cells was expressed as the ratio of Sp2 / Jurkat cells.

Cell cycle analysis

Approximately 10⁶ cells were washed quickly in PBS then 1 mL ice-cold ethanol was added gradually, drop by drop while thoroughly vortexing them. The ethanol-fixed cells were

kept at 4°C for at least 15 min. before washing with PBS 3X and re-suspending in Propidium-Iodide (PI) solution (PBS, 0.1% Triton-X 100, 20 µg/ml PI, 0.2 mg/ml RNase A). After 30 min. incubation in dark at room temperature, the fluorescence intensity of PI dye per cell was detected at 620 nm (FL3 channel) with Cytomics FC 500 flow cytometer. Gating and selection of regions (G₀₋₁, S and G₂/M phase) were performed on control cells and identical selections were utilized for all samples.

Data analysis

Data are presented as means ± standard deviations (SD) throughout. Comparisons were performed by One-way ANOVA plus Bonferroni's post-comparison test using Graphpad Prism software. Statistically significant differences between groups were defined as P values < 0.05 and are indicated in the legends of figures.

Abbreviations

BrdU	bromodeoxyuridine
GFP	green fluorescence protein
PI	Propidium-Iodide
Tpot	potential doubling time

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Péter Balogh and Ferenc Boldizsár at the Dept. of Immunology and Biotechnology of the University of Pécs for providing the Sp2 and Jurkat cells.

Funding

This work was funded by the Research Fund of the University of Pécs, Faculty of Medicine [ÁOK-KA 2013/19] and supported by János Szentágotthai Research Center.

References

- [1] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant anti-tumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel anti-leukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971; 93:2325-7; PMID:5553076; <http://dx.doi.org/10.1021/ja00738a045>
- [2] Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell* 2014; 25:2677-81; PMID:25213191; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E14-04-0916>
- [3] Dyer M, Richardson J, Robertson J, Adam J. NICE guidance on bevacizumab in combination with paclitaxel and carboplatin for the first-line treatment of advanced ovarian cancer. *Lancet Oncol* 2013; 14:689-90; PMID:23706983; [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70248-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70248-1)
- [4] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [Internet]. Available from: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp
- [5] Markman M. Current standards of care for chemotherapy of optimally cytoreduced advanced epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2013; 131:241-5; PMID:23726888; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygy-no.2013.05.029>
- [6] Kumar A, Hoskins PJ, Tinker AV. Dose-dense paclitaxel in advanced ovarian cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2015; 27:40-7; PMID:25455846; <http://dx.doi.org/10.1016/j.clon.2014.10.001>
- [7] Seidman AD, Berry D, Cirrincione C, Harris L, Muss H, Marcom PK, Gipson G, Burstein H, Lake D, Shapiro CL, et al. Randomized phase III trial of weekly compared with every-3-weeks paclitaxel for metastatic breast cancer, with trastuzumab for all HER-2 overexpressors and random assignment to trastuzumab or not in HER-2 nonoverexpressors: final results of Cancer and Leu. *J Clin Oncol* 2008; 26:1642-9; PMID:18375893; <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2007.11.6699>
- [8] Parness J, Horwitz SB. Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *J Cell Biol* 1981; 91:479-87; PMID:6118377; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.91.2.479>
- [9] Wang X, Pan L, Mao N, Sun L, Qin X, Yin J. Cell-cycle synchronization reverses Taxol resistance of human ovarian cancer cell lines. *Cancer Cell Int* 2013; 13:77; PMID:23899403; <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2867-13-77>
- [10] Hornick JE, Bader JR, Tribble EK, Trimble K, Breunig JS, Halpin ES, Vaughan KT, Hinchcliffe EH. Live-cell analysis of mitotic spindle formation in taxol-treated cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 2008; 65:595-613; PMID:18481305; <http://dx.doi.org/10.1002/cm.20283>
- [11] Long BH, Fairchild CR. Paclitaxel inhibits progression of mitotic cells to G1 phase by interference with spindle formation without affecting other microtubule functions during anaphase and telephase. *Cancer Res* 1994; 54:4355-61; PMID:7913875
- [12] Janssen A, Beerling E, Medema R, van Rheenen J. Intravital FRET imaging of tumor cell viability and mitosis during chemotherapy. *PLoS One* 2013; 8:e64029; PMID:23691140; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0064029>
- [13] Zasadil LM, Andersen KA, Yeum D, Rocque GB, Wilke LG, Tevaarwerk AJ, Raines RT, Burkard ME, Weaver BA. Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. *Sci Transl Med* 2014; 6:229ra43; PMID:24670687; <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3007965>
- [14] Geard CR, Jones JM. Radiation and taxol effects on synchronized human cervical carcinoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 29:565-9; PMID:7911795; [http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016\(94\)90457-X](http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016(94)90457-X)
- [15] Liebmann JE, Cook JA, Lipschultz C, Teague D, Fisher J, Mitchell JB. Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines. *Br J Cancer* 1993; 68:1104-9; PMID:7903152; <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.1993.488>
- [16] Wenz F, Greiner S, Germa F, Mayer K, Latz D, Weber KJ. Radiochemotherapy with paclitaxel: synchronization effects and the role of p53. *Strahlenther Onkol* 1999; 175(3):2-6; PMID:10554637; <http://dx.doi.org/10.1007/BF03215919>
- [17] Supiot S, Gouard S, Charrier J, Apostolidis C, Chatal JF, Barbet J, Davodeau F, Cherel M. Mechanisms of cell sensitization to α radio-immunotherapy by doxorubicin or paclitaxel in multiple myeloma cell lines. *Clin Cancer Res* 2005; 11:7047s-52s; PMID:16203801; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-1004-0021>
- [18] Begg AC, Haustermans K, Hart AA, Dische S, Saunders M, Zackrisson B, Gustaffson H, Coucke P, Paschoud N, Hoyer M, et al. The value of pretreatment cell kinetic parameters as predictors for radiotherapy outcome in head and neck cancer: a multicenter analysis. *Radiother Oncol* 1999; 50:13-23; PMID:10225552; [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8140\(98\)00147-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8140(98)00147-9)
- [19] Bertuzzi A, Gandolfi A, Sinisgalli C, Starace G, Ubezio P. Cell loss and the concept of potential doubling time. *Cytometry* 1997; 29:34-40; PMID:9298809; [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(199709-01\)29:1<34::AID-CYTO3>3.0.CO;2-D](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(199709-01)29:1<34::AID-CYTO3>3.0.CO;2-D)
- [20] Xu J, Xie J, Jourquin J, Colvin DC, Does MD, Quaranta V, Gore JC. Influence of cell cycle phase on apparent diffusion coefficient in synchronized cells detected using temporal diffusion spectroscopy. *Magn Reson Med* 2011; 65:920-6; PMID:21413058; <http://dx.doi.org/10.1002/mrm.22704>
- [21] Yano S, Zhang Y, Miwa S, Tome Y, Hiroshima Y, Uehara F, Yamamoto M, Suetsugu A, Kishimoto H, Tazawa H, et al. Spatial-temporal FUCCI

- imaging of each cell in a tumor demonstrates locational dependence of cell cycle dynamics and chemoresponsiveness. *Cell Cycle* 2014; 13:2110-9; PMID:24811200; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.29156>
- [22] Auersperg M, Soba E, Vraspir-Porenta O. Intravenous chemotherapy with syndronization in advanced cancer of oral cavity and oropharynx. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol* 1977; 90:149-59; PMID:74141; <http://dx.doi.org/10.1007/BF00285321>
- [23] Deep G, Agarwal R. New combination therapies with cell-cycle agents. *Curr Opin Investig Drugs* 2008; 9:591-604; PMID:18516759
- [24] Gelbert LM, Cai S, Lin X, Sanchez-Martinez C, del Prado M, Lallena MJ, Torres R, Ajamie RT, Wishart GN, Flack RS, et al. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Invest New Drugs* 2014; 32:825-37; PMID:24919854; <http://dx.doi.org/10.1007/s10637-014-0120-7>
- [25] Verheul HMW, Qian DZ, Carducci MA, Pili R. Sequence-dependent antitumor effects of differentiation agents in combination with cell cycle-dependent cytotoxic drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 60:329-39; PMID:17256134; <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-006-0379-2>
- [26] Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 59:928-42; PMID:15234026; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.03.005>
- [27] Park SS, Kim YJ, Ju EJ, Shin SH, Choi J, Park J, Lee JH, Lee KJ, Park J, Park HJ, et al. Ibulocydine sensitizes human cancers to radiotherapy by induction of mitochondria-mediated apoptosis. *Radiother Oncol* 2014; 112:295-301; PMID:25082098; <http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2014.07.005>
- [28] Rowinsky EK, Jiroutek M, Bonomi P, Johnson D, Baker SD. Paclitaxel steady-state plasma concentration as a determinant of disease outcome and toxicity in lung cancer patients treated with paclitaxel and cisplatin. *Clin Cancer Res* 1999; 5:767-74; PMID:10213211
- [29] Rew DA, Wilson GD. Cell production rates in human tissues and tumours and their significance. Part II: clinical data. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26:405-17; PMID:10873364; <http://dx.doi.org/10.1053/ejso.1999.0907>
- [30] Yano S, Li S, Han Q, Tan Y, Bouvet M, Fujiwara T, Hoffman RM. Selective methioninase-induced trap of cancer cells in S/G2 phase visualized by FUCCI imaging confers chemosensitivity. *Oncotarget* 2014; 5:8729-36; PMID:25238266; <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.2369>
- [31] Yano S, Tazawa H, Hashimoto Y, Shirakawa Y, Kuroda S, Nishizaki M, Kishimoto H, Uno F, Nagasaka T, Urata Y, et al. A genetically engineered oncolytic adenovirus decoys and lethally traps quiescent cancer stem-like cells in S/G2/M phases. *Clin Cancer Res* 2013; 19:6495-505; PMID:24081978; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0742>
- [32] Yano S, Zhang Y, Zhao M, Hiroshima Y, Miwa S, Uehara F, Kishimoto H, Tazawa H, Bouvet M, Fujiwara T, et al. Tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R decoys quiescent cancer cells to cycle as visualized by FUCCI imaging and become sensitive to chemotherapy. *Cell Cycle* 2014; 13:3958-63; PMID:25483077; <http://dx.doi.org/10.4161/15384101.2014.964115>
- [33] Hoffman RM, Jacobsen SJ. Reversible growth arrest in simian virus 40-transformed human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77:7306-10; PMID:6261250; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.77.12.7306>
- [34] Stern PH, Hoffman RM. Enhanced in vitro selective toxicity of chemotherapeutic agents for human cancer cells based on a metabolic defect. *J Natl Cancer Inst* 1986; 76:629-39; PMID:3457200
- [35] Hoffman RM. Development of recombinant methioninase to target the general cancer-specific metabolic defect of methionine dependence: a 40-year odyssey. *Expert Opin Biol Ther* 2015; 15:21-31; PMID:25439528; <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.2015.963050>

Review Article

The Role of Stress-Induced O-GlcNAc Protein Modification in the Regulation of Membrane Transport

Viktória Fisi,¹ Attila Miseta,¹ and Tamás Nagy^{1,2}

¹Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, University of Pécs, Ifjúság str. 13, Pécs 7624, Hungary

²János Szentágothai Research Centre, University of Pécs, Ifjúság str. 13, Pécs 7624, Hungary

Correspondence should be addressed to Tamás Nagy; nagy.tamas@pte.hu

Received 27 September 2017; Accepted 3 December 2017; Published 31 December 2017

Academic Editor: Silvia Dossena

Copyright © 2017 Viktória Fisi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is a posttranslational modification that is increasingly recognized as a signal transduction mechanism. Unlike other glycans, O-GlcNAc is a highly dynamic and reversible process that involves the addition and removal of a single N-acetylglucosamine molecule to Ser/Thr residues of proteins. UDP-GlcNAc—the direct substrate for O-GlcNAc modification—is controlled by the rate of cellular metabolism, and thus O-GlcNAc is dependent on substrate availability. Serving as a feedback mechanism, O-GlcNAc influences the regulation of insulin signaling and glucose transport. Besides nutrient sensing, O-GlcNAc was also implicated in the regulation of various physiological and pathophysiological processes. Due to improvements of mass spectrometry techniques, more than one thousand proteins were detected to carry the O-GlcNAc moiety; many of them are known to participate in the regulation of metabolites, ions, or protein transport across biological membranes. Recent studies also indicated that O-GlcNAc is involved in stress adaptation; overwhelming evidences suggest that O-GlcNAc levels increase upon stress. O-GlcNAc elevation is generally considered to be beneficial during stress, although the exact nature of its protective effect is not understood. In this review, we summarize the current data regarding the oxidative stress-related changes of O-GlcNAc levels and discuss the implications related to membrane trafficking.

1. Introduction

The function and impact of protein O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification are very complex and only partially discovered despite almost 1300 scientific studies were published in the last 30 years. Although a relatively simple molecular mechanism (the addition and removal of N-acetylglucosamine on Ser/Thr residues), it is a focal point of numerous converging and diverging cellular events. One of the most profound properties of O-GlcNAc is that it is directly embedded in the metabolic regulation of the cells [1]. Since metabolism is basically required for and influences every other cellular function, the role of O-GlcNAc to mediate signals to and from metabolic systems seems to be an obvious choice for nature. Indeed, several studies showed that both increased (e.g., in diabetes) and decreased (fasting) glucose metabolism have an impact on O-GlcNAc [2–6]. Consequently, O-GlcNAc directly influences various regulatory

systems, such as the transcriptional machinery, protein synthesis, trafficking and degradation, and regulation of glucose uptake [7, 8]. Glucose metabolism was the most studied element in this respect, but the involvement of other metabolic pathways (nucleotide synthesis, amino acid, and lipid metabolism) was also proposed [1].

Despite difficulties in discerning cause and effect (e.g., malignant cells may develop altered metabolic rate and/or O-GlcNAc levels independently), it appears that besides metabolic challenges, regular cellular events such as mitosis, cell differentiation, and response to a hormonal signal or cell-cell adhesion may also directly influence O-GlcNAc modifications on proteins [9–13]. Moreover, a wide variety of stressors, including osmotic challenge, hyperthermia, heavy ion toxicity, hypoxia, and oxidative stress, was also shown to impact O-GlcNAc [14–17]. The most comprehensive data available were provided by studies done on cardiomyocytes under ischemic or oxidative conditions. The majority of these studies showed that elevation of O-GlcNAc prevented or at

least ameliorated the damage caused by the stress. Several mechanisms were proposed to explain the protective effect of O-GlcNAc under stress situation, such as increased heat shock protein synthesis, inhibition of protein degradation, inhibition of apoptosis, and modulation of calcium homeostasis [18]. Although membrane transport is involved in many of these mechanisms and several studies demonstrated evidences concerning O-GlcNAc's influence on membrane trafficking (Table 1), a comprehensive understanding of this interaction is missing. In this review, we summarize our current understanding of the intracellular process called O-GlcNAc modification, its adaptive response regarding oxidative stress, and its influence on membrane traffic, including glucose and ion transport and also synaptic, nuclear, and mitochondrial transport.

2. Regulation of Proteins by O-GlcNAc

O-linked N-acetylglucosamine (or O-GlcNAc) is a reversible, dynamic posttranslational modification (PTM) affecting serine and threonine residues of proteins. It was first discovered in 1984 by Torres and Hart [19]. The set of O-GlcNAc targets includes around 1500 proteins which are located both in the nucleus, the cytoplasm, and the mitochondria of the cells [20]. Likewise, several membrane proteins were found to be O-GlcNAcylated on their intracellular domain, for example, inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptor type I, beta-amyloid precursor protein (APP), or epidermal growth factor receptor (EGFR) [21–23]. Interestingly, recent discoveries showed that even extracellular domains can carry the O-GlcNAc modification [24]; however, the latter seems to be irreversible and controlled by a different enzyme (EGF repeat-specific O-GlcNAc transferase termed EOGT) than cytoplasmic O-GlcNAc modification.

O-GlcNAc cycling is controlled by the action of O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA), the enzymes that add and remove O-GlcNAc, respectively. The substrate of the transferase reaction is the uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), the product of the nutrient-sensitive hexosamine biosynthetic pathway (HBP). Approximately, 1–3% of total glucose is entering this pathway which integrates glucose, amino acid, fatty acid, and nucleotide metabolism [1]. Using UDP-GlcNAc, OGT attaches a single O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) moiety to Ser or Thr residues of proteins (Figure 1).

O-GlcNAc modification may influence the proteins' functions [7, 25, 26], protect from degradation [27, 28], influence protein-protein interaction or localization [29–32], and possibly alter protein hydrophobicity [17]. The most studied effect is its competition with phosphorylation, since O-GlcNAc can occupy the same residues as phosphorylation. However, other interactions such as proximal site competition and proximal site occupation were also proposed [25]. O-GlcNAc also influences protein synthesis via modulation of the action of transcription factors such as c-myc, NF κ B, and p53 [33–37]. It is estimated that around 25% of the O-GlcNAc-modified proteins are involved in transcriptional regulation [38]. Mechanistically, O-GlcNAcylation can affect the translocation, DNA binding, transactivation and stability

of transcription factors. Moreover, O-GlcNAcylation regulates protein synthesis also by cotranslational glycosylation which protects nascent polypeptide chains from ubiquitination [28]. This interplay with ubiquitination also has a general impact on protein stability and turnover by reducing proteasome degradation [27, 39]. O-GlcNAc plays a role in protein folding and unfolded protein response as well [40, 41].

O-GlcNAc modification is abundantly present in higher eukaryotes, and it is required for the normal functions of the cells [42, 43]. It influences several cellular processes, including nutrient sensing, cell cycle regulation, transcriptional regulation, Ca²⁺ handling, cytoskeletal organization, or nuclear translocation [1, 7, 25, 44–48]. Naturally, O-GlcNAc's involvement in pathophysiological processes was soon proposed. Its reciprocal relationship with phosphorylation was best characterized in Alzheimer's models; abnormal low level of O-GlcNAc may give a way for hyperphosphorylation on tau proteins which are prone to form neuron-damaging neurofibrillary tangles [49, 50]. Elevated level of O-GlcNAc can also cause deleterious effects: in diabetes, long-term hyperglycemia will inevitably lead to increased flux through the HBP and increased O-GlcNAc [51, 52]. Chronic imbalance of O-GlcNAc could lead to disturbed transcriptional factor activation, reactive oxygen species production, altered signal transductions, or inhibition of eNOS activity [53, 54]. Surprisingly, a few studies found that short-term hypoglycemia also elevated O-GlcNAc levels [6]. This paradox may be resolved if O-GlcNAc is considered as a stress adaptation mechanism that is triggered by acute challenges, such as hypoglycemia. Indeed, a large number of data suggest that protein O-GlcNAc modification dynamically increases after the cells are exposed to various type of environmental challenges [15, 16].

