

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

AZ AMPK SZEREPE AZ EMLŐTUMOROK METABOLIKUS SZABÁLYOZÁSÁBAN ÉS A BÉZS ZSÍRSEJTEK DIFFERENCIÁCIÓJÁBAN

Fodor Tamás

Témavezető: Dr. Bay Péter



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2018

Az AMPK szerepe az emlőtumorok metabolikus szabályozásában és a bézs zsírsejtek differenciációjában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Fodor Tamás okleveles biológus/biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Bay Péter, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
tagok: Dr. Pankotai Tibor, PhD
Dr. Dóczy-Bodnár Andrea, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK,
Élettudományi Központ
3.009-3.010 (OVI-BMBI közös könyvtára)
2018. május 22. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Sebestyén Anna, PhD
Dr. Uray Iván Péter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
tagok: Dr. Dóczy-Bodnár Andrea, PhD
Dr. Pankotai Tibor, PhD

Dr. Sebestyén Anna, PhD
Dr. Uray Iván Péter, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme
2018. május 22. 11:00 óra

ELMÉLETI HÁTTÉR

Az élő szervezet a túlélés érdekében kénytelen alkalmazkodni az olyan különféle környezeti faktorokhoz, mint például a tápanyagok elérhetősége (pl.: tápanyag bőség, tápanyag hiány), vagy a külső hőmérsékleti változások. Ennek érdekében a sejtek olyan energia- és tápanyag érzékelő rendszerrel rendelkeznek, mely az anyagcsere finomhangolásában és a szervezet energia egyensúlyának fenntartásában segíti őket. Ezen érzékelő rendszer nem megfelelő működése olyan patológiás anyagcsere-adaptációhoz vezet, mely hozzájárulhat a karcinogenesishez és a rák előrehaladásához. Munkánk során mind a fiziológiai, mind a patológiai anyagcsere-adaptáció szabályozását egyaránt vizsgáltuk.

Az AMPK szerkezete

A szervezetet felépítő sejtek optimalizált energiaállapotának fenntartása elengedhetetlen a sejtek túlélése szempontjából. Ennek egyik feltétele az energiát biztosító ATP termelődésének és elhasználódásának kiegyensúlyozottsága. Az 5'-adenozin-monofoszfát aktivált protein kináz (AMPK) egy, a celluláris energiaállapotra rendkívül érzékeny energiaszenzor. Az ATP/AMP arány csökkenése aktiválhatja az AMPK-t az egymástól függő allosztérikus és poszt-transzlációs módosítások révén. Az AMPK egy heterotrimerikus enzimkomplex, amely az enzim aktivitásához szükséges katalitikus α , valamint a szabályozó β és γ alegységekből áll. Az α , β és γ alegységeknek különböző izoformái vannak, mint például $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$ és $\gamma 1$, $\gamma 2$ és $\gamma 3$. Emlősökben ezeket az izoformákat hét gén kódolja. A katalitikus α és a szabályozó β alegységeket két gén kódolja (PRKAA1, PRKAA2, és PRKAB1, PRKAB2) a szabályozó γ alegységet három gén kódolja (PRKAG1, PRKAG2 és PRKAG3). Az $\alpha 1$, $\beta 1$ és $\gamma 1$ (a közös izoformák) a legtöbb emlősejtben expresszálódnak. Az $\alpha 2$, $\beta 2$, $\gamma 2$ és $\gamma 3$ izoformák a szív és a vázizmokban fordulnak elő nagyobb mennyiségben.

A γ -alegység meghatározó szerepet játszik a citoplazmatikus AMP/ADP arány közvetlen érzékelésében és az AMPK enzimaktivitásának stimulálásában. A γ alegységnek négy cisztation-béta-szintáz (CBS) doménje van,

amelyek képessé teszik az AMPK-t az ATP/AMP arány változásának érzékeny detektálására.

Az AMPK aktiváció a magas AMP szinthez kötött, azaz a sejtek energetikai stresszének a következménye. Az ilyen módon aktivált AMPK bekapcsolja az ATP-termelő folyamatokat (máj zsírsav oxidáció, ketogenezis stimulálása, a vázizom zsírsav oxidáció és a glükóz felvétel stimulálása), miközben kikapcsolja az ATP-t fogyasztó folyamatokat (koleszterin szintézis, lipogenezis, triglicerid szintézis, lipolízis és lipogenezis gátlása, valamint a hasnyálmirigy- béta-sejtek inzulin kiválasztásának gátlása), hogy helyreállítsa a sejtek megfelelő energia szintjét.

Az AMPK AMP/ATP arány függvényében történő szabályozása

Egy energetikai szempontból nyugalmi állapotban lévő sejt ATP/ADP aránya 10: 1, az ATP/AMP aránya pedig 100: 1. Az energetikailag kedvezőtlen reakciók magas ATP/ADP arányt igényelnek. Az ATP-fogyasztás emelkedett szintje, amelyet az ATP termelés már nem képes fedezni, az ADP szint növekedéséhez vezet. Az ADP gyors ATP-vé és AMP-vá alakítását az adenilát kináz végzi az alábbi reakcióban:



Ez a reakció drámaian megnöveli az AMP szintjét, aminek következtében az AMPK aktivitása az 5-szörösére nő. Az AMPK aktiválása az AMP γ -alegységen való kötődése révén történik. A megnövekedett AMP-koncentráció az AMPK γ -alegységének konformációs változását eredményezi olyan módon, hogy egyszerre két AMP kapcsolódhat a négy cisztation-béta-szintáz doménekhez, ami Bateman-doménként is ismert. Ez a konformációs változás az AMPK-aktivitás mérsékelt növekedését eredményezi: 2-10-szeresére. Ez a konformációs változás fokozza az α -alegység foszforilációját a Thr172 oldalláncon, amely tovább aktiválja az AMPK-t, az enzim akár 100-szoros aktivációját eredményezve. Egy közelmúltban készült tanulmány azonban rámutatott arra, hogy az AMP és ATP mellett az ADP is képes az AMPK szabályozására.

Az AMPK szerepe az egészségben és a különböző betegségekben

Minden organizmus folyamatos energiaigénnyel szembesül élete során. Ezen stressz-tényezőkre reagálva a sejtek komplex anyagszere-folyamatokat fejlesztettek ki, hogy képesek legyenek az energia szubsztrátumok tárolására, amikor az élelmiszerforrás bőséges, és képesek legyenek csökkenteni az energiafogyasztást, valamint mozgósítani a készleteket, ha alacsony az energiaellátás. Ezek az energia kiegyenlítő folyamatok elengedhetetlenek mind a rövid távú, mind a tartós tápanyaghiányban.

