

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Az NMNAT-1 enzim szerepe a daganatsejtekben

Kiss Alexandra

Témavezető: Dr. Hegedűs Csaba



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

TARTALOMJEGYZÉK

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
II. BEVEZETÉS	5
III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
III.1. Az oszteoszarkóma	7
III.1.1. Az oszteoszarkóma fontosabb jellemzői és diagnosztikája	7
III.1.2. Az oszteoszarkóma terápiája	8
III. 2. A NAD ⁺ szerkezete és funkciói	10
III.2.1. A NAD ⁺ szerkezete	10
III.2.2. A NAD ⁺ szintézise	10
III.2.3. A NAD ⁺ szerepe a redoxireakciókban	12
III.2.4. A NAD ⁺ jelátvitelben betöltött szerepe	12
III.3. Az NMNAT enzimek	15
III.3.2. Az NMNAT enzimek szerepe az idegsejtekben	16
III.3.2. NMNAT1 szerepe a daganatokban	17
IV. CÉLKITŰZÉSEK	18
V. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	19
V.1. Sejtkultúra tenyésztése	19
V.2. NMNAT1 KO sejtek előállítása Crispr-cas9 technikával	19
V.3. Western blot	20
V.4. High Content Analysis (HCA)	22
V.4.1. γ H2AX detektálása	22
V.4.2. Kaszpáz-aktiváció vizsgálata	22
V.4.3. Sejtproliferáció mérése	23
V.5. Életképesség vizsgálata	23
V.6. Klonogén aktivitás mérése	24
V.7. LDH-felszabadulás mérése	24
V.8. Teljes sejtes NAD-szint mérése	24
V.9. Teljes sejtes ATP-szint mérése	25
V.10. Sejtanyagcsere vizsgálata Seahorse metabolikus analizátorral	25
V.11. RNS izolálás sejtkultúrából	26
V.12. Valós idejű kvantitatív PCR (RT-QPCR)	26
V.13. Életképesség mérése nagy áteresztőképességű szűrővel	27
V.14. Citotoxikus találatok validálása	27
V.15. Sejtciklus-analízis áramlási citometriával	28
V.16. Statisztikai analízis	29
VI. EREDMÉNYEK	30

VI.1. Tumorsejtek NMNAT1-expressziójának vizsgálata és NMNAT1 génhányos sejtvonala előállítása.....	30
VI.1.1. NMNAT1-expresszió vizsgálata humán tumor sejtvonalakban.....	30
VI.1.2. Genotoxikus stressz hatása az NMNAT1 expressziójára.....	31
VI.1.3. NMNAT1-génhányos sejtvonala előállítása és ellenőrzése.....	32
VI.1.4. Az NMNAT1 KO sejtek jellemzése.....	33
VI.2. Az NMNAT1 szerepének vizsgálata cisplattal kezelt oszteosarkóma sejteken	36
VI.2.1. Életképesség vizsgálata.....	36
VI.2.2. DNS-károsodás vizsgálata	37
VI.2.3. Sejthalál-útvonalak vizsgálata.....	38
VI.2.4. Cisplatin-kezelés hatása az NMNAT1 KO sejtek NAD ⁺ - és ATP szintjére.....	40
VI.2.5. Metabolikus útvonalak vizsgálata	41
VI.2.6. A PARázció szerepe az NMNAT1 KO sejtek fokozott érzékenységében.....	43
VI.3. NMNAT1 KO sejteken fokozott sejtpusztulást okozó gyógyszerhatóanyagok azonosítása ..	45
VI.3.1 Nagy áteresztőképességű szűrővizsgálat.....	45
VI.3.2. A szűrés során azonosított vegyületek hatásának megerősítése.....	47
VI.4. Az NMNAT1 szerepének vizsgálata aktinomycin D-vel kezelt oszteosarkóma sejteken.....	49
VI.4.1. Az aktinomycin D által kiváltott sejthalál jellemzése	49
VI.4.2. A sejtek NAD ⁺ - és az ATP –szintjének vizsgálata Aktinomycin D kezelést követően	52
VI.4.3. Az aktinomycin D DNS károsodást és PARP aktivációt vált ki	53
VI.4.4. A p53 fehérje acetilációjának vizsgálata.....	55
VI.4.5. p53-dependens pro-apoptotikus gének indukciójának vizsgálata	56
VI.4.6. Az NMNAT1 hiánya gátolja a sejtek proliferációját	58
VI.4.7. Az NMNAT1 KO fenotípus és az actinomycin D - kezelés hatása az RNS-tartalomra .	62
VII. MEGBESZÉLÉS	63
VIII. KONKLÚZIÓK.....	72
IX. ÖSSZEFOGLALÁS.....	73
X. SUMMARY	74
XI. IRODALOMJEGYZÉK.....	75
XII. PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	86
XIII. TÁRGYSZAVAK	87
XIV. KEYWORDS	88
XV. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	89
XVI. FÜGGELÉK.....	90

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ActD: Aktinomycin D	Nam: Nikotinamid
ADP: Adenozin difoszfát	NAMPT: Nikotinamid foszforiboziltranszferáz
ADM: adriamicin	NEC1: Nekrosztatin1
ART: ADP-riboziltranszferáz	NMN: Nikotinamid mononukleotid
ATP: Adenozin trifoszfát	NMNAT: Nikotinamid mononukleotid adenililtranszferáz
BSA: Bovine serum albumin	NMNAT1: Nikotinamid mononukleotid adenililtranszferáz -1
CTR: Kontroll	OCR: Oxygen consumption rate
CDP: ciszplatin	OLA: Olaparib
DAPI: 4',6-Diamidin-2-fenil-indol dihidroklorid	OS: Osteoszarkóma
DDR: DNA damage response	PAR: Poli-ADP-ribóz
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium	PARP1: Poli-ADP-ribóz polimeráz 1
DNA: Deoxyribonucleic acid	PARPi: Poli-ADP-ribóz polimeráz inhibitor
DNS: Deoxiribonukleinsav	PARylation: Poli-ADP-riboziláció
DOX: Doxorubicin	PBS: Phosphate-buffered saline
DSB: Double strand breaks	PET: pozitron emissziós tomográfia
ECAR: Extracellular acidification rate	PMSF: fenilmetilszulfonil-fluorid
ECL: Enhanced chemiluminescence	Rb: Retinoblasztóma
FBS: főtális borjúsérum	RFP: Red fluorescent protein
FCCP: Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone	RIOS: radiation-induced oszteoszarkóma
FITC: Fluorescein isothiocyanate	RNA: Ribonucleic acid
HCA: High Content Analysis	RNS: Ribonukleinsav
HDMTX: metotrexát	SARM1 (sterile Alpha and Toll Interleukin Receptor Motif-containing protein 1)
HRP: Horseradish peroxidase	SDS: Sodium dodecyl sulfate
IF: ifoszfamid	SEM: Standard error of the mean
KO: Knockout	siRNA: Small interfering RNA
LDH: Laktát dehidrogenáz	SIRT1: Sirtuin1
mRNA: Messenger RNA	SRB: Sulforhodamine B
NA: nikotinsav	TCA-cycle: Tricarboxylic acid cycle
NAADP: a nikotinsav-adenin-dinukleotid-foszfát	WT: Wild type
NAD: Nikotinamid adenin dinukleotid	

II. BEVEZETÉS

A daganatok kezelése során, az esetek jelentős részében kemoterápiát alkalmaznak. Ennek hatásossága azonban nem minden esetben éri el a kellő mértéket. Ezen kívül, a kemoterápia a daganatos sejteken kívül az ép - különösen a gyorsan növekvő és osztódó - sejtekre is hatással van. Ilyen sejtekből áll a tápcsatorna nyálkahártyája, a szőrtüszők és a vér. Emiatt a kemoterápiás kezelések legjellemzőbb mellékhatásaiként émelygés, hányás, fáradtságérzés, láz, nyálkahártya-fekély, a hajszálak, szőrszálak elvékonyodása és kihullása jelentkezhet, fertőzések alakulhatnak ki [2]. Ezért kiemelkedően fontos a tumorsejtek érzékenységének fokozása, mely egyaránt szolgálhatja a kezelés fokozottabb hatékonyságát és a mellékhatások csökkentését.

Az oszteoszarkóma egy rendkívül agresszív típusú tumor fajta. Főként a fiatalabb korosztályt érinti, a legtöbb esetet a 10 és 30 év közötti korcsoportban diagnosztizálják. Becslések szerint évente egymillió ember közül 3-4 embernél fejlődik ki [3, 4]. A daganat az esetek túlnyomó részében a hosszú csontokban (pl.: combcsontban, a sípcsontban [1. ábra] és a felkar csontjában) jelentkezik, de lapos csontokban is előfordulhat (pl.: állkapocscsont). A primer daganat mellett áttétek is kialakulhatnak, melyek többsége a tüdőben lokalizálódik [5]. Más daganatok sugárkezelése hosszú távon szintén oszteoszarkóma kialakulásához vezethet [6]. Noha az oszteoszarkómás esetek többsége szórványos előfordulású, bizonyos örökletes szindrómák kísérő jelenségeként nagyobb arányú előfordulásáról számoltak be. Például a tumorsuppresszor retinoblasztóma fehérje (Rb) mutációi a retinoblasztómában [7], vagy a p53 Li-Fraumeni szindrómában [8], valamint a DNS-javító helikáz Werner fehérje mutációi szintén társíthatók az oszteoszarkómához [9].

Az oszteoszarkóma kezelése általában neoadjuváns kemoterápiával kezdődik, amelyet az elsődleges tumor és az áttétek műtéti eltávolítása követ. Az oszteoszarkóma kemoterápiájában alkalmazott szerek közé tartozik a ciszplatin, a metotrexát és a doxorubicin [10]. Az Európai Unióban a liposzómába kapszulázott szintetikus muramid-dipeptid-analógot, a mifamurtidot az Európai Gyógyszerügynökség is jóváhagyta az oszteoszarkóma immunterápiájára [11]. Továbbá az oszteoszarkóma egyik változatának, az Ewing-szarkómának, mely a csont- és az azt körülvevő lágyrészt érintő daganat típus, kezelésére az aktinomicin D-t is alkalmazzák [12]. Az ötéves túlélési arány az oszteoszarkóma stádiumától, típusától és altípusától függ, és 60% és 75% között mozog

[13]. A meglehetősen gyenge terápiás válaszkészség azt jelzi, hogy az oszteosarkóma betegek túlélésének javítása új terápiás megközelítések kidolgozását igényli.

A NAD^+ egy koenzim, amely részt vesz a normál szövetek redox reakcióiban, valamint a tumor túléléséhez és növekedéséhez szükséges anyagcsere-útvonalakban. A legnagyobb mennyiséget azonban a NAD^+ segítségével posztranszlációs fehérjemódosításokat végző poli (ADP-ribóz) polimeráz (PARP) és a sirtuin (SIRT) enzimek használják fel [14, 15]. Ezek az enzimek részt vesznek többek között a DNS-hibajavítás, az anyagcsere, a génexpresszió szabályozásában [16-18]. A NAD^+ három különböző úton szintetizálható [3. ábra]: a Preiss-Handler útvonalon (PHP), nikotinsavból; a de novo szintézis (DNP) során triptofánból; valamint a mentési útvonalon (SP) nikotinamidból (NAM) [19]. A NAD^+ -szintézis utolsó lépését az NMNAT enzimek katalizálják, melyek ATP-ből és NMN-ből szintetizálnak NAD^+ -ot [20].

Három különböző humán NMNAT izoenzimet fedeztek fel, amelyek szöveti eloszlásban és szubcelluláris lokalizációban is különböznek egymástól. Az NMNAT1 enzim a sejtmagban, az NMNAT2 a sejtek citoplazmájában és a Golgi-testekben, az NMNAT3 izoforma pedig a mitokondriumban lokalizálódik [20]. Az NMNAT1 sejtmagi lokalizációja, és a NAD^+ -szintézisben való részvétele miatt összefüggésbe hozható olyan sejtmagi enzimekkel, mint a Sirtuin1 (SIRT1), és a poli-(ADP-ribóz)-polimeráz 1 (PARP1). Ismert, hogy az NMNAT1 expressziója megemelkedik a sejteket érő genotoxikus stressz hatására, ezért valószínűsíthető, hogy az enzim fontos szerepet tölt be a károsodott sejtek túlélésében [21]. Jelenleg még kevés információval rendelkezünk az NMNAT1 tumorsejtben betöltött szerepével kapcsolatban. Eredményeink alapján azonban az NMNAT1 gátlása több genotoxikus kemoterapeutikumra is érzékenyíti az oszteosarkóma sejteket, ezért specifikus NMNAT1 gátlószer kifejlesztése egy új irányvonal lehet az oszteosarkóma hatékony kezelésének szempontjából.

III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

III.1. Az oszteoszarkóma

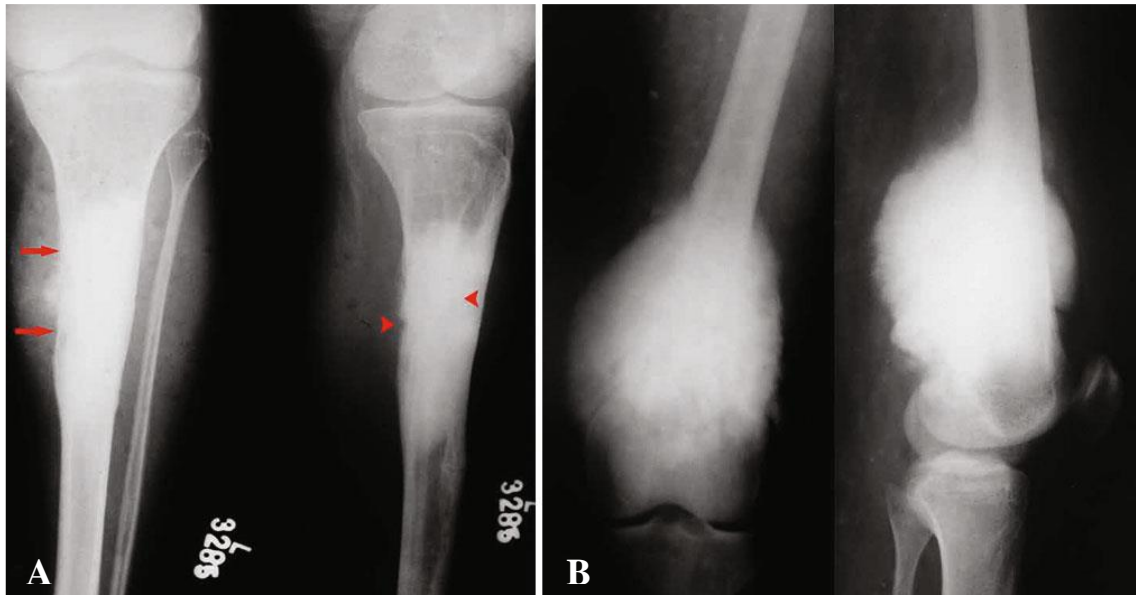
III.1.1. Az oszteoszarkóma fontosabb jellemzői és diagnosztikája

Az oszteoszarkóma a csontszövet elsődleges rosszindulatú daganata. A daganat az esetek túlnyomó részében a hosszú csontok középső részében, az úgy nevezett metaphysis részéből indul ki [22] [1. ábra]. Ezen kívül, lapos csontokban is előfordulhat, például az állkapocscsontban [23].

Az oszteoszarkómában szenvedő betegeknél kialakulhatnak áttétek, melyek az esetek túlnyomó részében a tüdőben lokalizálódnak. Ezen áttétek a vér és nyirokkeringés útján jutnak el a csontoktól a tüdőbe [24]. A tüdőben kialakuló metasztázis jelenléte rossz prognózist jelent az oszteoszarkómás betegek számára [25]. A kemoterápiás kezelések bevezetése előtt a betegek kb. 90%-a tüdő metasztázis miatt hunyt el [26].

Az oszteoszarkóma ötéves túlélési aránya kb 70% között mozog [27-29]. Az áttétek megjelenése esetén viszont már csak 20% ez az arány [29, 30]. Az oszteoszarkóma az összes rosszindulatú daganat kb. 0,2% -a, becsült előfordulása 3 eset / 1 millió lakos / év [31]. Bármilyen életkorban előfordul, de a legtöbb eset serdülőkorban kerül diagnosztizálásra [32-34].

A diagnózis felállítása általában egy egyszerű röntgenfelvétel és szövettani mintavétel segítségével történik [35]. Viszont fontos meghatározni az esetleges áttétek jelenlétét, melyhez mellkas röntgent vagy mellkas számítógépes tomográfiai (CT) vizsgálatot alkalmaznak [36]. A mágneses rezonancia képalkotás (MRI) alkalmas a tumor a lágy szövetekbe, a medulláris csatornába, az ízületbe való kiterjedésének megállapítására, valamint megmutatja a tumor közelségét a neurovaszkuláris struktúrákhoz. A Tc99 csontszkenelés detektálja a csontos metasztázisokat. A pozitron emissziós tomográfia (PET/CT) alkalmazásának előnye a pontosság, az érzékenység és a specifitás az oszteoszarkóma diagnosztizálásában. Nemcsak az elsődleges elváltozások és áttétek diagnosztizálásához nyújt széleskörű információt, hanem a neoadjuváns kemoterápiára adott válasz szövettani kiértékeléshez és a prognózishoz is [37]. Biokémiai markerként az alkalikus foszfatázt és a laktát-dehidrogenázt használják a prognózis és a kezelési válasz meghatározására. A biopszia megerősíti a diagnózist és feltárja a tumor stádiumát. A végtagok szarkómáihoz leggyakrabban a rosszindulatú mozgásszervi daganatok stádiumozására szolgáló rendszert és az Amerikai Egyesített Rákellenes Bizottság (AJCC) stádiumrendszereit használják [38-40].



I. ábra: Röntgenfelvétel a sípcsont (A) és combcsont (B) oszteoszarkómás elváltozásáról (forrás: [38])

III.1.2. Az oszteoszarkóma terápiája

Az oszteoszarkóma kezelése egyaránt magába foglalja a sebészi és a kemoterápiás eljárásokat. A sebészeti műtéti kezelés önmagában gyakran sikertelen, az oszteoszarkóma magas fokú mikrometasztázis-képzési tulajdonságának gyakorisága miatt [24]. Ezért azt úgynevezett preoperatív vagy neoadjuváns kemoterápia szokta megelőzni, melynek fő célja a daganat méretének csökkentése, hogy a műtét során minél kisebb mértékű kimetszéssel lehessen a teljes daganatot biztonságosan eltávolítani [35].

Az oszteoszarkóma kezelésében sugárterápiát nem használnak első vonalbeli kezelésként. Egyrészt azért, mert az oszteoszarkóma nem sugárérzékeny tumor [41]. A craniofacialis oszteoszarkómában szenvedő betegeknél alkalmazott sugárterápia az esetek nagy részében nem volt olyan sikeres, mint a távoli áttéteknél alkalmazva. Ennek valószínűleg az az oka, mert az arccsonton nagyobb nehézséggel jár a negatív műtéti margó elérése [42]. Másrészt pedig a sugárterápia inicializálhatja is oszteoszarkóma kialakulását. Az összes csont tumor kb. 5,5%-át fokozott sugárterhelés okozza [43]. A sugárzás okozta oszteoszarkóma (RIOS) a sugárterápia ritka késői szövődménye lehet olyan betegségek esetében, mint a retinoblasztóma, a Hodgkin-kór, az emlőrák és a kismedencei rák [44]. Mivel az oszteoszarkóma agresszív tumor típus, és a műtéti eltávolítása mellett is viszonylag nagy a kiújulás gyakorisága, ezért felmerül a lehetőség,

hogy a műtét, a sugárterápia és a kemoterápia kombinációja fokozhatja a kezelés hatékonyságát [45].

Az oszteoszarkóma kemoterápiában alkalmazott szerek közé tartozik a ciszplatin, a metotrexát és a doxorubicin [10]. Az Európai Unióban a liposzómába kapszulázott szintetikus muramil-dipeptid analógot, a mifamurtidot az Európai Gyógyszerügynökség is jóváhagyta az oszteoszarkóma immunterápiájára [11].

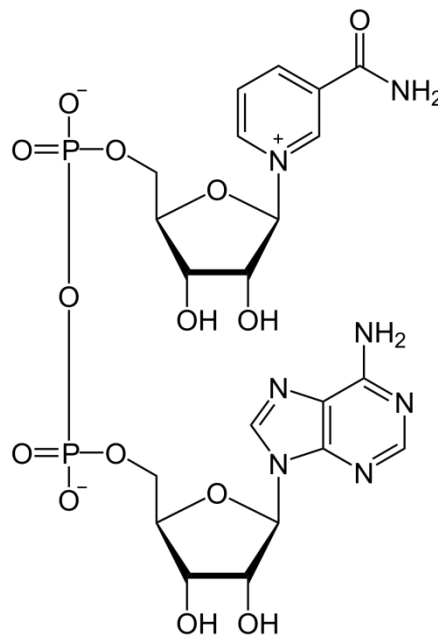
Az oszteoszarkóma kezelésében használt metotrexát (HDMTX), és a ciszplatin (CDP) mellett még gyakori a doxorubicin (adriamicin, ADM) és ifoszfamid (IF) alkalmazása is, melyeket általában kombinációban alkalmaznak. Vagy a 4 gyógyszer együttes kombinációját (HDMTX, CDP, ADM, IF) vagy pedig 3 gyógyszer kombinációját (HDTX, CDP, DM) használják a betegek kezelésére [46]. Az oszteoszarkóma egyik változatának, az Ewing-szarkómának a kezelésére az aktinomicin D-t is alkalmazzák [12].

