

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

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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.

BEVEZETÉS

1.Paclitaxel

Az eukarióta sejt osztódása szigorúan szabályozott, komplex folyamat, melynek eredményeként fiziológias esetben két, vele genetikailag megegyező leánysejt képződik. A sejtciklus vizsgálatához a leggyakrabban alkalmazott módszer a szinkronizálás. Ennek során - különböző módszerek révén - a sejtciklus progresszióját egy adott ponton felfüggesztve fázis-homológ populációk nyerhetők. A gátlás feloldása után a sejtek egymással szinkronizált módon haladnak tovább a sejtciklusban. Ezt követően meghatározott időpontokban mintát gyűjtve képesek vagyunk az adott fázisban lévő sejtcsoport ciklusfüggő paramétereit vizsgálni. A szinkronizálás nehézségei közé tartozik, hogy a sejtciklusban blokkolt sejt bizonyos idő eltelte után az apoptózis útjára lép, tehát 100%-os szinkronizáltságot nehéz létrehozni. Emiatt szükséges a kezelések időpontját és időtartamát minden egyes sejtpopulációra és a vizsgálni kívánt fázisra optimalizálni, hogy a lehető legmagasabb szinkronizáltsági fokot érjük el, minél kevesebb apoptotikus sejt létrejöttével.

Az egyik gyakran alkalmazott szinkronizáló ágens a természetes eredetű kemoterápiás szer, a paclitaxel (taxol). A paclitaxel a mikrotubulusokhoz kötődve (Kampan et al. 2015) a tubulin-polimerizációt serkenti, illetve annak depolimerizációját gátolja. Az így képződő mikrotubulusok különösen stabilak és diszfunkcionálisak. A mitózishoz és a vitális interfázis-folyamatokhoz szükséges fiziológias mikrotubulus-dinamika hiányának következtében a sejtek a mitózis fázisában rekednek, majd a blokk feloldásának hiánya esetén elpusztulnak. (Rowinsky EK 1995; Parness & Horwitz 1981)

A paclitaxel klinikai használatát az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerellenőrző Hatóság (U.S. Food and Drug Administration; FDA) emlő-, ovárium- és tüdőtumorkban, valamint Kaposi sarcoma kezelésében engedélyezte. Emellett off-label módon használatos endometriális, cervix, prosztatata, gastro-oesophageális, illetve fej-nyaki tumorok esetén, valamint egyes sarcomákban, lymphomákban és leukaemiákban.(Weaver 2014) 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 radioterápiával vagy egyéb kemoterápiás szerekkel. (Dyer et al. 2013; Kumar et al. 2015; Markman et al. 2013)

Habár irodalmi adatok alapján a taxol okozta apoptózis nemcsak a mitózis-megállás következtében, hanem interfázisú sejteken való hatás eredményeként is létrejöhet,(Janssen et

al. 2013; Zasadil et al. 2014) a szer citotoxikus hatása mégis az M fázis során a legkifejezettebb.(Liebmann et al. 1993) Már 5 nM paclitaxel-koncentráció elégséges a malignus sejtek osztódásban való gátlásához, illetve azt követő elpusztításához. Az effektivitás, a szükséges koncentráció és a kezelési időtartam azonban nagymértékben függ a célzott sejtípustól.(Liebmann et al. 1993) A kezelésnek tehát a sejtciklus dinamikájához szükséges igazodnia. Korábbi közlemények arról számoltak be, hogy ováriumtumor-sejtvonal szinkronizálása megszünteti a sejtek paclitaxellel szembeni rezisztenciáját,(Wang et al. 2013) illetve a paclitaxel okozta szinkronizáció hatásosnak bizonyult tumorsejtek radioterápiára való szenzitivitása céljából,(Supiot et al. 2005; Wenz et al. 1999) ugyanis a G₂, illetve M a sugárterápia szempontjából is legérzékenyebb fázisok.(Tishler et al. 1992)

2. O-glikoziláció a sejtciklus-szabályozásban

A sejtciklus folyamatainak összehangolt működése szigorú szabályozás következménye, melyben transzkripció, transláció, poszttranszláció, valamint degradációs folyamatok egyaránt közreműködnek. A sejtciklus minden egyes lépése több száz regulátor befolyása alatt áll, melyek 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. (Wang & Wang 2015; Slawson et al. 2010; Balomenos & Martínez-A 2000)