Az AMPK egy jól ismert Ser / Thr kináz, amely kiemelkedő szerepet játszik az emlőssejtek energia egyensúlyának fenntartásában. Működését az ATP/AMP arány szabályozza. Az AMPK aktivációja több szerv és szövetfüggő hatást vált ki, közös bennük, hogy beindítják a cukor és a zsírsav oxidációt, hogy helyreállítsák a sejtek, szövetek ATP szintjét. Ezen védelmi mechanizmusok mellett az AMPK különböző szerepet tölt be nem csak a perifériás szövetek (pl. zsírszövet, máj, hasnyálmirigy- β -sejtek, vázizmok) metabolizmusának szabályozásában, de mindemellett a központi idegrendszer (hipotalamusz) energiaérzékelésének, és ebből következően az egész test energia háztartásának finomhangolásában is. Fontos megemlíteni, hogy az AMPK a leggyakoribb krónikus betegségekben, például a rákban, a cukorbetegségben, a gyulladásban és az elhízásban is alulszabályozott. Ebből kifolyólag az AMPK a fent említett betegségek egyik lehetséges terápiás célpontjává vált.

AMPK aktivátorok

Az AMPK energiaszenzorként viselkedik az ATP/AMP arány érzékelésében. Megváltozott élettani körülmények között, mint a metabolikus vagy energetikai krízis, ahol az ATP szint veszélyeztetett, például hipoxia, iszkémia, alacsony tápanyag ellátottság vagy emelkedett ATP-fogyás esetén az AMPK aktiváció célja, hogy visszaállítsa a sejtek energia egyensúlyát. Következésképpen az AMPK-aktiválás katabolikus folyamatokat indít be ATP-termelés céljából, és elnyomja az ATP-fogyasztó folyamatokat, amelyek nem szükségesek a sejtek

pillanatnyi túléléséhez. Számos természetes gyógyszer, növényi vegyület, több hormon, és mesterséges gyógyszer is képes aktiválni az AMPK-t. Hatásmechanizmusuk alapján négy csoportot különböztetünk meg. Az első csoportba tartoznak azok az aktivátorok, amelyek közvetlenül a mitokondriális ATP szintézis gátlásán keresztül hatnak, például gátolva a Complex I-et (pl.: metformin, vagy phenformin), a Complex III-at (pl.: antimicin A), vagy gátolják a mitokondriális F1 ATP-szintáz a légzési láncban (pl.: oligomycin). Ezek a vegyületek képesek megnövelni a sejtes ADP/ATP és ATP/AMP arányait, viszont ezen arányok és az AMPK-aktivitás változásai közötti összefüggések még nem bizonyítják, hogy az AMP és ADP által okozott AMPK-aktiváció lenne az egyetlen aktivációs mechanizmus. A második csoportba tartoznak azok az aktivátorok, amelyek előanyagokként a sejten belül konvertálódnak AMPK analógokká, mint például az 5-aminoimidazole-4-carboxiamide ribozid (AICAR) is. Kísérleteinkben az AICAR-t alkalmazzuk az AMPK aktiválása céljából. Az AICAR adenzin transzportereken keresztül jut be a sejtbe és az intracelluláris adenzin kináz foszforilálja 5-aminoimidazol-4-karboxiamid -D-ribofuranozil-5'-monofoszfáttá (ZMP). A ZMP egy AMP analóg vegyület, ami az AMPK AMP kötő helyéhez képes kapcsolódni és hasonló hatást vált ki, mint az AMP. A harmadik csoportba tartoznak azok az aktivátorok, amelyek közvetlenül képesek kötődni az AMPK-hoz, az AMP kötőhelytől függetlenül. Ezek természetes vegyületek, mint például az aszpirin metabolitja, a szalicilát. A negyedik csoportba az antifolát-gyógyszerek tartoznak, amelyek képesek az AMPK-t aktiválni a ZMP felhalmozódásán keresztül. Egy tanulmány rámutatott arra, hogy az antimetabolit metotrexát, amit a vizsgálatunk során az AICAR-ral együtt alkalmazzunk, drasztikusan érzékennyé teszi a sejteket az AICAR aktiváló hatásával szemben, továbbá figyelemre méltó additív hatást mutatott kombinációban alkalmazva. Ezen kívül léteznek még olyan fiziológiás hormonok is, amelyek hasonló AMPK aktiváló hatással rendelkeznek, mint a korábban felsorolt gyógyszerek. Az egyik ilyen hormon a leptin, amelyet az adipociták inzulin jelenlétében választanak ki. A leptin is képes szabályozni az energiaegyensúlyt a jóllakottság érzésének kiváltásával. A perifériás szövetekben, mint például a

vázizomban a leptin közvetlenül képes aktiválni az AMPK-t az AMP/ATP arány stimulálásával.

Az AMPK szerepe a Warburg metabolizmusban

Otto Warburg felismerte, hogy a rákos sejtek metabolizmusa eltér a normál, nem transzformált sejtektől. Azt feltételezte, hogy a rák esszenciális oka az újraprogramozott anyagcsere folyamatokban keresendő. A Warburg-hatás a legtöbb rákos sejtből azonosítható. Többek között az emlőrákban is, amely aerob körülmények között is előnyben részesíti a glikolízist a fokozott energiatermelés érdekében és mindeközben laktátot termel a citoszolban. Ezek a sejtek, a gyors sejtprolifерáció elősegítése érdekében általában alulszabályozott mitokondriális oxidációval és emelkedett glikolitikus rátával és pentóz-foszfát-transzformációval jellemezhetők. A rákos sejtek kiemelkedően magas, külső forrásból származó glükózt és glutamint, valamint a belső forrásból származó glikogént használnak fel szubsztrátként, de mindezek közül a glükóz glikolízisen keresztül történő lebontása a fő ATP forrás. Mindazonáltal a megnövekedett glikolitikus ráta növelheti a pentóz-foszfát-út vonal sebességét, amely fokozza a *de novo* nukleotid szintézist.

A citoszolban a glikolízis a pentóz-foszfát-shunt számára biztosít intermediereket a nukleotid termelés támogatására. Mindeközben a mitokondriumban a TCA ciklus alternatív enzimek segítségével glutamint használ a citrát termeléshez, amely tovább stimulálja az ellenőrizetlen sejtprolifерációt. A tumor sejtekben az anyagcsere utak újraprogramozása növeli az aerob glikolízis sebességét, továbbá szétkapcsolja glikolízist és a TCA ciklust. Kísérleteink során gátolni próbáltuk a nukleotid szintézist a folát analóg metotrexáttal (MTX) és aktiválni próbáltuk az AMPK-t AICAR-ral. Ami a gyors sejtosztódást illeti, fontos kihangsúlyozni, hogy a G1/S ellenőrző pont metabolikus kontroll alatt áll. Bármilyen beavatkozás az anyagcserébe a sejtciklus G1-S átmenet leállítását eredményezheti. Az AMPK bonyolult kapcsolatokat mutat más anyagcsere- és energiaérzékelő útvonalakkal, mint például az Akt, mTOR, Sirt1, és a PARP-ok. Fontos megjegyezni, hogy az AMPK-aktiváció során a mitokondriális oxidáció, és következésképpen a

mitokondriális biogenezis fokozódik, ami összefüggésbe hozható a lymphomák elleni anti-Warburg és antiproliferatív hatásokkal. Annak érdekében, hogy felderítsük az AMPK lehetséges szerepét a Warburg-metabolizmus megfordításában és antiproliferatív hatásának vizsgálatára, az AMPK farmakológiai aktivátorát az AICAR és a folátfüggő 1-szén metabolizmus analóg MTX használtuk.