Az oszteoszarkómák viszonylag nagy kemoterápiás dózisokra reagálnak, ráadásul a jelenleg ismert kezelésekkel szemben nagyfokú rezisztenciát mutatnak, ami a betegek kezelésének többségében jelentős problémát jelent, ez okozza a sikertelenül kezelt esetek 90 %-át [47, 48]. A rezisztencia gyors kialakulása, a visszaeső betegségek mindösszesen 20% -os megmentési arányában is tükröződik [32]. Az oszteoszarkóma tehát egy rendkívül ellenálló, agresszív tumorfajta, mely kezelésében egyértelműen új perspektívák szükségesek, a betegek túlélési rátájának javításához.

III. 2. A NAD⁺ szerkezete és funkciói

III.2.1. A NAD⁺ szerkezete

A nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺) az élő sejtekben megtalálható fontos biológiai kofaktor. Felépítését tekintve egy nikotinsavamid β-N-glikozidos kötéssel kapcsolódik egy D-ribózhhoz; a D-ribóz 5' szénatomjához pedig egy adenzin kapcsolódik egy pirofoszfáton keresztül [49] [2. ábra].



2. ábra A NAD⁺ szerkezete (forrás:[50])

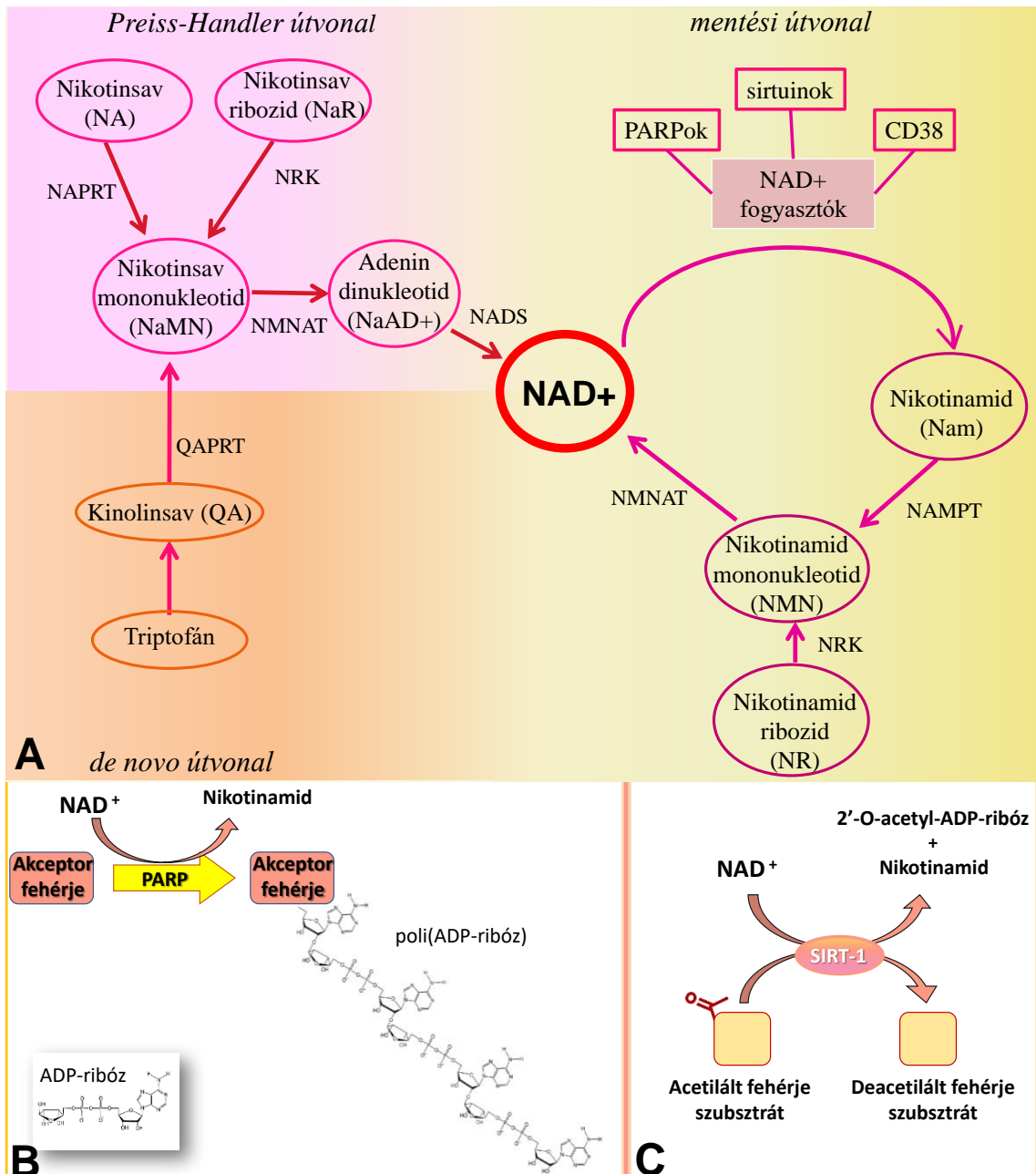
III.2.2. A NAD⁺ szintézise

A NAD három útvonalon keresztül – mentési, de novo, és Preiss-Handler útvonalon - szintetizálódhat. A mentési útvonal [3. ábra] felelős a különböző biológiai folyamatokhoz folyamatosan szükséges NAD⁺ gyors regenerálásáért. A NAD⁺-ot felhasználó enzimek (pl. PARP, sirtuin enzimek, CD38) Nikotinamidot (Nam) szabadítanak fel. A nikotinamid foszforibosziltranszferáz (NAMPT) a nikotindamidot, nikotinamid mononukleotiddá (NMN) alakítja. Illetve a nikotinamid ribozidból (NR) nikotinamid ribozid kinázok a NMN-t képeznek [51]. Majd a nikotinamid mononukleotid adenililtranszferáz (NMNAT) NAD⁺-ot hoz létre azáltal, hogy az a NMN-re adenililcsoportot hidrolizál az ATP-ről [52].

A Preiss-Handler útvonal [3. ábra] során a nikotinsavat (NA) a nikotinsav foszforiboszil transzferáz (NARPT) enzim, míg a nikotinsav ribozidot (NaR) a ribozid kináz (NRK) enzim nikotinsav mononukleotiddá (NaMN) alakítja, melyet az NMNAT

enzimek adenin dinukleotiddá alakítanak (NaAD⁺). Végül pedig a NAD szintetáz által a NaAD NAD⁺-dá alakul [53, 54]

A de novo útvonal [3. ábra] kiindulási molekulája a máj által szintetizált triptofán, [55]. A triptofán a kynurenine útvonal (ábrán részleteiben nem mutatjuk) során való átalakulása során kinolinsavat (QA)-t eredményez. A QA a Preiss-Handler útvonalba kapcsolódik be úgy, hogy a kinolinát foszforiboziltranszferáz (QAPRT) enzim segítségével NaMN-é alakul [1].



3. ábra. A panel: NAD⁺ - bioszintézis útvonalai [1]. B. panel: NAD⁺ szerepe a PARilációban. C panel: NAD⁺ szerepe a SIRT1 függő deacetilációban.

III.2.3. A NAD⁺ szerepe a redoxireakciókban

A NAD⁺ legismertebb funkciója az elektrontranszport. Redoxireakciónak nevezünk minden olyan kémiai reakciót, mely az oxidációs állapot (oxidációs szám) megváltozásával jár. Ezen reakciók során a reakcióban résztvevő egyik reakciópartner felvesz, a másik pedig lead elektron(oka)t. Az NAD oxidált formáját oxidációs állapotának megfelelően NAD⁺-ként jelöljük. A NAD⁺ két elektront és egy protont képes felvenni, és eközben az elektronszerkezete aromásból kinoidálisá változik, redukált NAD-dá, (NADH) alakul [56]. A NAD⁺ kritikus fontosságú minden élő életforma anyagcseréje szempontjából, szabályozza a dehidrogenázok aktivitását, amelyek több katabolikus útvonalban is szerepet játszanak, beleértve a glikolízist, a glutaminolízist és a zsírsav-oxidációt. A NAD⁺ az energiatermelés központi metabolitja, amely elektronhordozóként szolgál a glikolízis és a trikarbonsav (TCA) ciklusban, melyekből az elektronokat az elektrontranszport-láncnak juttatja el. Ezáltal az eukarióták hatékonyan képesek adenosin-trifoszfátot (ATP) képezni. A NAD⁺ foszforilezhető is, így NADP⁺ képződik, amely hidrid -akceptorként NADPH képződéséhez vezet, és az oxidatív stressz elleni védelemben, valamint az anabolikus útvonalakban, például zsírsavsintézisben vesz részt [57]. A metabolikus kofaktor szerepe mellett a NAD⁺ jelátviteli molekula szerepet is betölt [58].

III.2.4. A NAD⁺ jelátvitelben betöltött szerepe

A sejtek kóros elváltozása a metabolikus utak alapvető átrendeződésével jár. A gyorsan proliferáló sejtek anyagcseréjének egyik fő jellemzője a fokozott glikolitikus aktivitása, még akkor is, ha megfelelő mennyiségű oxigén áll rendelkezésre. Mely ebben az esetben nem csupán a sejtek energiaigényét, hanem a pentóz-foszfát útvonalon keresztül a fokozott sejtosztódáshoz szükséges megnövekedett nukleotid-igényt is kiszolgálja. Ezt nevezzük Warburg-effektusnak [59]. A Warburg-effektus során a tumorsejtek a fokozott glikolitikus aktivitáshoz szükséges nagyobb mennyiségű oxidált NAD⁺ regenerációja céljából nagy mennyiségű laktátot termelnek. Vagyis ahelyett, hogy a NADH elektronokat szolgáltatna a mitokondriális légzési láncba, a citoszolikus NADH nagy része regenerálódik, piruvát laktáttá redukálásával [60]. A NAD⁺ részt vesz a mono- és poli-ADP riboziláció mechanizmusában, a SIRT-függő fehérjék deacetilezésben, a ciklikus ADP-ribóz és a nikotinsav-adenin-dinukleotid-foszfát (NAADP) előállításában [61, 62]. Ezen felül, a NAD⁺-függő jelátviteli útvonalak részt vesznek számos

nélkülözhetetlen biológiai folyamatban, úgy mint a transzkripció, a sejtciklus, és a sejanyagcsere szabályozásában a DNS-hibajavításban, és a cirkádian ritmus fenntartásában [60].

III.2.4.1. A NAD⁺ szerepe a PARiláció folyamatában

Az ADP-ribozilációt az ADP-ribozil-transzferázok (ART-ok) katalizálják [63]. Az emlősök ART-szuperfamilájának két fő családja az ARTD és az ARTC. A széles körben használt elnevezés a PARP, mely az ARTD családba tartozik. A PARP-ot a jelenleg használt nomenklatúra alapján önálló névnek tekintik és így javasolják használni, nem pedig a poli-ADP-ribóz-polimeráz rövidítésének [64].

A PARP enzimes család jelen ismereteink szerint 17 tagból áll [65], a fehérjecs család minden tagját külön gén kódolja, viszont mindegyikre jellemző egy 50 aminosavból álló konzervált szekvencia, a „PARP signature sequence”, ami a katalitikus doménben helyezkedik el [58, 65]. Ez a PARP-okra jellemző szekvencia a gerinces élőlények körében 100%-os homológiát mutat [66].

Az enzimes család legtöbbet tanulmányozott tagja, a PARP-1 (ARTD1), mely az enzimes család humán sejtekben a legnagyobb mennyiségben előforduló tagja. Génje az 1. kromoszómán található meg, mely egy 1014 aminosavból felépülő, kb. 113kDa molekulatömegű fehérjét kódol [65]. A fehérje három fő doménből épül fel: N-terminális DNS-kötő doménből, amely két cinkujjat tartalmaz, az automodifikációs doménből és a C-terminálison elhelyezkedő katalitikus doménből [67].

A PARP1, katalitikus aktivitása során nagy mennyiségű NAD⁺-ot használ. Részt vesz olyan fontos sejtfolyamatok szabályozásában, mint a DNS-replikáció, a génextpresszió, a DNS-javítás, a sejtadhézió és a migráció [68]. Legismertebb funkciója a DNS-törések érzékelése és a báziskihasításos hibajavítás elősegítése [69]. A DNS-törést követően az enzim aktiválódik, a két Zn-ujj domén segítségével, nagy affinitással kötődik a DNS-hez [70]. Ezután a NAD⁺-ból, mint szubsztrát molekulából ADP-ribóz polimereket szintetizál, és specifikus célfehérjékhez kapcsolja őket, beleértve a hisztonokat, a transzkripciós faktorokat és magát a PARP1-et (Ezen folyamatok összefoglalása látható a 3. ábra B panelen). Ez a fehérjemódosítás kiemelkedően fontos a DNS-javító komplexek toborzása, és más fontos sejtes események szabályozásának szempontjából, beleértve a transzkripciót, az apoptózist és a sejtciklus-szabályozást [71]. A poli-ADP-riboziláció NAD⁺-felhasználása a DNS-károsodás mértékétől függ [72]. Túlzott mértékű DNS-károsodás a PARP túlaktiválása révén kimerítheti a NAD⁺-ot,

ezáltal lassítva a glikolízis, az elektronszállítás és az ATP-képződés sebességét. Endothelsejtek és a cardiomyocyták esetében kimutatták, hogy funkcionális károsodásukhoz vagy nekrotikus pusztulásukhoz vezet [67, 73, 74].

A PARilációhoz szükséges NAD^+ előállításában az NMNAT1 enzim fontos szerepet játszik. Több bizonyíték is van arra vonatkozóan, hogy NMNAT1 enzim kiemelkedő jelentőségű a PARP1 közvetlen NAD^+ -ellátásában. A PARP1 úgy jut az aktivitásához szükséges NAD^+ -hoz, hogy az általa szabályozott promóterekhez irányítja az NMNAT1-et. Ezen felül, a két fehérje kölcsönhatása fokozza a PARP-1 enzimátikus aktivitását a NAD^+ -termeléstől függetlenül [75]. Feltételezhető, hogy az NMNAT1 hasonlóan segíti a PARP1 működését a DNS hibajavítás iniciációja során is.

Tumorbiológiában betöltött szerepét számos közlemény megerősíti [76-78]. Az utóbbi évtizedekben a PARP1 enzim gátlása egy újszerű rákterápiás lehetőségként jelent meg. A klinikumban alkalmazott PARP-inhibitorok (PARPi) hatásosságát kimutatták petefészek - és mellrák sejtekben amelyek BRCA1 vagy BRCA2 mutációt hordoztak. Ezek a fehérjék a homológ rekombinációval történő DNS hibajavításban vesznek részt. Mutációjukkal ez a funkció sérül, ezért a báziskihasításos hibajavítást is legátolva (PARP-gátlás), az ún. szintetikus letalitás útján fokozottan érzékennyé tehetjük ezeket a sejteket [69, 79]. A PARP inhibitorok önmagukban alkalmazva, vagy DNS-károsító kezelésekkel kombinálva a fentiek alapján fokozhatják a terápia hatásosságát. A PARP-inhibitorok kemoszenzitizáló hatását tapasztalták temozolomid DNS-alkilező ágenssel vagy a topoizomeráz inhibitor topotekánnal kombinálva [80, 81].

III.2.4.2. A NAD^+ szerepe a SIRT függő deacetilációban

A sirtuin enzimek számos fiziológias és patológias folyamatban szabályozó szerepet töltenek be, beleértve az öregedést, a neurodegenerációt, az elhízást, a kardiovaszkuláris kórképeket, a gyulladást és a rákot [82, 83]. A sirtuin enzimsaládnak 7 tagja ismert az emlős sejtekben (SIRT 1 - SIRT 7), amelyek mindegyike a III. osztályú hiszton-deacetilázokhoz (HDAC) tartozik. Ezek szerkezetükben, lokalizációjukban és funkciójukban is különböznek egymástól [84].

A Sirtuinok enzimátikus aktivitásuk során egy acetilcsoportot távolítanak el célfehérjék lizin aminosavmaradékairól egy kétlépéses folyamatban: először a NAD^+ -ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítják, másodsor pedig a célfehérje acetilcsoportját továbbítják az ADP-ribózra, így egy köztes molekula a peptidil-ADP-ribóz képződik. Ezt követően O-acetil-ADP-ribóz szabadul fel [85] (Ezen folyamatok összefoglalása látható

a 3. ábra C panelen). A sirtuin család egyes tagjai olyan acilezési reakciókat közvetítenek, mint a szukcinilezés, malonilezés és zsírsav-acilezés [86], ezek sejtfunkciói egyelőre nem teljesen tisztázottak [87]. A SIRT4 és a SIRT6 ADP-riboziltranszferázokként is funkcionálnak [88, 89].

A p53 tumorszuppresszor fehérje a SIRT1 kölcsönható partnere, így képesek egymás működésének befolyásolására [90]. Például a p53 súlyos DNS-károsodás esetén történő aktivációja szükséges a SIRT1 aktivációjához, mely deacetiláz funkcióját ellátva a p53 acetilációt gátolja [91]. A SIRT1 általi p53 deacetiláció gátolja az apoptózist, ezáltal elősegíti a sejtek túlélését.

Mivel a SIRT1 katalitikus aktivitásához szubsztrátként NAD^+ -ot használ, megfelelő mennyiségű NAD^+ hiányában a SIRT1 nem képes ellátni a deacetiláz funkcióját. Ezáltal az p53 acetilációjának mértéke megemelkedik [92]. A magas p53-acetilációs szint a sejtciklus leállításához és apoptózis indukciójához vezethet. A p53 fehérje deacetilációjának elmaradása esetén megfigyelhető a pro-apoptotikus gének, mint pl. a PUMA, NOXA és a BAX indukciója [93].

A Bcl-2 család tagjai az apoptózist fokozó tumorszuppresszor gének közé tartoznak, amelyek kulcsszerepet játszanak az apoptotikus kaszkádban [94]. A PUMA a mitokondriális membránban helyezkedik el, és egy BH3 doménon keresztül kölcsönhatásba lép a Bcl-2-vel és a Bcl-xL-lel. Amikor az apoptotikus stimulusok indukálják a PUMA expresszióját, a PUMA kötődik a Bcl-xL-hez, ezáltal felszabadítva a Bax-ot [95]. A Bax transzlokál a mitokondriális membránhoz, megköti a citokróm c-t és multimerizálja az Apaf-1-et [96].

A p53 a sejtciklus regulációjában is szerepet játszik, a p21 (WAF1/ CIP1) expressziójának szabályozásával. A p21 egy ciklinfüggő kináz inhibitor, a sejtproliferáció fontos negatív szabályozója. Amennyiben az p53 fehérje acetilációja megnő, a p21 ciklinfüggő kináz inhibitor mennyisége is emelkedik, ami ez által a sejtciklus leállítását idézheti elő [97].

III.3.1. Az NMNAT enzimek

Az NMNAT enzimek a NAD^+ előállításában vesznek részt, a mentési útvonalon és a Preiss-Handler útvonalon keresztül.

A mentési útvonal [3. ábra] során a nikotinamid foszforibosziltranszferáz (NAMPT) a nikotindamidot (Nam) nikotinamid mononukleotiddá (NMN) alakítja. Illetve

a nikotinamid ribozidból (NR) nikotinamid ribozid kinázok a NMN-t képeznek [51]. Majd az NMNAT enzimek NAD^+ -ot hoznak létre azáltal, hogy az a NMN-re adenililcsoportot hidrolizálnak az ATP-ről [52].

A Preiss-Handler útvonal [3.ábra] esetén a nikotinsavat (NA) a nikotinsav foszforibozil transzferáz (NARPT) enzim, míg a nikotinsav ribozidot (NaR) az ribozid kináz (NRK) enzim nikotinsav mononukleotiddá (NaMN) alakítja át, melyet az NMNAT enzimek adenin dinukleotiddá alakítanak (NaAD^+). Végül pedig a NAD szintetáz által a NaAD NAD^+ -dá alakul [53, 54].

Az NMNAT enzimeknek 3 izofomája ismert. Az NMNAT1 a sejtmagban, az NMNAT2 a citoplazmában és a Golgi-testben, az NMNAT3 pedig a mitokondriumban lokalizálódik [20]. Az NMNAT1 izoforma sejtmagi lokalizációja és funkciója miatt összefüggésbe hozható olyan sejtmagi enzimekkel, mint például a SIRT1, és a poli-ADP-ribóz-polimeráz 1 (PARP1), melyek a nukleáris NAD^+ -készlet fő fogyasztói [14, 15]. Az NMNAT1 homozigóta hiánya az egerekben embrió korban elhalást okoztak, míg a heterozigóta NMNAT1-hiány esetén normális fejlődést figyeltek meg [98].