Az O-glikozilációnak a sejtosztódásban betöltött jelentőségére az utóbbi években derült fény. (Slawson & Hart 2011) Az O-glikoziláció 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. A módosulás által érintett, ismert fehérjék száma a javuló technikai feltételeknek köszönhetően az elmúlt néhány évben megsokszorozódott. Napjainkig több mint 3000 O-glikozilált fehérje került leírásra, melyek a génexpresszió, transláció, fehérjedegradáció, szignál transzdukció, és egyebek között a sejtciklus-szabályozás szempontjából is kiemelkedő jelentőséggel bírnak.(Zachara et al. 2015)

A módosulás egyik fontos jellemzője, hogy a sejt metabolikus állapotával szoros kapcsolatban áll („nutrient sensor”). Szubsztrátja ugyanis az uridin-difoszfát-N-acetilglükózamin (UDP-GlcNAc), amely a hexózamin bioszintézis útvonal (HBP)

végterméke. Ebbe, a glükóz-, aminosav-, zsírsav- és nukleotid-metabolizmust összekapcsoló útvonalba lép be a sejtbe jutó glükóz 2-4%-a.(Goldberg et al. 2006)

Irodalmi adatok alapján az O-GlcNAc státusz manipulálása a sejtciklus progressziójának zavaraihoz vezet.(Slawson et al. 2005; Wang et al. 2012; Dehennaut, Hanouille, et al. 2008) A módosulás optimális mértéke szükséges a megfelelő arányú hiszton-foszforilációhoz,(Delporte et al. 2014) a mitotikus orsó kialakulásához,(Tan et al. 2013) illetve a sejtciklus során szintén jelentős szerepet játszó c-myc fehérje expressziójához.(Itkonen et al. 2013) Emellett az egyik legmagasabb O-glikoziláltsági fokot mutató fehérjék a maghártyában elhelyezkedő nukleoporinok.(J. A. Hanover et al. 1987) Rajtuk keresztül, illetve a transzportálandó fehérjék módosítása révén az O-GlcNAc hatással bír a sejtmag be- illetve kifelé irányuló transzportfolyamataira. A mitózis folyamata során egyes szerzők emelkedett, (Wang et al. 2010; Dehennaut, Hanouille, et al. 2008; Yang et al. 2012; Lefebvre et al. 2004) mások csökkent O-glikozilációs státuszt írtak le.(Fong et al. 2012; Sakabe & Hart 2010) Összességében, bár az O-GlcNAc módosulásnak a sejtciklus szabályozásában betöltött szerepe vitathatatlan, ezzel kapcsolatban részletes ismeretek még nem állnak rendelkezésünkre, a globális O-glikozilációs változások sejtciklus alatti változásairól közölt eredmények pedig ellentmondásosak.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A munka egyik célja egy olyan citotoxikus kezelési séma kidolgozása volt, melyet specifikusan egy sejtvonagra optimalizálunk, az osztódási karakterisztika figyelembe vételével. Az ehhez szükséges lépések a következők voltak:

- a. Sp2 sejt vonal osztódási ciklusának jellemzése, a duplikációs idő meghatározásán túl az egyes fázisok 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 sejt vonal között, az előbbire optimalizált kezelés révén; a klinikai gyakorlatban megcélozni kívánt tumorsejtek és az eltérő osztódási kinetikával rendelkező egészséges testi sejtek analógiájaként:

- a. Jurkat sejtvonal 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 sejtenyészet 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, citoskeletális fehérjékkel való esetleges kolokalizációjának analízise.

ANYAG ÉS MÓDSZER

1. Sejtkultúrák, szinkronizálás

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 forgalmazó protokolljainak megfelelően. (A sejtvonalak a PTE Immunológiai és Biotechnológiai Intézetéből Dr. Balogh Péter és Dr. Boldizsár Ferenc ajándéka).