Vizsgálatunkban *in vitro* modellként MCF7 emlőtumor sejteket használtunk. Az emlőrák a leggyakoribb daganat a nők körében világszerte. Közel 1,7 millió új esetet diagnosztizáltak 2012-ben. Ez az összes új rákos megbetegedések 12% -át, és a nők összes rákos megbetegedésének 25%-át jelenti. A kiterjedt megelőzési programok ellenére még mindig az ötödik leggyakoribb halálozási ok a nők rákos megbetegedéseiben. Az emlőtumor sejtek a Warburg metabolizmussal jellemezhetőek. Fontos megemlíteni, hogy voltak próbálkozások az anyagcsere folyamatok megfordítására, hogy a kemoterápiás kezelések hatékonyságát ilyen módon is támogassák. A MTX gátolhatja a *de novo* nukleotid szintézist, gátolva a folátfüggő C1 töredék metabolizmust. A metotrexát a DNS és az RNS szintézis során specifikusan hat, ezért citotoxikus hatású a sejtciklus S-fázisára nézve. Az emlőrák kemoterápiás kezelés során a metotrexátot ciklofoszfamiddal és 5-fluor-uracillel együtt alkalmazzák, amelyet CMF protokollnak is neveznek. A Warburg-anyagcsere nyilvánvaló szerepe az emlőrákban arra enged következtetni, hogy az AMPK-indukcióval szembeni anti-Warburg metabolikus átrendeződések antiproliferatív hatással járhatnak, és esetleg szinergikusan hathatnak a metotrexáttal.

Az AMPK szerepe a bézs adipocita fiziológiájában

Az élő organizmusok energiaháztartását az energiabevitel és az energiafogyasztás határozza meg. Az energiaegyensúly bármely akut vagy hosszú távú zavara krónikus anyagcsere-betegséghez vezet. Az energiaeeloszlás függ az aktív biokémiai folyamatok (például foszforiláció-defoszforiláció), a testmozgás és a mitokondriális oxidatív foszforiláció (például a szív- és vázizmok vagy a barna zsírszövetek) által termelt energiától.

A zsírszövet alapvető szerepet játszik a szervezet energia egyensúlyának fenntartásában. Háromféle zsírszövetet különíthetünk el: fehér zsírszövet, barna zsírszövet, és a bézs zsírszövet (barna és fehér fuzionált változata). Az emlősökben a fehér zsírszövet az energiatárolásra specializálódott. A barna és a bézs adipociták hasonló funkciókat mutatnak rágcsálókban és emlősökben. Mindkettő termogén tulajdonsággal rendelkezik, amely során lebontják a glükózt és a zsírt, és mindeközben hőt termelnek. Mindez az úgynevezett uncoupling protein-1 (UCP1) aktiválásán keresztül történik, amely meggátolja a mitokondriális ATP szintézist. Az adrenerg tónus erősödése megemeli a bézs adipocitákban a lipolízist, a mitokondriális oxidációt, a mitokondriális biogenezist és a kreatin-foszfát-ciklust. Számos tényező képes bézs differenciálódást és barnulást kiváltani a zsírszövetben. Ilyen például a környezeti stressz, a hormonok és a gyulladás. Funkcionálisan aktív és transzplantálódó bézs sejteket találtak már emberekben, továbbá ismert, hogy a bézs adipociták közel azonos arányban vannak jelen a hőtermelésnél, mint például vázizom. Az olyan hormonok, mint az irizin, a BMP4, az FGF21, a GLP-1, az NRG4 az AgRP neuronok és a szerotoninerg rendszer segítségével stimulálhatják a bézs zsírsejtek differenciálódást és a barnulást. Fontos megjegyezni, hogy a fibrátok vagy a tiazolidindion szintén barnulást indukálhatnak. A bézs adipociták indukciójában a sirtuin 1 (Sirt1) aktiváció és az ebből következő PPAR γ deacetiláció központi szerepet játszik. Ezek a folyamatok vezetnek a mitokondriális oxidáció és a mitokondriális biogenezis emelkedéséhez. Az AMPK nem csak a Sirt1 upstream szabályozója és az energiaegyensúly fő irányítója, hanem szerepet játszik a barna zsírszövet differenciálódásában is a mitokondriális oxidáció és a mitokondriális biogenezis indukálásán keresztül. Ezért nagyon valószínű, hogy az AMPK is befolyásolhatja a bézs zsírszövet differenciálódását. Tanulmányunkban humán perikardiális zsírszövetből származó mesenchymális őssejteket (hADMSCs) differenciáltattunk és vizsgáltuk az AICAR aktivált AMPK hatását a szöveti differenciációban.

CÉLKITŰZÉSEK

Az AMPK az energetikai stresszhez való alkalmazkodás központi szereplője. Szerettük volna kibővíteni az ismereteinket azáltal, hogy megvizsgáltuk az AMPK szerepét a Warburg anyagszere megfordításában és szerettük volna jobban megérteni annak szerepét a bézs adipocita differenciálódásban.

A következő kérdések megválaszolását terveztük:

- Melyek az AICAR és a metotrexát (MTX) együttes alkalmazásának főbb metabolikus hatásai?
- Milyen molekuláris szereplői vannak az AICAR és az MTX együttes alkalmazása által okozott anyagszere-átrendeződéseknek?
- Az AICAR és a metotrexát együttes alkalmazása hatással van-e a sejtprolifерációra?
- Mi az AMPK szerepe a humán zsírszövetből származó mesenchymális őssejtek bézs adipocitákká történő differenciációja során?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtek tenyésztése

Az egér emlőtumor (4T1), a humán emlő adenokarcinóma (MCF-7) és a humán emlőtumor sejteket (SKBR-3) MEM sejtenyészítő oldatban növesztettük 2 mM L-glutamin, 10% hőinaktivált FBS és 1% Penicillin/Streptomycin mellett. A human perikardiális zsírszövetből izolált mesenchymális őssejteket (hADMSCs) 10% hőinaktivált FBS tartalmú DMEM-F12 sejtenyészítő oldatban tenyésztettük. Mindhárom sejtvonal tenyésztése 37 °C-os inkubátorban történt 5% CO₂ és 95% levegő vízgőzzel telített keverékében 60-90%-os konfluens kultúrákban.

AICAR és MTX kezelések

A sejteket az AMPK aktivátor 5'-amino-imidazol-4-karboxamid-ribonukleotid (AICAR) és az antimetabolit metotrexát (MTX) farmakológiai aktivátorával kezeltük. 10uM MTX és 100uM AICAR és ezek 10uM MTX + 100uM AICAR kombinációját alkalmaztuk a későbbi kísérletekben. A kontroll mintákban PBS-t használunk hordozóanyagként. A sejteket a korábban leírt gyógyszerekkel kezeltük 1 és 6 napig.