III.3.2. Az NMNAT enzimek szerepe az idegsejtekben

Az NMNAT1 enzimnek eddig leginkább idegrendszerben betöltött szerepét tanulmányozták. Ismert, hogy az NMNAT-1 jelenléte véd a hipoxia okozta dendrit-degenerációval szemben [99] és jelentős szerepét mutatták ki az axonális degeneráció lassításában is [100-102]. Kimutatták, hogy az NMNAT1 overexpressziója Waller-féle degeneráció folyamatában elősegíti a sérült axonok regenerációját. Ennek hátterében az NMNAT1 enzim által okozott SARM1 (sterile Alpha and Toll Interleukin Receptor Motif-containing protein 1) - gátlás áll, ami a degenerációt gátolja [103]. A Leber veleszületett amaurosis (LCA) egy genetikai betegség, amely az NMNAT fehérjével társul, ez a gyermekek örökletes vakságának egyik leggyakoribb formája. Az NMNAT1 (LCA9, OMIM 608553) gén heterozigóta vagy homozigóta mutációi olyan autoszomális recesszív állapotot eredményeznek, amelyet a látásvesztés és a retina degenerációjának súlyos korai kialakulása és gyors lefolyása jellemez [104]. Eddig megközelítőleg 30 olyan mutációról szármoltak be, amelyek az NMNAT1 gént érintik. Ezek között missense, nonsense és splicing mutációk is vannak [105-108].

Az NMNAT másik két izoformájának is fontos szerepe van az idegrendszerben. Az NMNAT2, az NMNAT1-hez hasonlóan endogén axon-fenntartó szereppel rendelkezik, vagyis megőrzi az axonok épségét a Waller-féle axon-degeneráció blokkolásával [109]. Egérmodellek alapján valószínűsíthető, hogy csökkent endogén Nmnat2-expresszió és funkció szerepet játszhat az Alzheimer-kór és a tauopathia neurodegeneratív kórképekben [110, 111].

Az NMNAT3 enzim neuroprotektív szerepéről számoltak be agysérülést követően, az agy gyógyulási folyamataiban [112]. Egy genomiális asszociációs vizsgálat során összefüggést találtak a későn megjelenő Alzheimer kór és az NMNAT3 gén mögött, az ilyen mintákban nagy gyakoriságban fordult elő az rs952797 SNP [113].

III.3.3. NMNAT1 szerepe a daganatokban

Az NMNAT-1 tumorokban betöltött szerepéről kevés információ áll rendelkezésre. T. Song és munkatársai összefüggést találtak az NMNAT1 heterozigóta deléciója és DNS-károsodással szembeni fokozott érzékenység között tüdődaganat sejtvonalban, doxorubicinnel történő kezelést követően [21]. Ez a hatás valószínűleg részben a fehérje-fehérje kölcsönhatásoknak részben pedig az enzim katalitikus aktivitása révén előállított NAD^+ -nak tulajdoníthatunk. Mint azt korábban említettük, a NAD^+ koncentrációjának és elérhetőségének változása mind metabolikus, mind pedig jelátviteli szerepét is érinti. A lokális NAD^+ -koncentráció változása az egyes sejtkompartmentekben vélhetően idővel kiegyenlítődhet, viszont a nukleáris szinten jelentkező váratlan NAD -igényt várhatóan nehezen tudják kompenzálni a sejtek egy akut genotoxikus stressz esetén.

A NAD^+ számos metabolikus úton, köztük a glikolízisben közvetít redoxreakciókat [114]. A rákos sejtek egyedülálló anyagcserével rendelkeznek a gyors szaporodás fenntartásához. Az anaerob glikolízis előnyben részesítése normál oxigénkörülmények között a rákos anyagcsere egyedülálló tulajdonsága, amit Warburg-hatásnak nevezünk. A fokozott glikolízis támogatja a nukleotidok, aminosavak, lipidek és folsav képződését is, melyek a rákos sejtek osztódásának építőkövei [115].

IV. CÉLKITŰZÉSEK

A daganatos betegség kezelésekor, az esetek jelentős részében kemoterápiát is alkalmaznak, viszont ez nem mindig kellően hatásos. Ezen kívül a kemoterápia a daganatos sejteken túl az ép - különösen a gyorsan növekvő és osztódó - sejtekre is hatást gyakorol. Ezért kiemelkedően fontos a tumor sejtek érzékenységének fokozása, mely a kezelés fokozottabb hatékonyságával és a mellékhatások csökkentésének lehetőségét rejtheti. Az NMNAT fehérjék a sejtek NAD-szintézisében részvevő enzimek, ezáltal számos biokémiai folyamatot befolyásolhatnak [20]. Viszont a tumorsejtben betöltött szerepével kapcsolatban kevés információval rendelkezünk. Ezért munkánk során célul tűztük ki:

- NMNAT1-expresszió vizsgálata humán tumor sejtvonalakban
- NMNAT1-génhiányos (knock-out) oszteoszarkóma sejtvonala előállításának és ellenőrzésének és jellemzése
- Cisplatin kezelés hatásainak összehasonlítása vad típusú és NMNAT1 KO oszteoszarkóma sejteken

Munkánk első részének eredményei alátámasztják az enzim fontos szerepét a daganatsejtekben cisplatin kezelést követően. Valószínűsítettük, hogy nem a cisplatin az egyetlen olyan vegyület, mely fokozott citotoxicitást mutat NMNAT1 KO sejteken. Ezért munkánk második részében a következő célokat fogalmaztuk meg:

- Nagy áteresztőképességű szűrővizsgálat NMNAT1 hiányában fokozott sejtpusztulást okozó gyógyszer hatóanyagok azonosításának céljából
- A szűrés során azonosított vegyületek hatásának megerősítése
- Egy, a szűrés során azonosított vegyület hatásának jellemzése vad típusú és NMNAT1 KO oszteoszarkóma sejteken

V. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

V.1. Sejtkultúra tenyésztése

A humán eredetű U2OS oszteoszarkóma sejtek tenyésztéséhez magas glükóz tartalmú (4500 mg/l) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, #12-604F, Lonza, Basel, Switzerland) tápfolyadékot használtunk, melyet 10% FBS-sel, 5 % L-glutaminnal és 5% penicillin-sztreptomycin oldattal egészítettünk ki. A sejtek tenyésztése a standard sejttenyésztési körülmények között zajlott: 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom mellett, sejttenyésztő inkubátorban. A kísérletekhez az irodalmi ajánlásoknak megfelelő 25 alatti passzázsszámú kultúrát használtunk. A sejteket mycoplasma kontaminációra rendszeresen teszteltük.

V.2. NMNAT1 KO sejtek előállítása Crispr-cas9 technikával

Az NMNAT1 KO U2OS sejteket Crispr-Cas9 technikával állítottuk elő. A transzfekcióhoz szükséges reagenst és küvettát a Lonza gyártótól rendeltünk (Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V). A gyártó által javasolt protokollt alkalmaztuk a KO sejtek létrehozásához. A sejteket ~70-80 %-os konfluencia szintig növekedtek, ezt követően tripszin segítségével emésztettük fel őket, majd pedig antibiotikum-mentes médiumban vettük fel (DMEM, #12-604F). Mintánként 10⁶ sejtet gyűjtöttünk, melyeket centrifugálást követően (100g, 10 perc) 100 µl transzfekciós reagensben vettünk fel. Ezután 2.5 µl NMNAT1 CrisPR - és 2.5 µl Homology-directed repair (HDR) plazmidot adtunk a sejtekhez. A sejteket azonnal transzfekciós küvettába mértük át, és Amaxa Nucleofector II (Lonza) készülékkel, a gyári protokoll szerinti, U2OS sejtvonalnak megfelelő programmal transzfektáltuk (X-001). A transzfektált sejtek szuszpenzióját 6 lyukú platbe pipettáztuk, mely előre melegített, antibiotikum-mentes sejttenyésztő médiumot tartalmazott (DMEM, #12-604F, Lonza). A sejtek 24 órán keresztül inkubáltuk általános sejttenyésztési körülmények között, majd a tápfolyadékot (mely tartalmazta a transzfekciós reagenseket), sejttenyésztő fülkében vákuum segítségével eltávolítottuk, majd PBS-el 1x mostuk, és előmelegített, penicillin (PEN) és sztreptomycin (STREP) mentes magas glükóz tartalmú (4500 mg/l) DMEM tápfolyadékra cseréltük át, mely 10% FBS-sel, 5 % L-glutamint tartalmazott. Ezt követte a puromicin szelekció 3 hétig, mely során a médiumot lecseréltük olyan antibiotikum mentes (PEN/STREP mentes) médiumra, mely 2.5 µg/ml puromicin antibiotikumot tartalmazott. A transzfekció hatékonyságának vizuális megerősítésére a transzfekciós rendszer részeként red

fluorescent protein (RFP) szolgált, melyet fluoreszcens mikroszkóp segítségével detektálhatunk. Így a puromicin szelekciót követően, a sejteket szortoltuk RFP fluoreszcencia alapján BD LSR II Cell Sorter (Franklin Lakes, New Jersey, USA) áramlási citométer segítségével. Az így kapott egysejt-klónokat felszaporítottuk. Az NMNAT1 expressziójának hiányát mRNA szinten qPCR technikával, fehérje szinten pedig western blot módszer segítségével bizonyítottuk.

V.3. Western blot

Az U2OS sejteket 100 µl RIPA-lízis pufferben vettük fel, mely protáz inhibitor koktélt (#M221, VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA; 1:100) és foszfatáz-inhibitor (PMSF, 1:100; # PMSF-RO, Merck, Darmstadt, Germany) tartalmazott (RIPA puffer összetétele: 50mM Tris-HCl [pH 7.4], 1%- NP40, 0,5 % Na-deoxycholate, 0,1 %-os SDS, 150 nM NaCl, 2 mM EDTA és 50 mM NaF). A sejtek feltárását szonikálással végeztük el. Ezt követően, a sejtörmeléket centrifugálással távolítottuk el (16100 g, 10 perc, 4 °C). A fehérje-koncentrációt a felülúszóból határoztuk meg Direct Detect infravörös spektrométer (EMD Millipore Corporation, Burlington, Massachusetts, USA) segítségével. Ezt követően, a lizátumokat 5 x minta-pufferrel (összetétele: 50% glicerin, 10% SDS, 100 mM DTT, 0,31 M Tris-HCl, 0,01 % brómfenolkék és steril H₂O) és β-Merkaptoetanollal (5%) egészítettük ki, majd 95 °C-on inkubáltuk 10 percig.

A mintákat a meghatározott összfehérje-koncentráció alapján 20 µg/µl koncentrációban, maximum 20 µl/lyuk térfogatban vittük fel a géltre (15 fésűs, 10 %-os, 1,5 mm-es, házilag öntött SDS-PAGE gél; A szeparáló gél összetétele: H₂O, 30% akrilamid, 0.8% bis-akrilamid, 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4 %-os SDS, 10% AMPER és TEMED. A gyűjtő gél összetétele: H₂O, 30% akrilamid, 0.8% bis-akrilamid, 0,5 M Tris-HCl [pH 6,8], 0,4 %-os SDS, 10% AMPER és TEMED).

Az elektroforézis 100 V-on történt, SDS-Tris-glycin futató pufferrel (összetétele, 1 literre vonatkoztatva, dH₂O-ban oldva: 144.1 g glicin, 30,3 g Tris-HCl, 10g SDS [pH 8,3]), melyet dH₂O-val tízszeresre hígítva használtunk.

Ezt követően, a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk át transzferpuffer (5x transzferpuffer: [pH 8,3], 1 L dH₂O-ban oldva 15.5 g Tris-HCl és 72,05 g glicin) melyből 200 ml-t használva, azt 200 ml metanollal (99.9%-os) és 600 ml dH₂O-val kiegészítve 5x hígítottunk. A membránokat 1 órán keresztül blokkoltuk 5%-os tejporban (#70166, Merck) mely 1%-os Tween20-al kiegészített 0,01% PBS-ben (1x

TBS-T) oldottunk fel. Az elsődleges antitesteket a blokkoló oldatba hígítottuk, és 4 °C-on, egész éjszakán keresztül inkubáltuk. A tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitesteket szintén az előzőekben említett módon készített blokkoló oldatban használtuk, 2 órán keresztül, szoba hőmérsékleten. Az eredmények detektálását kemilumineszcens módszerrel végeztük, ECL reagens segítségével (Super Signal, West Pico Plus, Luminol/Enhancer #1863098, Peroxidase Solution #1863099, ThermoFisher Waltham, Massachusetts, USA). A blotképek dokumentálásához Bio-Rad ChemiDoc Imager (Bio-RAD, Hercules, California, USA) készüléket használtunk. Az eredményeket ImageLab 6,0 szoftverrel értékeltük. A kísérleteinkhez használt antitesteket az 1. számú táblázat tartalmazza.

1. táblázat Antitestek western blothoz

<i>Az antitest célpontja</i>	<i>gazdafaj</i>	<i>katalógus szám</i>	<i>gyártó</i>	<i>hígítás</i>
poli-(ADP-ribóz)	egér	N/A	házipilag előállított (10H hibridóma)	1:500
NMNAT1	nyúl	sc-271557	Santa Cruz (Dallas, Texas, USA)	1:1000
β-aktin	egér	sc-47778	Santa Cruz	1:20000
BAX	nyúl	ab32503	Abcam (Cambridge, UK)	1:1000
NOXA	egér	ab13654	Abcam	1:100
p21	egér	05-655	Sigma (St. Louis, MO, USA)	1:1000
foszfo-hiszton H2AX	egér	4418-APC-100	Trevigen (Gaithersburg, MD, USA)	1:1000
Acetil-p53 (Lys379)	egér	2570S	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)	1:1000
egér IgG (HRP)	ló	7076S	Cell Signaling	1:3000
nyúl IgG (HRP)	kecske	7074S	Cell Signaling	1:1500

V.4. High Content Analysis (HCA)

V.4.1. γ H2AX detektálása

A sejteket (2×10^4 , 100 μ l/lyuk) speciális optikai sajátosságokkal rendelkező mikroplate-be pipettáztuk (Cell Carrier-96 ultra, PerkinElmer, Waltham, MA, USA), majd 24 órán keresztül növekedtek. Ezt követően, a kísérleti paramétereknek megfelelően kezeltük a sejteket. A kezelési idő letelte után 3 % formaldehid/PBS oldattal 15 percig fixáltuk a sejteket szobahőmérsékleten. Ezután 3x mostuk PBS-sel, és 15 percen keresztül inkubáltuk blokkoló oldattal (5% BSA PBS-ben), szobahőmérsékleten. Az anti-foszfo-H2AX antitestet a blokkoló oldatba hígítottuk, és 2 órán keresztül inkubáltuk. A másodlagos antitesteket a blokkoló oldatba hígítottuk és 1 órán keresztül inkubáltuk. Ezt követően a sejteket 2x mostuk PBS-sel, majd pedig 5 percig szobahőn PBS-be hígított 4',6-Diamidino-2-fenilindol-dihidrokloriddal (DAPI) festettük sejtmagokat. Ezt követően a sejteket 3x mostuk PBS-sel, majd pedig 100 μ l PBS-ben tartottuk a detektálásig.

A mikroszkópos felvételeket Opera Phenix High Content Analyzer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) készüléssel készítettük, 10x objektívvel (NA 0,3). A felvételek kiértékelését a beépített Harmony szoftverrel végeztük, melynek során három különböző sejtmorfológiát tudunk elkülöníteni: normál sejteket, amelyek nem tartalmaztak foszfo-H2AX (γ -H2AX) jelet; pöttyözött sejtek, amik γ -H2AX-gócokat tartalmaztak; és fragmentált sejteket, amelyek kondenzált morfológiát mutattak, diffúz γ -H2AX jellel. A Harmony (PerkinElmer) szoftver segítségével automatizált módon határoztuk meg az egyes csoportokba tartozó sejtek számát és egymáshoz viszonyított arányát.

V.4.2. Kaszpáz-aktiváció vizsgálata

A sejteket (2×10^4 /mL, 100 μ l/lyuk) 96 lyukú platebe (#6055302, Cell Carrier Ultra, Perkin Elmer) pipettáztuk, majd 24 órán keresztül növesztettük. A következő napon fél órán keresztül előkezeltük a sejteket 50 μ M z-DEVD-FMK kaszpáz-gátlóval (#S7312, Selleckchem), majd 5 μ M cisplatinnal (Accord) (a kontroll sejtek esetén médiummal) kezeltük sejteket. A sejtek a kezelési idő letelte után 50 μ l végtérfogatban inkubáltuk CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagenssel, 7 μ M végkoncentrációban. A plateket Opera Phenix High-Content Analyzátorba helyeztük, a készülék környezeti kontrollt (5% CO₂, 37 °C) képességét kihasználva 11 órán keresztül végeztük a mérést, óránként detektálva a fluoreszcens jel megjelenését, 502/530 nm-en. Az analízis Harmony szoftverrel (PerkinElmer) készült.

V.4.3. Sejtproliferáció mérése

A sejteket (10^3 db/100 μ l / lyuk) Cell Carrier ultra 96 ultramikroplatekbe plateltük (Perkin Elmer) és 24 órán át növesztettük. Másnap ActD-t (1,25 nM; # S8964, Selleckchem) adtunk hozzá, és a sejteket 4 napon keresztül inkubáltuk. A PARP inhibitorokkal végzett kísérletek során ActD kezelés előtt 30 perccel az olaparibot (S1060, Selleckchem, 10 μ M végkoncentrációban) vagy PJ34-et (S7300, Selleckchem, 10 μ M végkoncentrációban) adtuk a sejtekhez. Négy nap elteltével a lemezeket egy Opera Phenix HCA (Perkin Elmer) analízátorba helyeztük, és a sejtek számát fáziskontraszt üzemmódban készült mikroszkópos felvételek alapján határoztuk meg a Harmony szoftver (Perkin Elmer) segítségével.

2. táblázat A High Content Analysis során használt festékek és antitestek

<i>Termék</i>	<i>gazdafaj</i>	<i>katalógus szám</i>	<i>gyártó</i>	<i>hígítás /koncentráció</i>
anti-foszfo-H2AX	egér	4418-APC-100	Trevigen	1:1000
anti-rabbit, Alexa Fluor 488	kecske	A1108	Invitrogen	1:2000
CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection	-	C10423,	Thermo Fischer	7 μ M
DAPI	-	#013606	Molecular Probes	0.5 μ g/ml

V.5. Életképesség vizsgálata

Az életképesség vizsgálatára Calcein AM életképességi esszét használtunk. A calcein vagy más néven fluorescein egy fluoreszcens festék, melynek gerjesztési hullámhossza 495 nm míg emissziós hullámhossza 515 nm. A biológiai rendszerekben a calcein acetoximetil származékát használjuk, ami a sejtek belsejébe bejut, az élő sejtekben működő intracelluláris észteráz enzimek hidrolizálják az acetoximetil-csoportot, ami fluoreszcens jelet ad. Mivel a halott sejtekben az észterázok nem aktívak, így csak az élő sejtek esetén detektálható a gerjesztést követően zöld fluoreszcens jel. A sejteket 96-lyukú sejtenyésztő edényben növesztettük (2×10^4 /ml sejt, 100 μ l/lyuk), 24 órán keresztül. A következő nap a kísérleti paramétereknek megfelelően kezeltük a sejteket. A kezelési idő letelte után, a sejtek felülúszóját eltávolítottuk, majd 50 μ l Calcein-AM (#17783, Merck) oldattal festettük, 1 μ M végkoncentrációban, 1 órán keresztül, 37 °C-on. A sejtekből felszabaduló fluoreszcens jelet (EX/EM: 485 nm/530 nm) Tecan Spark

20M (Tecan, Männedorf, Switzerland) multimode reader-el mértük Az életképességet a kezeltlen kontroll százalékában fejeztük ki.

V.6. Klonogén aktivitás mérése

Az U2OS sejteket 6 lyukú platekbe mértük ((#92006, TPP), 1×10^3 db sejt/ml). 24 óra elteltével a sejtek $10 \mu\text{M}$ PJ34 (P4365, Merck) vagy $10 \mu\text{M}$ Olaparib (S1060, Selleckchem) előkezelést kaptak 30 percig, ezt követően pedig $5 \mu\text{g/mL}$ ciszplatinnal (Accord) kezeltük. A sejteket 6 napig inkubáltuk, majd a telepeket manuálisan számoltuk, 20%-os etanolban oldott 0,5 %-os kristályibolyával történő festést követően.

V.7. LDH-felszabadulás mérése

Az sejtek felülúszójába kiszabadult laktát dehidrogenáz LDH mennyiségének meghatározásához LDH-assay kit-et használtunk (#786-210, GBiosiences, St. Louis, MO, USA). A sejteket 96-lyukú sejtenyésztő platekben növesztettük (2×10^4 /ml sejt, 100 μl /lyuk), 24 órán keresztül. A következő napon a sejteket $5 \mu\text{g/mL}$ ciszplatinnal (Accord), vagy 40 nM ActD-vel kezeltük, $50 \mu\text{M}$ DEVD-fmk (kaszpáz-gátlószer) vagy $1 \mu\text{M}$ Nec1 (nekroptózis-gátlószer) előkezelést (30 perc) követően 24 óráig. A pozitív kontrollokat a kithoz mellékelt LDH lízispuffer segítségével készítettük el, melyet 1:10 arányban mértünk a sejteken lévő felülúszóhoz. A platet centrifugáltuk (800 g-n 5 percig szobahőn), majd a felülúszót legyűjtöttük egy üres 96 lyukú platbe. Vaknak médiumot használtunk. Az LDH puffert desztillált vízzel 1:20 arányban hígítottuk. Az így elkészített assay puffert 1:1 arányban adtuk a mintákhoz. 20 percig inkubáltuk sötétben, majd Tecan Spark 10M mikroplatereader segítségével 490 nm-en detektáltuk az abszorbanciát.