A paclitaxellel való szinkronizációhoz friss, 6 mg/l-es paclitaxel törzsoldatot használtunk, a humán gyógyászatban alkalmazott 6 mg/ml-es paclitaxel oldatból (Teva Gyógyszergyár Zrt.) előállítva. A kezeléseket komplett médiumban 0.05 mg/l koncentrációjú paclitaxellel történtek, 37°C-on. A citotoxikum eltávolítása céljából a sejteket centrifugáltuk (500 RCF, 5 perc) és háromszor mostuk paclitaxelmentes, teljes médiumban, majd reszuszpendálás után 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.

Dupla timidin blokkal való szinkronizálás során adherens HeLa sejtenyészetet ~40%-os konfluencia elérésekor vetettünk alá kezelésnek. A sejteket 2 mM timidin jelenlétében 19 órán át inkubáltuk, majd 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.

Ahhoz, hogy szelektívebb, mitózisban levő 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 sejteket a tenyésztőflaskától elválva összegyűjtöttük. 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.

2. Sejtszámlálási módszerek

Méréseink során különböző sejtszámlálási módszereket használtunk. 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 tripánkéék ekklúziós festés segítségével, haemocytométerrel határoztuk meg, sztereomikroszkóp alatt. 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 sejtípus arányát homogén sejtszuspenzióban, 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), valamint az 525 nm-en (FL1 csatorna) mért fluoreszcenciaintenzitás szimultán detekciójával történt. Minden kísérletben azonos szelekciós régiókat használva 10.000 partikulumot detektáltunk.

HeLa sejtek esetén a számlálás célja a különböző időpontokban éppen mitózisban lévő, lekerekedett sejtek mennyiségének meghatározása volt. Ehhez Leica DM IL inverz mikroszkóp alatt, 10x objektívet használva meghatároztuk a lekerekedett sejtek számát legalább 5 látótérben. Minden számlálás után erőteljes rázással eltávolítottuk a kerek sejteket a flaskából, így a következő időpontban csupán az újonnan mitózisba lépett sejtek kerültek a számlálásba.

3. Sejtciklus-analízis

A sejtciklus vizsgálatát flow cytometriával végeztük permeabilizált sejteken, propidium-jodiddal (PI) való jelölést követően.

A mérés előtt az adherens sejteket 0.25% tripszint és 0.5 mM EDTA-t tartalmazó foszfát pufferes sóoldattal (PBS) választottuk el a tenyésztőflaskától. A tripszin neutralizálása céljából a reszuszpendált sejteket komplett médiummal mostuk. Az ezt követő lépések az adherens és a szuszpenziós kultúrák esetén megegyeztek. Etanolos fixáció után a sejteket 4 °C-ra helyeztük legalább 15 percig, majd háromszori PBS-es mosást követően 0.2 mg/ml RNáz A-t tartalmazó propidium-jodid (PI) oldatban 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

4. Western blot, Immunprecipitáció

Western blot vizsgálatainkhoz HeLa sejteket PBS oldatos mosást követően jégen tartott RIPA pufferbe gyűjtöttünk össze. 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 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 tableta/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 0.1 M, pH 2.8 glicinoldattal eluáltuk, és a mintákhoz 4x Laemmli-puffert adtunk.

A fehérjéket SDS-tartalmú, 8%-os poliakrilamid gélelektroforézissel szeparáltuk, majd polivinil-difluorid (PVDF) membránra elektroblottoltuk (Millipore). A membránokat O-GlcNAc ellenes CTD110.6 (1:2000, Sigma-Aldrich), szintén O-GlcNAc ellenes RL2 (1:1000, Thermo Fisher Scientific), MAb414 (1:1000, Biolegend), illetve anti-aktin (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.

5. Immunfluoreszcencia

HeLa sejteket ~50% konfluencia eléréséig fedőlemezeken tenyésztettünk. 30 perces, 10% formaldehid-tartalmú PBS-ben történő fixálást, illetve 10 perces 50 mM ammónium-klorid-oldatban való inkubációt követően a sejteket 0.25% Triton-X 100 oldattal permeabilizáltuk.

5% borjú szérum albumint tartalmazó PBS oldattal történő blokkolás után az elsődleges ellenanyagokkal való jelölés (CTD110.6 (1:200), RL2 (1:100), anti- α -tubulin (Sigma-Aldrich, 1:100)) 2 órán át, szobahőmérsékleten történt. 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 használtunk. A fedőemezeket Vectashield (Vector Laboratories) fedőmédiummal tárgylemezeken rögzítettük. A fotókat CellD (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.