3. Oxidative Stress and O-GlcNAc

Disruption of redox regulation has been implicated in many conditions, such as aging, neurodegenerative diseases, ischemic events, arterial hypertension, and diabetes. Recent advances in O-GlcNAc-related studies suggest that disturbed O-GlcNAc regulation is involved in the development of these conditions. It also seems to be that stress response and O-GlcNAc are connected [14, 55]. Increasing number of evidences suggest that oxidative stress may stimulate the hexosamine biosynthetic pathway and consequently O-GlcNAcylation [16, 51]. Reactive oxygen species (ROS) can modify protein functions by oxidation of cysteine residues [56]. Within the glycolytic metabolic pathway, the activity of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is particularly sensitive to inhibition by ROS [57]. GAPDH is a key enzyme controlling the metabolic flux through glycolysis and Krebs cycle; thus, its inhibition results in diverting glucose to bypass pathways, such as the pentose phosphate shunt and the HBP [14, 51]. It has also been shown that inhibition of GAPDH by mitochondrial superoxide is an important factor in increased O-GlcNAcylation associated with hyperglycemia [54, 58]. Jones et al. have shown in myocytes that incubation with hydrogen peroxide

TABLE 1: O-GlcNAc-influenced membrane or membrane-associated transport proteins.

Protein	Function	Evidence for direct influence by O-GlcNAc	Evidence for indirect influence by O-GlcNAc	Reference
Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 3 (KCNQ3)	Voltage-dependent K ⁺ channel	+	–	[97]
Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 2 and 5 (KCNQ2, KCNQ5)	Voltage-dependent K ⁺ channel	MS hit	Form complex with KCNQ3	[93, 98]
Small conductance calcium-activated potassium channel protein 2 and 3 (KCNN2, KCNN3)	Voltage-independent calcium-activated K ⁺ channel	MS hit	–	[93]
Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1 (KCNMA1)	Calcium-activated K ⁺ channel	MS hit	–	[93]
Potassium voltage-gated channel subfamily A member 4 (KCNA4)	Voltage-dependent K ⁺ channel	MS hit	–	[93]
Voltage-gated sodium channels	Sodium transport	MS hit	Ankyrin G (link the cytoplasmic domains of integral proteins to cytoskeletal proteins)	[93, 100]
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2 and alpha-3	Plasma membrane sodium-potassium exchanger	MS hit	–	[93]
Stromal interaction molecule 1 (STIM1)	Ca ²⁺ store depletion triggered Ca ²⁺ influx in nonexcitable cells	+	–	[96]
Voltage-dependent calcium channels (CACNB3, CACNG3, CACNA1B, CACNA1A, CACNA1G)	Voltage-dependent Ca ²⁺ channels in murine synapses	MS hit	–	[93]
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA)	Endoplasmic Ca ²⁺ reuptake. Playing a role in cardiac muscle contractility	+	Phospholamban (repressor of SERCA)	[94, 95]
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 and 3 (VDAC1, VDAC3)	Voltage-dependent anion channels in the outer mitochondrial and cell membrane	+	Bcl-2 (inhibits mPTP opening possibly by interaction with VDAC)	[59, 93, 151, 152]
Chloride channel-2 (ClC-2)	Cl [–] channel	–	Sp1 (transcription factor)	[102]
Synapsin I	Regulation of synaptic vesicle release	+	–	[32, 114]
Alpha-synuclein	Regulation of neurotransmitter release	+	Identified O-GlcNAc sites influence its aggregation properties	[118]
Adaptor protein-1 (AP-1)	Endocytosis	–	Interaction with synergin gamma that has been identified as O-GlcNAc target	[37, 119, 120]
Piccolo (PCLO)	Cycling of synaptic vesicles	+	–	[116]
Amyloid-β precursor protein (APP)	Synapse formation	+	–	[22]
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4 (GLUT4)	Glucose transporter	+	Munc18c (GLUT4 vesicle protein, influencing its translocation)	[109, 110]
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 (GLUT1)	Glucose transporter	–	HIF-1α (induces the transcription of GLUT1. O-GlcNAc affects the degradation of HIF-1α.)	[111]

TABLE 1: Continued.

Protein	Function	Evidence for direct influence by O-GlcNAc	Evidence for indirect influence by O-GlcNAc	Reference
Nucleoporins (Nups)	Nuclear transport	+	–	[26, 143–146]
Nup153	Nuclear transport for proteins and RNA	+	–	[160]
Importin α 5	Nuclear transport receptor for proteins	–	Mediates the nuclear import of OGT	[37, 161]
Beta-catenin	Intracellular adhesion and transcriptional coactivator	+	–	[31]
Nuclear factor- κ B (NF κ B)	Transcriptional factor	+	–	[33, 48, 140, 141]

Specific proteins are selected and included in the table based on either direct, published evidence for O-GlcNAc modification, or indirect evidence (e.g., a molecular partner of the protein is known to be O-GlcNAcylated, or O-GlcNAc influences the expression of the protein). We considered finding O-GlcNAc protein only by mass spectrometry screening combined with various enrichment techniques (e.g., wheat germ agglutinin binding) as direct—albeit weak—evidence and indicated in the table as “MS hit.”

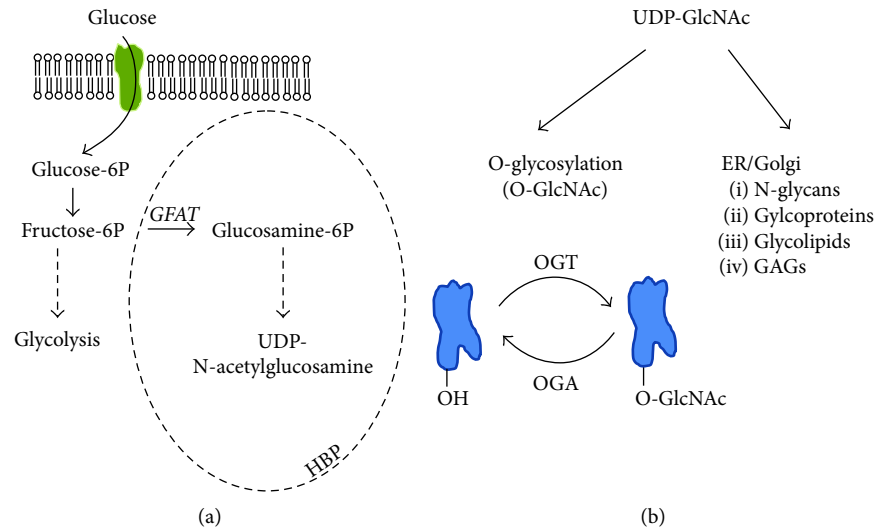


FIGURE 1: The hexosamine biosynthesis pathway (HBP) and the O-GlcNAc posttranslational modification. (a) An estimated 1–3% of the total glucose enters HBP. The key enzymatic reaction of this pathway is the addition of an amino group from glutamine to fructose-6-phosphate by the rate-limiting enzyme glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT). Following subsequent steps (addition of an acetyl group, converting 6-phosphate to 1-phosphate and finally the transfer to UDP), the end product of HBP is uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc). (b) The majority of UDP-GlcNAc is utilized in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus for various glycolipid, glycoprotein, and glycan synthesis. A small, but significant, percentage of UDP-GlcNAc serves as a substrate pool for the dynamic, reversible posttranslational modification termed O-GlcNAc. A single N-acetylglucosamine group is attached to the Ser/Thr residues of target proteins by O-GlcNAc transferase, while the removal of this group is managed by the enzyme O-GlcNAcase. O-GlcNAc modification occurs predominantly in the cytoplasm and in the nucleus, and it is strongly dependent on substrate availability (i.e., the metabolic flux through HBP).

caused an early increase of O-GlcNAc levels followed by a gradual decrease after 45 min [59]. Similarly, ROS-induced O-GlcNAcylation has been reported in cultured 3T3-L1 adipocytes. In these cells, urea induced ROS production which increased O-GlcNAc modification of insulin signaling molecule IRS-1 [60]. Kátaí et al. demonstrated that protein O-GlcNAcylation was transiently elevated in a neuroblastoma cell line following oxidative stress [16]. The expression level or the activity of OGT after various stresses, including hypoxia/reperfusion and oxidative stress, has been also found to be increased [15, 16, 61]. Interestingly, in some of the studies, the activity and expression of OGA also increased following stress [62].

O-GlcNAc can in turn modulate the response to oxidative stress: however, data are contradictory in this field [14]. It has been shown that increased O-glycosylation by either elevated OGT activity or OGA inhibition attenuated ROS generation induced by H_2O_2 or hypoxia [63–65]. However, Goldberg et al. demonstrated that high-glucose-induced ROS production was prevented by O-GlcNAc depletion in mesangial cells, which was speculated to be caused by the influence of O-GlcNAc on NADPH oxidase phosphorylation [66]. Nevertheless, the majority of the data shows that O-GlcNAc either directly or indirectly influences enzymes participating in the redox regulation [67]. For example, in various tissues, hyperglycemia induces an increase in mitochondrial superoxide production in association with elevated O-GlcNAcylation and a reciprocal decrease in phosphorylation of eNOS at the primary positive regulatory site, Ser-1177 [54, 68, 69]. Inducible NOS (iNOS) production is

mediated by the $NF\kappa B$ pathway, of which stimulation by $TNF\alpha$ or LPS has been reported to be affected by O-GlcNAc. $TNF\alpha$ -induced iNOS expression was shown to be drastically decreased by high O-GlcNAc [70, 71], while LPS-induced $NF-\kappa B$ activation is suggested to be inhibited by OGT [72]. Expression of endogenous enzymatic antioxidants like superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase is increased in the case of OGA inhibition, while reduction of O-GlcNAc decreases expression level of these genes [63, 73].

An important mediator of response to oxidative stress is the heat shock protein (HSP) family. HSP expression is at a low level under normal physiological conditions, but in response to stress such as heat, oxidative damage, or heavy metal poisoning, it dramatically increases [74]. Zachara et al. found that elevating O-GlcNAc by blocking OGA prior to heat shock increased the thermotolerance and sped up the increase of HSP70 and HSP40 [15]. In a later article, the same research group also showed that O-GlcNAc modification might compete with glycogen synthase kinase 3 β -dependent phosphorylation (GSK3 β) on HSP90 β proteins [75]. Using an inducible OGT null cell line, Kazemi et al. have screened the expression of 84 molecular chaperones and have shown that 18 HSP proteins have reduced mRNA expression. The authors found that O-GlcNAc may also influence HSP expression by promoting the phosphorylation and inhibition of GSK-3 β [76].

In general, augmentation of O-glycosylation seems to attenuate oxidative damage. The connection between O-GlcNAc and oxidative stress was extensively studied in neural, retinal cells and cardiomyocytes due to its clinical

significance in neurodegenerative disorders and ischemic organ damages [16, 63, 77, 78]. In response to ischemia-reperfusion injury, the amount of O-GlcNAc dramatically increases [64, 79, 80]. The role of O-GlcNAc in myocardial protection against oxidative stress is associated with calcium paradox. It is suggested that elevated HBP flux and O-GlcNAc inhibit Ca^{2+} influx [45]. Changes in intracellular Ca^{2+} play a critical role in initiating cardiomyocyte apoptosis and necrosis resulting from Ca^{2+} overload [79].

4. O-GlcNAc and Ion Channels

4.1. Ca^{2+} Channels. While intracellular free calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) concentration remains usually below 100 nM [81], in extracellular space and in compartmentalized intracellular stores, the calcium concentration is 10000 times higher, up in the millimolar range. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is regulated by a multitude of mechanisms, specific channels allowing Ca^{2+} to enter the cells from the extracellular space such as voltage-gated channels, ligand-gated channels, and the elusive store-operated channels. Ryanodine receptors and IP3 receptors present on the endoplasmic reticulum or sarcoplasmic reticulum can also quickly release a large amount of Ca^{2+} . The removal of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is managed mostly by SERCA, the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA), and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) [82, 83]. Calcium-binding proteins, such as calmodulin, calcineurin, and also the actin-myosin-troponin complex, are not only downstream elements of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signaling but also serve as intracellular buffer to bind Ca^{2+} [84]. Intracellular calcium signaling is similarly versatile compared to O-GlcNAc regulation; $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is a central messenger in several signaling pathways, influencing transcriptional factors, calcium-dependent phospholipase A2, protein kinase C, and various proteases [85]. It is a significant contributor to the deleterious effects of ischemia/reperfusion injuries, that is, abnormal elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ will lead to apoptosis and hypertrophy [63, 86, 87].

O-GlcNAc and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ regulation can intercept each other at several levels. Many of the downstream elements of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signaling are influenced by O-GlcNAc modification, including calmodulin-dependent kinase IV, myosin, actin, and PKC [88–90]. More importantly, O-GlcNAc seems to be influencing $[\text{Ca}^{2+}]_i$ as well [45]. The most studied models in this respect were cardiac ischemia/reperfusion and calcium paradox experiments [65, 79]. Based on these studies, it seems to be that artificially elevating O-GlcNAc levels are a pro-survival mechanism [91]. Moreover, it was found that stress itself will elevate O-GlcNAc and that preconditioning protects the cells at least partially via increased O-GlcNAc levels [92]. One of the mediators of this protection was $[\text{Ca}^{2+}]_i$. O-GlcNAc was shown to suppress calcium elevation and calcium overload elicited by agonists, oxidative stress. Liu et al. showed that increased O-GlcNAc is also effective to decrease calcium overload in calcium-paradox experiments when a short perfusion with Ca^{2+} -free medium followed by perfusion with a normal amount of Ca^{2+} would lead to rapid calcium overload and cellular damage [79].

Which of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ regulatory elements are affected by O-GlcNAc? Regarding voltage-dependent calcium channels,

detailed functional information is not yet available but Trinidad et al. identified calcium voltage-gated channel subunit beta 3 (CACNB3), gamma 3 (CACNG3), alpha 1B (CACNA1B), alpha 1A subunit (CACNA1A), and alpha 1G subunit (CACNA1G) as O-GlcNAc modified proteins of murine synapse [93]. SERCA itself has been described to be O-GlcNAc modified [94], while O-GlcNAcylation of phospholamban (SERCA repressor) also modulates its inhibitory effects on SERCA, correlating with reduced cardiac function in diabetic cardiomyopathy [95]. A frequently studied nonvoltage-gated calcium entry pathway is the store-operated calcium entry (SOCE) which is an extracellular Ca^{2+} influx into the cytoplasm in response to intracellular Ca^{2+} store depletion. Nagy et al. demonstrated that the latter process is blocked by O-GlcNAc elevation in cardiomyocytes [45]. Although the exact mechanism of SOCE still needs to be clarified, another important mediator protein of SOCE, stromal interaction molecule 1 (STIM1), has been proved to be influenced by O-GlcNAc [96]. During ER Ca^{2+} depletion induced by thapsigargin or EGTA, STIM1 proteins form puncta in ER/SR membrane which was inhibited in a dose-dependent manner by elevating O-GlcNAc levels. Moreover, it has been shown that STIM1 itself is a target for O-GlcNAc and that increasing STIM1 O-GlcNAcylation significantly modified its phosphorylation [96].

4.2. Other Ion Channels. Given that calcium is an important intracellular messenger, it is no surprise that its interaction with O-GlcNAc modification attracted significant research interest. In contrast to calcium, the influence of O-GlcNAc on the regulation of other ions and ion channels is less documented yet. Nevertheless, the data available at present does suggest that O-GlcNAc—and consequently O-GlcNAc-related cellular mechanisms such as carbohydrate metabolism and/or stress response—might have an impact on several elements of sodium, potassium, and chloride transport. For example, Ruan et al. have shown that voltage-dependent K^+ channel KCNQ3 (Kv7.3) interacts with OGT and it is probably O-GlcNAc modified at threonine 655 in neurons [97]. This protein functions in the regulation of neuronal excitability by associating with the related KCNQ2 or KCNQ5 thus forming an M-channel [98]. Defects in this gene are a cause of benign familial neonatal convulsions (BFNC) [99]. KCNN2, KCNN3, KCNMA1, and KCNA4 were also identified by mass spectrometry screening as potential O-GlcNAc proteins [93].

To our knowledge, no direct evidence was published yet on the potential O-GlcNAc modification of sodium channels. However, indirect data shows that sodium pumps still might be influenced by O-GlcNAc. The same study that probed murine synapses for O-GlcNAc-modified proteins and identified potassium channels also found HexNAc peptide characteristic for voltage-gated sodium channels and for sodium/potassium-transporting ATPases [93]. Indirect influence by O-GlcNAc on sodium transport has been speculated by other authors. Namely, isoforms of ankyrin G at nodes of Ranvier have been shown to be modified by O-GlcNAc. Ankyrins are spectrin-binding proteins that link the cytoplasmic domains of membrane proteins to the

spectrin/actin network, in particular, ankyrin G binds voltage-gated sodium channels. The authors speculate that O-GlcNAcylated serine-rich domain of ankyrin G may be involved in targeting voltage-dependent sodium channels to specific locations [100].

Among voltage-dependent anion channels (VDACs), VDAC1 seems to be O-GlcNAc modified [59, 93]. VDAC1 is extensively studied because of its clinical significance. It was shown to be overexpressed in many cancer types, and silencing of its gene inhibits tumor growth [101]. VDAC plays a critical role in the transport of small, negatively charged molecules across the mitochondrial membrane. Considering that this function is an important part of the cellular metabolism, it is plausible that O-GlcNAc modification could regulate mitochondrial activity through VDAC. Indirect evidence shows that Cl^- channels might be also regulated by O-GlcNAc. For example, the expression of chloride channel-2 (ClC-2) is dependent on the Sp1 transcription factor. Vij and Zeitlin published that O-GlcNAcylation of Sp1 is required for proper ClC-2 gene expression [102]. On the other hand, our recent publication [17] showed that osmotic resistance and volume regulation are influenced by O-GlcNAc. Since osmotic regulation (under hypotonic conditions) is controlled in a large part by a mechanism called regulatory volume decrease and carried out by the activation of a chloride conductance upon cell swelling (IClswell). Based on bioinformatics analysis of the ICl_n protein, which is responsible for IClswell, the presence of various O-GlcNAcylation sites on ICl_n is likely [103].

4.3. Glucose Transport. There is plenty of evidence that O-GlcNAc may regulate glucose transport. In fact, one of the first functions proposed for O-GlcNAc was nutrient sensing and O-GlcNAc is considered a key participant in insulin resistance [1]. As mentioned earlier, substrate production for O-GlcNAc is provided by the HBP. Since O-GlcNAc formation is dependent on the metabolic flux through HBP, which in turn is dependent on glucose (and subsequent fructose-6-phosphate) availability, metabolic changes can influence O-GlcNAc levels. Increased O-GlcNAc is thought to regulate glycogen synthesis, glucose metabolism, and glucose transport [5, 75, 104]. Several intermediate messengers of the insulin receptor signaling cascade have been identified as target for O-GlcNAc modulation such as IRS-1 and Akt [105–107].