V.8. Teljes sejtes NAD-szint mérése

NAD⁺-tartalom meghatározása NAD-assay kittel történt (NAD/NADH Quantitation Kit. #MAK037-1KT, Merck). A sejteket 6 lyukú TPP sejtenyésztő platekbe (TPP, cat#92006) ültettük ki és 24 órán át növesztettük. Másnap a sejteket $5 \mu\text{g/mL}$ ciszplatinnal (Accord), vagy 40 nM ActD-vel kezeltük 24 órán keresztül, míg a bazális NAD-tartalom meghatározáshoz a sejteket kezelés nélkül, 24 órás tenyésztést követően NAD extrakciós pufferben vettük fel. A sejtlizátumból a felülúszót 13000 g-n, 4°C-on 10 percig tartó centrifugálással nyertük ki. A felülúszóból a fehérjekoncentrációt Direct Detect spektrométerrel (EMD Millipore Corporation) határoztuk meg. A standardekét a kithoz mellékelt NAD-standardból hígítottuk ki. A vak minta a NAD extrakciós puffer volt. A

NAD-cycling enzimet 1:50 arányban hígítottuk NAD-cycling pufferrel. A mintákat és a hígított NAD-cycling enzimet, 1:1 arányban, 96 lyukú, half-area platebe (Costar, ref#3697) mértük össze. A mintákhoz 1:10 arányban NAD-developer oldatot adtunk. Ezt követően, 37 °C-on 2 órán át inkubáltuk plate-shakeren a mintákat, folyamatos keverés (300 RPM) mellett. A fluoreszcenciát 450 nm-en, Tecan Spark 10M mikroplatereaderrel mértük. A fluoreszcencia intenzitásokat fehérje-tartalomra normalizáltuk.

V.9. Teljes sejtes ATP-szint mérése

A sejteket 6 lyukú platekbe pipettáztuk ((#92006, TPP). Másnap a sejteket kezeltük (50 μ M DEVD-FMK, 1 μ M Necrostatin1, 5 μ g/mL ciszplatin vagy 40nM ActD). A kezelési idő lejártát követően a sejteket PBS-el mostuk, majd ATP-assay pufferben vettük fel. 1×10^6 db sejt/minta sejtszámot használtunk. Ezt követően, 5 percig 4°C-on, 13 000g –n centrifugáltuk a sejteket, majd a felülúszót új eppendorf csövekbe mértük át. Az assay összeállításáig jégen tároltuk a mintákat.

Az ATP-tartalom meghatározása ATP-assay kittel történt, a gyártó utasításai alapján (#110M6101, Merck). A méréshez 96-lyukú mikroplateket használtunk. A reakcióhoz szükséges vak az ATP-assay puffer volt, melyből 50 μ L/lyuk mennyiséget használtunk. A standardsor elkészítéshez a 10mM –os standard oldatot hígítottuk úgy, hogy 0.2–1 nmol/lyuk koncentrációban legyen 50 μ L/lyuk mennyiségben plateben. A pufferoldattal hígított mintákat is 50 μ L/lyuk mennyiségben mértük a platbe. Az ATP reakció mix-ből 50 μ L-t adtunk a vakhoz, standardekhez és a mintákhoz is. 30 percig sötétben inkubáltuk a platet. A fluoreszcencia mérést Ex/Em= 535/587 nm –en plate readerrel végeztük el (Tecan Spark 20M, Tecan). ATP tartalmat fehérje-mennyiségre normalizáltuk.

V.10. Sejtanyagcsere vizsgálata Seahorse metabolikus analizátorral

U2OS WT és NMNAT1 KO sejteket (1×10^5 db sejt/lyuk) DMEM-ben plateltük XF96 cell culture mikroplatbe (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, California, USA) és egy éjszakán keresztül növekedtek 5% CO₂ és 37°C-on.

A szükséges próbák rehidrációját dH₂O-val végeztük egy éjszakán át, majd ezt Seahorse Bioscience XF96 calibrant oldatra (pH 7.4) (Part No: 100-840-000) cseréltük. A szenzorokat a kalibrációs oldatban 2 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk CO₂ hiányban. A mérést Seahorse XF96 Analyzer (Agilent Technologies) készülékkel végeztük el. XF Cell Mito Stress analízist a gyártó utasításai szerint végeztük [116], a következő módosításokkal: A mitochondriális inhibitorok végső koncentrációja a következőkre

módosítottuk: 2 μ M oligomicin, 0.5 μ M FCCP, és 1 μ M antimicin-A. A mérést követően, mintáinkat 10% TCA-val fixáltuk, majd lyukanként meghatároztuk a fehérje tartalmat, szulforodamin B (SRB) esszé segítségével [117]. Eredményeinket fehérje tartalomra normalizáltuk.

V.11. RNS izolálás sejtkultúrából

Az RNS izolálása TRIzol reagenssel történt (Tri-RNA reagent, #FATRR001, Amplicon, Odense, Denmark) a gyártó utasítási alapján.

V.12. Valós idejű kvantitatív PCR (RT-QPCR)

A mérés a LightCycler 480 thermocycler (Roche, Basel, Switzerland) készülékkel történt, SYBR Green oldattal (SyberGreen, #4472908, Applied Biosystems, Foster City, California, USA) a gyártó által meghatározott protokoll szerint. A mintákat triplikátumban, 10 μ l mennyiségben vittük fel a plate-re, és az adatokat normalizáltuk a háztartási gének matematikai átlagához (36B4 és cyclophilin). Az primerek szekvenciáját a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat Kvantitativ PCR-hez használt primerek szekvenciái

Primers	Fw	Rw
<i>hNMNAT1</i>	AAAGGCCTGGAAGGAAGAGG	CCCATAGTTGGCCACGATT
<i>hNMNAT2</i>	CATATTCCTGGTGGCATCT	CTGGTCCTGCCTATGTGGTT
<i>hNMNAT3</i>	GCGCACATCCAGGAAATAGT	TGGCACTGATCTCATTCTGC
<i>hBAX</i>	CTGCAGAGGATGATTGCCG	TGCCACTCGGAAAAAGACCT
<i>hNOXA</i>	CTGGAAGTCGAGTGTGCTACTC	TGAAGGAGTCCCCTCATGCAAG
<i>h45S</i>	ACCCACCCTCGGTGSGA	CAAGGCACGCCTCTCAGAT
<i>h18S_45S</i>	CTCACCACGGGAAACCTCAC	CGCTCCACCAACTAAGAACG
<i>hTIGAR</i>	ATGAGGACAAAGCAGACCATGC	GCTTTGCCTTCTACAACCCC
<i>hPUMA</i>	GAGCAGGGCAGGAAGTAACAA	GGCAGACCCCATGCCAAAT
<i>hp21</i>	AGTCAGTTCCTTGTGGAGCC	CATTAGCGCATCACAGTCGC
<i>h36B4</i>	CCATTGAAATCCTGAGTGATGTG	GTCGAACACCTGCTGGATGAC
<i>hcyclophilin</i>	GTCTCCTTTGAGCTGTTTGCAGAC	CTTGCCACCAGTGCCATTATG

V.13. Életképesség mérése nagy áteresztőképességű szűréssel

A szűréshez egy 774 db vegyületet tartalmazó FDA (US Food and Drug Administration) által jóváhagyott molekulakönyvtárat használtunk: Screen-Well® FDA approved Drug Library (BML-2843-0100, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA). Minden plate négy kezeletlen lyukat (CTL) tartalmazott.

A sejteket (2×10^4 db sejt / 100 μ L / lyuk) 96-lyukú sejttenyésztő platekbe mértük és 24 órán át növesztettük. A könyvtár vegyületeit Tecan Freedom EVO folyadékkezelő robottal vittük a platekre, 10 μ M végkoncentrációban. A sejteket 24 órán át inkubáltuk a molekulakönyvtár vegyületeivel. A sejtek életképességét Calcein-AM (# 17783, Merck) oldat hozzáadásával (50 μ l/lyuk, 1 μ M végkoncentráció) határoztuk meg, meg a V.5. fejezetben leírtaknak megfelelően. Az életképességet a kezeletlen kontroll százalékában fejeztük ki, majd százalékos citotoxicitásban fejeztük ki.

V.14. Citotoxikus találatok validálása

A szűrés során hatásosként azonosított vegyületek citotoxicitását életképességi Calcein-AM esszével vizsgáltuk, melyhez egy széles tartományú koncentráció-sorozatot készítettünk (1,22 nM - 40000 nM között). Ehhez a sejteket (2×10^4 db sejt / lyuk, 100 μ l/lyuk) 96 lyukú platekben tenyésztettük 24 órán át. A vegyületeket különböző vállalatoktól vásároltuk meg (4. táblázatban összefoglalva). A sejtek életképességének meghatározására a fent leírtak szerint (lásd V.5. fejezet) történt. A kapott életképességi adatokból citotoxicitást számoltunk.

4. táblázat A kezelésekhez használt vegyületek

Vegyület	katalógusszám	Gyártó
Z-DEVD-fmk	S7312	Selleckchem
Necrostatin 1	480065	Calbiochem (Billerica, MA, USA)
Actinomycin D	S8964	Selleckchem

Daunorubicin	D8809	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Bortezomib	HY-10227/CS-1039	MedChemExpress (New Jersey, NJ, USA)
Digoxin	D6003	Sigma
Doxorubicin	OGYI-T-8808/04	Teva (Debrecen, Hungary)
Mitoxantron-dihydrochlorid	M6545	Sigma
Teniposide	1787	Selleckchem
Idarubicin	S1228	Selleckchem
Epirubicin	S1223	Selleckchem
RNAse	R4875	Sigma
Propidium iodide	P4864	Sigma
PJ-34	S7300	Selleckchem
Olaparib	S1060	Selleckchem

V.15. Sejtciklus-analízis áramlási citometriával

1. A sejtciklus szinkronizálása

A sejtciklus szinkronizálása szérumbiztosítással történt. A sejteket T25 sejtenyésző flaskában (# 90026, TPP, Trasadingen, Svájc) növesztettük 1 napig, és amikor elérték a kb. 60% -os konfluenciát, egyszer PBS-sel mostuk, és 24 órán át a szérumbiztosítós tápfolyadékban tartottuk őket. A sejteket PBS-sel történő mosást követően, tripszinezttük és Falcon-csővekbe helyeztük.

2. A minták előkészítése

A sejteket 300 x g sebességgel 5 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót eldobtuk, és a sejteket 3 ml PBS-ben szuszpendáltuk. A sejteket ismét 300 x g-vel centrifugáltuk 5 percig. A felülúszót eldobtuk, és a sejteket 400 µl PBS-ben szuszpendáltuk. Ezután lassan 3 ml 70% -os jéghideg etanol adunk a sejtekhez, és a mintákat jégre helyeztük 30 percre. Az inkubációs idő után a sejteket 5 percig centrifugáltuk 300 x g sebességgel. A felülúszót

eldobtuk, és a sejteket 3 ml PBS-sel mostuk. Ezt követően a felülúszót eldobtuk, és a sejteket 500 µl PBS-sel szuszpendáltuk, majd 50 µl RNáz-A oldatot (Sigma) és 5 µl propidium-jodidot (PI) (Sigma) mértünk a sejtekhez. A mintákat az elemzés előtt szobahőmérsékleten 1 órán át sötétben inkubáltuk.

RNáz-A oldat: 50 mg RNáz A-t (Sigma, R4875) feloldunk 50 ml PBS-ben és 0,1% Tween-20 és 5 mM EDTA-ban. Az oldatot 95 °C-os vízfürdőbe tesszük 30 percre. Ezt követően az oldat jégen 1 órán át hűlt. Az oldat csapadékát 0,2 µm-es szűrővel eltávolítottuk.

Propidium-jodid (PI) oldat: A PI törzsoldatot (Sigma, P4864) dH₂O-ban, a koncentráció 1 mg / ml végkoncentrációra hígítottuk.

3. Sejtciklus elemzés áramlási citometriával

Az elemzést a Novocyte 3000 (Acea Biosciences, Santa Clara, CA, USA) áramlási citométerrel végeztük.

V.16. Statisztikai analízis

A kísérleteket legalább háromszor elvégeztük, a három kísérlet számított átlagát ábrázoltuk ± SEM. A statisztikai elemzéshez a GraphPad Prism 9-et (La Jolla, Kalifornia) használtuk. Az adatok normál eloszlását D'Agostino-Pearson teszttel határoztuk meg. Valamennyi adat normál eloszlást mutatott, és kétutas ANOVA teszt segítségével elemeztük, amelyeket Sidak, Tukey vagy Dunett poszt-hoc tesztek követtek. A poszt-hoc teszt aktuális típusát minden ábránál külön jelöltük.

VI. EREDMÉNYEK

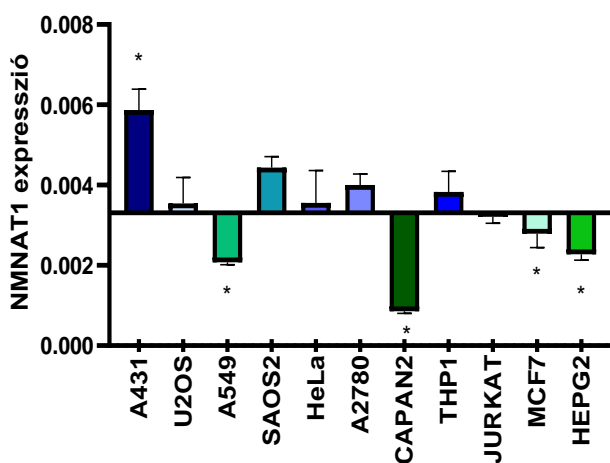
VI.1. Tumorsejtek NMNAT1-expressziójának vizsgálata és NMNAT1 génhányos sejtvonal előállítás.

VI.1.1. NMNAT1-expresszió vizsgálata humán tumor sejtvonalakban

Az NMNAT enzimek a NAD^+ szintézisében vesznek részt, a mentési és a Preiss-Handler útvonalon keresztül [3. ábra] [51]. A NAD^+ legismertebb feladata az elektronszállítás, de szubsztrátként több fontos jelátviteli folyamathoz nélkülözhetetlen, ilyen például a PARiláció folyamata és a SIRT enzimek által katalizált deacetiláció. Ezen folyamatok szerepet játszanak a sejtek túlélésében, a transzkripció, apoptózis és a sejtciklus szabályozásában [71].

Az irodalomban kevés információ érhető el tumor sejtvonalak NMNAT1 mRNS expressziós szintjéről. Ezért tizenegy különböző humán tumor sejtvonalban vizsgáltuk meg az NMNAT1 mRNS-expresszióját (4. Ábra). A sejtvonalak eredete megtalálható a 4. táblázatban. Az transzkriptum az összes sejtvonalban kimutatható volt, és különböző szinten expresszáldott. Az átlagos expressziós szinthez képest az A431 sejtek szignifikánsan magasabb NMNAT1 mRNS expressziót mutattak, míg az A549, Capan2, MCF7 és HepG2 sejtvonalakban szignifikánsan alacsonyabb expressziót tapasztaltunk. A további vizsgálatainkhoz egy átlagos NMNAT1 mRNS expresszió szintet mutató sejtvonalat - az oszteoszarkóma eredetű U2OS-t – választottuk.

5. táblázat: sejtvonalak eredete

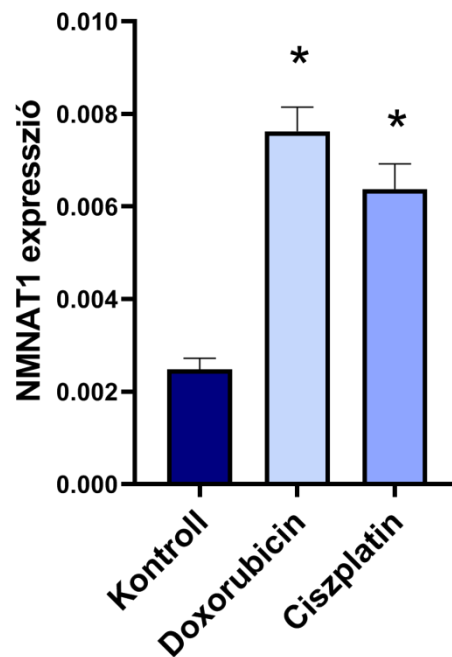


Sejtvonal	Sejtvonal eredete
A431	epidermális karcinóma
U2OS	oszteoszarkóma
A549	alveoláris bazális hámsejtek
SAOS2	oszteoszarkóma
HELa	méhnyakrák
A2780	petefészek karcinóma
CAPAN2	hasnyálmirigy adenocarcinoma
JURKAT	leukémiás T-sejtes limfoblaszt
THP1	humán leukémia monocita sejtvonal
MCF7	epitheliás sejtek mellrákból
HEPG2	máj daganat

4. ábra. A nikotinamid mononukleotid adenilil-transzferáz – 1 (NMNAT1) bazális mRNS expressziója különböző sejtvonalokon. A grafikon a tesztelt sejtvonalak NMNAT1 háztartási génekhez képest mutatott relatív expressziós szintjét mutatja, alapvonalként az átlagos expressziós szintet alkalmaztuk (\pm SEM). A csillagokkal jelölt oszlopok szignifikánsan eltérnek az átlagtól (Student – Newman – Keuls teszt; * $p < 0,05$, $n = 3$)

VI.1.2. Genotoxikus stressz hatása az NMNAT1 expressziójára

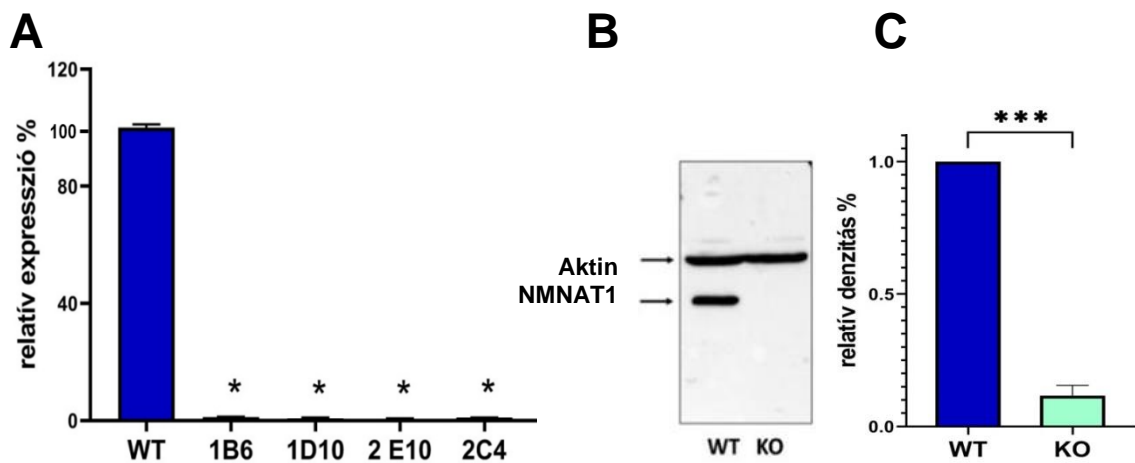
Az oszteosarkóma terápiában is használt DNS-t károsító kemoterápiás szerekkel, ciszplatinnal (cisz-diamminediklór-platina (II)) és doxorubicinnel kezeltük 24 óráig az U2OS sejteket. A kezelés hatására az oszteosarkóma sejtekben szignifikánsan nőtt az NMNAT1 mRNS expressziója (5. ábra). Ez alapján valószínűsíthető, hogy az enzimnek fontos szerepe lehet a DNS-károsodást követően, a sejtek túlélésében. További vizsgálatainkat ciszplatinnal végeztük.



5. ábra: *NMNAT1 mRNS expressziójának változása doxorubicin - és ciszplatin - kezelés hatására.* Az NMNAT1 gén indukcióját 24 órás doxorubicin (2 g / ml) vagy ciszplatin (6,25 g / ml) kezelést követően határoztuk meg. A csillagokkal jelölt oszlopok szignifikánsan eltérnek a kontrolltól (Dunnett-teszt; * $p < 0,05$, az ábrázolt adatok három kísérlet átlagát mutatják, (\pm SEM)). A kísérletek Dr. Ráduly Arnold közreműködésével készültek el.

VI.1.3. NMNAT1-génhiányos sejtvonal előállítása és ellenőrzése

Az NMNAT1-nek specifikus farmakológiai gátlószere nem ismert, ezért szerepének vizsgálatához az NMNAT1 gént CRISPR-Cas9 technológiával inaktiváltuk. Az eljárást követően a puromicin-rezisztens sejteket szelektáltuk, és az NMNAT1 knockout (KO) sejtekből áramlási citometriával történő szortolással egysejt-klónokat nyertünk (1B6, 1D10, 2E10, 2C4 elnevezésű klónok). Az NMNAT1 KO sejtek NMNAT1-expresszióját mRNS és fehérje szinten is megvizsgáltuk. Egyik NMNAT1 KO klón esetében sem volt tapasztaltunk jelentős NMNAT1 mRNS expressziót (6A. ábra). További kísérleteinkhez az 1B6 klónt használtuk. Western blot módszer segítségével bizonyítottuk, hogy az NMNAT1 fehérje nem mutatható ki az 1B6 elnevezésű klónból származó sejtvonalban (6B. és 6C. Ábra).