6. 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.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

A paclitaxel citotoxikus hatásának sejtciklusfüggő változásai

Eredmények

1. Sp2 sejtek szinkronizálása és osztódási ciklusának jellemzése

Az Sp2 sejtek 0.05 mg/l koncentrációjú, 14 órán át tartó paclitaxelkezelésével a G₂/M fázisban átmeneti blokkot értünk el. A szer kimosása után a sejtek képesek voltak szinkronizált módon továbbhaladni a következő sejtciklusba. Ezt követően a G₀/G₁, S, illetve G₂/M fázisban levő sejtek arányát 4 óránként propidium-jodid jelöléssel meghatározva, az azonos fázisok ismétlődését (pl. S-S vagy G₂/M-G₂/M) ~16 óránként észleltük. Az Sp2 sejtek teljes sejtciklusának ideje tehát hozzávetőlegesen 16 órára volt tehető.

Teljes, szinkronizált sejtkultúra egyes fázisainak időtartama azonban nem csupán egy-egy individuális sejtnél az adott fázisban eltöltött idejét jelenti. Megállapításánál 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. A fenti képletet a sejtciklus minden egyes fázisára alkalmazva a következő értékeket kaptuk: G₀/G₁ ≈ 1.5 óra, S ≈ 9.5 óra, G₂/M ≈ 5 óra, T_d ≈ 6.5 óra.

2. Az időzítés jelentősége a paclitaxel citotoxikus hatásában

Mivel a paclitaxel főként a mitózis alatt fejt ki hatását, abból a feltételezésből indultunk ki, hogy a sejtek ezen időszakban mutatnak legnagyobb érzékenységet a kezelésre. E hipotézis vizsgálatához szinkronizált Sp2 sejteket a G₂/M fázis lezajlásakor időzített második kezeléssel törekedtünk a legmagasabb citotoxikus hatás elérésére.

A második kezelés időtartamának éppen elég hosszúnak kellett lennie ahhoz, hogy a legtöbb sejt belépjen a G₂/M fázisba (a számított 6.5 órás T_d értéknél hosszabb), feleslegesen hosszú inkubációs idő azonban a későbbi kokultúrában végzett kezelések miatt is kerülendő volt. Az így választott 8 órás időtartam a vizsgálatok szempontjából megfelelőnek bizonyult. A kezelés optimális időpontjának megállapításához azonos kiindulási sejtszámú kultúrákon

különböző kezelési sémák effektivitását hasonlítottuk össze. Mivel az első, szinkronizáló paclitaxel-inkubáció után ~16 óra elteltével volt várható a következő G₂/M fázis, 8-22 óra közti időpontokban alkalmaztuk a második dózist (0,05 mg/l, 8 órán át). A második kezelés ≈12-14 órával az első kezelés befejeztét követően bizonyult leghatásosabbnak. Ezzel szemben, amennyiben a második kezelés az első követő 22-30 órával - vagyis számításaink alapján a következő G₂/M fázis lezajlása után - történt, szignifikánsan több túlélő sejt maradt. Az optimális és szuboptimális időzítés közti különbség a kezeléseket követő 2 napon keresztül továbbkövethető volt.

3. Sejtvonalak differenciálása ismételt, időzített kezelések által

Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy egymást követő paclitaxelkezelések segítségével elérhető-e effektívasságbeli különbség két, eltérő sejtciklus-karakterisztikával bíró sejtvonal között. E célból zöld fluoreszcens proteint (GFP-t) expresszáló Jurkat sejteket kevertünk össze az Sp2 sejtvonallal. A Jurkat sejtek ciklusideje hozzávetőlegesen 24-36 órának bizonyult az Sp2 sejtekével megegyező tenyésztési körülmények között. 14 órás, 0.05 mg/l paclitaxelkezelést követően azt tapasztaltuk, hogy a Jurkat sejtek esetén az Sp2 tenyésztésre optimalizált 14 órás kezelés effektivitása alacsonyabb volt, csak kismértékű szinkronitást eredményezett.