Kaspáz aktivitás mérés

A kaspáz-3 aktivitást a fluorogén tetrapeptid-amino-4-metil-kumarin konjugátum (DEVD-AMC) hasításával határoztuk meg. Az MCF7 sejteket 6 lyukú lemezen (10 000 sejt / lyuk) tenyésztettük. A sejteket egy és hat napon keresztül 100 µM 5-amino-imidazol-4-karboxamid-1-β-D-ribofuranoziddal (AICAR) és 10 µM metotrexáttal (MTX) kezeltük. A kezelést követően a sejteket összegyűjtöttük és újrasszuszpendáltuk lízis pufferben (10 mM HEPES, 0,1 M CHAPS, 5 mM DTT, 2 mM EDTA, 10 µg / ml aprotinin, 20 pg / ml leupeptin, 10 pg / ml pepstatin A, 1 mM PMSF, pH 7,25). A sejtlizátumokat és szubsztrátokat (50 µM) kaspáz reakció pufferben (100 mM HEPES, 10% szacharóz, 5 mM DTT, 0,1% CHAPS, pH 7,25) 37 °C-on triplikátumokban elegyítettük. A felszabadult AMC fluoreszcenciáját

fluoriméterrel (Thermo Labsystems Multiskan MS) határoztuk meg 380 nm gerjesztési hullámhosszon és 460 nm hullámhosszon.

Sejtciklus analízis

Az MCF7 sejteket 6 lyukú lemezen (10 000 sejt / lyuk) tenyésztettük. A sejteket egy és hat napon keresztül 100 μ M 5-amino-imidazol-4-karboxamid-1- β -D-ribofuranoziddal (AICAR) és 10 μ M metotrexáttal (MTX) kezeltük. A kezelés után a sejteket hideg 70%-os etanolban fixáltuk, és 50 μ g/ml propidium-jodiddal fluoreszcensen jelöltük. Fluoreszcensen aktivált áramlási citometriával (FACS) FACS Calibur készüléken mértünk 535 nm gerjesztési hullámhosszon és 617 nm hullámhosszon (Beckton Dickinson, Mountain View, CA.).

Konstruktok és transzfekció

A sejtek csendesítésének vizsgálatához a pSuper RNSi rendszert használtuk. Az shRNS expresszálo konstruktt készítéséhez egy kettős szálú DNS oligonukleotidot klónoztunk pSuper vektorba. Az oligonukleotidokat (amelyek tartalmazzák a siRNS-szekvenciát) annealing pufferben (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Hepes, pH = 8,0) hőkezeltük. A kapott duplexek BglIII és HindIII hasító helyeket hordozták. Az emlős expressziós vektorokat (siPGC1 α 1, siPGC1 α 2, siPGC1 β , FOXO1, AMPK α 1) naponta transzfektáltuk MCF7 sejtekbe a hatnapos kezelés ideje alatt polietilén-imin (PEI) transzfekciós reagens segítségével. Utána RT-PCR segítségével mértük a gének expresszióját.

Az emberi zsírszövetből származó mesenchymális őssejtek izolálása, tenyésztése és differenciálása (hADMSCs)

A szövetmintákat a szívűtét napján összegyűjtöttük és feldolgoztuk. A zsírszövetet és a maradék szöveteket PBS-ben 120 U/ml kollagenázzal 1 órán át 37 °C-on emésztettük enyhe keverés mellett. Az elválasztott szövetet 100 μ M pórusméretű szitán átszűrtük, hogy eltávolítsuk a felesleges szövetrészeket. A sejtszuspenziót 10 percig 1300 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk, és a sztrómális sejtek (hADMSC-ek) pelletét 10% FBS-t (Gibco) tartalmazó DMEM-F12

táptalajban szuszpendáltuk és a megfelelő lemezre oltottuk. Miután a sejtek konfluenssé váltak megkezdjük a differenciálást. Fischer-Posovszky és munkatársai protokollját használtuk a fehér zsírsejtek differenciálására, Elabd és munkatársai protokollját a barna zsírsejtek differenciálására. Az AMPK aktivációhoz 100 μ M AICAR-t használtunk a fehérzsírsejtek differenciációs közegéhez adva. A differenciálódás során FBS-mentes táptalajt használtunk. A sejteket 14 napig differenciáltattuk.

Szulforodamin B teszt

A sejteket 96 lyukú lemezen (3000-5000 sejt/lyuk) tenyésztettük. A sejteket vehikulum jelenlétében tenyésztettük, 100 μ M AICAR, 10 μ M MTX és AICAR+MTX kombinációjával kezeltük egy, kettő, három és hat napon keresztül (MCF-7 sejtek - 6 napig, SKBR-3 sejtek - 3 napig, 4T1 sejtek - 2 napig, SAOS sejtek - 6 napig, WM35-6 napig). A kezelés végén, 50% triklór-ecetsavval (TCA) rögzítettük a sejteket, utána 0,4%-os szulforodamin B (SRB) oldattal festettük. A sejtekről a nem kötődött festéket 1%-os ecetsavval mostuk le. A festéket 10 mM TRIS bázissal oldottuk fel. Az abszorbanciát egy automata lemezleolvasón (Thermo Labsystems Multiskan MS) 540 nm-en detektáltuk.

A mitokondriális membránpotenciál mérése

A mitokondriális membránpotenciált DioC6 (3,3-dihexil-oxa-karbo-cin-jodid) festéssel határoztuk meg. A sejteket 96 lyukú lemezen (25 000 sejt/lyuk) tenyésztettük. Az egy és hat napos AICAR+MTX kezelés után a sejteket tripszin/EDTA oldat segítségével összegyűjtöttük, és a detektált sejteket 40 nM DioC6-tal festettük 30 percig, majd PBS oldattal mostuk. A sejteket áramlási citometria analízisnek vetettük alá (FACSCalibur, BD Biosciences). Minden mérési pontot három párhuzamosban megismételtünk. A kontroll sejteket 10 μ M karbonil-cianid-4-(trifluor-metoxi)-fenil-hidrazonnal (FCCP) kezeltük. Az FCCP-vel kezelt sejtek mért értékeit kivontuk minden csoportból. Az FCCP-vel korrigált értékeket használtuk statisztikai elemzésre és ezeket az eredményeket ábrázoltuk.

Szuperoxid termelés mérése

A szuperoxidot hidroetidin (HE) festéssel határoztuk meg. A sejteket a mitokondriális membránpotenciál méréséhez hasonlóan állítottuk elő, és 2 mM HE-el 30 percig festettük. A fluoreszcenciát áramlási citometriával (FACSCalibur, BD Biosciences) elemeztük. A szuperoxid termelést az egyes mintákban a HE fluoreszcencia átlagaként jelöltük. Minden egyes mérési pontot három párhuzamos ismételtsben megismételtünk.