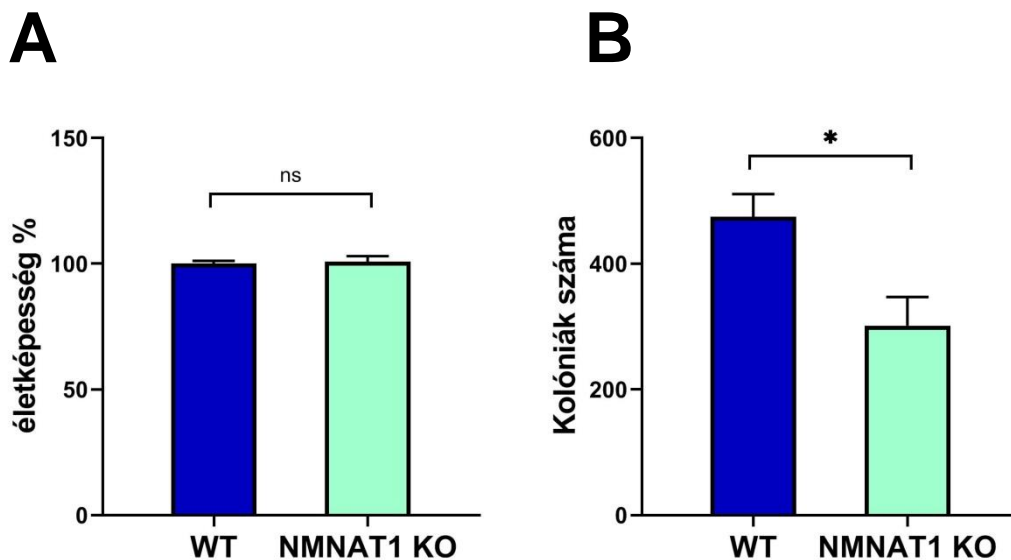
6. ábra: Az NMNAT1 KO sejtvonal ellenőrzése

Az NMNAT1 knockout (KO) sejtvonalakat CRISPR-Cas9 technológiával állítottuk elő. A puromicin-rezisztens sejteket szelektáltuk és egysejt-klónokat növesztettünk (1B6, 1D10, 2E10, 2C4). Az NMNAT1 mRNS szintjét minden klónban RT-QPCR-módszerrel mértük. Az eredményeket a vad típusú U2OS sejtvonal (WT) NMNAT1-expressziójának százalékában fejezzük ki. A csillagokkal jelölt oszlopok szignifikánsan eltérnek a kontrolltól (Dunnett-teszt; * $p < 0,05$) (A). Az 1B6 klónt választottuk a további vizsgálatokhoz (későbbiekben az egyszerűség kedvéért NMNAT1 KO vagy KO sejtvonalként jelöljük). Az NMNAT1 fehérjét vad típusú (WT) és az NMNAT1 KO (KO) sejtvonalban Western blot (B) alkalmazásával detektáltuk. A blotok kvantitatív kiértékelést 3 független kísérlet alapján végeztük (C) (T-próba *** $p < 0,001$). Az ábrázolt adatok három kísérlet átlagát mutatják \pm SEM. Az áramlási citometriás szortolás Dr. Tarapcsák Szabolcs segítségével készült el. A QPCR és western blot kísérletek Dr. Ráduly Arnold közreműködésével készültek el.

VI.1.4. Az NMNAT1 KO sejtek jellemzése

VI.1.4.1. Életképesség és kolóniaképző aktivitás vizsgálata

Mivel irodalmi adatok jelenleg nem elérhetőek az NMNAT1 hiányának fenotípusos következményeivel kapcsolatban, a továbbiakban összehasonlítottuk a két sejtvonalt néhány alapvető fiziológiai sajátosságát (életképesség, proliferáció, NAD⁺ - és ATP-tartalom, metabolikus útvonalak aktivitása, kemoszenzitivitás). Vizsgálataink alapján, a vad típusú és az NMNAT1 KO sejtvonalt életképességében nincs különbség (7A. Ábra). Ezzel szemben, a kolóniaképző aktivitás csökkent az NMNAT1 enzim hiányában (7B ábra).

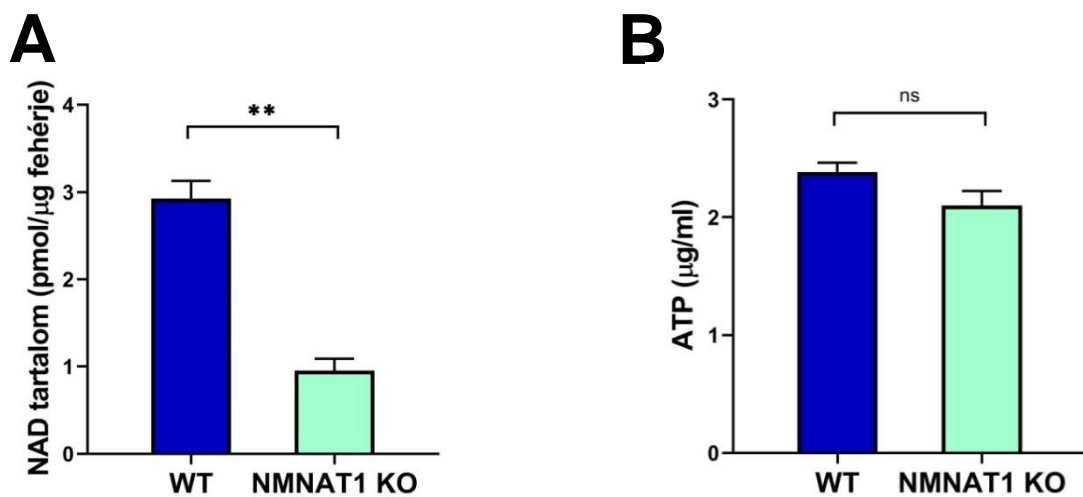


7. ábra: Az NMNAT1 KO sejtek életképességének és kolóniaképző aktivitásának vizsgálata. Az életképességet Calcein AM esszé segítségével vizsgáltuk (A). Eredményeinket a vad típusú sejtek életképességének százalékában ábrázoltuk. A kolóniaképző aktivitást a plateléstől számított a 6. napon értékeltük, a kristály-ibolyával festett telepek számának manuális meghatározásával (B). (Student's t teszt; * $p < 0,05$, n.s. \therefore nem szignifikáns). Az ábrázolt adatok három kísérlet átlagát mutatják \pm SEM.

VI.1.4.2. NAD⁺- és ATP-tartalom mérése

Az emlőssejtekben általában két fő szubcelluláris NAD⁺-készlet van, a sejtmagi - és citoplazmatikus NAD⁺ készlet, valamint a mitokondriális NAD⁺ készlet. A sejtmagi és a citoplazmatikus NAD⁺ készletet azért tekinthetjük egy egységnek, mert a NAD⁺ számára nukleáris membrán szabadon átjárható [20, 62]. Mivel a belső mitokondriális membrán a NAD⁺ számára átjárhatatlan, a mitokondriális NAD⁺-nak vagy a NAD⁺ importálásából vagy NAD⁺-prekursorokból kell származnia a citoszolból. Ez vagy transzportereken keresztül zajlik, vagy közvetett csere útján, a malát-aszpartát transzferen (MAS) keresztül történik, ahol a NAD⁺ a mitokondriumból NADH-ért cserébe kerül a mitokondriumba [121-123].

Az NMNAT enzimek két útvonalon keresztül is részt vesznek a NAD⁺ szintézisében, a mentési és a Preiss-Handler útvonalon keresztül [3. ábra] [51]. A teljes sejtes NAD⁺-szint mérését elvégezve elmondható, hogy az NMNAT1 KO sejtek NAD⁺ -tartalma vad típusú sejtvonalon (WT) képest körülbelül az egyharmadára csökkent (8A. Ábra) az NMNAT1 gén inaktiválásának hatására. Ez azt jelezheti, hogy az NMNAT1 enzim meghatározó szerepet játszik az U2OS sejtek NAD⁺-szintézisében és annak fenntartásában. Érdekes, hogy az alacsonyabb NAD⁺-szintek az NMNAT1 KO sejtekben nem csökkentették szignifikánsan az ATP-szintet (8B ábra).

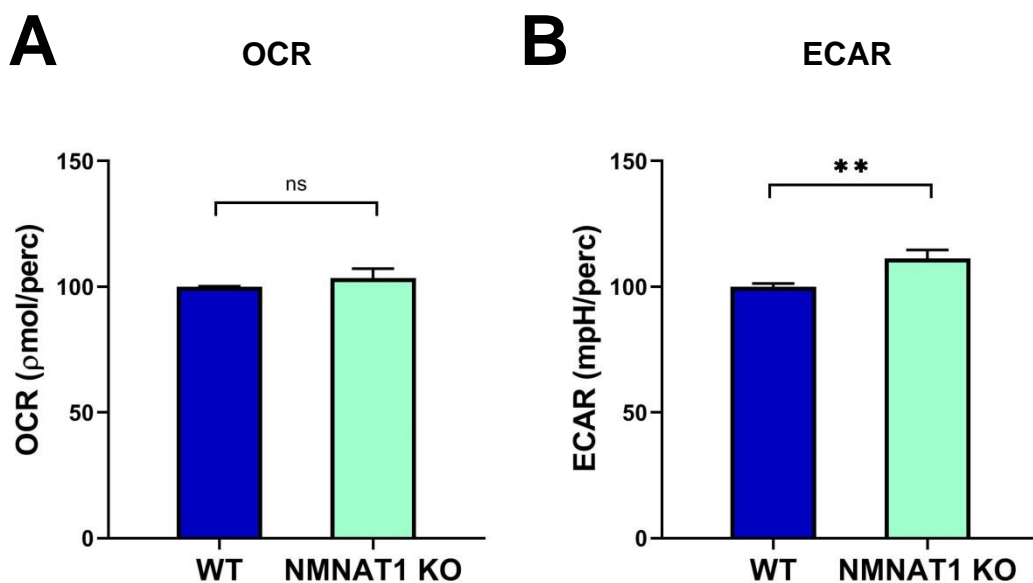


8. ábra: Az NMNAT1 KO sejtek NAD - és ATP tartalmának meghatározása. A sejtek NAD⁺ - (A) és ATP-szintjét (B) sejtlyázátumokból határoztuk meg és fehérjetartalomra normalizáltuk. A csillagokkal jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek (Student's t teszt; ** $p < 0,01$, n.s.: nem szignifikáns. Az ábrázolt adatok 3 kísérlet átlagát mutatják \pm SEM.

VI.1.4.3. Az NMNAT1 szerepének vizsgálata a sejtek energia-metabolizmusában

A NAD⁺ központi szereppel rendelkezik a sejtek energiametabolizmusában, mivel elektronhordozóként részt vesz a glikolízisben, oxidatív foszforilációban és a trikarbonsav (TCA) ciklusban, mely során az elektronokat az elektrontranszport láncnak juttatja el. Ezáltal az eukarióták képesek hatékonyan ATP-t képezni. A NAD⁺ foszforilált formája a NADP⁺, amely hidrogén-akceptorként (NADPH), részt vesz az oxidatív stressz elleni védelemben, valamint az anabolikus útvonalakban, például zsírsavszintézisben [57].

A metabolikus útvonalak vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az NMNAT1 hiánya nem befolyásolta a sejtlégzést, amit a változatlan mértékű oxigénfogyasztás (OCR: oxygen consumption rate, 9A ábra) jelez. Viszont a glikolitikus aktivitás (ECAR: ecar extracellular acidification rate), szignifikánsan magasabbnak bizonyult NMNAT1 hiányában a vad típusú sejtvonalhoz képest (9B ábra).



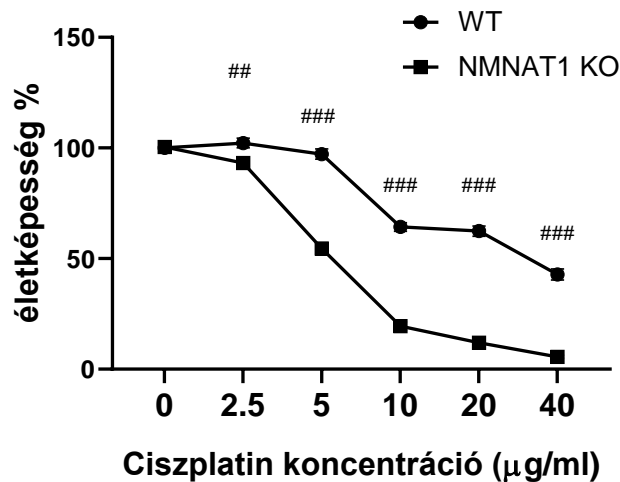
9. ábra: Az NMNAT1 KO sejtek metabolikzs vizsgálata Az oxigénfogyasztási sebességet (OCR) / oxidatív foszforilációt (A) és extracelluláris savasodási sebességet (ECAR) / glikolitikus aktivitást (B) Seahorse metabolikus analízátorral határoztuk meg. A csillagokkal jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek (Student's t teszt; ** $p < 0,01$, n.s. : nem szignifikáns). Az ábrázolt adatok 3 kísérlet átlagát mutatják \pm SEM.

VI.2. Az NMNAT1 szerepének vizsgálata cisplatinnal kezelt oszteoszarkóma sejteken

VI.2.1. Életképesség vizsgálata

Az NMNAT1 enzim az U2OS sejtek NAD^+ -szintjének kialakításában és fenntartásában fontos szerepet tölt be, a NAD^+ pedig szubsztrátként számos jelátviteli folyamat részvevője (pl. PARliáció és SIRT függő deacetiláció), így feltételezhetően az enzim hiánya a tumorsejtek érzékenységére is hatással lehet. Erre utal az a megfigyelésünk is, mely szerint a fehérje expressziójának emelkedése tapasztalható, doxorubicin vagy ciszplatin kezelés hatására (5. ábra). T. Song és munkatársai is összefüggést találtak az NMNAT1 hiánya és DNS-károsodással szembeni fokozott érzékenység között tüdődagányat sejtvonalon, doxorubicinnel történő kezelést követően [21].

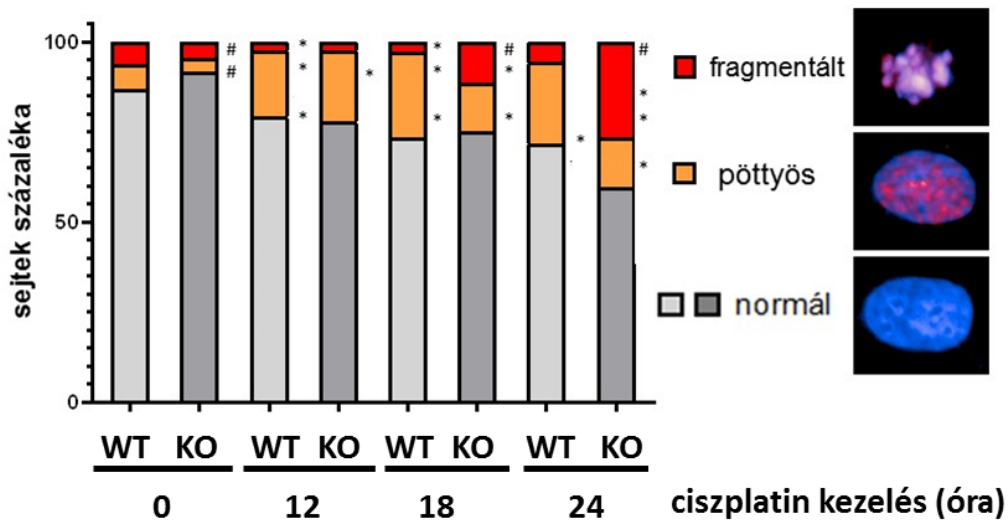
A KO sejtek kemoszenzitivitásának vizsgálata céljából egy ciszplatin koncentráció sor (0-40 $\mu\text{g/ml}$) segítségével hasonlítottuk össze a két sejt vonal ciszplatinnal szembeni érzékenységét. Megállapítottuk, hogy az NMNAT1 hiánya fokozott sejtpusztulást eredményezett a vad típusú sejtekhez képest. (10. ábra).



10. ábra A vad típusú és NMNAT1 KO U2OS sejt vonalak kemoszenzitivitásának összehasonlító vizsgálata. A vad típusú (WT) és a knockout (NMNAT1 KO) sejtek kemoszenzitivitását Calcein AM életképességi vizsgálattal hasonlítottuk össze, 24 órával a ciszplatin koncentrációssal (0–40 $\mu\text{g/ml}$) történő kezelést követően. Az eredményeket a kezeletlen sejtek életképességének százalékában fejeztük ki. A kettős keresztekkel jelölt adatpontok szignifikánsan különböznek vad típusú és NMNAT1 KO sejtek azonos koncentrációval történt kezelése esetén (Bonferroni teszt; ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$). Az ábrázolt adatok 3 kísérlet átlagát mutatják \pm SEM.

VI.2.2. DNS-károsodás vizsgálata

A ciszplatin egy DNS-keresztalkotó szer, amely közvetett módon DNS-törések kialakulását okozza. A kettős DNS-szálszakadások (DSB) kimutatására leggyakrabban a H2AX hiszton-variáns foszforilációjának detektálását használják. A H2AX foszforilációját (γ -H2AX) immuncitokémiával detektáltuk (11. ábra). A ciszplatinnal kezelt sejtekben a H2AX jelentős mértékben foszforilálódik, ami tükrözi a DNS-javító mechanizmusok aktiválódását, például a nukleotidok excíziójának helyreállítását vagy a nem homológ végek csatlakozását. A HCA analízissel három különböző sejtformológiát határoztunk meg: a „normál” sejtek nem tartalmaztak γ -H2AX jelet, a „pöttyös” sejtek γ -H2AX-gócokat tartalmaztak, míg a „fragmentált” sejtek sűrű- diffúz γ -H2AX-festődést mutattak. Korábbi irodalmi adatokkal [124] összhangban a ciszplatin H2AX-foszforilációt (γ -H2AX képződést) okozott vad típusú sejtekben, viszont az NMNAT1-hiányos sejtekben lényegesen nagyobb mennyiségű a γ -H2AX volt detektálható ciszplatin kezelést követően (vagyis „fragmentált” sejtek aránya szignifikánsan magasabb volt a vad típusú társaikhoz képest). (11. ábra).

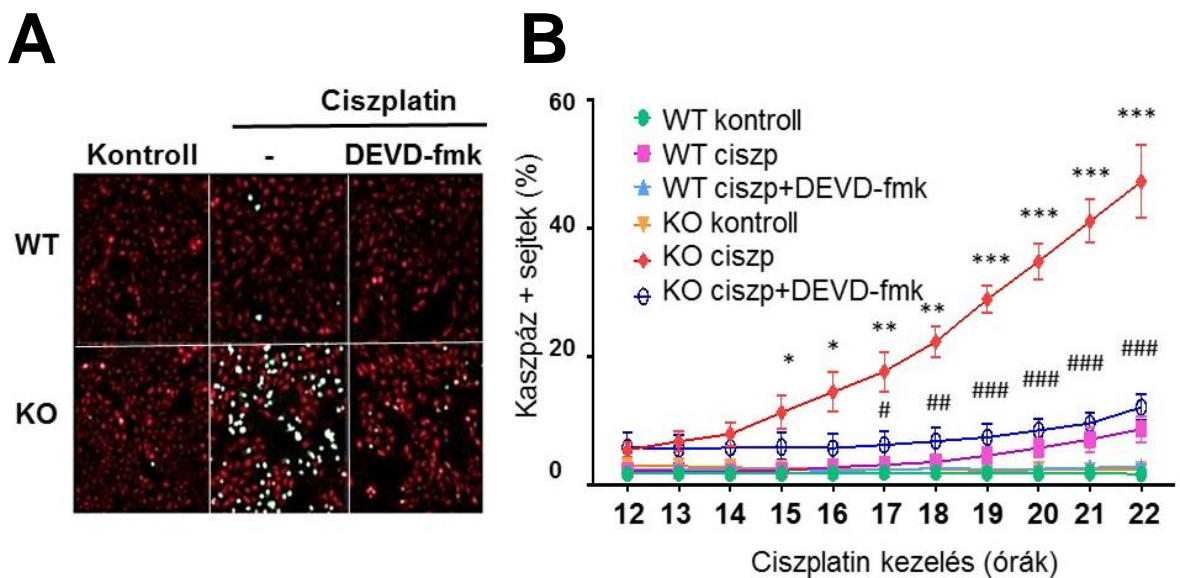


11. ábra A ciszplatin által kiváltott DNS-károsodás és magmorfológia vizsgálata

A ciszplatin által kiváltott DNS károsodás mértékét a sejtekben megjelenő γ -H2AX megjelenésének és eloszlásának meghatározásával értékeltük immunfluoreszcens festést követően. A high-content analízis három különböző sejtformológiát detektált, a „normál”, „pöttyös” és „fragmentált” sejtek. Az erről készült reprezentatív képeket mutatjuk be az ábra jobb oldalán. Mintánként a teljes sejtpopulációt a fenti kategóriákba soroltuk és azok százalékos megoszlását ábrázoltuk az ábrán jelölt kezelési időknél megfelelően. A csillagokkal jelölt oszlopok szignifikánsan eltérnek a kontrolltól (Student – Newman – Keuls módszer; * $p < 0,05$). A kettős keresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT KO sejt vonal azonos kezelése esetén (Student – Newman–Keuls módszer; # $p < 0,05$). High-content analízis beállítása és a képek elkészítése Dr. Regdon Zsolt segítségével készültek el.