The principal glucose transporter protein that mediates glucose uptake is glucose transporter type 4 (GLUT4), which plays a key role in regulating glucose homeostasis. GLUT4 is one of 13 sugar transporter proteins (GLUT1 to GLUT12 and HMIT) in humans. It is mainly expressed in skeletal muscle and adipose tissues. In an unstimulated state, it is mostly located in intracellular vesicles but a rapid translocation into the plasma membrane occurs after insulin stimulation to increase glucose uptake [108]. There is a growing evidence that increased O-GlcNAcylation of GLUT4 vesicle proteins such as Munc18c and others has a role in the inhibition of glucose transport in diabetes [109] and GLUT4 itself is suspected to be an O-GlcNAc target [110]. In cancer cells, the transcription factor HIF-1 α (hypoxia-inducible

factor 1 α) induces a metabolic shift to aerobic glycolysis through the upregulation of various glycolytic proteins, including GLUT1 [111]. Ferrer et al. showed that OGT and O-GlcNAc modification are required to prevent HIF-1 α proteasomal degradation in breast cancer cells thus enabling GLUT1 expression, glucose uptake, and survival in breast cancer cells [111].

4.4. Synaptic Transport. Nerve terminals are especially enriched in O-GlcNAcylation [112]. According to the recent data of Lagerlöf et al., OGT is present not only in presynaptic, but also in postsynaptic density and they proposed that O-GlcNAc is an important regulator of the synaptic maturation and plasticity [113]. One of the more abundant phosphoproteins in the brain is synapsin I. It belongs to the synapsin family that anchors synaptic vesicles to the cytoskeleton thus playing a role in neurotransmitter release control [114]. Synapsin I controls the size and release of residual pool of synaptic vesicles, and disruption of synapsin I function causes reduced size of the synaptic vesicle pool, defects in synaptic plasticity, memory deficits, and epileptic seizures. Synapsin I was among the first proteins that were found to be heavily O-GlcNAc modified [115]. Skorobogatko et al. have also found that synapsin I is O-GlcNAcylated during hippocampal synaptogenesis in rats. The authors identified three novel O-GlcNAc sites on the protein; two of them are also known as Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation sites. They also showed that the O-GlcNAc site of Thr-87—which is located within an amphipathic lipid-packing sensor motif—interferes with the binding of synapsin I to synaptic vesicles. When O-GlcNAc modification is impossible due to mutation of Thr-87, synapsin I tends to localize to synapses. Lacking O-GlcNAc on Thr-87 also led to increased density and size of synaptic vesicles [32]. Among with synapsin I, the protein Piccolo was also found to be heavily O-GlcNAc modified [116]. Both proteins are involved in the regulation of synaptic vesicles, and both are known to be phosphorylated, suggesting that interaction between O-GlcNAc and phosphorylation might have a mutual regulatory role.

Alpha-synuclein, a small protein consisting of 140 amino acids, is also implicated to take part in regulating neurotransmitter release. The protein is specifically enriched in presynaptic nerve terminals and is likely to play a role in the development of Parkinson's disease [117]. Its potential implication is suggested in exocytic processes and in the recycling of synaptic vesicles through association with the cell membrane [118]. In vivo, endogenous O-GlcNAcylation of alpha-synuclein at threonine 64 and 72 in mice and serine 87 in humans has been identified. Available data suggest that the presence of these modifications reduces the chance for aggregation and the toxicity of the protein but likely has no or little effect on its binding or remodeling membranes [118].

In a proteome-wide identification of O-GlcNAc-modified proteins, synergin gamma has also been detected as a target [37]. Through interaction with adaptor protein 1 (AP-1) complex, synergin gamma is involved in the trafficking of clathrin-coated vesicles to different directions like the trans-Golgi network or the plasma membrane

[119, 120]. Perez-Cervera et al. have shown a connection between O-GlcNAc and lipid rafts. They demonstrated that OGT is present in lipid microdomains and that its localization at the raft is regulated by insulin signaling [121]. Although the role of O-GlcNAc is not clarified yet, it is noteworthy to mention that lipid rafts seem to play an important role in synaptic signaling and plasticity and, moreover, are involved in endocytic and exocytic transport routes [122, 123].

The O-GlcNAc modification of amyloid precursor protein (APP) carries special importance; inadequate proteolysis of APP produces amyloid-beta, which is a hydrophobic peptide and the major hallmark of Alzheimer's disease (AD) [22, 124]. APP is an integral membrane protein involved in synaptic formation and repair. While it is not known whether O-GlcNAc directly regulates the normal function of APP, its role in the normal processing and trafficking to the plasma membrane has been studied by several researchers [125–127]. Apparently, increased O-GlcNAc modification on APP will facilitate its traffic to the membrane and decrease its endocytosis, resulting in reduced formation of the pathological amyloid-beta products. This process could be a promising therapeutic target to be exploited. On the other hand, O-GlcNAc modification of APP has interesting implications regarding AD and carbohydrate metabolism. Type 2 diabetes is associated with a higher risk of AD, some even use the term “type 3 diabetes” for AD [128]. It seems to be that similarly to other tissues, neuronal cells develop insulin resistance and decrease glucose uptake—or in a more severe case almost completely switch to keton and fatty acid metabolism [129]. Amyloid-beta accumulation contributes to this metabolic switch by causing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. Taken together, decreased O-GlcNAc modification on APP, intracellular hypoglycemia, and oxidative stress via continuous amyloid-beta deposition leads to neuronal degeneration [52, 130, 131].

4.5. Nuclear Transport. In eukaryotic cells, an important location of transport is at the double nuclear membrane. Bidirectional exchanges through this membrane are carried out by 125×10^6 Da supramolecular complexes, called nuclear pore complexes (NPC) [132]. NPCs consist of various copies of ~30 different subunits called nucleoporins (Nups). Proteins below 40 kDa can pass through NPCs via passive diffusion, but protein transport above 40 kDa is an energy-dependent process. It requires the presence of nuclear localization signal (NLS) that is a sequence with high basic amino acid content exposed on the protein surface or a leucine-rich nuclear export signal (NES) [133]. O-GlcNAc has been suggested to interfere at two levels in the nuclear transport; it can modify proteins designated to nuclear translocation but may also alter the nucleoporins of nuclear pore complex [134].

First studies in 1989 assumed sugar residues can act as nuclear targeting signals [135]. Later, Duverger et al. performed experiments with fluorescein-coupled bovine serum albumin (BSA) in either electroporated or digitonin-permeabilized cells. According to their results, sugar-

substituted BSA was able to enter the nucleus while control, unsubstituted albumin, stayed in the cytosol [136]. Subsequent studies also suggested the presence of an NLS-independent, sugar-mediated nuclear import of proteins [137, 138]. O-GlcNAc is likely to have remarkable influence on the nuclear transport and activity of beta-catenin. Besides participating in cell-cell adhesion, this protein also has a role in expression regulation as a transcriptional coactivator mediating *wnt* signaling. The latter function is involved in cell proliferation and invasion. O-GlcNAcylation of beta-catenin was demonstrated to have an inverse relationship with the protein's nuclear localization and transcriptional activity. Minimal O-GlcNAcylation of beta-catenin has been shown in tumor cells together with an elevated transcriptional state, while in normal cells, significantly, O-GlcNAcylation of beta-catenin is associated with decreased transcriptional activity [31]. A central element in stress-related transcriptional regulation is NF κ B, which normally stays in the cytoplasm due to the inhibitory action of I κ B α which masks the NLS sequence of NF κ B [139]. Several studies showed that O-GlcNAc had a positive influence on NF κ B activation and nuclear translocation [48, 140, 141]. Multiple sites were found in the sequence of the p65 subunit to be directly O-GlcNAc modified, and data suggest that O-GlcNAc might disrupt/prevent the masking effect of I κ B α [48, 140]. Interestingly, Xing et al. found that O-GlcNAc modification has an opposite effect on NF κ B activation [33]. Other studies also elaborated on the inhibitory role of O-GlcNAc on NF κ B [72, 142]. This contradiction of results is difficult to resolve without more experimental data; however, the most plausible explanation would be that the interplay between several O-GlcNAc and phosphorylation sites on NF κ B has many variations. Depending on the cell type, the duration, type and severity of stress, and different post-translational patterns may develop on NF κ B and produce different outcomes.

Nups were some of the first described OGT substrates, and they are among proteins with the highest O-GlcNAc density [143, 144]. As of now, 18 Nups have been identified as potential candidates for O-GlcNAc-modified proteins [145]. Despite emerging knowledge, the specific function of O-GlcNAc on Nups remains to be elucidated [26]. Recently, O-GlcNAc has been suggested to alter several structural and biophysical properties of NPCs and influence the interactions between soluble nuclear transport receptors (NTR) and Nups located at the central channel of NPCs, the so-called FG-Nups (phenylalanine-glycine-rich Nups) [146]. This way, O-GlcNAc may alter protein-protein interactions at the NPC thus modulating its permeability. Moreover, stability of FG Nups is also influenced by O-glycosylation via protection from ubiquitination and subsequent proteasomal degradation [145]. Thus, cross-talk between O-GlcNAcylation and ubiquitination also plays a role in stabilizing the NPC and maintaining the integrity of the selectivity filter.

4.6. Mitochondrial Transport. O-GlcNAcylation affects not only nucleocytoplasmic but also mitochondrial proteins as well by the help of mitochondrial (mOGT) and

nucleocytoplasmic OGT (ncOGT) isoforms. The substrate for the modification, UDP-GlcNAc, is transferred into mitochondria via pyrimidine nucleotide carrier 1 (PNC1) [147, 148]. Only a few data is available regarding O-GlcNAc modification of specific mitochondrial carrier proteins. Mitochondrial permeability transition pore (mPTP) represents a nonspecific pore located in both the outer and inner mitochondrial membranes and allows molecules below 1.5 kDa to enter and exit the mitochondrial matrix. mPTP is activated by calcium overload and oxidative stress; its opening is a critical step in the initiation of apoptosis and cell death [63]. Reports demonstrated that elevated O-GlcNAc attenuates the mPTP opening [59, 149]. A central element of mPTP, voltage-dependent anion channel (VDAC), was revealed to be O-GlcNAc modified in cultured cardiac myocytes [59]. It was also demonstrated that cardiac mitochondria isolated from selective OGA-inhibited mice and OGT-overexpressing rat cardiomyocytes were resistant to the mPTP induction, while OGT inhibition increased sensitivity to Ca^{2+} -induced mitochondrial swelling [59]. Hirose et al. also found supporting evidence for the protective effect of O-GlcNAc due to inhibition of mPTP opening; in their study, they used the anesthetic isoflurane for the preconditioning of cardiac myocytes and revealed that isoflurane increased O-GlcNAc modification of VDAC [150]. Another important player of mitochondrial permeabilization and apoptosis is Bcl-2, an antiapoptotic protein that inhibits mPTP opening possibly by direct interaction with VDAC. Bcl-2 is upregulated in association with hypoxic injury-induced cell death [151, 152]. Glucosamine treatment and OGT overexpression both significantly increased mitochondrial Bcl-2 levels under normoxic conditions and augmented the response to ischemia/reperfusion thus mediating the hyperglycemia-induced protective effect against hypoxic injury [64].

5. Conclusion and Perspectives

The number of proteins found to be O-GlcNAcylated is still rapidly increasing as of today. This is partly fueled by improvements in methodology, for example, by recent developments of mass spectrometry techniques (such as native mass spectrometry) or the availability of more potent and specific OGA and OGT inhibitors [153–155]. On the other hand, O-GlcNAc also received heightened interest in recent years; it is an excellent candidate for a direct signaling link between diverse cellular functions. A more practical reason of why O-GlcNAc deserves special attention is that it has a potential in human medicine. As mentioned above, O-GlcNAc plays a significant role in the development of AD and in diabetes, but disturbances of O-GlcNAc regulation are now considered in other syndromes such as malignant disorders or inflammatory diseases [33, 70, 156]. Recently, substantial research work has been dedicated to clarify its significance in hypoxia-induced or oxidative stress-related pathophysiological events [14, 63, 92]. Measurement of O-GlcNAc levels in human patients could report about important information. A few studies already attempted to use O-GlcNAc analysis to predict the extent

of metabolic dysfunction and the complications of diabetes [157, 158]. On the other hand, intervening in O-GlcNAc regulation by specific OGT and OGA inhibitors could significantly improve the outcome of some diseases. For example, the protective effect of increased O-GlcNAc modification in ischemia/reperfusion experiments could be translated and utilized in human medicine in the future [79]. In malignant diseases, specific OGT inhibitors might support chemotherapy efforts by hindering insulin-independent glucose uptake or tilting the balance toward apoptosis in malignant cells [111].

What makes O-GlcNAc such a promising research subject—that is, its versatile nature—also makes it a difficult scientific endeavor. Since it influences so many different proteins and a wide variety of protein functions, general experimental approaches such as interfering with overall O-GlcNAc by altering the HBP metabolism or even by specific OGA/OGT inhibitors might lead to false results. The complexity that underlies this relatively simple mechanism is revealed by apparent paradoxes; for example, in acute stress situations, O-GlcNAc seems to be protective whereas chronic hyperglycemia-induced O-GlcNAc elevation clearly has a negative effect. In contrast, permanently decreased O-GlcNAc levels have been associated with AD, despite the fact that diabetic patients are more prone to the disease and that increased oxidative stress (which is supposed to elevate O-GlcNAc) is thought to contribute to the development of AD [159]. It seems to be that the analysis of both the spatial and temporal distribution of O-GlcNAc on individual proteins will be required for a complete understanding. Thus, studying O-GlcNAc on individual proteins is not only an option but it is also a necessity to locate specific regulatory events. In this review, our aim was to sum up the growing number of evidences supporting the idea that O-GlcNAc—directly or indirectly—influences membrane traffic elements. These data, taken together with the fact that O-GlcNAc is an important part of the cellular stress-adaptation mechanism, provides a firm basis for further studies to elucidate O-GlcNAc's role in the regulation of membrane transport under normal and pathological conditions as well.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was supported by the EU-founded Hungarian projects GINOP under Grant nos. 2.3.2.-15-2016-00050 and 2.3.3.-15-2016-00025.

References

- [1] L. Wells, K. Vosseller, and G. W. Hart, "A role for *N*-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 60, no. 2, pp. 222–228, 2003.

- [2] J. L. McLarty, S. A. Marsh, and J. C. Chatham, "Post-translational protein modification by O-linked N-acetylglucosamine: its role in mediating the adverse effects of diabetes on the heart," *Life Sciences*, vol. 92, no. 11, pp. 621–627, 2013.
- [3] C. Springhorn, T. E. Matsha, R. T. Erasmus, and M. F. Essop, "Exploring leukocyte O-GlcNAcylation as a novel diagnostic tool for the earlier detection of type 2 diabetes mellitus," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 97, no. 12, pp. 4640–4649, 2012.
- [4] R. J. Clark, P. M. McDonough, E. Swanson et al., "Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 45, pp. 44230–44237, 2003.
- [5] J. G. Kang, S. Y. Park, S. Ji et al., "O-GlcNAc protein modification in cancer cells increases in response to glucose deprivation through glycogen degradation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 50, pp. 34777–34784, 2009.
- [6] L. Zou, X. Zhu-Mauldin, R. B. Marchase et al., "Glucose deprivation-induced increase in protein O-GlcNAcylation in cardiomyocytes is calcium-dependent," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 41, pp. 34419–34431, 2012.
- [7] T. Nagy, A. Miseta, and L. Kovacs, "Protein-associated O-GlcNAc, a multifunctional mechanism in cell signaling and its role in the pathogenesis of diabetes, stress and malignant diseases," *Biochimica Medica*, vol. 17, no. 2, pp. 162–177, 2007.
- [8] J. A. Hanover, M. W. Krause, and D. C. Love, "The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1800, no. 2, pp. 80–95, 2010.
- [9] E. P. Tan, F. E. Duncan, and C. Slawson, "The sweet side of the cell cycle," *Biochemical Society Transactions*, vol. 45, no. 2, pp. 313–322, 2017.
- [10] V. Dehennaut, T. Lefebvre, Y. Leroy, J.-P. Vilain, J.-C. Michalski, and J.-F. Bodart, "Survey of O-GlcNAc level variations in *Xenopus laevis* from oogenesis to early development," *Glycoconjugate Journal*, vol. 26, no. 3, pp. 301–311, 2009.
- [11] H. Jang, T. W. Kim, S. Yoon et al., "O-GlcNAc regulates pluripotency and reprogramming by directly acting on core components of the pluripotency network," *Cell Stem Cell*, vol. 11, no. 1, pp. 62–74, 2012.
- [12] M.-D. Li, H.-B. Ruan, J. P. Singh et al., "O-GlcNAc transferase is involved in glucocorticoid receptor-mediated transrepression," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 16, pp. 12904–12912, 2012.
- [13] M. Bektas and D. S. Rubenstein, "The role of intracellular protein O-glycosylation in cell adhesion and disease," *Journal of Biomedical Research*, vol. 25, no. 4, pp. 227–236, 2011.
- [14] J. Chatham and R. Marchase, "Protein O-GlcNAcylation: a critical regulator of the cellular response to stress," *Current Signal Transduction Therapy*, vol. 5, no. 1, pp. 49–59, 2010.
- [15] N. E. Zachara, N. O'Donnell, W. D. Cheung, J. J. Mercer, J. D. Marth, and G. W. Hart, "Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress: a survival response of mammalian cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 29, pp. 30133–30142, 2004.
- [16] E. Kátai, J. Pál, V. S. Poór, R. Purewal, A. Miseta, and T. Nagy, "Oxidative stress induces transient O-GlcNAc elevation and tau dephosphorylation in SH-SY5Y cells," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 20, no. 12, pp. 2269–2277, 2016.
- [17] T. Nagy, A. Balasa, D. Frank et al., "O-GlcNAc modification of proteins affects volume regulation in Jurkat cells," *European Biophysics Journal*, vol. 39, no. 8, pp. 1207–1217, 2010.
- [18] M. R. Martinez, T. B. Dias, P. S. Natov, and N. E. Zachara, "Stress-induced O-GlcNAcylation: an adaptive process of injured cells," *Biochemical Society Transactions*, vol. 45, no. 1, pp. 237–249, 2017.
- [19] C. R. Torres and G. W. Hart, "Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 259, no. 5, pp. 3308–3317, 1984.
- [20] G. W. Hart, C. Slawson, G. Ramirez-Correa, and O. Lagerlof, "Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 80, no. 1, pp. 825–858, 2011.
- [21] J. Rengifo, C. J. Gibson, E. Winkler, T. Collin, and B. E. Ehrlich, "Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type I by O-GlcNAc glycosylation," *The Journal of Neuroscience*, vol. 27, no. 50, pp. 13813–13821, 2007.
- [22] L. S. Griffith, M. Mathes, and B. Schmitz, " β -amyloid precursor protein is modified with O-linked N-acetylglucosamine," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 41, no. 2, pp. 270–278, 1995.
- [23] R. S. Haltiwanger and G. A. Philipsberg, "Mitotic arrest with nocodazole induces selective changes in the level of O-linked N-acetylglucosamine and accumulation of incompletely processed N-glycans on proteins from HT29 cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 13, pp. 8752–8758, 1997.
- [24] S. Varshney and P. Stanley, "EOGT and O-GlcNAc on secreted and membrane proteins," *Biochemical Society Transactions*, vol. 45, no. 2, pp. 401–408, 2017.
- [25] C. Butkinaree, K. Park, and G. W. Hart, "O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1800, no. 2, pp. 96–106, 2010.
- [26] M. Eustice, M. R. Bond, and J. A. Hanover, "O-GlcNAc cycling and the regulation of nucleocytoplasmic dynamics," *Biochemical Society Transactions*, vol. 45, no. 2, pp. 427–436, 2017.
- [27] H.-B. Ruan, Y. Nie, and X. Yang, "Regulation of protein degradation by O-GlcNAcylation: crosstalk with ubiquitination," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 12, no. 12, pp. 3489–3497, 2013.
- [28] Y. Zhu, T.-W. Liu, S. Cecioni, R. Eskandari, W. F. Zandberg, and D. J. Vocadlo, "O-GlcNAc occurs cotranslationally to stabilize nascent polypeptide chains," *Nature Chemical Biology*, vol. 11, no. 5, pp. 319–325, 2015.
- [29] M. D. Roos, K. Su, J. R. Baker, and J. E. Kudlow, "O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 17, no. 11, pp. 6472–6480, 1997.
- [30] X. Yang and K. Qian, "Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 18, no. 7, pp. 452–465, 2017.