Ezután az Sp2 és Jurkat sejtvonalat kezdetben 1:1 arányban elegyítettük egymással és szintén 14 órán át 0.05 mg/l koncentrációjú paclitaxelkezelésnek vetettük alá, majd a szerkimosását követően a sejteket továbbtenyésztettük. A két sejttípus mennyiségének követése céljából ismételt, fixálás nélküli flow cytometriás méréseket végeztünk a kezelés kezdetétől számított 36., 50. és 74. órában. Ismételt paclitaxelterápia hiányában az Sp2 sejtek gyorsan túlnőtték a Jurkat sejteket. A második kezelést „szuboptimális” esetben 22 órával az első végét követően végezve az Sp2/Jurkat sejtarány a második kezelés nélküli eredményeket közelítette. „Optimálisan”, 14 óra elteltével időzítve azonban az Sp2/Jurkat sejtarány az Sp2 sejtek gyorsabb osztódása ellenére az utánkövetési idő végéig szignifikánsan alacsonyabb maradt.

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, melynek 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 különböző osztódási kinetikával rendelkező sejtvonalak közt különbség tehető. Az Sp2 sejtvonalra optimalizált 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 hatékonyságának esetleges fokozásával kapcsolatban történtek. 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, illetve a módszerrel a DNS szintézis idejéről is nyerhető információ. (Bertuzzi et al. 1997; Riccardi et al. 1988) Biopsziás mintából vett sejtek sejtciklus-analízise DNS-festék és flow cytometria vagy mikroszkópia segítségével szintén lehetséges volna. Ugyanakkor noninvazív technikák, mint pl. MRI is használható lenne az osztódó sejtek arányának megítélésére. (Xu et al. 2011) Igaz, a felsorolt módszerek mindegyike rendelkezik limitációkkal. A BrdU esetleges mellékhatásairól, sejtciklus-karakterisztikát módosító tulajdonságairól az utóbbi évek kutatásai számoltak be. (Lehner et al. 2011) Emellett ahhoz, hogy a DNS-mennyiség analízise flow cytometriával kivitelezhető legyen, különálló tumorsejtek szuszpenzióját szükséges előállítani, amely bizonyos tumorszövetek esetében igen 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 közti 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. (Yano, Zhang, Miwa, et al. 2014) 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 sejt-szinkronizáció régóta ismert. A paclitaxelt eredményesen használták malignus sejtek szinkronizációjához, radioterápiára való

szinkronizáció céljából.(Wenz et al. 1999) Sőt, Wang és mtsai a paclitaxelkezelést megelőző sejtszinkronizáció hatásait is vizsgálták, kimutatva, hogy a szinkronizáció csökkenti a paclitaxelrezisztenciát sejt kultúrák modellen.(Wang et al. 2013) 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.(Weaver 2014; Rowinsky et al. 1999) A kísérleteinkben alkalmazott koncentráció tehát a terápiás tartomány alsó értékével hasonlítható össze. Az általunk választott sejt vonalak jól modellezhetik a gyorsan osztódó tumoros sejteket a lassabban osztódó, egészséges testi sejtek mellett. Léteznek azonban olyan daganatok, melyek populációs duplikációs ideje néhány naptól néhány hónapig is terjedhet, tehát növekedési ütemük igen eltérő lehet.(Rew & Wilson 2000) Ilyen esetben a páciens elméletileg hosszabb idő alatt is részesülhetne a terápiában, mely révén több malignus sejt lépne be, majd rekedne a sejtciklus G_2/M fázisában, azonban a hosszabb expozíció a nem-malignus sejtekben okozott citotoxikus károsodást is fokozná. Ez, a hagyományos daganatellenes kezeléseket érintő hátrány az időzített kezelési módszert 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 dózishoz képest. A kezelések másik nehezítő tényezője, hogy a daganatsejteknek gyakran jelentős hányada nyugvó állapotban (G_0 fázisban) van, ezáltal rezisztens a kemoterápiára és a szinkronizációra. Ennek kiküszöbölésére több, sikeresen alkalmazott módszert dolgoztak ki, melyek révén a nyugvó állapotban lévő sejtek a G_1 fázis restrikciós pontjának átlépésére bírhatók. (Yano et al. 2013; Yano, Li, Han, et al. 2014)

A módszer korlátozásai ellenére úgy gondoljuk, hogy az ismétlődő, időzített kezelési technika által nyújtott akár csak kismértékű javulás is hasznos volna az onkoterápiában, további vizsgálatok segítségével pedig több limitáció kiküszöbölhetővé válna. Növelhetné a módszer alkalmazhatóságát a paclitaxel egyéb szerekkel való kombinációja, 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.(Hoffman 2015) Alkalmazható volna tehát szinkronizáció céljára, szelektivitása

miatt valószínűleg kevesebb mellékhatás mellett. Ezáltal az említett lassan, illetve eltérő ütemben osztódó tumorok hosszabb szinkronizációs ideje kisebb problémát jelentene.