Oxigénfogyás mérése

Az oxigénfogyasztást XF96-oximéterrel (Seahorse Biosciences, North Billerica, MA, USA) mértük. A sejteket 96 lyukú XF 96 vizsgálati lemezekben (~2000 sejt/lyuk) tenyésztettük, és AICAR, MTX és AICAR+MTX kombinációjával kezeltük. A kezelést követő 30 percenként feljegyeztük az oxigénfogyasztási sebességet (OCR, a mitokondriális oxidációt írja le), a pH-változásokat és az extracelluláris savasodási arányt (ECAR, a glikolízist írja le). A sejteket etomoxirral (50 μ M), majd oligomycinnel (10 μ M) és végül antimycinnel (10 μ M) kezeltük. Az adatokat a fehérjetartalomra normalizálva ábrázoltuk. Az adipociták esetében a sejteket a 96 lyukú XF96 well vizsgálati lemezekben tenyésztettük és differenciáltattuk. A differenciálódás után a kiindulási oxigénfogyasztást megmértük, majd a sejtekhez adrenerg stimulációt indukáló dibutiril-cAMP-t (500 μ M végkoncentrációjú) adtunk. Ezután az oxigénfogyasztást 30 percenként rögzítettük. A legutolsó leolvasás a kezelés utáni 7. órában történt. Végül antimycin A-t (10 μ M) adtunk a sejteknek az alapvonal korrekcióhoz. Mindkét esetben az adatokat normalizáltuk a fehérjetartalomra, és normalizált értékeket ábrázoltuk.

RNS izolálás, reverz transzkripció és RT-qPCR

A sejtekből totál RNS-t izoláltunk TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, Amerikai Egyesült Államok) reagens alkalmazásával, követve a gyártó utasításait. Az RNS 2 μ g-ját használtuk fel reverz transzkripcióhoz (RT). Tízezerszeresére hígított cDNS mintákat használtunk a valós idejű kvantitatív PCR (qPCR) reakcióhoz, melyhez qPCR Supermixet (qPCRBIO SyGreen Mix, Nucleotest Bio Kft.,

Magyarország) és a vizsgálni kívánt gének primerjeit használtuk, kivéve a TBX1-et, ahol a primert és próbákat az Applied Biosystems (Taqman Hs00271949_m1, Applied Biosystem) tervezte és szolgáltatta. Az RT-qPCR-t Light-Cycler 480 II készüléken (Roche Applied Science, Penzberg, Németország) végeztük. A génexpresszió normalizálása három kontroll gén (β -aktin, ciklofillin, 36B4 és/vagy GAPDH) geometriai átlagára történt.

Fehérje extrakció és Western blot

A MCF7 és hADMSC sejtek lizálása RIPA puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10% SDS, 1% Nonidet P-40, 1 mM Na_3VO_3 , and 1 mM NaF, 0, 5% nátrium-deoxikolat, 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid, proteáz inhibitor-keverék, pH 8,0) alkalmazásával történt. A kapott fehérjék molekulatömeg szerinti szétválasztását 8%-os SDS-PAGE-sel végeztük, amiről a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltunk a blottolás során. A megfelelő antitestekkel jelölt membránokon Fluorchem FC2 Imager készülékkel detektáltuk a kemilumineszcens jelet. A denzitometráltást Image J szoftver alkalmazásával végeztük.

Adatbázis-elemzés

Az AMPK α 1, FOXO1 és PGC1 α expresszió emlőrákra gyakorolt hatását a túlélésben a Kaplan-Meier plotter adatbázis (<http://kmplot.com/analysis/>) segítségével értékeltük, beleértve azokat a betegeket is, akiknél az ER státusz a génexpressziós adatokból származott. A teljes túlélést elemeztük.

Statisztikai analízis

A statisztikai szignifikanciát két csoport között – kezelt és kontroll csoport – Student *t*-tesztel határoztuk meg. 2-nél több csoport esetén egy utas ANOVA vagy általános lineáris modell (GLM) alkalmazásával végeztük. A hibasávok a $\pm$ középérték hibáját mutatják meg (SE). *, ** és *** a szignifikáns különbségeket ábrázolják a kontroll és a kezelt csoportok között, ahol $p < 0.05$, $p < 0.01$ vagy $p < 0.001$, a jelzéseknek megfelelően.

EREDMÉNYEK

Az AMPK szerepe a Warburg metabolizmusban

Az AICAR és MTX kombinációja gátolja az MCF-7 sejtproliferációt és csökkenti a proliferáció sebességét

Első lépésként meghatároztuk az MCF7 sejtek érzékenységét az AICAR és MTX anyagokra. A sejteket külön-külön (3-300 μM) MTX-al vagy (100-1000 μM) AICAR-al kezeltük és vizsgáltuk a két szer hatását kombinációban is. A sejtproliferációt inverz mikroszkóppal becsültük meg és SRB vizsgálattal az első és hatodik napon mértük az összes fehérje mennyiségét, amely megfelel a sejtszámnak. Amikor a sejteket MTX-al vagy AICAR-al külön-külön kezeltük, nem észleltük az összfehérje tartalom csökkenését, azonban az AICAR és az MTX kombinációja az összes fehérje jelentős csökkenését eredményezte. A 6. napon a 10 μM MTX + 100 μM AICAR kombinációja a sejtszám 50%-os csökkenését eredményezte. Következő lépésként időfüggés kísérletet végeztünk. Az AICAR+MTX kombináció alkalmazása a kezelés harmadik napján kezdett hatékonyá válni, és a hatodik napon bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. A biokémiai változások dinamikájának mérésére egy korai időpontban (egy nappal a kezelést követően) és egy késői időpontban (6 nappal a kezelést követően) végeztünk méréseket.

Az AICAR+MTX kezelés hatására bekövetkezett összfehérje mennyiség csökkenés feltételezhető okának a szintetikus letalitást gondoltuk. Fontos megjegyezni, hogy a PI pozitív sejtekben nem észleltünk szignifikáns növekedést, sem az 1. napon, sem a 6. napon. A kaszpáz aktivitás mérés nem mutatott változást. Ezek az eredmények azt sugallták, hogy a csökkent összfehérje mennyisége nem apoptózisra, hanem inkább a proliferáció lassulására utal.