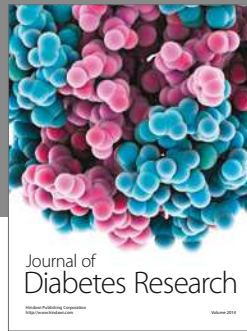
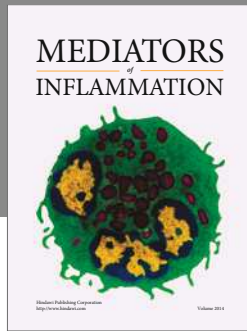
- [31] R. Sayat, B. Leber, V. Grubac, L. Wiltshire, and S. Persad, "O-GlcNAc-glycosylation of β -catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity," *Experimental Cell Research*, vol. 314, no. 15, pp. 2774–2787, 2008.
- [32] Y. Skorobogatko, A. Landicho, R. J. Chalkley, A. V. Kossenkov, G. Gallo, and K. Vosseller, "O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) site thr-87 regulates synapsin I localization to synapses and size of the reserve pool of synaptic vesicles," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 6, pp. 3602–3612, 2014.
- [33] D. Xing, K. Gong, W. Feng et al., "O-GlcNAc modification of NF κ B p65 inhibits TNF- α -induced inflammatory mediator expression in rat aortic smooth muscle cells," *PLoS One*, vol. 6, no. 8, article e24021, 2011.
- [34] W. H. Yang, J. E. Kim, H. W. Nam et al., "Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability," *Nature Cell Biology*, vol. 8, no. 10, pp. 1074–1083, 2006.
- [35] T. Y. Chou, C. V. Dang, and G. W. Hart, "Glycosylation of the c-Myc transactivation domain," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 10, pp. 4417–4421, 1995.
- [36] L. Wells, S. A. Whelan, and G. W. Hart, "O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 302, no. 3, pp. 435–441, 2003.
- [37] H. Hahne, N. Sobotzki, T. Nyberg et al., "Proteome wide purification and identification of O-GlcNAc-modified proteins using click chemistry and mass spectrometry," *Journal of Proteome Research*, vol. 12, no. 2, pp. 927–936, 2013.
- [38] S. Ozcan, S. S. Andrali, and J. E. L. Cantrell, "Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1799, no. 5-6, pp. 353–364, 2010.
- [39] F. Zhang, K. Su, X. Yang, D. B. Bowe, A. J. Paterson, and J. E. Kudlow, "O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome," *Cell*, vol. 115, no. 6, pp. 715–725, 2003.
- [40] Z. V. Wang, Y. Deng, N. Gao et al., "Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway," *Cell*, vol. 156, no. 6, pp. 1179–1192, 2014.
- [41] G. A. Ngoh, T. Hamid, S. D. Prabhu, and S. P. Jones, "O-GlcNAc signaling attenuates ER stress-induced cardiomyocyte death," *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, vol. 297, no. 5, pp. H1711–H1719, 2009.
- [42] D. C. Love, M. W. Krause, and J. A. Hanover, "O-GlcNAc cycling: Emerging roles in development and epigenetics," *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 21, no. 6, pp. 646–654, 2010.
- [43] Y. R. Yang, M. Song, H. Lee et al., "O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability," *Aging Cell*, vol. 11, no. 3, pp. 439–448, 2012.
- [44] V. Dehennaut, T. Lefebvre, C. Sellier et al., "O-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G₂/M transition in *Xenopus laevis* oocytes," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 17, pp. 12527–12536, 2007.
- [45] T. Nagy, V. Champattanachai, R. B. Marchase, and J. C. Chatham, "Glucosamine inhibits angiotensin II-induced cytoplasmic Ca²⁺ elevation in neonatal cardiomyocytes via protein-associated O-linked N-acetylglucosamine," *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, vol. 290, no. 1, pp. C57–C65, 2006.
- [46] F. Liu, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, G. W. Hart, and C.-X. Gong, "O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 29, pp. 10804–10809, 2004.
- [47] J. L. E. Walgren, T. S. Vincent, K. L. Schey, and M. G. Buse, "High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including α -tubulin," *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, vol. 284, no. 2, pp. E424–E434, 2003.
- [48] W. H. Yang, S. Y. Park, H. W. Nam et al., "NF κ B activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 45, pp. 17345–17350, 2008.
- [49] C.-X. Gong, F. Liu, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal, "Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease," *Journal of Neural Transmission*, vol. 112, no. 6, pp. 813–838, 2005.
- [50] Y. Liu, F. Liu, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, and C. X. Gong, "Brain glucose transporters, O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in diabetes and Alzheimer's disease," *Journal of Neurochemistry*, vol. 111, no. 1, pp. 242–249, 2009.
- [51] M. Brownlee, "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications," *Nature*, vol. 414, no. 6865, pp. 813–820, 2001.
- [52] W. B. Dias and G. W. Hart, "O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease," *Molecular BioSystems*, vol. 3, no. 11, pp. 766–772, 2007.
- [53] U. Karunakaran and N. H. Jeoung, "O-GlcNAc modification: friend or foe in diabetic cardiovascular disease," *Korean Diabetes Journal*, vol. 34, no. 4, pp. 211–219, 2010.
- [54] X. L. Du, D. Edelstein, S. Dimmeler, Q. Ju, C. Sui, and M. Brownlee, "Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 108, no. 9, pp. 1341–1348, 2001.
- [55] P. S. Banerjee, O. Lagerlöf, and G. W. Hart, "Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 51, pp. 1–15, 2016.
- [56] V. Adler, Z. Yin, K. D. Tew, and Z. Ronai, "Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling," *Oncogene*, vol. 18, no. 45, pp. 6104–6111, 1999.
- [57] D.-M. Chuang, C. Hough, and V. V. Senatorov, "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 45, no. 1, pp. 269–290, 2005.
- [58] X. L. Du, D. Edelstein, L. Rossetti et al., "Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 22, pp. 12222–12226, 2000.
- [59] S. P. Jones, N. E. Zachara, G. A. Ngoh et al., "Cardioprotection by N-acetylglucosamine linkage to cellular proteins," *Circulation*, vol. 117, no. 9, pp. 1172–1182, 2008.
- [60] M. D'Apolito, X. Du, H. Zong et al., "Urea-induced ROS generation causes insulin resistance in mice with chronic renal

- failure," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, no. 1, pp. 203–213, 2010.
- [61] W. D. Cheung and G. W. Hart, "AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate O-GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 19, pp. 13009–13020, 2008.
- [62] J. A. Groves, A. O. Maduka, R. N. O'Meally, R. N. Cole, and N. E. Zachara, "Fatty acid synthase inhibits the O-GlcNAcase during oxidative stress," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 292, no. 16, pp. 6493–6511, 2017.
- [63] G. A. Ngoh, L. J. Watson, H. T. Facundo, and S. P. Jones, "Augmented O-GlcNAc signaling attenuates oxidative stress and calcium overload in cardiomyocytes," *Amino Acids*, vol. 40, no. 3, pp. 895–911, 2011.
- [64] V. Champattanachai, R. B. Marchase, and J. C. Chatham, "Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2," *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, vol. 294, no. 6, pp. C1509–C1520, 2008.
- [65] G. A. Ngoh, H. T. Facundo, T. Hamid, W. Dillmann, N. E. Zachara, and S. P. Jones, "Unique hexosaminidase reduces metabolic survival signal and sensitizes cardiac myocytes to hypoxia/reoxygenation injury," *Circulation Research*, vol. 104, no. 1, pp. 41–49, 2009.
- [66] H. Goldberg, C. Whiteside, and I. G. Fantus, "O-linked β -N-acetylglucosamine supports p38 MAPK activation by high glucose in glomerular mesangial cells," *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, vol. 301, no. 4, pp. E713–E726, 2011.
- [67] V. V. Lima, K. Spitler, H. Choi, R. C. Webb, and R. C. Tostes, "O-GlcNAcylation and oxidation of proteins: is signalling in the cardiovascular system becoming sweeter?," *Clinical Science*, vol. 123, no. 8, pp. 473–486, 2012.
- [68] B. Musicki, M. F. Kramer, R. E. Becker, and A. L. Burnett, "Inactivation of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (Ser-1177) by O-GlcNAc in diabetes-associated erectile dysfunction," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 33, pp. 11870–11875, 2005.
- [69] M. Federici, R. Menghini, A. Mauriello et al., "Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells," *Circulation*, vol. 106, no. 4, pp. 466–472, 2002.
- [70] R. H. P. Hilgers, D. Xing, K. Gong, Y.-F. Chen, J. C. Chatham, and S. Oparil, "Acute O-GlcNAcylation prevents inflammation-induced vascular dysfunction," *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, vol. 303, no. 5, pp. H513–H522, 2012.
- [71] L. G. Nöt, C. A. Brocks, L. Vámhidy, R. B. Marchase, and J. C. Chatham, "Increased O-linked β -N-acetylglucosamine levels on proteins improves survival, reduces inflammation and organ damage 24 hours after trauma-hemorrhage in rats," *Critical Care Medicine*, vol. 38, no. 2, pp. 562–571, 2010.
- [72] S.-Y. Hwang, J.-S. Hwang, S.-Y. Kim, and I.-O. Han, "O-GlcNAc transferase inhibits LPS-mediated expression of inducible nitric oxide synthase through an increased interaction with mSin3A in RAW264.7 cells," *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, vol. 305, no. 6, pp. C601–C608, 2013.
- [73] G. D. Liu, C. Xu, L. Feng, and F. Wang, "The augmentation of O-GlcNAcylation reduces glyoxal-induced cell injury by attenuating oxidative stress in human retinal microvascular endothelial cells," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 36, no. 4, pp. 1019–1027, 2015.
- [74] B. Kalmar and L. Greensmith, "Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, no. 4, pp. 310–318, 2009.
- [75] Z. Wang, A. Pandey, and G. W. Hart, "Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 6, no. 8, pp. 1365–1379, 2007.
- [76] Z. Kazemi, H. Chang, S. Haserodt, C. McKen, and N. E. Zachara, "O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) regulates stress-induced heat shock protein expression in a GSK-3 β -dependent manner," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 50, pp. 39096–39107, 2010.
- [77] A. C. Wang, E. H. Jensen, J. E. Rexach, H. V. Vinters, and L. C. Hsieh-Wilson, "Loss of O-GlcNAc glycosylation in forebrain excitatory neurons induces neurodegeneration," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 113, no. 52, pp. 15120–15125, 2016.
- [78] Y.-J. Chen, Y.-S. Huang, J.-T. Chen et al., "Protective effects of glucosamine on oxidative-stress and ischemia/reperfusion-induced retinal injury," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 56, no. 3, pp. 1506–1516, 2015.
- [79] J. Liu, Y. Pang, T. Chang, P. Bounelis, J. Chatham, and R. Marchase, "Increased hexosamine biosynthesis and protein O-GlcNAc levels associated with myocardial protection against calcium paradox and ischemia," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 40, no. 2, pp. 303–312, 2006.
- [80] V. Champattanachai, R. B. Marchase, and J. C. Chatham, "Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein-associated O-GlcNAc," *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, vol. 292, no. 1, pp. C178–C187, 2007.
- [81] J. M. Weinberg, J. A. Davis, and M. A. Venkatachalam, "Cytosolic-free calcium increases to greater than 100 micromolar in ATP-depleted proximal tubules," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 100, no. 3, pp. 713–722, 1997.
- [82] T. A. Stewart, K. T. D. S. Yapa, and G. R. Monteith, "Altered calcium signaling in cancer cells," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1848, no. 10, Part B, pp. 2502–2511, 2015.
- [83] R. S. Lewis, "Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes," *Annual Review of Immunology*, vol. 19, no. 1, pp. 497–521, 2001.
- [84] E. Carafoli and J. Krebs, "Why calcium? How calcium became the best communicator," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 291, no. 40, pp. 20849–20857, 2016.
- [85] D. E. Clapham, "Calcium signaling," *Cell*, vol. 131, no. 6, pp. 1047–1058, 2007.
- [86] B. Zhivotovsky and S. Orrenius, "Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community," *Cell Calcium*, vol. 50, no. 3, pp. 211–221, 2011.
- [87] M. A. H. Talukder, J. L. Zweier, and M. Periasamy, "Targeting calcium transport in ischaemic heart disease," *Cardiovascular Research*, vol. 84, no. 3, pp. 345–352, 2009.
- [88] W. B. Dias, W. D. Cheung, Z. Wang, and G. W. Hart, "Regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase IV

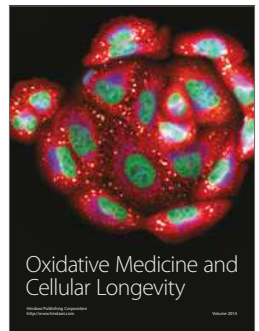
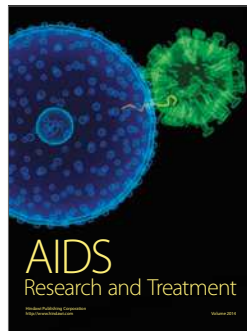
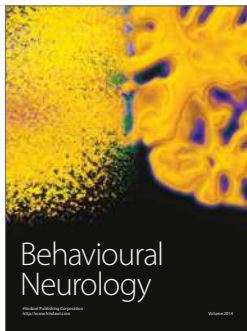
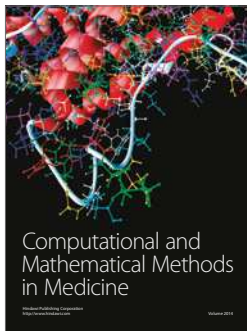
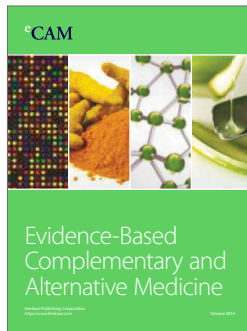
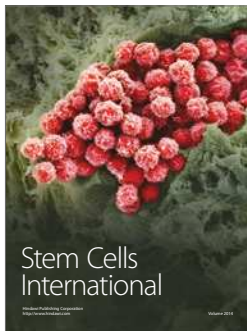
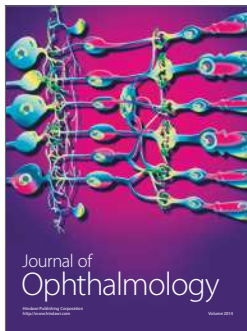
- by O-GlcNAc modification,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 32, pp. 21327–21337, 2009.
- [89] C. Cieniewski-Bernard, M. Lambert, E. Dupont, V. Montel, L. Stevens, and B. Bastide, “O-GlcNAcylation, contractile protein modifications and calcium affinity in skeletal muscle,” *Frontiers in Physiology*, vol. 5, p. 421, 2014.
- [90] J. A. Matthews, M. Acevedo-Duncan, and R. L. Potter, “Selective decrease of membrane-associated PKC- α and PKC- ϵ in response to elevated intracellular O-GlcNAc levels in transformed human glial cells,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1743, no. 3, pp. 305–315, 2005.
- [91] J. C. Chatham, L. G. Nöt, N. Fülöp, and R. B. Marchase, “Hexosamine biosynthesis and protein O-glycosylation: the first line of defense against stress, ischemia, and trauma,” *Shock*, vol. 29, no. 4, pp. 431–440, 2008.
- [92] J. C. Chatham and R. B. Marchase, “The role of protein O-linked β -N-acetylglucosamine in mediating cardiac stress responses,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1800, no. 2, pp. 57–66, 2010.
- [93] J. C. Trinidad, D. T. Barkan, B. F. Gullledge et al., “Global identification and characterization of both O-GlcNAcylation and phosphorylation at the murine synapse,” *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 11, no. 8, pp. 215–229, 2012.
- [94] V. L. Johnsen, D. D. Belke, C. C. Hughey et al., “Enhanced cardiac protein glycosylation (O-GlcNAc) of selected mitochondrial proteins in rats artificially selected for low running capacity,” *Physiological Genomics*, vol. 45, no. 1, pp. 17–25, 2013.
- [95] S. Yokoe, M. Asahi, T. Takeda et al., “Inhibition of phospholamban phosphorylation by O-GlcNAcylation: implications for diabetic cardiomyopathy,” *Glycobiology*, vol. 20, no. 10, pp. 1217–1226, 2010.
- [96] X. Zhu-Mauldin, S. A. Marsh, L. Zou, R. B. Marchase, and J. C. Chatham, “Modification of STIM1 by O-linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) attenuates store-operated calcium entry in neonatal cardiomyocytes,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 46, pp. 39094–39106, 2012.
- [97] H.-B. Ruan, M. O. Dietrich, Z.-W. Liu et al., “O-GlcNAc transferase enables AgRP neurons to suppress browning of white fat,” *Cell*, vol. 159, no. 2, pp. 306–317, 2014.
- [98] C. L. Wladyka and D. L. Kunze, “KCNQ/M-currents contribute to the resting membrane potential in rat visceral sensory neurons,” *The Journal of Physiology*, vol. 575, no. 1, pp. 175–189, 2006.
- [99] B. C. Schroeder, C. Kubisch, V. Stein, and T. J. Jentsch, “Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy,” *Nature*, vol. 396, no. 6712, pp. 687–690, 1998.
- [100] X. Zhang and V. Bennett, “Identification of O-linked N-acetylglucosamine modification of ankyrin_C isoforms targeted to nodes of Ranvier,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 49, pp. 31391–31398, 1996.
- [101] V. Shoshan-Barmatz and D. Mizrahi, “VDAC1: from structure to cancer therapy,” *Frontiers in Oncology*, vol. 2, p. 164, 2012.
- [102] N. Vij and P. L. Zeitlin, “Regulation of the ClC-2 lung epithelial chloride channel by glycosylation of SP1,” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 34, no. 6, pp. 754–759, 2006.
- [103] R. Gupta and S. Brunak, “Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function,” *Pacific Symposium on Biocomputing*, vol. 322, pp. 310–322, 2002.
- [104] W. Yi, P. M. Clark, D. E. Mason et al., “Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism,” *Science*, vol. 337, no. 6097, pp. 975–980, 2012.
- [105] S. Y. Park, J. Ryu, and W. Lee, “O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes,” *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 37, no. 3, pp. 220–229, 2005.
- [106] S. Wang, X. Huang, D. Sun et al., “Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates Akt signaling,” *PLoS One*, vol. 7, no. 5, article e37427, 2012.
- [107] M. G. Buse, “Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status,” *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, vol. 290, no. 1, pp. E1–E8, 2006.
- [108] S. Huang and M. P. Czech, “The GLUT4 glucose transporter,” *Cell Metabolism*, vol. 5, no. 4, pp. 237–252, 2007.
- [109] G. W. Hart and Y. Akimoto, “The O-GlcNAc modification,” in *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA, 2nd edition, 2009.
- [110] M. G. Buse, K. A. Robinson, B. A. Marshall, R. C. Hresko, and M. M. Mueckler, “Enhanced O-GlcNAc protein modification is associated with insulin resistance in GLUT1-overexpressing muscles,” *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, vol. 283, no. 2, pp. E241–E250, 2002.
- [111] C. M. Ferrer, T. P. Lynch, V. L. Sodi et al., “O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway,” *Molecular Cell*, vol. 54, no. 5, pp. 820–831, 2014.
- [112] R. N. Cole and G. W. Hart, “Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals,” *Journal of Neurochemistry*, vol. 79, no. 5, pp. 1080–1089, 2001.
- [113] O. Lagerlöf, G. W. Hart, and R. L. Haganir, “O-GlcNAc transferase regulates excitatory synapse maturity,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 114, no. 7, pp. 1684–1689, 2017.
- [114] P. E. Ceccaldi, F. Grohovaz, F. Benfenati, E. Chiergatti, P. Greengard, and F. Valtorta, “Dephosphorylated synapsin I anchors synaptic vesicles to actin cytoskeleton: an analysis by videomicroscopy,” *Journal of Cell Biology*, vol. 128, no. 5, pp. 905–912, 1995.
- [115] R. N. Cole and G. W. Hart, “Glycosylation sites flank phosphorylation sites on synapsin I: O-linked N-acetylglucosamine residues are localized within domains mediating synapsin I interactions,” *Journal of Neurochemistry*, vol. 73, no. 1, pp. 418–428, 1999.
- [116] K. Vosseller, J. C. Trinidad, R. J. Chalkley et al., “O-linked N-acetylglucosamine proteomics of postsynaptic density preparations using lectin weak affinity chromatography and mass spectrometry,” *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 5, no. 5, pp. 923–934, 2006.
- [117] M. G. Spillantini, M. L. Schmidt, V. M.-Y. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, and M. Goedert, “ α -Synuclein in Lewy bodies,” *Nature*, vol. 388, no. 6645, pp. 839–840, 1997.
- [118] N. P. Marotta, Y. H. Lin, Y. E. Lewis et al., “O-GlcNAc modification blocks the aggregation and toxicity of the