VI.2.3. Sejthalál-útvonalak vizsgálata

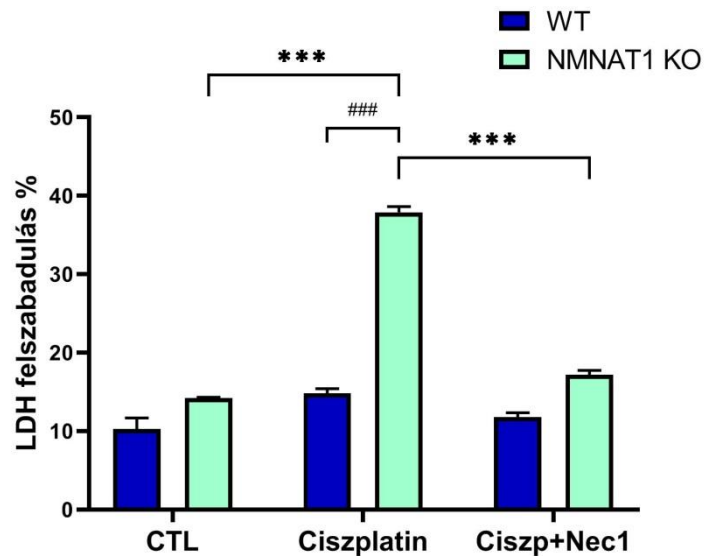
Az DNS-károsodás vizsgálata során, különösen az NMNAT1 KO vonalban nagy arányban azonosítottunk „fragmentált” morfológiájú, kondenzált magvú sejteket, mely apoptotikus sejthalálra utal. Ezért munkánkat az apoptózisra jellemző kaszpáz-3 aktivitás detektálásával folytattuk, melyet sejtpemeábilis, fluorogén kaszpáz-3/7 szubsztráttal végeztük. Cisplatin kezelés mellett kaszpáz gátlószerezrel (z - DEVD - FMK-val) kezeltük elő a sejteket. (12A ábra). A ciszplatinnal vagy ciszplatinnal és z-DEVD-FMK kombinációjával történő kezelést követően, 12 és 22 óra között óránként készítettünk felvételeket, melyeken a kaszpáz aktiváció esetén mérhető fluorescens jel statisztikai kiértékelését végeztük el (12B ábra). Az NMNAT1 KO sejtekben jelentős mértékű kaszpáz-aktivációt tapasztaltunk, mely gátolható volt a kaszpáz-inhibitor alkalmazásával.



12. ábra Apoptotikus sejthalál vizsgálata

A kaszpáz-3 aktivitását fluoreszcens kaszpáz-3 szubsztrát segítségével határoztuk meg Perkin Elmer Opera Phenix HCA készülékkel. A sejteket digitális fáziskontraszttal tettük láthatóvá, melyhez piros színű megjelenítést választottunk (A panel). A kaszpáz-aktivitást a zöld szín jelzi. A bemutatott felvételek 24 órával a cisplatin kezelés után készültek (A panel), a grafikon a ciszplatin-kezelést követően 12 és 22 óra között óránként készített felvételek kiértékelése alapján készült (B panel). A kaszpáz-pozitív sejtek számát az össz-sejtszám százalékában adtuk meg. A csillagokkal jelölt adatpontok szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Student – Newman – Keuls módszer; * $p < 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$). A kettős keresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT KO sejtvonal azonos kezelése esetén. Student – Newman – Keuls módszer; # $p < 0,05$, ## $< 0,01$, ### $< 0,001$). Az ábrán három kísérlet átlagát ábrázoltuk \pm SEM.

A nekrotikus jellegű sejthalál-módozatok lezajlása során a membrán permeabilitása fokozódik, mely fokozott laktát-dehidrogenáz (LDH) felszabaduláshoz vezet. Ez a sejtek felülűszójából mérhető. Vizsgálatunk során megfigyeltük, hogy a ciszplatinnal kezelt NMNAT1 KO sejtekben szignifikánsan magasabb LDH felszabadulás volt mérhető, mint a vad típusú sejtekben (13. ábra). A nekrosztatin 1 (NEC1) nekroptózis-gátlószer meggátolta az LDH felszabadulást, ami nekroptotikus sejthalálra utal [124].

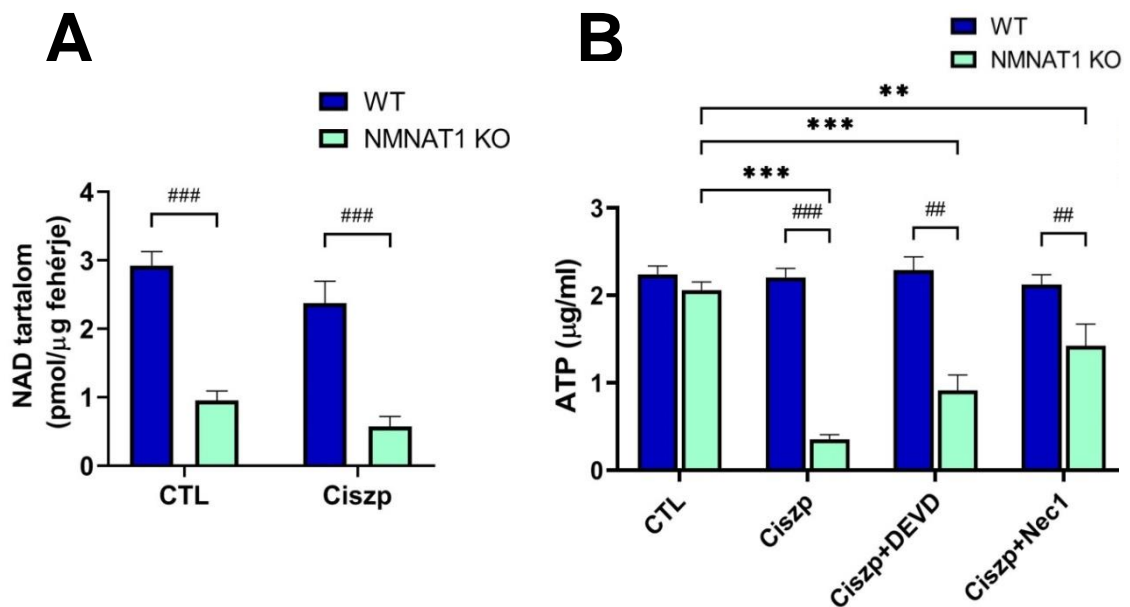


13. ábra Az LDH felszabadulása ciszplatinnal való kezelést követően

A ciszplatinnal való kezelést követően 24 órával meghatároztuk a felülűszóból a laktát-dehidrogenáz (LDH) felszabadulását és a pozitív kontroll százalékában (lizált sejtek) fejeztük ki. A sejtekből az LDH felszabadulását ciszplatinnal vagy a nekrosztatin (NEC1) nekroptózis inhibitorral való előkezelést követően határoztuk meg. A csillagokkal jelölt oszlopok jelentősen eltérnek a kontrolltól (Dunnett-teszt; *** $p < 0,001$). A kettőskeresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT KO sejtvonal azonos kezelése esetén (Dunnett-teszt; ### $p < 0,001$).

VI.2.4. Ciszplatin-kezelés hatása az NMNAT1 KO sejtek NAD⁺ - és ATP szintjére

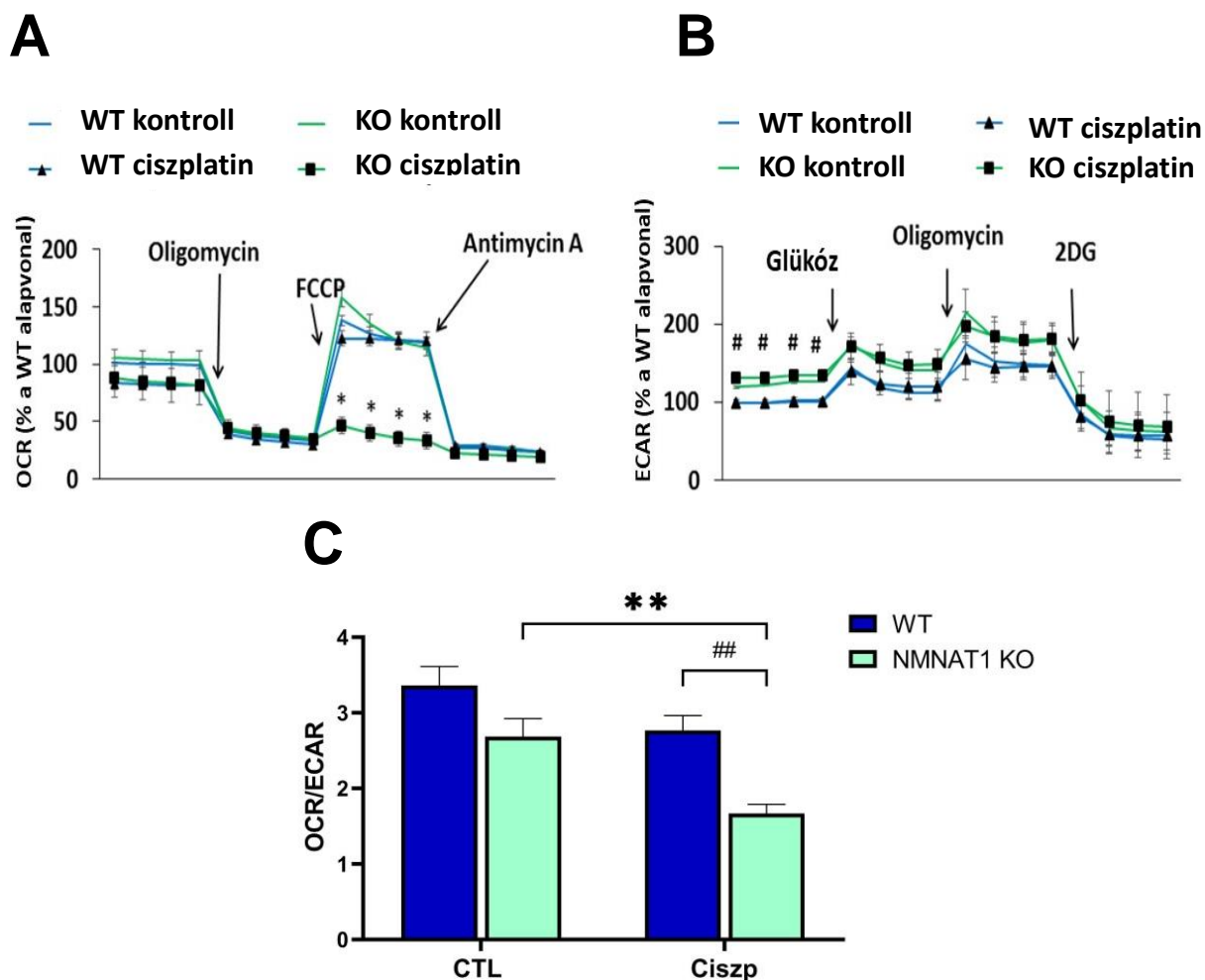
Az sejttanyagcsere megváltozása a rákos megbetegedések jellegzetes kísérő jelensége. Ráadásul a rákellenes szerek, beleértve a ciszplatin, metabolikus zavarokat okoznak [125, 126]. Figyelembe véve, hogy a NAD⁺ egy központi energia metabolit, és az NMNAT1 kiütése a sejt NAD⁺-készletének jelentős csökkenését eredményezte, feltételeztük, hogy a csökkent NAD⁺-tartalom hatással lehet a U2OS sejtek anyagcseréjére. Szignifikánsan alacsonyabb bazális NAD⁺-szintet mértünk az NMNAT1 KO sejtekben, mely tovább csökkent a ciszplatin-kezelés hatására (14A. ábra). Ciszplatin kezelés hatására az NMNAT1 KO sejtek ATP-szintjében szintén drámai változást figyeltünk meg, míg a vad típusú sejtekben nem tapasztaltunk változást (14B. ábra). A kaspáz inhibitor és a nekroptózis inhibitor is jelentősen gátolta az ATP-vesztéséget (14B. ábra), tehát az ATP-szint csökkenése részben a károsodott energiatermelés és az aktív sejthalálformák lezajlásához szükséges fokozott ATP-felhasználás miatt következik be.



14. ábra: NAD⁺ -és ATP szintek változása NMNAT1 KO sejtekben ciszplatin kezelést követően. A 24 órás ciszplatin (5 μg / ml) kezelést követően meghatároztuk a NAD⁺-szintet a WT és NMNAT1 KO sejtek lizátumaiból és normalizáltuk a fehérjetartalomra (A). A kettőskeresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT1 KO sejt vonal azonos kezelési esetén (Bonferroni teszt; ### $p < 0,001$) (A). A sejtes ATP-t 24 órával a ciszplatin-kezelés után vizsgáltuk (B ábra). A sejteket ciszplatinnal kezeltük önmagában vagy apoptózis (z-DEVD-FMK, 50 μM) vagy nekroptózis (NEC1, 1 μM) inhibitorokkal kombinálva. Az inhibitorokat 30 perccel a ciszplatin-kezelés előtt alkalmaztuk. Az csillagokkal jelölt oszlopok jelentősen eltérnek a kontrolltól (Dunnett-teszt; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). A kettős keresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT1 KO sejt vonal azonos kezelési esetén (Dunnett-teszt; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$).

VI.2.5. Metabolikus útvonalak vizsgálata

A sejtek energiatermelő útvonalainak a jellemzése során a sejtlegzés mérésére az oxigénfogyasztás sebességét (OCR, 15A. ábra), a glikolízis mértékének meghatározására pedig az extracelluláris savasodási sebességet (ECAR) vizsgáltuk meg (15B. ábra). A két sejtvonal közötti bazális légzésben nem volt megfigyelhető jelentős különbség (15A ábra). Az elvégzett mitokondriális stressz teszt (a részletekért lásd az Anyagok és módszerek részt) szintén hasonló értékeket mutatott mindkét sejtvonalban (15A ábra). A ciszplatin kezelés azonban az NMNAT1 KO sejtekben teljesen megszüntette a mitokondriális légzési tartalék-kapacitást (15A ábra, FCCP adagolását követő szakasz). A bazális glikolitikus aktivitás szignifikánsan magasabbnak bizonyult az NMNAT1 KO sejtvonalban (15B. Ábra). A glikolitikus stressztesztekben kezelés nélkül és ciszplatin kezeléssel sem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket a két sejtvonal között (15B. Ábra). Ez a megállapítás azt sugallja, hogy a ciszplatin az NMNAT1-státustól függetlenül, a glikolitikus aktivitást többnyire nem befolyásolja. A sejt szintű anyagcserét a két fő energiatermelő folyamat aktivitásának hányadosa, az OCR / ECAR arány jellemzi. A ciszplatin kezelést követően az OCR / ECAR arány csökkent az NMNAT1 KO sejtekben, ami azt jelzi, hogy a sejtek a glikolízisre támaszkodnak, sem mint a légzési energiatermelésre az anyagcseréjük során.



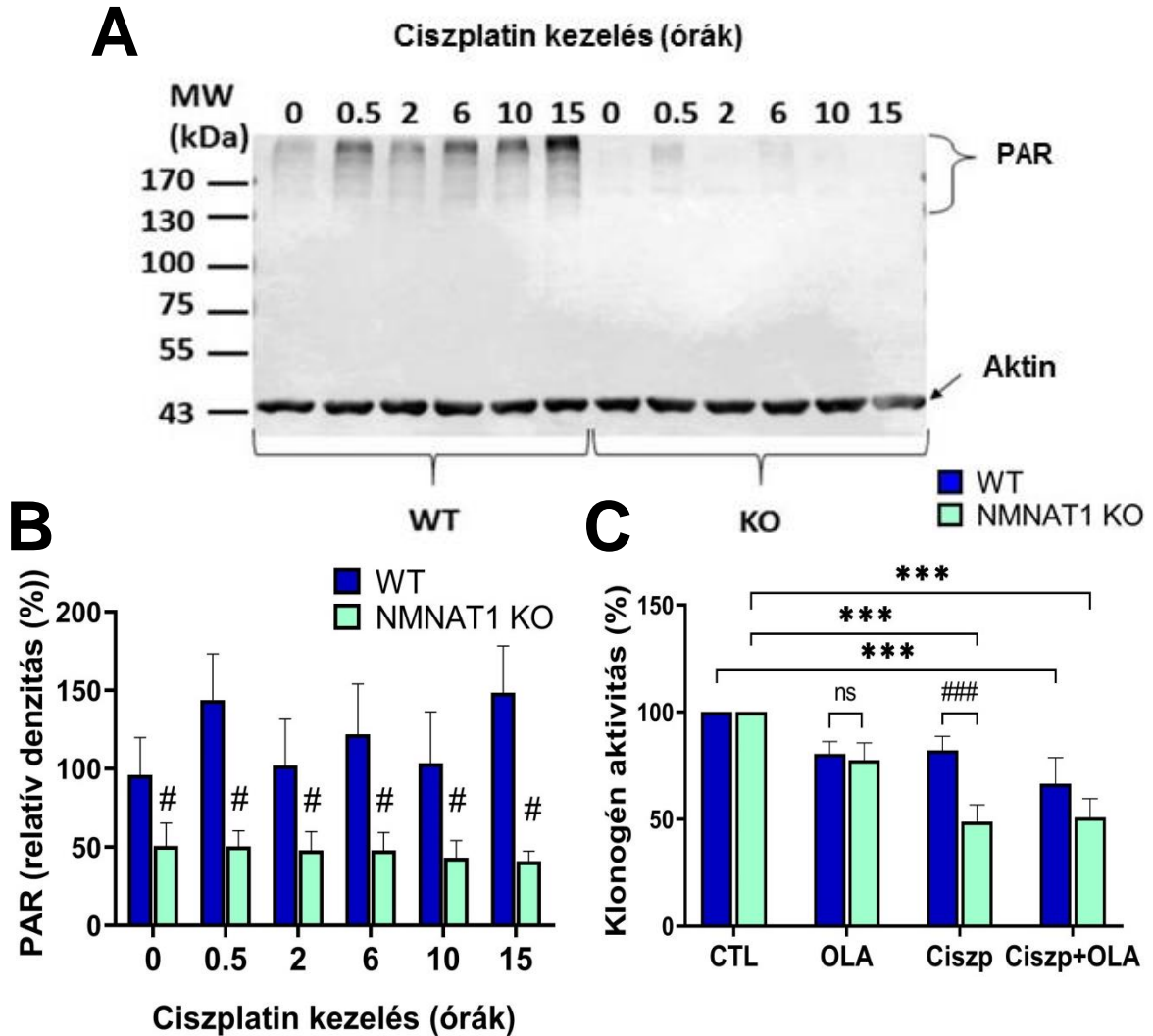
15. ábra: Az oxidatív foszforiláció és a glikolitikus aktivitás vizsgálata

Az oxigénfogyasztási sebességet (OCR) / az oxidatív foszforilációt (A) és az extracelluláris savasodási sebességet (ECAR) / a glikolitikus aktivitást (B) a Seahorse metabolikus analizátorral határoztuk meg, és az értékeket a WT sejtek kiindulási értékének százalékában fejeztük ki. Mind az OCR / oxidatív foszforilációt, mind az ECAR / glikolitikus aktivitást specifikus stressztesztekben figyeltük meg 13 órával a ciszplatin kezelés után. A mitokondriális stressztesztek az oligomicint ($2 \mu\text{M}$), az FCCP-t ($0,5 \mu\text{M}$) és az antimycin A-t ($1 \mu\text{M}$) tartalmaztak. Az ECAR vizsgálata során glükózt (10 mM), oligomycint ($2 \mu\text{M}$) és 2-dezoxi-glükózt (50 mM) alkalmaztunk. A csillagokkal jelölt adatpontok szignifikánsan eltérnek a kontrolltól (Student – Newman – Keuls módszer; * $p < 0,05$). A kettős keresztekkel jelölt adatpontok jelentősen különböznek a vad típusú és NMNAT1 KO sejtek esetében grafikon ugyanazon fázisában (Student Newman Keuls módszer; # $p < 0,05$). A két metabolikus út arányát a kiindulási OCR és ECAR értékek alapján határoztuk meg 13 órával a ciszplatin-kezelés után. A csillagokkal jelölt oszlopok szignifikánsan eltérnek a kontrolltól (Student Newman Keuls módszer; * $p < 0,05$). A kettős keresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT1 KO sejtvonal azonos kezelése esetén (Student Newman Keuls módszer; # $p < 0,05$). Az ábrázolt adatok 3 kísérlet átlagát mutatják $\pm \text{SEM}$.

VI.2.6. A PARiláció szerepe az NMNAT1 KO sejtek fokozott érzékenységében

A ciszplatin által kiváltott DNS-károsodás aktiválja a PARP1-et [127], mely hozzájárulhat a ciszplatin által okozott DNS-keresztkötések és DNS-léziók helyreállításához és a sejtek túléléséhez. Ezért feltételeztük, hogy az NMNAT1-hiányából következő csökkent nukleáris NAD⁺-szint veszélyeztetheti a PARP1 azon képességét, hogy DNS károsodás hatására aktiválódjon és a DNS-károsodások kijavításának elősegítésével megakadályozza a sejthalált.