Az AICAR és az MTX együttes alkalmazása indukálja az AMPK-t és megfordítja a Warburg anyagcserét

Az acetyl-CoA karboxiláz (pACC) foszforilációjának monitorozásával vizsgáltuk, hogy az AICAR valóban aktiválja-e az AMPK-t. A proliferációs vizsgálatokhoz hasonlóan az 1. napnál az AICAR önmagában nem indukálta az

AMPK-t, csak MTX-al kombinálva. Hosszan tartó kezelés esetén, a 6. napon a MTX, az AICAR és AICAR+MTX kombinációja erősen indukálta az AMPK-t. Az AMPK aktivációt a mitokondriális aktivációra átvezetve azt tapasztaltuk, hogy a DioC6 fluoreszcencia magasabb volt, amely mitokondriális membránpotenciál emelkedésére utal. Kutatásunkat a főbb anyagcsere szabályozó és effektor gének expressziójának mérésével folytattuk. Az 1. napon megfigyeltük az AICAR+MTX kezelés során a peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma-koaktivátor (PGC) -1 α és a forkhead transzkripciós faktor-1 (FOXO1) indukcióját. Ezzel összhangban az ATP5g1, az ATP-szintáz és az izocitrát-dehidrogenáz-2 (IDH2) valamint a trikarbonsav ciklus (TCA) markerei enyhén indukálódtak. A fumaráz és akonitáz (ACO2) gének expressziója is emelkedett. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a PGC1 α és FOXO1 magasabb génexpressziója a mitokondriális tevékenységek támogatására fordítódnak. A PGC1 α és FOXO1 expressziója tovább fokozódott a 6. napon az AICAR és MTX kezelés hatására, továbbá a PGC1 β (egy másik kulcsfontosságú mitokondriális regulátor gén) expressziója is megemelkedett. A 6. napon az AICAR+MTX-al kezelt sejtekben az ATP5g1 és az IDH2 expressziója fokozódott, valamint a TCA ciklus enzimeit, a fumaráz és akonitáz (ACO2) is magasabb expressziós szintet mutattak. Az anti-Warburg anyagcsere átrendeződés a glikolízis csökkenéséhez vezet, ezért a glikolízis és a mitokondriális oxigénfogyasztás sebességét a Seahorse XF96 készülék segítségével próbáltuk összehasonlítani. Meglepő módon az AICAR+MTX-al kezelt sejtekben az első napon a glikolízis indukálódott, amelyet az oxigénfogyasztási arány (OCR) / extra celluláris savasodás (ECAR) arányának csökkenése is igazolt. Ezzel szemben a 6. napon az AICAR+MTX kezelés hatására megnövekedett OCR / ECAR arányt detektáltunk, ami növekedett mitokondriális aktivitásra és a sejtek alacsonyabb, a glikolízis irányába történő elköteleződésére utalt. Megállapítottuk, hogy az MCF-7 sejtek AICAR+MTX-al történő kezelése a korai időpontban (az 1. napon) mérsékelten indukálja a mitokondriális metabolizmust, de ellenben támogatja a glikolízist - paradox módon, ami pro-Warburg változásokat eredményezett. Azonban ha a sejteket hosszabb ideig (6. nap) kezeljük az AICAR+MTX kombinációjával, az

nagymértékben indukálja a mitokondriális oxidációt és elnyomja a glikolízist, ami az igazi Warburg-ellenes változásokat eredményezi.

Az AICAR+MTX kezelés a sejtciklus G1/S és G2/M blokkjához vezet

A szintetikus letalitást arra vezettük vissza, hogy az AICAR és MTX kombinációja anti-Warburg szerként hat. A szerkombinációk a mitokondriális aktivitást fokozták, valamint a sejtciklus egyes fázisainak az arányát felborították, a sejtek felgyűltek a G1 és G2 fázisban. Ebből arra következtettünk, hogy a G1/S és a G2/M átmenetnél blokkolva van a sejtciklus.

A rövid távú AICAR+MTX kezelés (1. nap) csökkentette az S fázisban a sejtek számát, és enyhén emelte a sejtek számát a G2-ben. Amikor megvizsgáltuk a különböző sejtciklusos fázisok közötti arányokat, nyilvánvaló volt, hogy a G1/S és G2/S arányok növekedtek, míg a G1/G2 arány állandó maradt, ami a G2/M és valószínűleg a G1/S blokkra utal. Az elhúzódó AICAR+MTX kezelés (6. nap) hasonló változásokat mutatott. A G2 sejtek számának növekedése csökkentette az S-fázisú sejtek számát, és a G1 és G2 sejtek arányainak növekedése összehasonlítva az S fázis sejteinek számával a G1/S és G2/M átmenetek blokkját feltételezték a sejtciklusban. Ez utóbbit áramlási citometriával, propidium jodid festés alkalmazásával igazoltuk.

Az SKBR-3 és 4T1 sejtek AICAR és MTX kombinációjával történő kezelése additív módon csökkenti a sejtproliferáció sebességét

Korábbi eredményeinket két másik sejtvonalon is ellenőriztük. Ezek a humán SKBR-3 és az egér 4T1 sejtek voltak. Az SKBR-3 sejtek hasonlóan az MCF7 sejtekhez külön-külön alkalmazva nem voltak érzékenyek az AICAR és MTX kezelésre. Az AICAR+MTX kombinációja lelassította a sejtproliferációt és ezzel párhuzamosan számos mitokondriális marker gén (FOXO1, PGC1 α , PGC1 β , fumaráz, IDH2 és ACO2) expressziós szintje emelkedett, akárcsak az MCF7 sejtek esetében. A 4T1 sejtek nagyon érzékenyek voltak a MTX koncentrációra. Összehasonlítva az MCF7 és SKBR-3 sejtek érzékenységeivel a különbség kb. 1000-szeres volt. A 4T1 sejtek esetében már nagyon kicsi mennyiségű MTX is

antiproliferatív hatást váltott ki. Az érzékenység ellenére enyhe antiploriferatív hatás emelkedést detektáltunk a sejteken, amikor 300 μ M AICAR + 7.8 nM MTX, vagy 300 μ M AICAR + 15.6 nM MTX kombinációkat alkalmaztunk, összehasonlítva a szerek hatását külön-külön alkalmazva is. Az SKBR-3 sejteket 300 μ M AICAR + 7,8 nM MTX kombinációban kezelve a FOXO1, az ATP5g1, a fumaráz és az IDH2 expresszióját kismértékben indukálta hasonlóan az MCF7 sejtekhez. Megállapítottuk, hogy az AICAR+MTX kezelés additív hatása nem specifikus az MCF-7 sejtekre, de hasonló hatást képes kiváltani más emlőrákos sejtvonalakban is. Az AICAR+MTX kezelés specifikusságának meghatározására két másik sejtvonalat is teszteltünk. Ezek a melanoma sejtvonal (WM35), illetve az osteosarcoma modellje (SAOS) voltak. Egyik sejtvonal sem volt érzékeny a MTX+AICAR kombinációra (ezeket az adatokat nem mutatjuk be). Az AICAR+MTX kezelés gátló tulajdonságai megfordíthatóak voltak a mitokondriális transzkripciós faktorok csendesítésével. Az AICAR+MTX kezelés anti-Warburg anyagcsere-változásokat eredményezett, és a G1/S és G2/M átmenetekenél megállította a sejtciklust.