Összegezve, kísérleteink alapján adott sejttípus 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 sejtkultúrák modellben. Ezen túlmenően, megfelelően kiválasztott kezelési időpontok segítségével fokozni tudtuk a kezelés szelektivitását egy adott sejttípusra nézve, míg a másik sejtvonalat érintő, „kollaterális” károsodás csökkent.

Az O-glikoziláció változásai mitotikus HeLa sejtekben

Eredmények

1. Paclitaxelkezelést követő O-glikozilációs változások

Paclitaxellel végzett szinkronizációs kezeléseink során összehasonlítottuk HeLa sejtek O-glikozilációs mintázatát aszinkron szinkronizált sejtcsoportok esetén. Western blot módszert alkalmazva, a fehérjéket CTD110.6 anti-O-GlcNAc antitesttel jelölve a 4, illetve 8 órás paclitaxelkezelés befejeztekor egy enyhe O-glikoziláció-fokozódást tapasztaltunk.

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. Ezért a dupla timidin blokkal való szinkronizálást választottuk, mely során a G_1/S átmenet gátlása történik. (Pederson & Robbins 1971; Bostock et al. 1971) Ennek megfelelően, a módszert HeLa sejteken alkalmazva túlnyomórészt G_1 fázisú sejtpopulációt nyertünk. Eredményeink szerint a blokk feloldását követően, 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. 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 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.

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. 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, azonban a G₂/M – G₁ átmenetnek megfelelő időintervallum során az O-glikozilációt illetően lényegi változást ezzel a módszerrel nem tudtunk detektálni.

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. Ehhez a dupla timidin blokkot követő 9. és 13. óra között 25 perces időközökben mitotikus lerázással gyűjtöttük össze a lekerekedett sejteket. Az első 6 („M1”) és az utolsó 3 („M2”) frakciót pooloztuk, majd G₁, S és G₂ 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. A mitotikus, illetve a G₁ fázisú fehérjemintákat ebben a kísérleti beállításban összehasonlítva, mindkét ellenanyag által eltérést észleltünk a sejtek mintázatában. Az összességében emelkedett O-glikoziláció mellett az egyik legszembetűnőbb különbség egy 100 kDa magasságban megjelenő band volt a mitotikus sejtek esetében.

5. Az O-glikozilációs változások vizsgálata magpórusfehérjék immunprecipitációjával

A magpórusfehérjék (Nup, Nuclear pore protein) bár 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 ellenanyaggal. Eredményeink az irodalomnak megfelelően erős O-GlcNAc jelölődést mutattak a Nup fehérjéken. Emellett a mitózis során a teljes

sejtlizátumban észlelt, 100 kDa magasságában megjelenő O-glikozilációs mintázatbeli változás is fellelhető volt, melyet az a-Nup ellenanyag nem detektált.

6. Az O-glikozilációs változások detektálása immunfluoreszcenciával

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 O-GlcNAc ellenes RL2 antitesttel jelöltünk. Az eredmények számszerűsítése céljából az interfázisú és a mitotikus sejtek fluoreszcenciaintenzitását határoztuk meg. A mitózisban lévő sejteket Hoechst-féle nukleáris jelölés révén azonosítottuk. Az osztódó sejteket morfológiájuk alapján korai (pro- és metafázisú) és késői (ana- és telofázisú) mitotikus csoportokba soroltuk. Eredményeink a mitotikus sejtek esetében szignifikánsan magasabb fluoreszcencia-intenzitás értékeket mutattak, a késői mitózisban azonban jelentős csökkenést tapasztaltunk, melynek hátterében az osztódás során történő sejtméret-változások 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.