A PARP aktivitását a keletkező PAR polimerek mennyiségének detektálásával követhettük nyomon. Megállapítottuk, hogy a ciszplatin poli-(ADP-ribóz) (PAR) képződéshez vezetett a WT sejtekben, míg az NMNAT1 KO sejtekben ez nem volt kimutatható (16A, B ábra). Ezen kívül, a ciszplatin kezelés a kolóniaképző aktivitást a vad típusú sejtekben csak enyhén csökkentette, ezzel szemben az NMNAT1 KO sejtekben szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető. A ciszplatin és a PARP inhibitor (olaparib) kombinált kezelése szignifikánsan alacsonyabb proliferációt eredményezett a vad típusú sejtekben, mint a ciszplatinnal kezelt sejtek esetében, de az NMNAT1 KO sejtekben további csökkenést nem lehetett kimutatni (16C. ábra). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a ciszplatin által kiváltott DNS-károsodás nem képes aktiválni a PARP1-t az NMNAT1 KO sejtekben, és a PARP1 szubsztrátjának hiánya korlátozza a sejtek azon képességét, hogy hatékonyan helyrehozzák a DNS-sérülését.



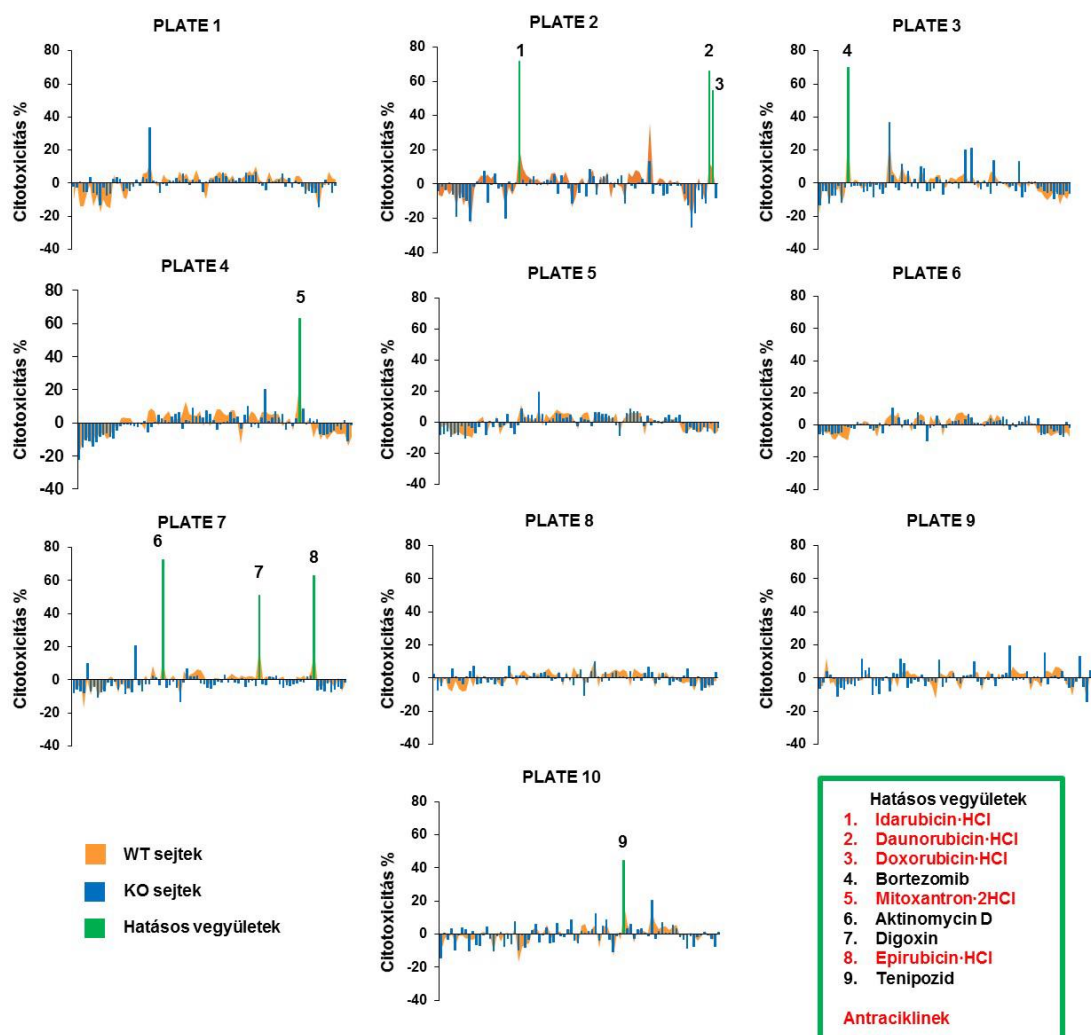
16. ábra: A PARiláció szerepe az NMNAT1 KO sejtek ciszplatin által okozott érzékenységben. A PAR polimer képződésének szintjét Western blot módszerrel detektáltuk vad típusú (WT) és NMNAT1 KO (KO) sejtekben, a megadott időpontokban (0,5 óra, 2 óra, 6 óra, 10 óra és 15 óra) a ciszplatin kezelést követően (5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) (A). A minták fehérjeszintjének normalizálására béta-aktint használtunk. A relatív densitást (a béta-aktinra normalizálva és a kezeletlen WT kontrollhoz viszonyítva) a B. panelen mutatjuk be. A kettőskeresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT KO sejt vonal azonos kezelése esetén (Bonferroni teszt; $\#P < 0,05$). A PARP-1 - NMNAT1 kölcsönhatás lehetséges szerepét úgy határoztuk meg a kolónia képző aktivitásban, hogy a 6. napon kristály-ibolyával festett kolóniákat megszámoltuk. A sejteket médiummal (CTL), ciszplattinnal (5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) vagy ciszplatin és olaparib (10 μM) (Ciszp + OLA) kombinációjával kezeltük, és az egyes kolóniákat minden mintában megszámoltuk. Az eredményeket a kontroll mintákban lévő telepek számának százalékában fejezzük ki. A csillaggal jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a megfelelő kontrolltól (Bonferroni teszt; $***P < 0,001$). A kettőskeresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT KO sejt vonal azonos kezelése esetén (Bonferroni teszt; $\#P < 0,05$). A grafikonok három kísérlet átlagát mutatják \pm SEM.

VI.3. NMNAT-1 KO sejteken fokozott sejtpusztulást okozó gyógyszerhatóanyagok azonosítása

VI.3.1 Nagy áteresztőképességű szűrővizsgálat

Korábbi eredményeink alátámasztják az NMNAT1 fontos szerepét a oszteoszarkóma sejtekben ciszplatin kezelést követően. Korábbi vizsgálataink alapján egyéb tumorelles szerek esetében is fokozottabb érzékenységet okozott az NMNAT1 enzim hiánya. Új projektünkben célul tűztük ki további potenciális gyógyszerjelöltek felkutatását, melyek az NMNAT1 enzim hiányában fokozottan citotoxikusak a daganatsejtekre.

Ehhez egy nagy áteresztőképességű szűrést végeztünk (HTS- High Throughput Screening) párhuzamosan a vad típusú és NMNAT1 knockout sejteken, Tecan Freedom EVO robot használatával, egy olyan vegyületkönyvtárral, amely 775 db FDA (Food and Drug Administration) által jóváhagyott gyógyszert tartalmazott. A szűrés során a vad típusú (WT) és NMNAT-1 KO (KO) oszteoszarkóma sejt vonalakat egységesen 10 μ M végkoncentrációban kezeltük a molekulakönyvtárban lévő vegyületekkel. 24 órás kezelést alkalmaztunk, és ezt követően meghatároztuk mind a két sejt vonalban citotoxicitást Calcein AM esszével. Azokat a vegyületeket tekintettük hatásosnak, ahol az értékelés során az NMNAT1 KO sejt vonalon legalább 25% -kal magasabb toxicitást tapasztaltunk a vad típusú sejtekhez képest. A kritériumoknak kilenc vegyület felelt meg: bortezomib, aktinomycin-D, digoxin, tenipozid és öt antraciklin (idarubicin, daunorubicin, doxorubicin, mitoxantron, epirubicin) (17. ábra).

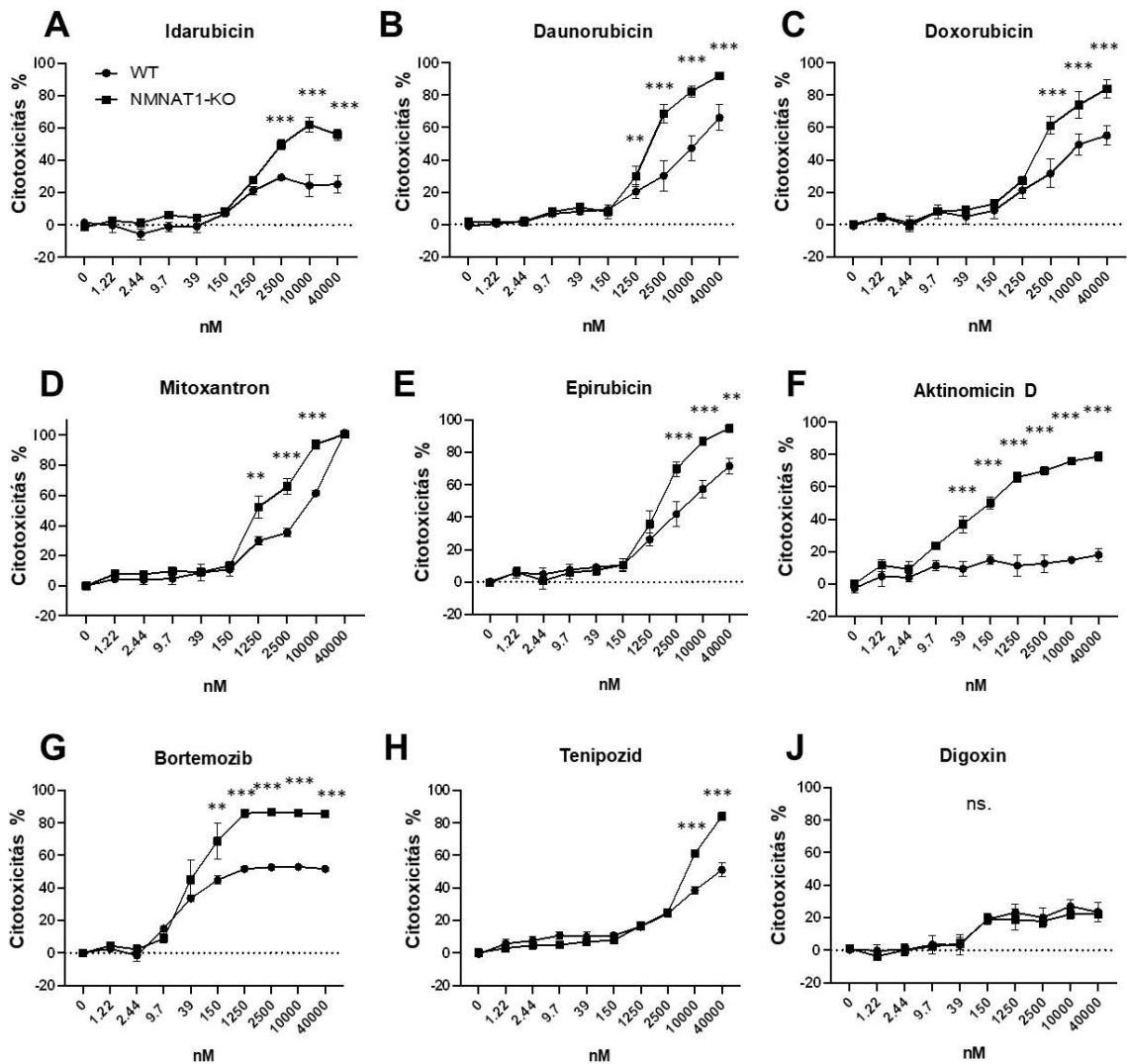


17. ábra. Vegyületek azonosítása nagy áteresztőképességű szűréssel. FDA által jóváhagyott gyógyszerhatóanyagokból álló molekulakönyvtár plateket (1-10. plate) szűrtünk nagy áteresztőképességű szűréssel. A szerek végkoncentrációja egységesen 10 μ M-os volt. A molekulakönyvtár vegyületeit Tecan folyadékkezelő robot segítségével adagoltuk a sejtekhez, majd pedig 24 órával a kezelést követően CalceinAM vizsgáltuk a vad típusú sejtek és az NMNAT1 KO sejtek életképességében fellépő különbséget. A plate átlagának citotoxicitását vettük 0%-nak. Ehhez viszonyítottuk a szűrés során alkalmazott szerek citotoxicitását.

VI.3.2. A szűrés során azonosított vegyületek hatásának megerősítése

Találataink megerősítését mind vad típusú, mind NMNAT1-KO U2OS sejteken elvégeztük. A szűrés során azonosított vegyületek (lásd 4. táblázat) citotoxicitását a kezelést követően 24 órával, Calcein-AM életképességi esszével vizsgáltuk, melyhez egy széles tartományú koncentráció-sorozatot készítettünk (1,22 nM - 40000 nM között), alkalmazva a szűrés során használt 10 μ M (10 000 nM) koncentrációt is (18. ábra). Kilenc vegyület közül 8 esetben igazolható volt az NMNAT1 KO fenotípus érzékenyítő hatása. Minden azonosított antraciklin hatása igazolható volt (18A-E ábra). Az aktinomicin D (18F ábra), a bortezomib (18G ábra) és a tenipozid (18H ábra) szintén jelentős növekedést okozott a KO sejtvonal citotoxicitásában a WT sejtekhez képest. A digoxin esetén is mindkét sejtvonalban koncentráció-függő citotoxicitást tapasztaltunk, de a toxicitás a KO sejtvonalon ebben az esetben nem volt szignifikánsan magasabb a vad típusú sejtekhez képest (18I ábra).

A legmarkánsabb különbség az aktinomicin D esetében volt megfigyelhető, mivel az NMNAT1 hiánya \sim 40 nM koncentrációtól kezdve jelentős szenzibilizáló hatást váltott ki. Az aktinomicin D (Act D) a *Streptomyces* nemzetségből izolált polipeptid antibiotikum. Az aktinomicin D interkalálódik DNS guanin és citozin gazdag régióhoz, ezzel megakadályozza az RNS-polimerázok működését, ezáltal gátolja a transzkripciót [128]. Az aktinomicin D volt az az első antibiotikum, amelyet tumorok kezelésére használtak. Alkalmazzák többek között pl. Wilms-daganatban, rhabdomiosarkómában, Ewing-sarkómában és az NPM1-mutált akut myeloid leukémiában [128-130]. Az aktinomicin D apoptózist indukál [131]. Nagy dózisban alkalmazva ($>1 \mu$ g/ml) blokkolja az összes RNS -fajta transzkripcióját, míg az alacsony dózisok (< 100 ng/ml) a riboszómális RNS -szintézis gátlását okozzák [132, 133]. Tumorölő mechanizmusának molekuláris háttere még csak részben feltárt, NMNAT1 enzimmel kapcsolatos interakciókról pedig jelenleg nincs irodalmi adat. Ezért további vizsgálatainkhoz az aktinomycin D-t választottuk.



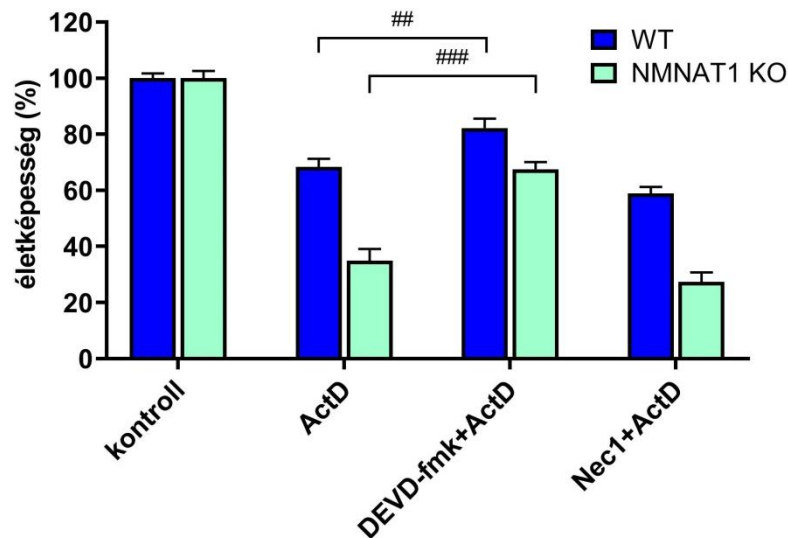
18. ábra. A szűrés során azonosított vegyületek validálása. CalceinAM életképességi assay-el végeztük el a szűrés során azonosított szerek megerősítő vizsgálatát. Egy széles tartományú koncentráció-sorozattal (1,22 nM - 40000 nM) kezeltük a sejteket 24 órán keresztül, majd Calcein AM életképességi essét végeztünk. A csillaggal jelölt adatpontok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT1 KO sejtvonala azonos kezelése esetén (Sidak's teszt; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, n.s. : nem szignifikáns). Az ábrákon 3 kísérlet átlagát mutatjuk be \pm SEM.

VI.4. Az NMNAT1 szerepének vizsgálata aktinomicin D-vel kezelt oszteoszarkóma sejteken

VI.4.1. Az aktinomicin D által kiváltott sejthalál jellemzése

Ismert, hogy az aktinomicin D hasnyálmirigy sejtvonalon [131] és oszteoszarkóma sejtvonalon (MG63 sejtvonal) [134] apoptózist indukál. Viszont azzal kapcsolatban nincs információnk, hogy az aktinomicin D indukál-e nekroptózist és hogy az NMNAT1 enzim milyen módon befolyásolja, az aktinomicin D által kiváltott sejthalált.

Ezért megvizsgáltuk, hogy hogyan változik az aktinomicin D-vel kezelt sejtek életképessége az apoptózis vagy nekroptózis specifikus gátlása mellett (19. ábra). Az aktinomicin D kezelést (40 nM) vad típusú és NMNAT1 KO sejteken alkalmaztuk, vagy önmagában, vagy kaszpáz-3 inhibitorral (DEVD-fmk) vagy nekroptózis inhibitorral (Nec1) kombinálva. Vizsgálatunk azt mutatta, hogy a DEVD-fmk jelentősen növelheti az Aktinomicin D-vel kezelt vad típusú és NMNAT1 KO sejtek életképességét, míg a Nec1 előkezelés nem okozott változást az életképességben, a csak aktinomicin D-vel kezeltetekhez viszonyítva.

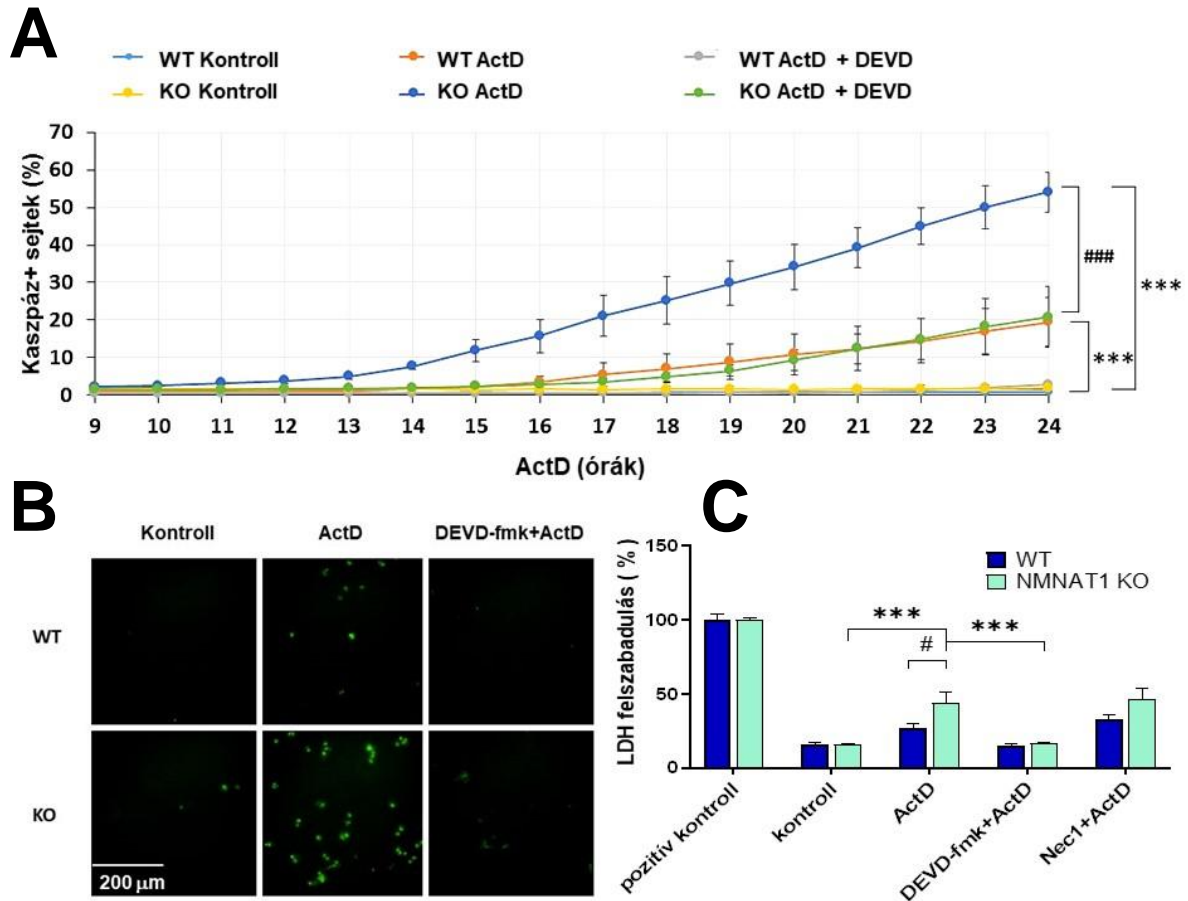


19. ábra. Az aktinomicin D által kiváltott sejthalál vizsgálata

Az aktinomicin D által okozott sejthalál lehetséges mechanizmusát életképességi vizsgálattal azonosítottuk az apoptotikus (DEVD-fmk) és nekroptotikus (Nec1) útvonalak gátlóival. A kettős kereszttekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a csak aktinomicin D-vel kezelt mintáktól (Dunett's multiple comparisons ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$).