A PGC1 α , PGC1 β és FOXO1 fokozott expressziója korrelál a fokozott mitokondriális aktivitással és a proliferáció lelassulásával. Ez arra enged következtetni, hogy ezek a fehérjék központi szerepet játszanak az AICAR+MTX kezelés által kiváltott antiproliferatív hatásmechanizmusban. Különböző shRNS expresszálo konstrukciókat készítettünk, megcélozva az említett fehérjéket annak érdekében, hogy felmérjük azok lehetséges szerepét. Mind a rövid (1. nap), mind a hosszú távú (6. nap) csendesítés (minden nap transzfekciót végeztünk) hatékonyan csökkentette a cél-mRNS expresszióját. Amikor ezeket a konstruktokat MCF-7 sejtekbe transzfektáltuk, a sejtek proliferációja megduplázódott. Ezen kívül a 6 napos AICAR+MTX kezelés után a csökkent sejtproliferáció megszűnt.

Az AMPK α 1 és a FOXO1 expressziója pozitívan korrelál a túléléssel az emlőrákban

Az AMPK α 1, FOXO1 és PGC1 α expresszió emlőrákra gyakorolt hatását a túlélésben a Kaplan-Meier plotter adatbázis (<http://kmplot.com/analysis/>)

segítségével elemeztük, beleértve azokat a betegeket is, akiknél az ER státusz a génexpressziós adatokból származott. A teljes túlélést elemeztük. A legkisebb és a legmagasabb expressziós kvartilis összehasonlításakor az AMPK α 1 és FOXO1 magas expressziója szignifikánsan hosszabb túlélést eredményezett. A PGC1 α magasabb expressziója nem biztosított hosszabb túlélést (az adatokat nem mutattuk be).

Az AMPK szerepe a bézs adipocita differenciációjában

A hADMSC-ből származó fehér adipociták AICAR kezelése AMPK aktivációt eredményez

A vizsgálatban humán perikardiális zsírszövetből származó mesenchymális őssejteket (hADMSC) használtunk a fehér és bézs adipociták modellezésére. Mindegyik hADMSC sejtvonalat három különböző irányban differenciáltattunk, nevezetesen a bézs adipociták, a fehér adipociták, és az AICAR kezelt fehér adipociták irányába. A differenciáció végén mindhárom csoportban megmértük az AMPK-aktivitást. Azt tapasztaltuk, hogy az AMPK-aktivitás nagyobb volt a bézs adipocitákban, mint a fehér adipocitákban. Fontos megjegyezni, hogy a 100 μ M AICAR-al kezelt fehér adipocitákban fokozódott az AMPK aktivitás közel hasonló mértékben, mint a bézs adipocitákban. Ez az AMPK kiemelt szerepére utal a bézs adipocita differenciációjában és funkcionális működésében.

Az AICAR kezelt hADMSC-ből származó fehér adipociták nem eredményeznek funkcionális bézs adipocitákat

Kísérleteinket a bézs adipociták biológiai funkciójának vizsgálatával folytattuk. A bézs zsírsejtek a mitokondriális oxidációtól és mitokondriális biogenezistől függenek. A kutatás következő lépéseként megmértük a mitokondriális oxigénfogyasztást. Egy tanulmány rámutatott, hogy a bézs adipociták magasabb bazális és cAMP-stimulált oxigénfogyasztási arányt mutattak, mint a fehér adipociták. Meglepő módon az AICAR indukált AMPK aktiváció nem emelte meg a fehér zsírsejtek oxigénfogyasztási arányát. További kísérletben megmértük a tipikus bézs zsírsejtekre jellemző marker gének (TBX1, UCP1, CIDEA, PRDM16 és

TMEM26) mRNS expresszióját. Az AICAR kezelt fehér zsírsejtekben nem tudtunk funkcionális változásokat kimutatni sem a mitokondriális oxidáció, sem a bész zsírsejtekre jellemző marker gének expressziójának vizsgálatakor, összehasonlítva a barna adipocitákkal.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az AMP-aktivált protein kináz egyike az emberi szervezet legfontosabb energiaszenzorainak. Működését az ATP/AMP arány szabályozza. Az enzim egy heterotrimer, amelynek gamma alegysége AMP-t köt, amely az enzim aktivációjához vezet. Tulajdonképpen az AMPK aktiváció a magas AMP szinthez kötött, azaz a sejtek energetikai stresszének a következménye. Az AMPK akkor aktiválódik, ha valamilyen eltérés áll be a sejt tápláltsági alapállapotban. Az AMPK aktivációja több szerv és szövetfüggő hatást vált ki. E hatásokban közös, hogy beindítják a cukor és a zsírsav oxidációt, hogy helyreállítsák a sejtek, szövetek ATP szintjét. A rákos sejtek olyan metabolikus változásokon mennek keresztül, ami csökkent mitokondriális oxidációval és emelkedett glikolitikus rátával jellemezhető. Ez a Warburg metabolizmusnak nevezett állapot a gyors és kontrollálatlan sejtproliferáció szolgálatában áll. Az AMPK a mitokondriális biogenezis fokozásán keresztül anti-Warburg szerként képes viselkedni. Bizonyítottuk, hogy az AMP aktivált protein kináz farmakológiai aktivátora (AICAR) és a folát analóg methotrexát (MTX) együttes alkalmazása lelassíthatja az emlő tumor sejtek proliferációját. Az AICAR+MTX kombináció fokozott mitokondriális oxidációt és csökkent glikolitikus rátát eredményezett. Ezek a metabolikus változások együtt jártak a G1/S és a G2/M fázisok közötti átmenet blokkolásával, amely lelassította a sejtciklust.

A PGC1 α , PGC1 β , és FOXO1 transzkripciós faktorok expressziójának magas szintje felelős a fokozott mitokondriális oxidációért. A sejtproliferáció lassulása megszűnt, amikor a mitokondriális transzkripciós faktorokat csendesítettük.

További kísérleteinkben meghatároztuk az AMPK lehetséges szerepét a bézs sejtek differenciációjában, amelyhez humán perikardiális zsírszövetből származó mesenchymális őssejteket (hADMSC) használtunk modellként. A hADMSC-k differenciálódási folyamatában a fehér zsírsejteket 100 μ M AICAR-val indukáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy az AICAR képes volt növelni az AMPK aktivitást a fehér zsírszövetben hasonló mértékben, mint a barna adipocitákban. Az AICAR által indukált AMPK aktivitás morfológiai változásokat eredményezett a fehér

zsírsejtekben, hasonlóan a barna adipocitákhoz. Viszont az AICAR kezelt fehér adipocitákban nem tudtunk funkcionális változásokat kimutatni, sem a mitokondriális oxidáció, sem a bézs zsírsejtekre jellemző marker gének (TBX1, UCP1, CIDEA, PRDM16 és TMEM26) expressziójának vizsgálatakor, összehasonlítva a barna adipocitákkal.

Kísérleteink azt bizonyítják, hogy az AICAR által indukált AMPK aktiváció kiemelkedő potenciállal rendelkezik az anyagcsere és a daganatos megbetegedések kezelésében.