- protein α -synuclein associated with Parkinson's disease," *Nature Chemistry*, vol. 7, no. 11, pp. 913–920, 2015.
- [119] J. Hirst, G. H. H. Borner, M. Harbour, and M. S. Robinson, "The aftiphilin/p200/ γ -synergin complex," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 16, no. 5, pp. 2554–2565, 2005.
- [120] M. S. Robinson and J. S. Bonifacino, "Adaptor-related proteins," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 13, no. 4, pp. 444–453, 2001.
- [121] Y. Perez-Cervera, V. Dehennaut, M. Aquino Gil et al., "Insulin signaling controls the expression of O-GlcNAc transferase and its interaction with lipid microdomains," *The FASEB Journal*, vol. 27, no. 9, pp. 3478–3486, 2013.
- [122] B. Zonta and L. Minichiello, "Synaptic membrane rafts: traffic lights for local neurotrophin signaling?," *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, vol. 5, p. 9, 2013.
- [123] E. Ikonen, "Roles of lipid rafts in membrane transport," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 13, no. 4, pp. 470–477, 2001.
- [124] R. L. Neve, D. L. McPhie, and Y. Chen, "Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein," *Brain Research*, vol. 886, no. 1-2, pp. 54–66, 2000.
- [125] K. T. Jacobsen and K. Iverfeldt, "O-GlcNAcylation increases non-amyloidogenic processing of the amyloid- β precursor protein (APP)," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 404, no. 3, pp. 882–886, 2011.
- [126] S. A. Yuzwa, X. Shan, B. A. Jones et al., "Pharmacological inhibition of O-GlcNAcase (OGA) prevents cognitive decline and amyloid plaque formation in bigenic tau/APP mutant mice," *Molecular Neurodegeneration*, vol. 9, no. 1, p. 42, 2014.
- [127] Y. S. Chun, O.-H. Kwon, H. G. Oh et al., "Threonine 576 residue of amyloid- β precursor protein regulates its trafficking and processing," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 467, no. 4, pp. 955–960, 2015.
- [128] E. Blázquez, E. Velázquez, V. Hurtado-Carneiro, and J. M. Ruiz-Albusac, "Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease," *Frontiers in Endocrinology*, vol. 5, p. 161, 2014.
- [129] J. Yao, J. R. Rettberg, L. P. Klosinski, E. Cadenas, and R. D. Brinton, "Shift in brain metabolism in late onset Alzheimer's disease: implications for biomarkers and therapeutic interventions," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 32, no. 4–6, pp. 247–257, 2011.
- [130] Y. Zhu, X. Shan, S. A. Yuzwa, and D. J. Vocadlo, "The emerging link between O-GlcNAc and Alzheimer disease," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 50, pp. 34472–34481, 2014.
- [131] G. Verdile, S. J. Fuller, and R. N. Martins, "The role of type 2 diabetes in neurodegeneration," *Neurobiology of Disease*, vol. 84, pp. 22–38, 2015.
- [132] T. D. Allen, J. M. Cronshaw, S. Bagley, E. Kiseleva, and M. W. Goldberg, "The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm," *Journal of Cell Science*, vol. 113, Part 10, pp. 1651–1659, 2000.
- [133] G. Kabachinski and T. U. Schwartz, "The nuclear pore complex – structure and function at a glance," *Journal of Cell Science*, vol. 128, no. 3, pp. 423–429, 2015.
- [134] C. Guinez, W. Morelle, J.-C. Michalski, and T. Lefebvre, "O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins?," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 37, no. 4, pp. 765–774, 2005.
- [135] J. Hubert, A. P. Sève, P. Facy, and M. Monsigny, "Are nuclear lectins and nuclear glycoproteins involved in the modulation of nuclear functions?," *Cell Differentiation and Development*, vol. 27, no. 2, pp. 69–81, 1989.
- [136] E. Duverger, V. Carpentier, A. C. Roche, and M. Monsigny, "Sugar-dependent nuclear import of glycoconjugates from the cytosol," *Experimental Cell Research*, vol. 207, no. 1, pp. 197–201, 1993.
- [137] C. Rondanino, M.-T. Bousser, M. Monsigny, and A.-C. Roche, "Sugar-dependent nuclear import of glycosylated proteins in living cells," *Glycobiology*, vol. 13, no. 7, pp. 509–519, 2003.
- [138] E. Duverger, C. Pellerin-Mendes, R. Mayer, A. C. Roche, and M. Monsigny, "Nuclear import of glycoconjugates is distinct from the classical NLS pathway," *Journal of Cell Science*, vol. 108, Part 4, pp. 1325–1332, 1995.
- [139] M. D. Jacobs and S. C. Harrison, "Structure of an $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ /NF- κB complex," *Cell*, vol. 95, no. 6, pp. 749–758, 1998.
- [140] D. Zhang, Y. Cai, M. Chen, L. Gao, Y. Shen, and Z. Huang, "OGT-mediated O-GlcNAcylation promotes NF- κB activation and inflammation in acute pancreatitis," *Inflammation Research*, vol. 64, no. 12, pp. 943–952, 2015.
- [141] A. Golks, T.-T. T. Tran, J. F. Goetschy, and D. Guerini, "Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation," *The EMBO Journal*, vol. 26, no. 20, pp. 4368–4379, 2007.
- [142] L. Zou, S. Yang, V. Champattanachai et al., "Glucosamine improves cardiac function following trauma-hemorrhage by increased protein O-GlcNAcylation and attenuation of NF- κB signaling," *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, vol. 296, no. 2, pp. H515–H523, 2009.
- [143] J. A. Hanover, C. K. Cohen, M. C. Willingham, and M. K. Park, "O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, no. 20, pp. 9887–9894, 1987.
- [144] G. D. Holt, C. M. Snow, A. Senior, R. S. Haltiwanger, L. Gerace, and G. W. Hart, "Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine," *The Journal of Cell Biology*, vol. 104, no. 5, pp. 1157–1164, 1987.
- [145] Y. Zhu, T.-W. Liu, Z. Madden et al., "Post-translational O-GlcNAcylation is essential for nuclear pore integrity and maintenance of the pore selectivity filter," *Journal of Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 1, pp. 2–16, 2016.
- [146] A. A. Labokha, S. Gradmann, S. Frey et al., "Systematic analysis of barrier-forming FG hydrogels from *Xenopus* nuclear pore complexes," *The EMBO Journal*, vol. 32, no. 2, pp. 204–218, 2013.
- [147] R. Trapannone, D. Mariappa, A. T. Ferenbach, and D. M. F. van Aalten, "Nucleocytoplasmic human O-GlcNAc transferase is sufficient for O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins," *Biochemical Journal*, vol. 473, no. 12, pp. 1693–1702, 2016.
- [148] J. L. Sacoman, R. Y. Dagda, A. R. Burnham-Marusch, R. K. Dagda, and P. M. Berninson, "Mitochondrial O-GlcNAc transferase (mOGT) regulates mitochondrial structure, function, and survival in HeLa cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 292, no. 11, pp. 4499–4518, 2017.
- [149] G. A. Ngoh, L. J. Watson, H. T. Facundo, W. Dillmann, and S. P. Jones, "Non-canonical glycosyltransferase modulates post-hypoxic cardiac myocyte death and mitochondrial

- permeability transition,” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 45, no. 2, pp. 313–325, 2008.
- [150] K. Hirose, Y. M. Tsutsumi, R. Tsutsumi et al., “Role of the O-linked β -N-acetylglucosamine in the cardioprotection induced by isoflurane,” *Anesthesiology*, vol. 115, no. 5, pp. 955–962, 2011.
- [151] R. W. Birkinshaw and P. E. Czabotar, “The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation,” *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 72, pp. 152–162, 2017.
- [152] Y. Tsujimoto and S. Shimizu, “VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins,” *Cell Death and Differentiation*, vol. 7, no. 12, pp. 1174–1181, 2000.
- [153] A. C. Leney, K. Rafie, D. M. F. van Aalten, and A. J. R. Heck, “Direct monitoring of protein O-GlcNAcylation by high-resolution native mass spectrometry,” *ACS Chemical Biology*, vol. 12, no. 8, pp. 2078–2084, 2017.
- [154] A. Ostrowski and D. M. F. van Aalten, “Chemical tools to probe cellular O-GlcNAc signalling,” *Biochemical Journal*, vol. 456, no. 1, pp. 1–12, 2013.
- [155] H. C. Dorfmüller, V. S. Borodkin, M. Schimpl, S. M. Shepherd, N. A. Shpiro, and D. M. F. van Aalten, “GlcNAc-statin: a picomolar, selective O-GlcNAcase inhibitor that modulates intracellular O-glcNAcylation levels,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, no. 51, pp. 16484–16485, 2006.
- [156] Y. Fardini, V. Dehennaut, T. Lefebvre, and T. Issad, “O-GlcNAcylation: a new cancer hallmark?,” *Frontiers in Endocrinology*, vol. 4, p. 99, 2013.
- [157] J. P. Myslicki, J. Shearer, D. S. Hittel, C. C. Hughey, and D. D. Belke, “O-GlcNAc modification is associated with insulin sensitivity in the whole blood of healthy young adult males,” *Diabetology & Metabolic Syndrome*, vol. 6, no. 1, p. 96, 2014.
- [158] P. Degrell, J. Cseh, M. Mohás et al., “Evidence of O-linked N-acetylglucosamine in diabetic nephropathy,” *Life Sciences*, vol. 84, no. 13–14, pp. 389–393, 2009.
- [159] D. Luque-Contreras, K. Carvajal, D. Toral-Rios, D. Franco-Bocanegra, and V. Campos-Peña, “Oxidative stress and metabolic syndrome: cause or consequence of Alzheimer’s disease?,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2014, Article ID 497802, 11 pages, 2014.
- [160] M. Kodiha, D. Tran, A. Morogan, C. Qian, and U. Stochaj, “Dissecting the signaling events that impact classical nuclear import and target nuclear transport factors,” *PLoS One*, vol. 4, no. 12, article e8420, 2009.
- [161] H. G. Seo, H. B. Kim, M. J. Kang, J. H. Ryum, E. C. Yi, and J. W. Cho, “Identification of the nuclear localisation signal of O-GlcNAc transferase and its nuclear import regulation,” *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, article 34614, 2016.



Hindawi
Submit your manuscripts at
<https://www.hindawi.com>



Article

O-Linked N-Acetylglucosamine Transiently Elevates in HeLa Cells during Mitosis

Viktória Fisi ¹ , Emese Kátai ¹, József Orbán ², Silvia Dossena ³ , Attila Miseta ¹ and Tamás Nagy ^{1,4,*} 

¹ Department of Laboratory Medicine, Medical School, University of Pécs, Pécs H7624, Hungary; fisi.viktoria@gmail.com (V.F.); mesekatai@gmail.com (E.K.); miseta.attila@pte.hu (A.M.)

² Department of Biophysics, Medical School, University of Pécs, Pécs H7624, Hungary; josesan77@gmail.com

³ Institute of Pharmacology and Toxicology, Paracelsus Medical University, Salzburg 5020, Austria; silvia.dossena@pmu.ac.at

⁴ János Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, Pécs H7624, Hungary

* Correspondence: nagy.tamas@pte.hu; Tel.: +36-30-491-7721

Academic Editors: Franz-Georg Hanisch and Isabelle Breloy

Received: 27 April 2018; Accepted: 24 May 2018; Published: 26 May 2018



Abstract: O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is a dynamic post-translational modification of serine and threonine residues on nuclear and cytoplasmic proteins. O-GlcNAc modification influences many cellular mechanisms, including carbohydrate metabolism, signal transduction and protein degradation. Multiple studies also showed that cell cycle might be modulated by O-GlcNAc. Although the role of O-GlcNAc in the regulation of some cell cycle processes such as mitotic spindle organization or histone phosphorylation is well established, the general behaviour of O-GlcNAc regulation during cell cycle is still controversial. In this study, we analysed the dynamic changes of overall O-GlcNAc levels in HeLa cells using double thymidine block. O-GlcNAc levels in G₁, S, G₂ and M phase were measured. We observed that O-GlcNAc levels are significantly increased during mitosis in comparison to the other cell cycle phases. However, this change could only be detected when mitotic cells were enriched by harvesting round shaped cells from the G₂/M fraction of the synchronized cells. Our data verify that O-GlcNAc is elevated during mitosis, but also emphasize that O-GlcNAc levels can significantly change in a short period of time. Thus, selection and collection of cells at specific cell-cycle checkpoints is a challenging, but necessary requirement for O-GlcNAc studies.

Keywords: cell cycle; cell synchronization; mitosis; O-GlcNAc; post-translational modifications

1. Introduction

Checkpoints between cell cycle phases (G₀ to G₁, G₁ to S, S to M and M to G₁) refer to a more or less well-defined transition from one regulatory mechanism to the next one; certain proteins become deactivated while others are activated. Although it has the shortest duration, M phase can be further divided into sub-phases characterized by distinct signaling processes and distinct events. Each step in the cell cycle is influenced by the previous steps and is affected by hundreds of regulatory elements. Alterations to the progression of cell cycle and its regulatory mechanisms due to either intrinsic (mutations) or extrinsic (environmental changes, chemicals, etc.) causes may have serious consequences; most notably, the pathological changes of the cell cycle could lead to uncontrolled proliferation, but disturbance in the cell cycle regulation has been also associated with Alzheimer's disease, diabetes or autoimmune diseases [1–3].

Protein phosphorylation and its dynamic changes during the various stages of the cell cycle were extensively studied; the central elements of the cell cycle regulation: cyclins, cyclin dependent kinases

and their upstream regulators and downstream targets are known to activate or inhibit signaling elements by phosphorylation [4]. Around cyclins and cyclin dependent kinases, dozens of other kinases and phosphorylases are tightly organized both spatially and temporally. Many of their functions are well understood, and the periodic activity (and inactivity) of these proteins during the cell cycle is well established. However, hundreds of other cyclin-independent regulatory proteins may be also involved in the regulation of the cell cycle [5]. Besides phosphorylation, ubiquitination is also a well-known process involved in cell cycle regulation. Ubiquitination of a particular protein is a sign that the protein is selected for degradation. During various stages of the cell cycle, various sets of signaling proteins could be deemed to degradation [6]. Besides degradation, ubiquitination also regulates protein trafficking, scaffolding, DNA damage repair, and chromatin topology [7]. It is also worth noting that ubiquitination and phosphorylation may strongly interact; e.g., phosphorylation can target proteins for ubiquitination [8].

Although phosphorylation and ubiquitination are the most studied post-translational modifications participating in the signal transduction, dozens of other types of post-translational modifications (e.g., SUMOylation or Poly ADP-Ribosylation) have been also recognized to influence cell signaling [9,10]. Among these, scientific interest increased in recent years toward the so-called *O*-linked β -*N*-acetylglucosamine, or *O*-GlcNAc protein modification. *O*-GlcNAc seems to be an important regulator/modulator of many intracellular functions, including cell cycle [2]. *O*-GlcNAc is the enzymatic addition of a single *N*-acetyl-glucosamine molecule to the OH residues of serine or threonine. This mechanism is reversible, and in contrast to other types of glycosylation, it takes place in the cytoplasm and nucleus instead of the ER. The number of known *O*-GlcNAc sites and the proteins carrying those sites are rapidly increasing thanks to recent advances in mass spectrometry techniques—over 1000 *O*-GlcNAc proteins have been identified so far [11]. *O*-GlcNAc can interact with other post-translational modifications, most notably it can compete with phosphorylation for the same sites [12]. Interestingly, *O*-GlcNAcylation may also protect against polyubiquitination and increase protein stability [13–17].