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. 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. A pontosabb vizualizáció céljából az vizsgálatokat ezután konfokális mikroszkópiával egészítettük ki, a kettős jelölés azonban ez esetben sem mutatott érdemi kolokalizációt a citoskeletális fehérjékkel.

Megbeszélés

Kutatásunk során egy olyan fehérjemódosulás sejtciklus alatt történő változásait kívántuk elemezni, melynek az osztódás szabályozásában betöltött szerepével számos tanulmány foglalkozik. HeLa sejtek globális O-glikozilációs szintjének és mintázatának változásait

detektáltuk 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 sejtglyűjtést tesz lehetővé.(Sakabe & Hart 2010) 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.(Slawson et al. 2010; Butkinaree et al. 2010)

A G₂/M átmenet szempontjából kulcsfontosságú B1 ciklin expressziójának csökkenését írta le Fardini és mtsai mind az OGA, mind az OGT gátlása esetén. Kimutatták tehát, hogy a sejtciklus megfelelő progressziójához mindkét enzim megfelelő működése, így az optimális O-glikozilációs státusz fenntartása elengedhetetlen.(Fardini et al. 2013).

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.(Dehennaut, Hanouille, et al. 2008; Dehennaut et al. 2007; Yang et al. 2012; Dehennaut, Slomianny, et al. 2008; Fardini et al. 2013; Tian et al. 2016) Ezt támasztja alá, hogy az OGT gátlása a G₂/M átmenet zavaraihoz vezet.(Dehennaut et al. 2007) Yang és mtsai azonban már az S fázisban elinduló, M fázisban tetőző O-glikoziláció fokozódásról számoltak be MEF és HEK293 sejteken végzett kutatásaik alapján.(Yang et al. 2012) 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.(Slawson et al. 2005; Sakabe & Hart 2010; Haltiwanger & Philipsberg 1997) Ezeknek az ellentmondó eredményeknek több tényező állhat a hátterében. Egyfelől az O-GlcNAc módosulás igen gyors, dinamikus természete, másik oldalról viszont a mitózisban lejátszódó, szintén rövid ideig zajló események, melyek akár kismértékben eltérő szinkronizációs, időzítési vagy mintavételezési módszerek esetén különböző eredményekhez vezethetnek.

Korábbi közlemények szerint az O-GlcNAc a mitózis során hatással van a citoskeletális fehérjékre. 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 sejten, mely nehezíti a kisebb mértékű morfológiai eltérések detektálását, illetve a konfokális mikroszkópia révén történő kolokalizációs vizsgálatot egyaránt. Valószínűbbnek tartjuk azonban az O-GlcNAc módosulás sejten belüli megoszlása alapján, hogy a mitózis során bekövetkező emelkedés kevésbé a citoskeletális átrendeződéshez, inkább egyéb sejten belüli mitotikus történéshez köthető.

Munkánk egyik limitáló tényezője az erősen O-glikozilált magpórusfehérjék jelenléte, (J A Hanover et al. 1987) melyek az interfázisú sejtek immunfluoreszcens analízisét torzíthatják. Mivel azonban a magpórusfehérjék a mitózis során nem degradálódnak, (Theisen et al. 2008; Chatel & Fahrenkrog 2011) 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 áll 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 sejt mintákban nem észleltünk. Azonosítható volt azonban a mitotikus, immunprecipitált fehérjék O-GlcNAc mintázatában a teljes lizátumban is detektált, 100 kDa magasságban elhelyezkedő band, mely anti-Nup antitesttel azonban nem mutatott jelölődést. Ezek alapján az adott O-GlcNAc jel feltehetően olyan fehérjéhez kapcsolódik, mely a MAb414 antitest által felismert Nup-fehérjék egyikéhez asszociálódik, így megjelent az immunprecipitációs mintákban.

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. (Dossus & Kaaks 2008) 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.(Fardini et al. 2013) 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. (Rozanski et al. 2012) 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.(Lefebvre 2016)

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. [Közlésre elfogadva] 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 oktatómunkám során kapott hasznos tanácsaikért, útmutatásukért.

Szívből köszönöm kollégáimnak, 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, melyet tudományos diákkörös éveim során kaptam.

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 lehetővé tette dolgozatom megírását. Nagyon köszönöm kislányom, Írisz megértő hozzáállását és szeretetét!