Nyilvántartási szám: DEENK/1/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Fodor Tamás
Neptun kód: WAN836
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10043604

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Abdul-Rahman, O., Kristóf, E., Doan-Xuan, Q. M., Vida, A., Nagy, L., Horváth, A., Simon, J., Maros, T. M., Szentkirályi, I., Palotás, L., Debreceni, T., Csizmadia, P., Szeráfin, T., **Fodor, T.**, Szántó, M., Tóth, A., Kiss, B. K., Bacsó, Z., Bai, P.: AMP-Activated Kinase (AMPK) Activation by AICAR in Human White Adipocytes Derived from Pericardial White Adipose Tissue Stem Cells Induces a Partial Beige-Like Phenotype.
PLoS One. 11 (6), e0157644, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0157644>
IF: 2.806
2. **Fodor, T.**, Szántó, M., Abdul-Rahman, O., Nagy, L., Dér, Á., Kiss, B. K., Bai, P.: Combined Treatment of MCF-7 Cells with AICAR and Methotrexate, Arrests Cell Cycle and Reverses Warburg Metabolism through AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) and FOXO1.
PLoS One. 11 (2), 1-16, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0150232>
IF: 2.806





További közlemények

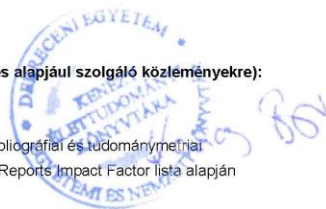
3. Mikó, E., Kovács, T., **Fodor, T.**, Bai, P.: Methods to assess to role of poly(ADP-ribose) polymerases in regulating mitochondrial oxidation.
Methods Mol. Biol. 1608, 185-200, 2017.
4. Márton, J., **Fodor, T.**, Nagy, L., Vida, A., Kis, G., Brunyánszki, A., Antal, M., Lüscher, B., Bai, P.: PARP10 (ARTD10) modulates mitochondrial function.
PLoS One. "Accepted by Publisher", 2017.
IF: 2.806 (2016)
5. Bai, P., Nagy, L., **Fodor, T.**, Liaudet, L., Pacher, P.: Poly(ADP-ribose) polymerases as modulators of mitochondrial activity.
Trends Endocrinol. Metab. 26 (2), 75-83, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2014.11.003>
IF: 8.964
6. Szántó, M., Brunyánszki, A., Márton, J., Vámosi, G., Nagy, L., **Fodor, T.**, Kiss, B. K., Virág, L., Gergely, P., Bai, P.: Deletion of PARP-2 induces hepatic cholesterol accumulation and decrease in HDL levels.
Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis. 1842 (4), 594-602, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.12.006>
IF: 4.882
7. Nagy, D., Gónczi, M., Dienes, B., Szóör, Á., Fodor, J., Nagy, Z., Tóth, A., **Fodor, T.**, Bai, P., Szűcs, G., Rusznák, Z., Csernoch, L.: Silencing the KCNK9 potassium channel (TASK-3) gene disturbs mitochondrial function, causes mitochondrial depolarization, and induces apoptosis of human melanoma cells.
Arch. Dermatol. Res. 306 (10), 885-902, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00403-014-1511-5>
IF: 1.902

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,166

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,612

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományos mérései ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.01.03.



KONFERENCIA ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

Konferencia előadások

Tamás Fodor, Magdolna Szántó, Judit Márton, Lilla Nagy, Péter Bai The role of AMPK in reversing Warburg metabolism Galyatető (2016)

Marton J, Nagy L, **Fodor T**, Bhattoa Pal H, Bai P PARP2 interferes with skeletal muscle cholesterol homeostasis and steroid metabolism. PARP Family and Friends, Cold Spring Harbor, NY, USA (2016)

Tamás Fodor , Magdolna Szántó , Omar Abdul-Rahman, Judit Márton , Lilla Nagy , Péter Bai Combined treatment of MCF7 cell with AICAR and methotrexate, arrests cell cycle and reverses Warburg metabolism through AMP-activated protein kinase (AMPK) and FOXO1, Debrecen (2015)

Fodor T, Mikó E, Vida A, Kovács T, Abdul-Rahman O, Nagy L, Trencsényi Gy, Bai P New ways to revert Warburg-type metabolism. FEBS3+ meeting, Protoroz, Szlovénia (2015)

Fodor T The analysis of AMPK activation in MCF7 cell modell, UK, Cambridge (2014)

Fodor T The analysis of AMPK activation in different cell models. Signaling pathways in cancer biology, Mátraháza (2014)

Szántó M, **Fodor T**, Nagy L, Márton J, Csumita M, Kiss B, Gergely P, Virág L, Bai P Poly (ADP-ribose) polymerase enzymes in metabolic regulation. MÉT Vándorgyűlés, Budapest (2013)

Fodor T (2013) The role of AMPK activation in the changes of mitochondrial activity in various cell models. Signaling pathways in cancer biology, Egerszalók (2013)

Szántó M, Brunyánszki A, Kiss B, Cantó C, Tóth A, **Fodor T**, Bai P The role of PARP-2 in the regulation of SIRT1 expression and mitochondrial respiration – metabolism and oxidative stress. PARP2013, Quebec City, Kanada (2013)

Konferencia poszterek

Nagy L, Docsa T, Tóth A, Somsák L, **Fodor T**, Gönczi M, Gergely P, Bai P (2015) Glycogen phosphorylase inhibition has positive effect on metabolism. FEBS3+ Portoroz, Szlovénia

Szántó M, Brunyánszki A, Márton J, Nagy L, **Fodor T**, Kiss B, Bai P (2014) The role of poly(ADP-ribose) polymerase enzymes in the regulation of cholesterol homeostasis Frontiers in Metabolism: From Molecular Physiology to Systems Medicine EMBL Heidelberg 2014

Márton J, Szántó M, Nagy L, **Fodor T**, Kiss B, Bai P (2014) The role of poly(ADP-ribose) polymerase-2 in the cholesterol homeostasis. MBKE Debrecen 2014

Tamás Fodor, Magdolna Szántó, Judit Márton, Lilla Nagy, Péter Bai
Study of anti-Warburg effect of AMPK activators and antimetabolite drugs on MCF7 cell model Conference of the Hungarian Society for Biochemistry, Debrecen (2014)

Tamás Fodor, Magdolna Szántó, Judit Márton, Lilla Nagy, Péter Bai
Study of anti-Warburg effect of AMPK activators and antimetabolite drugs on MCF7 cell model FEBS, Párizs, Franciaország (2014)

Fodor T, Szántó M, Nagy L, Brunyánszki A, Gergely P, Virág L, Bay P
The role of PARP10 enzyme in mitochondrial metabolism. Hungarian Molecular Life Sciences, Siófok (2013)

Fodor T, Szántó M, Nagy L, Brunyánszki A, Kiss B, Gergely P, Virág L, Bay P
The role of PARP10 in metabolic regulation. Conference of the Hungarian Society for Physiology, Budapest (2013)

A publikáció/prezentáció/poszter elkészítését a GINOP- 2.3.2-15-2016-00006 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.