A unique aspect of *O*-GlcNAc modification is that it is influenced by the metabolic state of the cell. Its substrate, UDP-GlcNAc, is produced by the hexosamine biosynthesis pathway (HBP), which is sustained by approx. 1–3% of the glucose entering the cell. It was recognized early that one of the functions regulated by *O*-GlcNAc is nutrient sensing [18]. Since then, many other cellular functions were demonstrated to be influenced by *O*-GlcNAc, including Ca^{2+} signaling, epigenetics, stress adaptation and notably: cell cycle [19,20]. Several studies reported that manipulating *O*-GlcNAc regulation can disrupt the normal progress of the cell cycle [21–23]. *O*-GlcNAc has been shown to be required for histone phosphorylation [24,25], mitotic spindle organization [26] or for the expression of genes associated with DNA replication and cell cycle progression such as *c-myc* [27]. *O*-GlcNAc is also thought to be part of the histone code [28]; others dispute these results [29]. The participation of *O*-GlcNAc in the regulation of cell cycle is undeniable; however, its role is far from being completely understood. *O*-GlcNAc levels were found to either increase [22,23,30–32] or decrease [24,33] during mitosis. This controversy could be—at least in part—explained by the reversible nature of *O*-GlcNAc modification. Some events of the cell cycle, especially during mitosis, occur in a few minutes, thus making it difficult to capture cells representative for a particular cell cycle phase.

The aim of the present study was to analyse the possible changes of *O*-GlcNAc levels in HeLa cells during various cell cycle stages. With the combination of synchronization of the cells by double thymidine block and fractionated cell collection, we have detected increased *O*-GlcNAc levels during mitosis. Thus, our findings support the idea that *O*-GlcNAc is elevated in mitosis and also demonstrate the highly dynamic nature of *O*-GlcNAc regulation.

2. Results

2.1. Synchronization of HeLa Cells by Double Thymidine Block

We have synchronized HeLa cells by a double thymidine block, which synchronizes cells at the G_1 -S border [34,35]. At the end of the treatment, the large majority of the cells were synchronized at

the G_1 phase. According to the DNA content of the cells determined by propidium-iodide, four hours after the release of the block the cells progressed into S phase and eight hours after most of the cells reached the G_2 phase. After 12 h, approximately half of the synchronized cells underwent mitosis (Figure 1). The duration of each cell cycle phases in synchronized cell cultures is longer than the transit time of an individual cell in that particular phase. The transit time for the total population (T_{total}) can be calculated by the following equation:

$$T_d + T_{Phase} = T_{total},$$

where T_d is the delay between the first and the last cell entering a given cell cycle phase, and T_{Phase} is the average time a single cell spends in that phase [36]. In line, we use the term ‘early G_2/M phase’ to describe the time period when most cells are in G_2 phase but did not undergo mitosis yet, and ‘late G_2/M phase’ to describe the time period a significant number of cells already underwent mitosis, while the rest of the cells are about to enter mitosis.

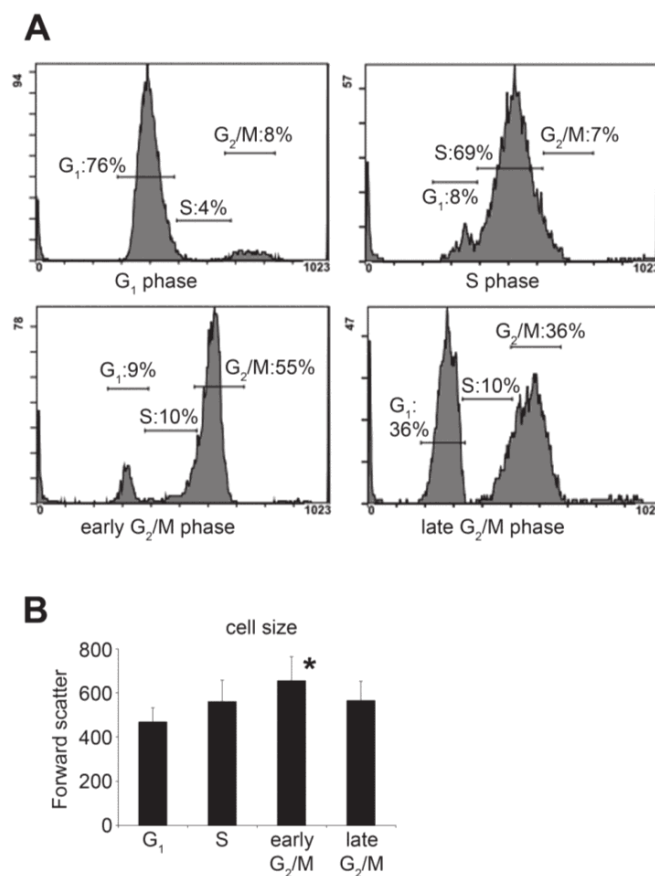


Figure 1. Characterization of cell cycle dynamic after double thymidine block. (A) HeLa cells were synchronized with double thymidine treatment and then allowed to recover from the blockage. Cell cycle distribution was monitored every 4 h by flow cytometry and propidium-iodide staining after fixation of the cells. Cell cycle distributions are shown as histogram plots of the FL3 fluorescence channel. G_1 , S, early G_2/M and late G_2/M phases were captured 0, 4, 8 and 12 h after the release of the block, respectively. Please note that the terms “early” and “late” refer to the average status of the total population, not the current position of individual cells; (B) average cell size was analysed by measuring the forward scatter (FS) values of live cells using flow cytometry. Cells were collected 0, 4, 8 and 12 h after the release of the block to obtain representative data for G_1 , S, early G_2/M and late G_2/M phases. FS is proportional to the size of the cells, and shows that the cell size increases during the cell cycle progression and reaches a peak in the early G_2/M phase. Data are shown as means \pm SD from at least three independent experiments, * $p < 0.05$.

2.2. Selective Collection of Mitotic Cells Resulted in Detection of Distinct Changes in O-GlcNAc Pattern

Although in our synchronized cultures up to 70% of the cells were in the same phase, the individual mitotic events are spread over several hours. To have a better estimation of the number of cells actually undergoing mitosis during shorter time frames (20–25 min.), we have counted the round shaped cells at regular intervals in synchronized HeLa cultures. Figure 2A shows that the number of round shaped cells started to rise 9 h after synchronization, reaching peak counts between 12–13 h post-synchronization.

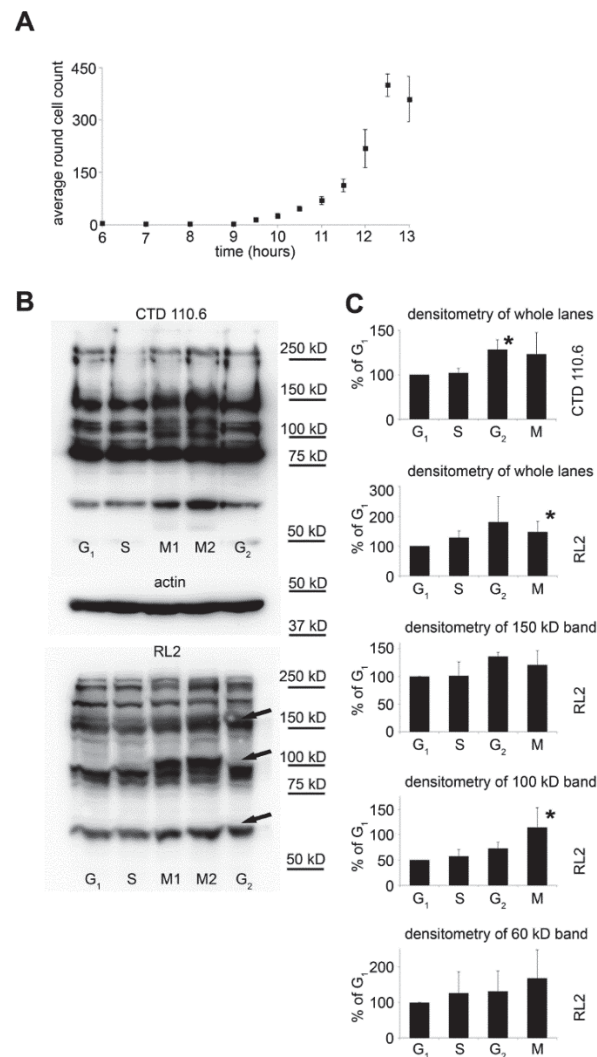


Figure 2. Overall protein O-GlcNAc levels during various cell cycle phases. (A) HeLa cells were synchronized and allowed to recover from the thymidine blockage. The number of mitotic cells at the indicated times was assessed as the number of round shaped cells per field of view using bright-field microscopy. Data are shown as means \pm SD from at least 3 independent experiments; (B) representative Western blot analysis using RL2 or CTD110.6 anti-O-GlcNAc antibody and anti-actin antibody on total protein extracts isolated from synchronized cells. Cells were collected at specific cell cycle phases as described in the Materials and Methods. For the mitotic cells, we pooled the first six fractions (M1) and the last three fractions (M2) prior to lysis; (C) densitometric analysis of CTD110.6 staining of whole lanes in the four main cell cycle phases (top panel) and densitometric analysis of RL2 staining of whole lanes and three individual bands (at ~150, 100 and 60 kD, as indicated by arrows in (B)) in the four main cell cycle phases. Data from M1 and M2 fractions were combined for statistical analysis. Data are shown as means \pm SD, * $p < 0.05$ vs. G₁.

Based on this result, we modified our sample collection protocol for Western blotting to collect mitotic cells in ~25 min. fractions from 9 to 13 h after synchronization by vigorously shaking the cell culture flasks to detach these cells from the surface. The first six fractions (M1) and the last three fractions (M2) were pooled together. Moreover, in this set of experiments, all samples were lysed directly in Laemmli sample buffer; consequently, the lysate represented the protein content of the whole cell. Figure 2B shows overall *O*-GlcNAc levels detected by Western blotting. For comparison, G₁ phase, S phase, and G₂ phase cells were also harvested and analysed. Overall, *O*-GlcNAc levels were analysed by RL2 and CTD110.6 antibodies. Both antibodies detected altered *O*-GlcNAc patterns in the mitotic and G₂ fractions, compared to other cell cycle phases. Most notably, a strong protein band at ~100 kD appeared in the mitotic cells (Figure 2B,C).

2.3. Synchronization Alone Is Not Sufficient to Detect Changes in Overall *O*-GlcNAc Levels during G₂/M–G₁ Transition

We measured the cell cycle distribution prior and during the time most cells progressed from G₂/M phase to G₁ phase. For this, HeLa cells were synchronized by double thymidine block and were allowed to progress in their cell cycle for 9, 10, 11 or 12 h. Our data showed that mitosis started between 10–11 h post synchronization and about half of the cells (6% G₁ cells at 10 h vs. 32% G₁ at 12 h and 68% G₂/M at 10 h vs. 43% G₂/M at 12 h) already passed mitosis 12 h post synchronization (Figure 3A).

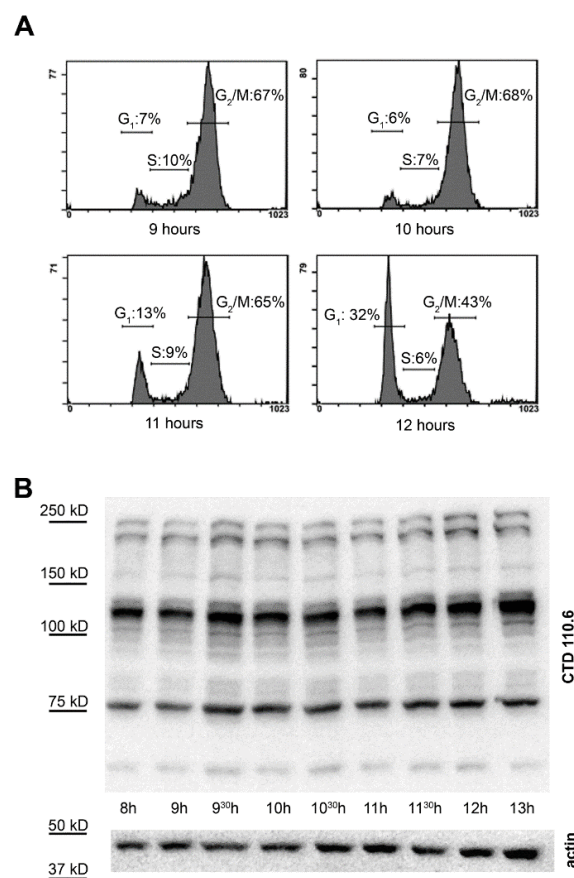


Figure 3. Overall protein *O*-GlcNAc levels during G₂/M phase. **(A)** HeLa cells were synchronized and the DNA content was monitored prior and during the G₂/M–G₁ transition (9, 10, 11 and 12 h after the release of the thymidine block) by flow cytometry and propidium-iodide staining; **(B)** representative Western blot using CTD110.6 anti-*O*-GlcNAc and anti-actin antibodies on total protein extracts isolated from synchronized cells at the indicated times after thymidine block release.

Therefore, we collected several fractions of cells from synchronized cultures for protein isolation and O-GlcNAc detection in a time period overlapping the critical phase when most cells progressed through mitosis (8–13 h). O-GlcNAc levels were detected by Western blotting with CTD110.6 anti-O-GlcNAc antibody. As Figure 3B demonstrates, no extra band or any obvious trend or change over time could be recognized during the G₂/M–G₁ transition.

2.4. Nuclear Pore Proteins Are Associated with Variable O-GlcNAc Content during Cell Cycle

Nuclear pore proteins (Nups) are among the longest known, heavily O-GlcNAc modified proteins [37]. O-GlcNAc modification was shown to be necessary for the correct expression of nuclear pore proteins [38]. On the other hand, it may also change the structural property of the pores and interfere with nuclear transport and permeability [39]. Since very few data are available on the regulation of Nups by O-GlcNAc, we have enriched Nups using mouse monoclonal antibody MAb414 to assess O-GlcNAc levels in mitotic cells. Corresponding to previous data, we have found that Nups are abundantly O-GlcNAc modified (Figure 4). Moreover, at ~100 kD molecular weight in mitotic cells, we have found an O-GlcNAc staining pattern similar to that observed in crude cell extracts (Figure 2B). In addition, we have tested the anti-Nup immunoprecipitates for the presence of OGT and OGA. Unfortunately, we could not find any association of either OGT or OGA with Nup proteins in any of our samples (data not shown), although crude cell extracts contained both OGT and OGA (Figure S1).

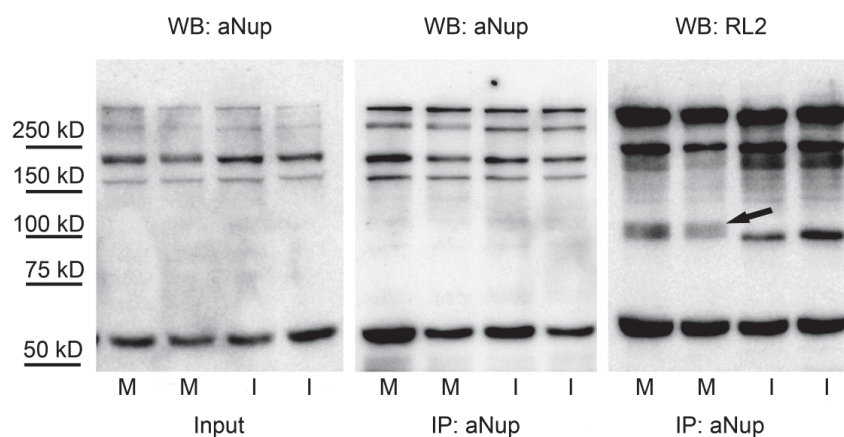


Figure 4. O-GlcNAc modification of nuclear pore proteins in mitotic and interphase cells. Mitotic and interphase cells were separated from asynchronous HeLa cells by mitotic shake-off. Nuclear pore proteins were enriched by immunoprecipitation with mouse monoclonal antibody MAb414 (aNup). Duplicates samples from mitotic (M) and interphase (I) cells were assessed by Western blot; detecting nuclear pore proteins with aNup antibody in crude cell extracts (input) and in immunoprecipitates (IP) and O-GlcNAc modified proteins with RL2 antibody in immunoprecipitates. The arrow indicates an extra O-GlcNAc band appearing at ~100 kD in the immunoprecipitates of the mitotic samples.

2.5. Immunofluorescence Detection Shows Increased Level of O-GlcNAc in Mitotic HeLa Cells

To assess the amount of O-GlcNAc and its subcellular distribution at the level of individual cells, asynchronous HeLa cells grown on coverslips were formalin-fixed and labelled with anti-O-GlcNAc monoclonal antibody RL2. As shown in Figure 5A, cells during mitosis (confirmed by Hoechst nuclear counterstaining) showed elevated levels of O-GlcNAc. To quantify this, we measured fluorescence intensity levels from interphase and mitotic cells (Figure 5B). Mitotic cells were further divided into early (prophase-metaphase (P-M)) and late (anaphase-telophase (A-T)) mitotic cells. Mitotic cells demonstrated significantly higher fluorescence intensity than interphase cells. The total fluorescence of the cells late in the mitosis was significantly lower. This was expected since the size of the daughter cells is approx. 50% of the metaphase cells before the division. Average fluorescence intensity in A-T cells was similar to the level of P-M cells after normalizing fluorescence intensity by the size of the cells.

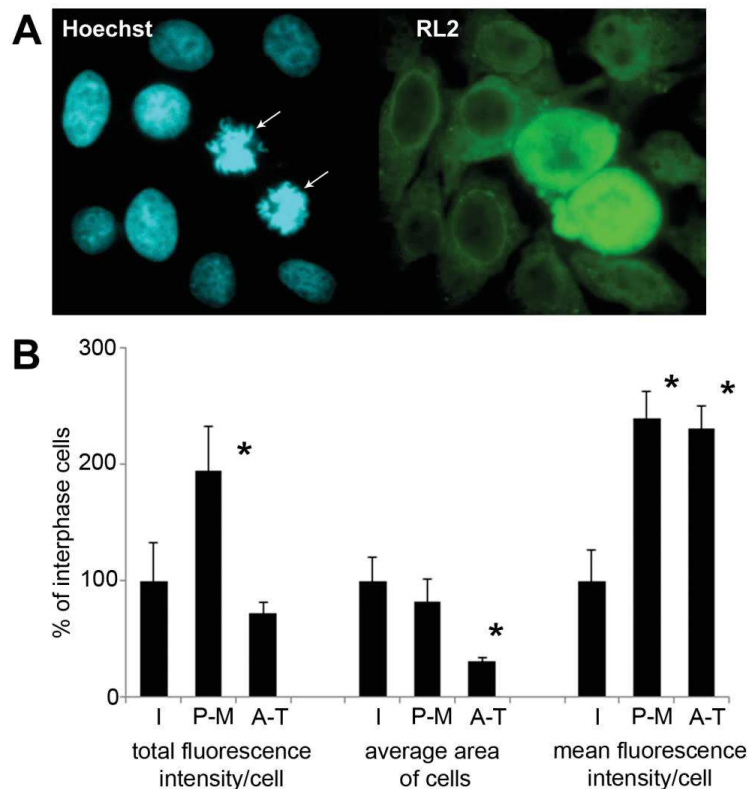


Figure 5. Immunofluorescence shows dynamic protein *O*-GlcNAc regulation during mitosis. Immunofluorescence labelling was performed on asynchronous HeLa cells grown and fixed on glass coverslips. (A) representative images captured by epi-fluorescence microscopy of cell stained with RL2 (green) and Hoechst (blue, nucleus) are shown. Two cells in mitosis (prometaphase) are indicated by arrows; (B) bar graph shows total fluorescence intensity per cell, area per cell and the average fluorescence intensity per cell (total fluorescence intensity divided by the area of the cell). Based on the morphology, the cells were categorized in three groups: interphase (I), prophase-metaphase (P-M) and anaphase-telophase (A-T). Data are expressed as percentage compared to the interphase cells in the same field of view. Each bar represents the average of 10 cells for P-M and A-T cells and 50 cells for interphase cells. Data are shown as means \pm SD, * $p < 0.05$ vs. interphase.

We have also investigated the relationship between tubulin and actin cytoskeletal proteins and *O*-GlcNAc modification during mitosis. Tubulin and actin has been previously demonstrated to be part of the ever growing *O*-GlcNAc protein family [40,41]. Thus, we simultaneously labelled asynchronous HeLa cells with CTD110.6 and an anti-tubulin antibody (Figure 6A) or phalloidin-Alexa Fluor 488 for actin (Figure 6B). CTD110.6 staining showed similar results to RL2, and the strong fluorescence signal of the mitotic cells was clearly distinct from the signal of the interphase cells. Mitotic cells containing the mitotic spindles visualized by tubulin staining also demonstrated increased level of *O*-GlcNAc. Epi-fluorescence microscopy did not show any obvious morphologic similarity between *O*-GlcNAc and either tubulin or actin staining pattern, thus we also examined possible co-localization by confocal microscopy. Figure 6C shows representative confocal images of asynchronous HeLa cells, including interphase and mitotic cells. In both interphase and mitotic cells, *O*-GlcNAc staining was granular and relatively evenly distributed in the cytoplasm. In mitotic cells, CTD110.6 labelling seemed to be excluded from the region where the chromosomes were localised—similarly CTD110.6 was also excluded from the nuclear region of interphase cells (in contrast to RL2, CTD110.6 is a mouse IgM antibody, which cannot penetrate the nuclear envelope). On the other hand, tubulin and actin both showed fibrillar morphology and a very different distribution pattern than *O*-GlcNAc. Based on our results, a large-scale co-localization between *O*-GlcNAc and either tubulin or actin could be ruled out,

but potential *O*-GlcNAc modification of a smaller subset of actin or tubulin unfortunately remains hidden in this experimental setup.

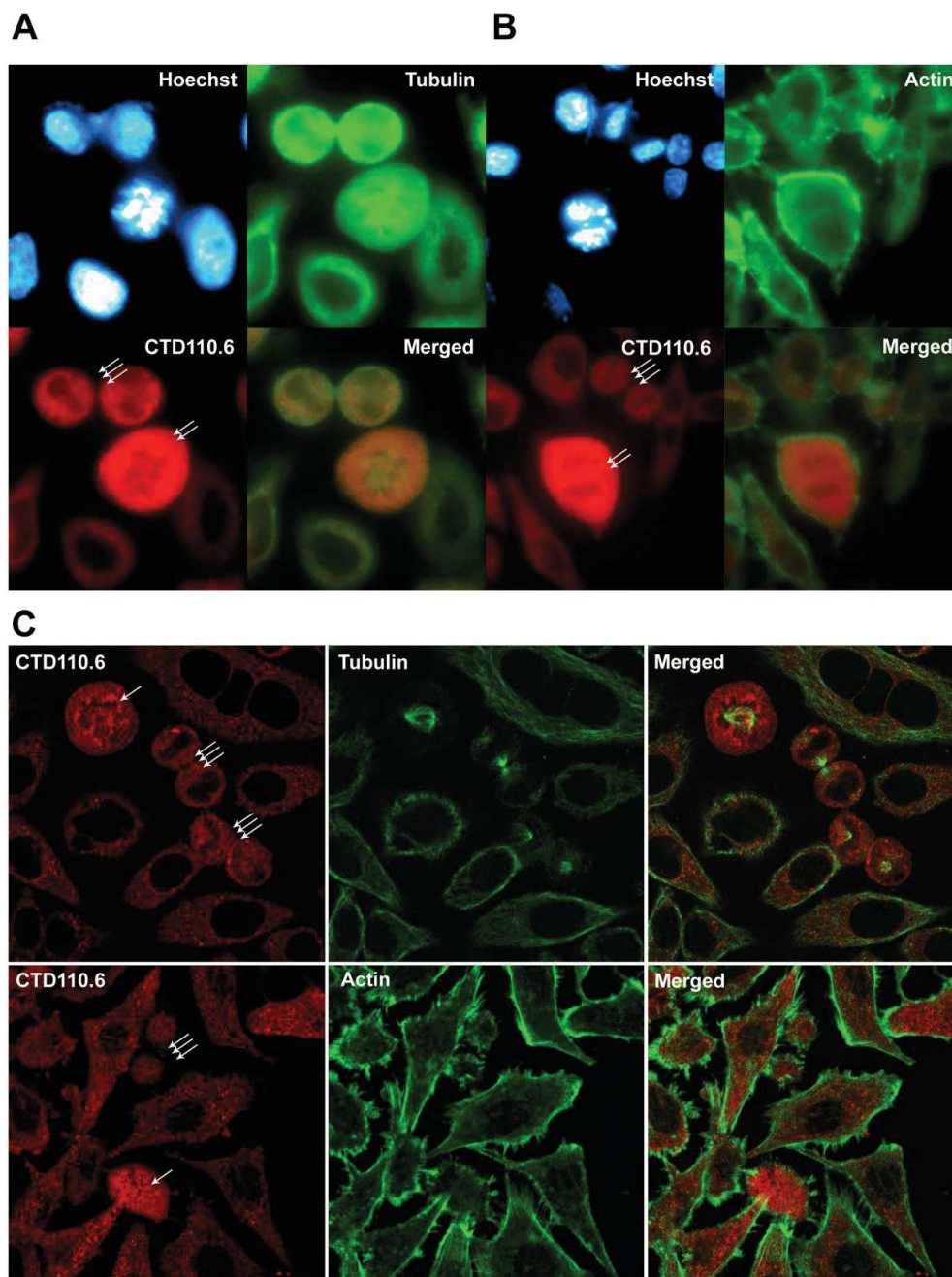


Figure 6. Protein *O*-GlcNAc distribution pattern compared to tubulin and actin staining. Immunofluorescence labelling was performed on asynchronous HeLa cells grown and fixed on glass coverslips. (A) representative epi-fluorescence images of cells stained with CTD110.6 (red), an anti-tubulin antibody (green) and Hoechst nuclear staining (blue), showing HeLa cells in various cell cycle phases; (B) representative images of asynchronous HeLa cells captured by epi-fluorescence microscopy in various cell cycle phases. Cells were stained with CTD110.6 (red), phalloidin-Alexa Fluor 488 (actin, green) and Hoechst (blue, nucleus); (C) confocal microscopy images showing asynchronous HeLa cells stained with CTD110.6 (red) and tubulin or actin (green) and corresponding merged images. Mitotic cells are indicated by arrows (prometaphase: single arrow, anaphase: double arrow, telophase: triple arrow).

3. Discussion

In the present study, we analysed the dynamic changes of global *O*-GlcNAc levels in HeLa cells during various cell cycle stages following synchronization by double thymidine block. We report here that *O*-glycosylation pattern did not alter during the G_1 and S phases, but a sudden elevation in M phase occurred. These changes remained hidden without the use of mitotic shake-off, which ensures a precise, almost pure mitotic cell collection [33]. According to our immunofluorescence results, this modification lasts only for a short period in the telophase of the mitosis, and, at the time of cytokinesis, the amount of *O*-glycosylated proteins already decreases.

There is increasing evidence representing *O*-GlcNAc modification as an important coordinator of the cell cycle. e.g., the level of *O*-GlcNAc-transferase (OGT) and *O*-GlcNAcase (OGA) the enzymes responsible for *O*-GlcNAc addition and removal were shown to be significantly fluctuate during various cell cycle transitions, correlating with changes of *O*-GlcNAc levels [19,32]. Thus, nutritional substrate availability for *O*-GlcNAc modification could be a pre-requisite for cell cycle entry. A decrease of *O*-glycosylation caused by reduced OGT activity (either by gene deletion or by substrate depletion) in mouse embryonic fibroblasts was associated with cell growth defects like delayed growth, increased expression of the cyclin dependent kinase inhibitor p27 and cell death [2,21,42,43].

Information about *O*-glycosylation of individual proteins during the cell cycle is also available. Important players of mitogen signaling PI3K and MAPK together with cyclin D1, a key regulator of G_1 phase have been reported to be disabled by blocking OGT after serum-stimulation [44,45]. All four core nucleosomal histones (H2A, H2B, H3, and H4) are *O*-GlcNAc modified in a cell cycle-dependent manner [28,46]. G_2 /M transition highly depends on cyclin B1 expression, which is decreased by either OGT or OGA inhibition showing that both enzymes are needed for proper cell cycle progression [47]. The other regulator of M phase entry, the cyclin B regulated CDK1 (cyclin dependent kinase) is also influenced by *O*-GlcNAc [48]. At the time of mitosis, OGT localizes to the mitotic spindle and later during cytokinesis to the midbody [49]. It has also been reported that OGT together with OGA plays a role in the regulation of the stability of the midbody through acting in a complex with the mitotic kinase Aurora B and protein phosphatase 1 [49]. In the anaphase, CDH1, one of the co-activators of anaphase promoting complex/cyclosome is shown to be *O*-GlcNAcylated, and this modification stimulates its activity [50]. Several transcription factors like myc, p53, NFkB and many others playing important role in cell division and tumorigenesis are also influenced by *O*-GlcNAc [47].

The changes of global *O*-GlcNAc level during the cell cycle are controversial. Several reports showed that an increase in *O*-glycosylation and OGT expression occurs in G_2 phase and these events are necessary to G_2 /M transition [23,31,32,41,47,51]. It was also shown that OGT-inhibition impairs G_2 /M transition in *Xenopus laevis* oocytes [31]. According to Yang et al., *O*-GlcNAc starts to elevate already in the late S phase and reaches a peak in the M phase of MEF and HEK293 cells [32]. However, other authors did not find any change or even detected a decrease in global *O*-glycosylation and OGT expression during M phase [21,33,52]. Differences between these findings regarding *O*-GlcNAc changes during mitosis may be explained by the rapid and reversible nature of *O*-GlcNAc modification but can also arise from the different synchronization techniques and timing of sample collection. To study these rapid changes, various techniques were developed to synchronize cells such as serum starvation, double thymidine block or cell cycle progression arrest with chemical agents such as nocodazole or paclitaxel [36,53]. However, synchronization could be ineffective (the individual cell cycle events are “spread out” in time, thus only a small fraction of the cells are truly representative of an assumed phase) or the drugs used to block the cell cycle progress are toxic [48,52–54]. These agents, while effectively arresting cells, could also have a number of side-effects that might influence *O*-GlcNAc regulation. These agents, while effectively arresting cells, could also have a number of side-effects that might influence *O*-GlcNAc regulation. Most relevant for our present findings is the study of Sakabe et al., in which they found decreased *O*-GlcNAc levels in M phase compared to G_1 phase [33]. In their experiment, they synchronized HeLa cells with nocodazole, mitotic shake-off and then replated the cells (for 1, 3 or 5 h) before final harvesting. In contrast, in our present study, mitotic cells were

collected without the presence of any cell cycle arresting drug. A second difference could be that we collected mitotic cells in short (20–25 min.) fractions, thus ensuring higher homogeneity. Moreover, we used strong lysis conditions to include all cellular proteins in our samples while Sakabe et al. discarded NP-40 insoluble material by pelleting.

Previous reports suggest that *O*-GlcNAc influences cytoskeletal proteins during mitosis. In M phase cells, OGT was shown to co-localize with the mitotic spindle and vimentin is reported to be influenced by *O*-GlcNAc cycling enzymes [21,49]. Other studies have also found strong evidence that cytoskeletal elements are regulated by *O*-GlcNAc modification [26,48,55,56]. In our experiments, we did not find any detectable co-localization between *O*-GlcNAc and actin or tubulin. Based on the intracellular localization and morphology of the abundant *O*-GlcNAc during mitosis, the elevation of *O*-GlcNAc is probably not directly connected to cytoskeletal re-arrangement, but it is more likely the result of a distinct mechanism in the mitotic cells. However, the present study was limited by the abundance of *O*-GlcNAc, which hinders the study of co-localization with other proteins by confocal microscopy. Slight morphological changes and interactions with cytoskeletal proteins may have remained hidden. Thus, we do not exclude the possibility that key elements of the cytoskeletal system might be reversibly *O*-GlcNAcylated during mitosis. However, it seems improbable that the large increase of *O*-GlcNAc during mitosis would be caused solely by the re-arrangement of the cytoskeletal system. One of the limitations of our study could be that nuclear pore proteins (Nups) are strongly *O*-GlcNAc modified [37], which could skew the analysis of the immunofluorescently labelled interphase cells. However, it seems to be that Nups also persist during mitosis [57,58]. Our Western blot data, which agreed with the immunofluorescence analysis, was based on strong lysis conditions (Laemmli sample buffer), thus the lysate represented the total protein content, including nuclear pore proteins in both interphase and mitotic samples as well. Moreover, we have also analysed the level of *O*-GlcNAc modification on Nups by immunoprecipitation. While we have found both in mitotic and interphase cells abundantly *O*-GlcNAc modified Nups, distinct differences could be observed that corresponded to *O*-GlcNAc staining patterns found in whole cell lysates. This finding suggests that at least part of the changes we see during mitosis may be attributed to either Nups or other proteins that are strongly associated with Nups. The distinct *O*-GlcNAc band appearing in Nup immunoprecipitates at ~100 kD would be of particular interest to further analyze by more specific techniques such as mass spectrometry.

Although we are only starting to understand the impact of *O*-GlcNAc on the regulation of cell division, there is evidence that the cell cycle control and metabolism are tightly connected. In a modern lifestyle, an important risk factor for cancer is excessive food intake [59]. Since *O*-GlcNAc is an important signalling element in nutrient sensing, metabolic changes could impact cell cycle regulation through *O*-GlcNAc's regulatory effect. Indeed, malignant cells show both an increased nutrient uptake and elevated *O*-GlcNAcylation [47]. It is also imperative that *O*-GlcNAc regulation in non-cancerous cells should be characterized in the future. A few studies using *Xenopus laevis* oocytes or embryonic fibroblasts showed an apparent increase in *O*-GlcNAc levels [30,32]; however, the data are far from complete and the difference between malignant and not malignant cells should be quantified. In fact, in the future, *O*-GlcNAcylation detection may become a valuable diagnostic and prognostic marker. Some authors have already proposed the measurement of OGT and OGA mRNA in urine as a diagnosis tool in bladder cancer [60]. Moreover, *O*-GlcNAc related proteins, e.g., OGT, OGA or *O*-GlcNAcylated cell cycle regulatory proteins, could represent promising targets in the therapy of malignant diseases [61].

4. Materials and Methods

4.1. Cell Line and Culture Conditions

HeLa cells were grown in a 1:1 mixture of EMEM and Ham's F12 medium supplemented with 10 *v/v*% fetal bovine serum (FBS), 1 *v/v*% non-essential amino acids, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL). The cells were incubated at 37 °C, in 95% air-5 *v/v*% CO₂ atmosphere in a

humidified incubator. Subculturing was performed every 2–3 days and medium was refreshed 12–24 h prior to each experiment.

Synchronized cell cultures were created by double thymidine block [35,62]. Briefly, HeLa cells were grown in tissue culture flasks until ~40% confluency. In addition, 2 mM thymidine was added to the cell culture medium and the cells were incubated for 19 h at 37 °C. Next, the cells were incubated for 9 h in complete medium without thymidine. Finally, another 2 mM thymidine was added to the medium for 16 h. At the end of the process, the large majority of the cells were in G₁ phase (Figure 1A).

For Western blot experiments, the cells were collected after synchronization as follows: G₁ phase cells were collected by scraping immediately after the end of the double thymidine block treatment. S phase cells were collected by scraping 4 h after thymidine block release. Mitotic cells were collected in 20–25 min. fractions between 9–13 h post-synchronization by vigorously shaking the culture flask to detach round-shaped cells. G₂ phase cells were collected by scraping the still attached cells after the last fraction of round-shaped cells were removed. Where indicated, mitotic cells were also isolated from asynchronous cell cultures by a similar fractionated shake-off method, while corresponding interphase cells were isolated from asynchronous cell cultures by scraping attached cells after a single vigorous shake-off removed all mitotic cells.

4.2. Flow Cytometry

Synchronized HeLa cells were detached from the cell culture vessels by incubation in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.25% trypsin and 0.5 mM EDTA for 3 min. at 37 °C. Resuspended cells were washed in complete medium to neutralize trypsin, next in PBS and then fixed in 1 mL ice-cold ethanol. The fixed cells were kept at 4 °C for at least 15 min, then washed with PBS 3X and resuspended in propidium-iodide (PI) solution (PBS, 0.1% Triton-X 100, 20 µg/mL PI, 0.2 mg/mL RNase A). After 30 min. incubation in the dark at room temperature, the fluorescence intensity of PI dye per cell was detected at 620 nm (FL3 channel) with a Cytomics FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Gating and selection of regions (G₁, S and G₂/M phase) were performed on asynchronous, control cells and identical selections were utilized for all samples.

Cell size analysis was performed on live cells measuring the forward scatter (FS) values of synchronized cells. Briefly, HeLa cells were washed and resuspended in PBS at room temperature. FS was measured from each sample within 30 min with Cytomics FC 500 flow cytometer. Average FS values were obtained after collecting data from 10,000 events and gating out cell debris and events that were caused by clumped cells (<10% of the total events).

4.3. Cell Counting

Synchronized HeLa cells were allowed to enter the cell cycle after double thymidine block. At the indicated times (Figure 3A), the cells were observed with a Leica DM IL inverted microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and the average number of round-shaped cells per field of view were counted using a 10× objective from at least 5 separate regions of the flask. After each counting, round-shaped cells were discarded by vigorously shaking the flasks; consequently, only newly formed mitotic cells were included in the next counting.

4.4. Western Blot Analysis

HeLa cells were washed twice in ice-cold PBS buffer and harvested in RIPA buffer (10 mM Tris pH 7.2, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1 w/v% SDS, 1 v/v% Triton-X 100, 0.5 w/v% deoxycholate, 10 v/v% glycerol, protease inhibitor cocktail: 1 tablet/10 mL (Roche Applied Science, Penzberg, Germany), kept on ice for 30 min, and centrifuged for 10 min at 4 °C at 3000 rpm. From the supernatant, the total protein concentration was determined using a Bio-Rad DC Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Next, the samples were completed by the addition of 4X Laemmli sample buffer and boiled for 5 min. Where specified, the centrifugation step was omitted to obtain samples containing all proteins including RIPA-insoluble ones. For immunoprecipitated

samples, we lysed the cells in IP buffer (25 mM Tris pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 *v/v*% Triton-X 100, 5 *v/v*% glycerol, 1 tablet/10 mL protease inhibitor cocktail, 0,05 *w/v*% Na-azide and 100 μ M *O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)-amino-*N*-phenylcarbamate (PUGNAc)). Immunoprecipitation was done overnight at 4 °C with mouse monoclonal antibody MAb414 (Biologend, San Diego, CA, USA, Cat. No.: 902902) followed by 3 h incubation with Protein A-Sepharose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Cat. No.: P3391). Captured proteins were eluted by 0.1 M glycine, pH 2.8 and completed by the addition of 4X Laemmli sample buffer and boiled for 5 min.

Proteins were separated by 8 *w/v*% SDS-PAGE and transferred onto Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). Blots were probed with the anti-*O*-GlcNAc antibody CTD110.6 (monoclonal mouse IgM (Sigma-Aldrich, Cat. No.: O7764, 1:2000) in 1 *w/v*% casein blocking buffer followed by horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-mouse IgM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 1:5000). Blots were also probed with mouse (monoclonal) anti-*O*-GlcNAc antibody RL2 (Thermo Fisher Scientific, Cat. No.: MA1-072, 1:1000), rabbit polyclonal anti-actin antibody (Sigma-Aldrich, Cat. No.: A2103, 1:1500) and mouse monoclonal antibody MAb414 (1:1000) according to the manufacturers' protocol followed by their respective HRP conjugated secondary antibodies (1:2500). The blots were developed using Femto chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific) and the signal was visualized by Kodak Image Station 2000R (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). Kodak 1D (ver3.6.1, Eastman Kodak Company, NewHaven, CT, USA) and ImageJ (ver 1.51j, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) analysis software were used to quantify the intensity of bands.

4.5. Immunofluorescence Microscopy

HeLa cells were grown on coverslips until ~50% confluency. Next, cells were washed twice in ice-cold PBS and fixed in 10 *v/v*% PBS-buffered formaldehyde for 30 min at room temperature. To avoid formaldehyde autofluorescence, the coverslips were quenched with 50 mM ammonium chloride for 10 min. The cells were permeabilized with 0.25 *v/v*% Triton-X 100 for 10 min. Nonspecific sites were blocked with 5% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) in PBS for 30 min. and then the coverslips were incubated at room temperature with the primary antibody (or antibodies) for 2 h in 5 *w/v*% BSA/PBS. The primary antibodies and their dilutions used were the following: CTD110.6 (1:200), RL2 (1:100), and anti- α -tubulin (Sigma-Aldrich, Cat. No.: T8203, 1:100). After rinsing 3 times with PBS, the samples were incubated with the secondary antibody for 1 h in dark. For visualizing actin, phalloidin-Alexa Fluor 488 conjugate (Thermo Fisher Scientific, Cat. No.: A12379, 1:20) was used. Nuclei were counterstained with Hoechst dye at a concentration of 0.24 μ g/mL for 15 min at room temperature. Finally, coverslips were mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) mounting medium. Image acquisition was performed with a Zeiss Axiovert 35 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) inverted fluorescence microscope equipped with CellD software (ver2.6, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany). Confocal images were captured using a Zeiss LSM 710 confocal scanning microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) equipped with ZEN software (ver2.3, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) and a 63X objective. Alexa Fluor 488 and Texas Red fluorescence channels were used for image acquisition (ex.: 488 nm and 594 nm, em: 518 nm and 624 nm, respectively).

4.6. Data Analysis

Data are presented as means \pm standard deviations (SD) throughout. Comparisons were performed using Student's *t*-test. Statistically significant differences between groups were defined as *p*-values < 0.05 and are indicated in the legends of figures.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/6/1275/s1>, Figure S1: OGT and OGA expression in mitotic and interphase cells.

Author Contributions: Conceptualization, A.M. and T.N.; Data curation, V.F., E.K. and J.O.; Formal analysis, V.F., E.K., J.O. and T.N.; Writing—original draft, V.F., S.D. and T.N.; Writing—review and editing, S.D. and A.M.

Funding: This research was funded by the EU founded Hungarian projects GINOP (2.3.2.-15-2016-00050 and 2.3.3.-15-2016-00025) and supported by János Szentágothai Research Centre, University of Pécs.

Acknowledgments: We wish to thank Viktor S. Poór at the Dept. of Forensic Medicine of the University of Pécs, Hungary for his editing work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wang, C.; Wang, Z. Studying the relationship between cell cycle and Alzheimer’s disease by gold nanoparticle probes. *Anal. Biochem.* **2015**, *489*, 32–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Slawson, C.; Copeland, R.J.; Hart, G.W. O-GlcNAc signaling: A metabolic link between diabetes and cancer? *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 547–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Balomenos, D.; Martínez-A, C. Cell-cycle regulation in immunity, tolerance and autoimmunity. *Immunol. Today* **2000**, *21*, 551–555. [[CrossRef](#)]
4. Swaffer, M.P.; Jones, A.W.; Flynn, H.R.; Snijders, A.P.; Nurse, P. CDK Substrate Phosphorylation and Ordering the Cell Cycle. *Cell* **2016**, *167*, 1750–1761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Malumbres, M. Revisiting the “Cdk-centric” view of the mammalian cell cycle. *Cell Cycle* **2005**, *4*, 206–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Mocchiari, A.; Rape, M. Emerging regulatory mechanisms in ubiquitin-dependent cell cycle control. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 255–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Swatek, K.N.; Komander, D. Ubiquitin modifications. *Cell Res.* **2016**, *26*, 399–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Cooper, J.A.; Kaneko, T.; Li, S.S.C. Cell Regulation by Phosphotyrosine-Targeted Ubiquitin Ligases. *Mol. Cell. Biol.* **2015**, *35*, 1886–1897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Woo, C.-H.; Abe, J.-I. SUMO—A post-translational modification with therapeutic potential? *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, *10*, 146–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Karlberg, T.; Langelier, M.-F.; Pascal, J.M.; Schüler, H. Structural biology of the writers, readers, and erasers in mono- and poly(ADP-ribose) mediated signaling. *Mol. Aspects Med.* **2013**, *34*, 1088–1108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Hahne, H.; Sobotzki, N.; Nyberg, T.; Helm, D.; Borodkin, V.S.; van Aalten, D.M.F.; Agnew, B.; Kuster, B. Proteome wide purification and identification of O-GlcNAc-modified proteins using click chemistry and mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **2013**, *12*, 927–936. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Butkinaree, C.; Park, K.; Hart, G.W. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1800*, 96–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ruan, H.-B.; Nie, Y.; Yang, X. Regulation of protein degradation by O-GlcNAcylation: Crosstalk with ubiquitination. *Mol. Cell. Proteom.* **2013**, *12*, 3489–3497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Keembiyehetty, C.N.; Krzeslak, A.; Love, D.C.; Hanover, J.A. A lipid-droplet-targeted O-GlcNAcase isoform is a key regulator of the proteasome. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 2851–2860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Guinez, C.; Mir, A.-M.; Dehennaut, V.; Cacan, R.; Harduin-Lepers, A.; Michalski, J.-C.; Lefebvre, T. Protein ubiquitination is modulated by O-GlcNAc glycosylation. *FASEB J.* **2008**, *22*, 2901–2911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Zhang, F.; Su, K.; Yang, X.; Bowe, D.B.; Paterson, A.J.; Kudlow, J.E. O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell* **2003**, *115*, 715–725. [[CrossRef](#)]
17. Sümegi, M.; Hunyadi-Gulyás, E.; Medzihradszky, K.F.; Udvardy, A. 26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *312*, 1284–1289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Wells, L.; Vosseller, K.; Hart, G.W. A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance. *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 222–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

19. Drougat, L.; Olivier-Van Stichelen, S.; Mortuaire, M.; Foulquier, F.; Lacoste, A.-S.; Michalski, J.-C.; Lefebvre, T.; Vercoutter-Edouart, A.-S. Characterization of O-GlcNAc cycling and proteomic identification of differentially O-GlcNAcylated proteins during G1/S transition. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1820*, 1839–1848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Zachara, N.E.; Hart, G.W. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1761*, 599–617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Slawson, C.; Zachara, N.E.; Vosseller, K.; Cheung, W.D.; Lane, M.D.; Hart, G.W. Perturbations in O-linked β -N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 32944–32956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Wang, Z.; Udeshi, N.D.; Slawson, C.; Compton, P.D.; Sakabe, K.; Cheung, W.D.; Shabanowitz, J.; Hunt, D.F.; Hart, G.W. Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates cytokinesis. *Sci. Signal.* **2010**, *3*, ra2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dehennaut, V.; Hanouille, X.; Bodart, J.-F.; Vilain, J.-P.; Michalski, J.-C.; Landrieu, I.; Lippens, G.; Lefebvre, T. Microinjection of recombinant O-GlcNAc transferase potentiates *Xenopus* oocytes M-phase entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *369*, 539–546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Fong, J.J.; Nguyen, B.L.; Bridger, R.; Medrano, E.E.; Wells, L.; Pan, S.; Sifers, R.N. β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is a novel regulator of mitosis-specific phosphorylations on histone H3. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 12195–12203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Delporte, A.; De Zaeytijd, J.; De Storme, N.; Azmi, A.; Geelen, D.; Smagghe, G.; Guisez, Y.; Van Damme, E.J.M. Cell cycle-dependent O-GlcNAc modification of tobacco histones and their interaction with the tobacco lectin. *Plant Physiol. Biochem.* **2014**, *83*, 151–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Tan, E.P.; Caro, S.; Potnis, A.; Lanza, C.; Slawson, C. O-linked N-acetylglucosamine cycling regulates mitotic spindle organization. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 27085–27099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Itkonen, H.M.M.; Minner, S.; Guldvik, I.J.J.; Sandmann, M.J.J.; Tsourlakis, M.C.C.; Berge, V.; Svindland, A.; Schlomm, T.; Mills, I.G.G. O-GlcNAc transferase integrates metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 5277–5287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Sakabe, K.; Wang, Z.; Hart, G.W. Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 19915–19920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Gagnon, J.; Daou, S.; Zamorano, N.; Iannantuono, N.V.G.; Hammond-Martel, I.; Mashtalir, N.; Bonneil, E.; Wurtele, H.; Thibault, P.; Affar, E.B. Undetectable histone O-GlcNAcylation in mammalian cells. *Epigenetics* **2015**, *10*, 677–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Lefebvre, T.; Baert, F.; Bodart, J.F.; Flament, S.; Michalski, J.C.; Vilain, J.P. Modulation of O-GlcNAc glycosylation during *xenopus* oocyte maturation. *J. Cell. Biochem.* **2004**, *93*, 999–1010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Dehennaut, V.; Lefebvre, T.; Sellier, C.; Leroy, Y.; Gross, B.; Walker, S.; Cacan, R.; Michalski, J.-C.; Vilain, J.-P.; Bodart, J.-F. O-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G₂/M transition in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 12527–12536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Yang, Y.R.; Song, M.; Lee, H.; Jeon, Y.; Choi, E.J.; Jang, H.J.; Moon, H.Y.; Byun, H.Y.; Kim, E.K.; Kim, D.H.; et al. O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability. *Aging Cell* **2012**, *11*, 439–448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sakabe, K.; Hart, G.W. O-GlcNAc transferase regulates mitotic chromatin dynamics. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 34460–34468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Pederson, T.; Robbins, E. A method for improving synchrony in the G₂ phase of the cell cycle. *J. Cell Biol.* **1971**, *49*, 942–945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bostock, C.J.; Prescott, D.M.; Kirkpatrick, J.B. An evaluation of the double thymidine block for synchronizing mammalian cells at the G1-S border. *Exp. Cell Res.* **1971**, *68*, 163–168. [[CrossRef](#)]
36. Fisi, V.; Káta, E.; Bogner, P.; Miseta, A.; Nagy, T. Timed, sequential administration of paclitaxel improves its cytotoxic effectiveness in a cell culture model. *Cell Cycle* **2016**, *15*, 1227–1233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Hanover, J.A.; Cohen, C.K.; Willingham, M.C.; Park, M.K. O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 9887–9894. [[PubMed](#)]
38. Zhu, Y.; Liu, T.-W.; Madden, Z.; Yuzwa, S.A.; Murray, K.; Cecioni, S.; Zachara, N.; Vocadlo, D.J. Post-translational O-GlcNAcylation is essential for nuclear pore integrity and maintenance of the pore selectivity filter. *J. Mol. Cell Biol.* **2016**, *8*, 2–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Fisi, V.; Miseta, A.; Nagy, T. The Role of Stress-Induced O-GlcNAc Protein Modification in the Regulation of Membrane Transport. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1308692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Walgren, J.L.E.; Vincent, T.S.; Schey, K.L.; Buse, M.G. High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2003**, *284*, E424–E434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Dehennaut, V.; Slomianny, M.-C.; Page, A.; Vercoutter-Edouart, A.-S.; Jesus, C.; Michalski, J.-C.; Vilain, J.-P.; Bodart, J.-F.; Lefebvre, T. Identification of structural and functional O-linked N-acetylglucosamine-bearing proteins in *Xenopus laevis* oocyte. *Mol. Cell. Proteom.* **2008**, *7*, 2229–2245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Chu, I.M.; Hengst, L.; Slingerland, J.M. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: Prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 253–267. [[CrossRef](#)]
43. Boehmelt, G.; Wakeham, A.; Elia, A.; Sasaki, T.; Plyte, S.; Potter, J.; Yang, Y.; Tsang, E.; Ruland, J.; Iscove, N.N.; et al. Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMe32-deficient cells. *EMBO J.* **2000**, *19*, 5092–5104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Olivier-Van Stichelen, S.; Drougat, L.; Dehennaut, V.; El Yazidi-Belkoura, I.; Guinez, C.; Mir, A.-M.; Michalski, J.-C.; Vercoutter-Edouart, A.-S.; Lefebvre, T. Serum-stimulated cell cycle entry promotes ncOGT synthesis required for cyclin D expression. *Oncogenesis* **2012**, *1*, e36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kwei, K.A.; Baker, J.B.; Pelham, R.J. Modulators of sensitivity and resistance to inhibition of PI3K identified in a pharmacogenomic screen of the NCI-60 human tumor cell line collection. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Slawson, C.; Hart, G.W. O-GlcNAc signalling: Implications for cancer cell biology. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 678–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Fardini, Y.; Dehennaut, V.; Lefebvre, T.; Issad, T. O-GlcNAcylation: A New Cancer Hallmark? *Front. Endocrinol.* **2013**, *4*, 99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Lanza, C.; Tan, E.P.; Zhang, Z.; Machacek, M.; Brinker, A.E.; Azuma, M.; Slawson, C. Reduced O-GlcNAcase expression promotes mitotic errors and spindle defects. *Cell Cycle* **2016**, *15*, 1363–1375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Slawson, C.; Lakshmanan, T.; Knapp, S.; Hart, G.W. A mitotic GlcNAcylation/phosphorylation signaling complex alters the posttranslational state of the cytoskeletal protein vimentin. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 4130–4140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Tian, J.; Geng, Q.; Ding, Y.; Liao, J.; Dong, M.-Q.; Xu, X.; Li, J. O-GlcNAcylation Antagonizes Phosphorylation of CDH1 (CDC20 Homologue 1). *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 12136–12144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Dehennaut, V.; Lefebvre, T.; Leroy, Y.; Vilain, J.-P.; Michalski, J.-C.; Bodart, J.-F. Survey of O-GlcNAc level variations in *Xenopus laevis* from oogenesis to early development. *Glycoconj. J.* **2009**, *26*, 301–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Haltiwanger, R.S.; Philipsberg, G.A. Mitotic arrest with nocodazole induces selective changes in the level of O-linked N-acetylglucosamine and accumulation of incompletely processed N-glycans on proteins from HT29 cells. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 8752–8758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Jackman, J.; O'Connor, P.M. Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2001**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Shen, Y.; Betzendahl, I.; Sun, F.; Tinneberg, H.-R.; Eichenlaub-Ritter, U. Non-invasive method to assess genotoxicity of nocodazole interfering with spindle formation in mammalian oocytes. *Reprod. Toxicol.* **2005**, *19*, 459–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Steenackers, A.; Olivier-Van Stichelen, S.; Baldini, S.F.; Dehennaut, V.; Toillon, R.-A.; Le Bourhis, X.; El Yazidi-Belkoura, I.; Lefebvre, T. Silencing the Nucleocytoplasmic O-GlcNAc Transferase Reduces Proliferation, Adhesion, and Migration of Cancer and Fetal Human Colon Cell Lines. *Front. Endocrinol.* **2016**, *7*, 46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Tarbet, H.J.; Dolat, L.; Smith, T.J.; Condon, B.M.; O'Brien, E.T.; Valdivia, R.H.; Boyce, M. Site-specific glycosylation regulates the form and function of the intermediate filament cytoskeleton. *eLife* **2018**, *7*, e31807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Theisen, U.; Straube, A.; Steinberg, G. Dynamic rearrangement of nucleoporins during fungal “open” mitosis. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 1230–1240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Chatel, G.; Fahrenkrog, B. Nucleoporins: Leaving the nuclear pore complex for a successful mitosis. *Cell. Signal.* **2011**, *23*, 1555–1562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

59. Dossus, L.; Kaaks, R. Nutrition, metabolic factors and cancer risk. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *22*, 551–571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Rozanski, W.; Krzeslak, A.; Forma, E.; Brys, M.; Blewniewski, M.; Wozniak, P.; Lipinski, M. Prediction of bladder cancer based on urinary content of MGEA5 and OGT mRNA level. *Clin. Lab.* **2012**, *58*, 579–583. [[PubMed](#)]
61. Lefebvre, T. O-GlcNAcylation: A sweet thorn in the spindle! *Cell Cycle* **2016**, *15*, 1954–1955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ma, H.T.; Poon, R.Y.C. Synchronization of HeLa cells. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *761*, 151–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Sample Availability: Not Available.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).