A sejtek apoptotikus pusztulásának további vizsgálatát high content analízissel végeztük egy kinetikus esszé segítségével, a kaspáz-3 inhibitor DEVD-fmk jelenlétében (20. ábra). Az aktinomicin D kezelés mindkét sejtvonalon a kaspáz-3 aktivitásának jelentős emelkedését okozta, amelyet a kaspáz-3 inhibitor hatékonyan gátolni tudott. Az NMNAT1 KO sejtvonalon a kaspáz-3 aktiváció már korábban kimutatható volt, és a kaspáz-pozitív sejtek aránya több mint kétszer annyi volt, mint a vad típusú sejtekben mérhető kaspáz-3 pozitívitás aránya. A kaspáz-pozitív sejtek reprezentatív képei 24 órás kezelést követően a 20 ábrán láthatóak.

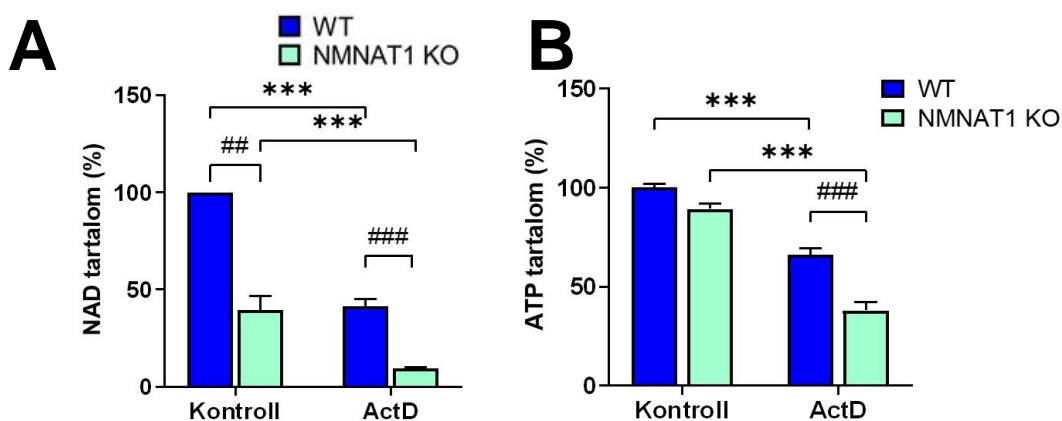
A nekrotikus sejtpusztulás lehetséges jelenlétét a felülúszók laktát-dehidrogenáz (LDH) szintjének mérésével vizsgáltuk 24 órával az Aktinomicin D kezelés után (20C ábra). Az WT sejtek esetében nem volt kimutatható szignifikáns LDH felszabadulás. Míg a KO sejtvonalon esetében jelentős LDH felszabadulást mértünk. Ugyanakkor a KO sejtek LDH felszabadulása másodlagos nekrozisnak tekinthető, mivel a DEVD-fmk kaspáz-3 inhibitor képes volt teljesen blokkolni.



20. ábra Az aktinomycin D által kiváltott sejthalál jellemzése Az apoptotikus sejtpusztulás követése fluoreszcens kaspáz szubsztrát alkalmazásával történt (Cellevent - zöld). Kinetikus vizsgálatban a kaspáz aktivitást az aktinomycin-kezelést követő 9-24 óra között vizsgáltuk, DEVD-fmk kaspáz inhibitor alkalmazásával. A kaspáz-pozitív sejtek össz-sejtszámhoz viszonyított százalékos arányát ábrázoltuk (A). A csillagokkal jelölt görbék adatpontjai szignifikánsan eltérnek az azonos sejtvonal kontroll mintáitól (Dunett's multiple comparisons; *** $P < 0,001$). A kettős keresztekkel jelölt görbék adatpontjai szignifikánsan eltérnek az aktinomycin D-vel kezelt, ugyanabból a sejtvonalból származó mintáktól (Dunett's multiple comparisons; ### $P < 0,001$). A fluoreszcens festéssel készült képek kaspáz pozitív sejteket mutatják 24 órás aktinomycin D kezelést követően (B). A laktát-dehidrogenáz (LDH) felszabadulását aktinomycin-kezelés és DEVD-fmk kaspáz inhibitor, valamint Nec1 nekroptózis inhibitor alkalmazásával (30 perccel az aktinomycin D kezelés előtt adtuk a sejtekhez), 24 órával az aktinomycin D kezelést követően határoztuk meg. A csillagokkal jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek az azonos sejtvonal kontroll mintáitól (Dunett's multiple comparisons; *** $P < 0,001$). A kettős keresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT KO sejtvonal azonos kezelése esetén (Dunett's multiple comparisons; # $P < 0,05$). Az ábrázolt adatok 3 kísérlet átlagát mutatják \pm SEM.

VI.4.2. A sejtek NAD⁺ - és az ATP –szintjének vizsgálata Aktinomicin D kezelést követően

Az NMNAT enzimek a NAD⁺ szintézisében két útvonalon keresztül is részt vesznek (mentési és a Preiss-Handler útvonalon) [51]. Így az enzim hiánya és az aktinomicin D kezelés hatására megfigyelt szignifikánsan magasabb citotoxicitás az NMNAT1 KO sejt vonalban, ebből arra következtethetünk, hogy a KO sejtek NAD⁺ és ATP tartalmának esetleges változását érdemes megvizsgálni. Mint már korábban bemutattam, (14. ábra) a bazális NAD⁺ szintek az NMNAT1 KO sejtekben szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a vad típusú U2OS sejtekben. Az aktinomicin D szignifikáns csökkenést okozott a NAD⁺ szintben, mindkét sejt vonal esetében (21A. ábra). A KO sejt vonalban a NAD⁺-szintet a kezelt vad típusú minták körülbelül 1/5-ére változtatta (21A. ábra). A celluláris ATP egy univerzális metabolit, amely szinte minden energiafüggő folyamathoz szükséges. Mivel az ATP termelése a NAD-tól függ, ezt követően megvizsgáltuk, hogy az aktinomicin D kezelés után megváltozik-e a sejtek ATP-szintje is (21B. ábra). A korábbi eredményeink alapján bazális ATP szintek nem különböznek szignifikánsan a WT és a KO sejtekben (14B ábra). Az aktinomicin D kezelés az ATP szint szignifikáns csökkenését okozta a vad típusú sejtekben. Viszont az NMNAT-1 KO sejtekben a vad típusú, kezelt mintákhoz képest is jelentősen csökkent az ATP -szint .

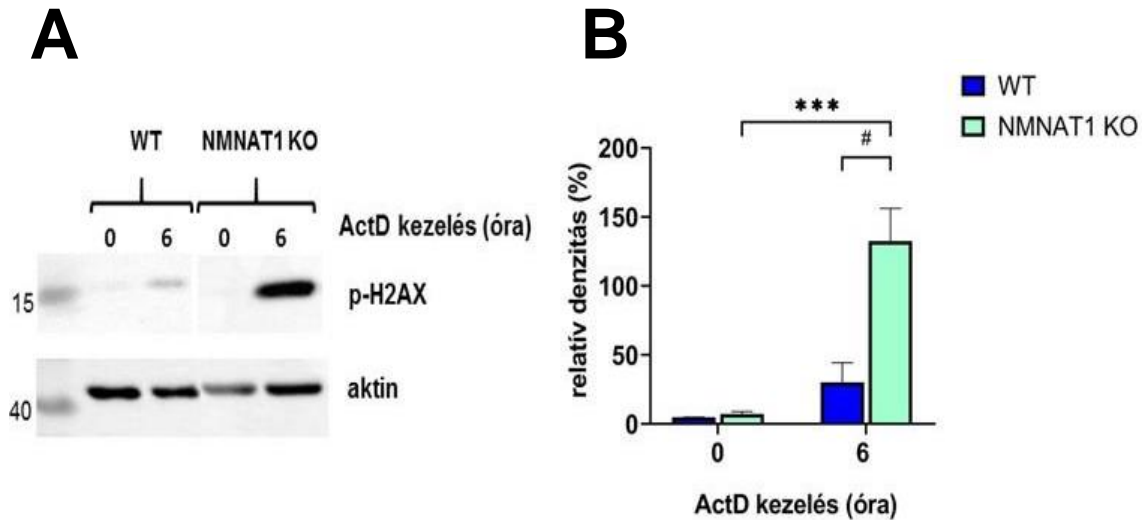


21. ábra. A NAD⁺ - és ATP szintek vizsgálata

A teljes NAD⁺-szintet a vad típusú és NMNAT1 KO sejtek lizátumaiból határoztuk meg 24 órával az ActD kezelés után (A). A csillagokkal jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Sidak tesztje; *** $p < 0,001$). A kettős keresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT KO sejt vonal azonos kezelése esetén (Sidak teszt; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$). Az ATP-tartalmat 24 órával az ActD kezelés után vizsgáltuk (B). A csillagokkal jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Dunnett-teszt; *** $p < 0,001$, ### $p < 0,001$). Mindkét vizsgálat esetében a kapott értékeket fehérje-tartalomra normáltuk és a vad típusú kontroll százalékában fejeztük ki. Az ábrázolt adatok 3 kísérlet átlagát mutatják \pm SEM.

VI.4.3. Az aktinomicin D DNS károsodást és PARP aktivációt vált ki

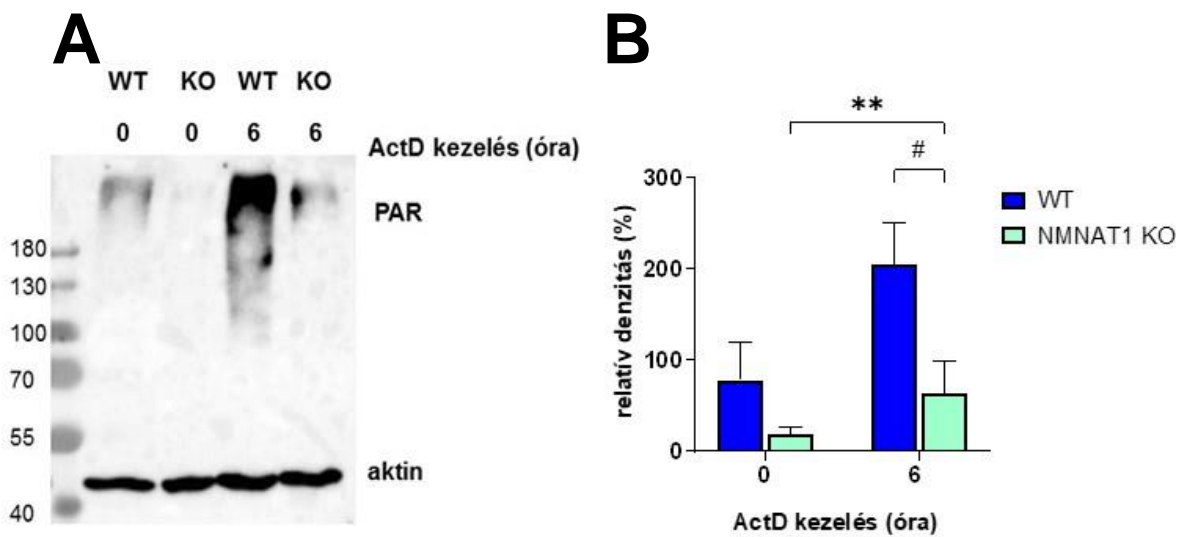
Irodalmi adatok alapján ismert, hogy az aktinomicin D DNS-károsodást okoz [135]. A DNS-károsodás egyik specifikus markere a H2AX foszforiláció (γ H2AX), ami fehérje szinten western blottal detektálható. A vad típusú U2OS sejtekben nem volt kimutatható jelentős DNS-károsodás (22A, B ábra). A KO sejtekben azonban az ActD kezelés után 6 órával magas szintű DNS károsodást tapasztaltunk (22A, B ábra).



22. ábra. Az aktinomicin D által kiváltott DNS károsodás vizsgálata.

Western-blot segítségével detektáltuk a H2AX hiszton foszforilációját 6 órával az aktinomicin D kezelés után WT és NMNAT1 KO sejtekben (A). A γ H2AX relatív denzitását a béta-aktin - mennyiségre normalizálva mutatjuk be a B ábrán. A csillagokkal jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Sidak tesztje; *** $p < 0,001$). A kettős keresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT KO sejtvonal azonos kezelése esetén (Sidak tesztje; # $p < 0,05$).

A megnövekedett DNS-károsodás a DNS-helyreállítás károsodására utalhat. A DNS károsodás aktiválja a NAD⁺-függő PARP1 enzimet, amely az irodalmi adatok alapján kölcsönhatásba léphet az NMNAT1-el a PARP1-függő promótereken [75]. Ezért megvizsgáltuk, hogy milyen módon változik a DNS károsodás hatására a PARP1 enzim által szintetizált poli-ADP-ribóz (PAR) polimer mennyisége az NMNAT1 génhíányos sejteken. A PARilációt western blot alkalmazásával detektáltuk, anti-PAR antitest (10H) alkalmazásával (23A, B ábra). A vad típusú sejtekben 6 órával az ActD-kezelés után fokozott PARP-aktiválódás volt kimutatható (23A, B ábra), míg a KO-sejteknél a PARP-aktiváció jelentősen csökkent, valószínűleg az alacsony NAD⁺ -tartalom miatt.

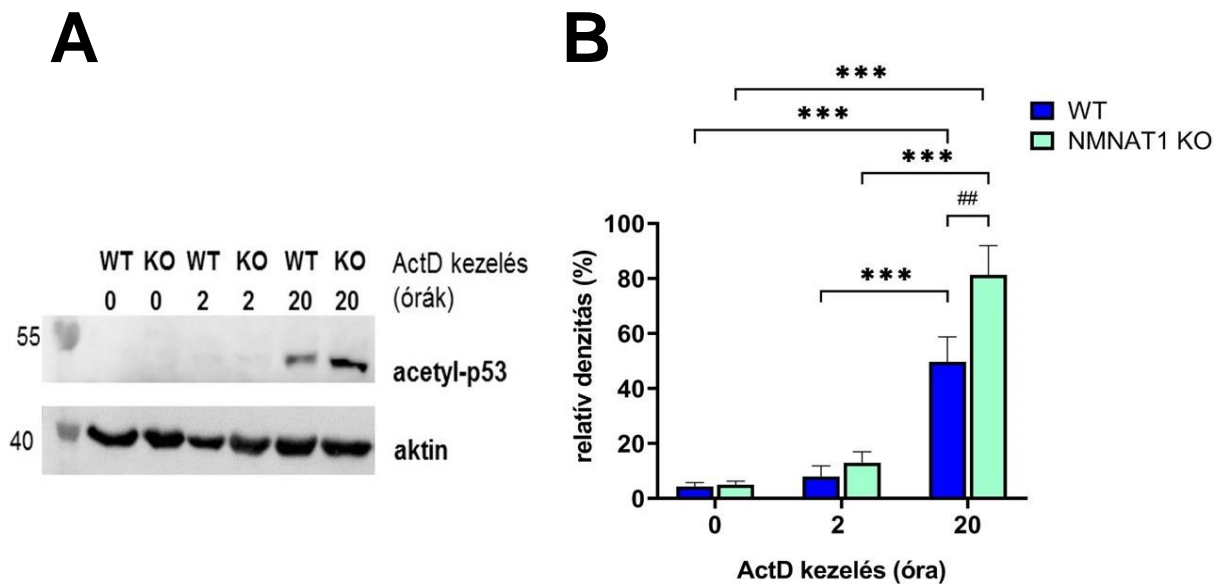


23. ábra Az aktinomicin D által kiváltott PARP aktiváció vizsgálata

Az aktinomicin D által indukált PARilációt western-blot segítségével detektáltuk 6 órával az aktinomicinnel végzett kezelést követően WT és NMNAT1 KO sejtekben (A). A PAR polimerek relatív denzitását mutatjuk be, normalizálva a béta-aktin szintre a B ábrán. A csillagokkal jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Sidak tesztje; * $p < 0,05$) A kettős keresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT KO sejtvonal azonos kezelése esetén (Sidak tesztje; ## $p < 0,01$). A diagram 3 független blot denzitásának átlagát mutatja \pm SEM. (B, D).

VI.4.4. A p53 fehérje acetilációjának vizsgálata

Az alacsony NAD⁺-szintről az irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy gátolja a nukleáris NAD⁺-függő enzimek, például a PARP1 vagy a SIRT1 aktivitását [136, 137]. Mivel a SIRT1 egy NAD⁺-függő deacetiláz enzim, aktivitásának csökkenése várhatóan a célfehérjéinek acetileződésének emelkedését okozza (pl. p53-as fehérje) [138]. A p53 Lys382-es fehérje oldalláncon történő acetilezését Western-blot segítségével detektáltuk (24A ábra). A kezeletlen mintákban acetilezést nem lehetett kimutatni, és a rövid (2 órás) ActD kezelés nem volt hatással az acetilált p53 szintjére. 20 óra ActD-kezelés után azonban mind a WT, mind a KO sejtekben fokozott acetilációt detektáltunk, ami szignifikánsan magasabb szintet mutatott a KO sejtekben (24B. ábra).

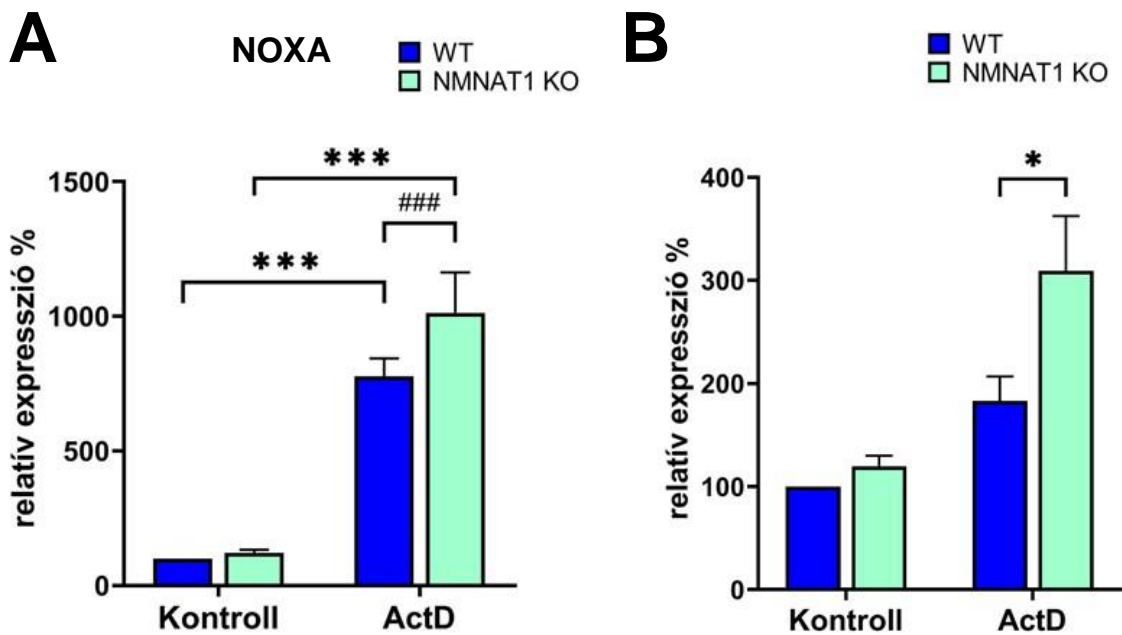


24. ábra A p53 fehérje acetilációjának vizsgálata Western blottal.

Kettő vagy 20 órás aktinomicin D kezelést követően megvizsgáltuk az acetilált p53 fehérje mennyiségét. Az acetil-p53 szintjét a béta-aktin szintjére normalizáltuk. 3 független blot denzitometriájának átlagát mutatjuk be a B ábrán \pm SEM. A csillaggal jelölt oszlopok szignifikánsan eltérnek a kontrolltól (Sidak tesztje; *** $p < 0,001$). A kettős keresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT KO sejtvonal azonos kezelése esetén (Sidak teszt; ## $p < 0,01$).

VI.4.5. p53-dependens pro-apoptotikus gének indukciójának vizsgálata

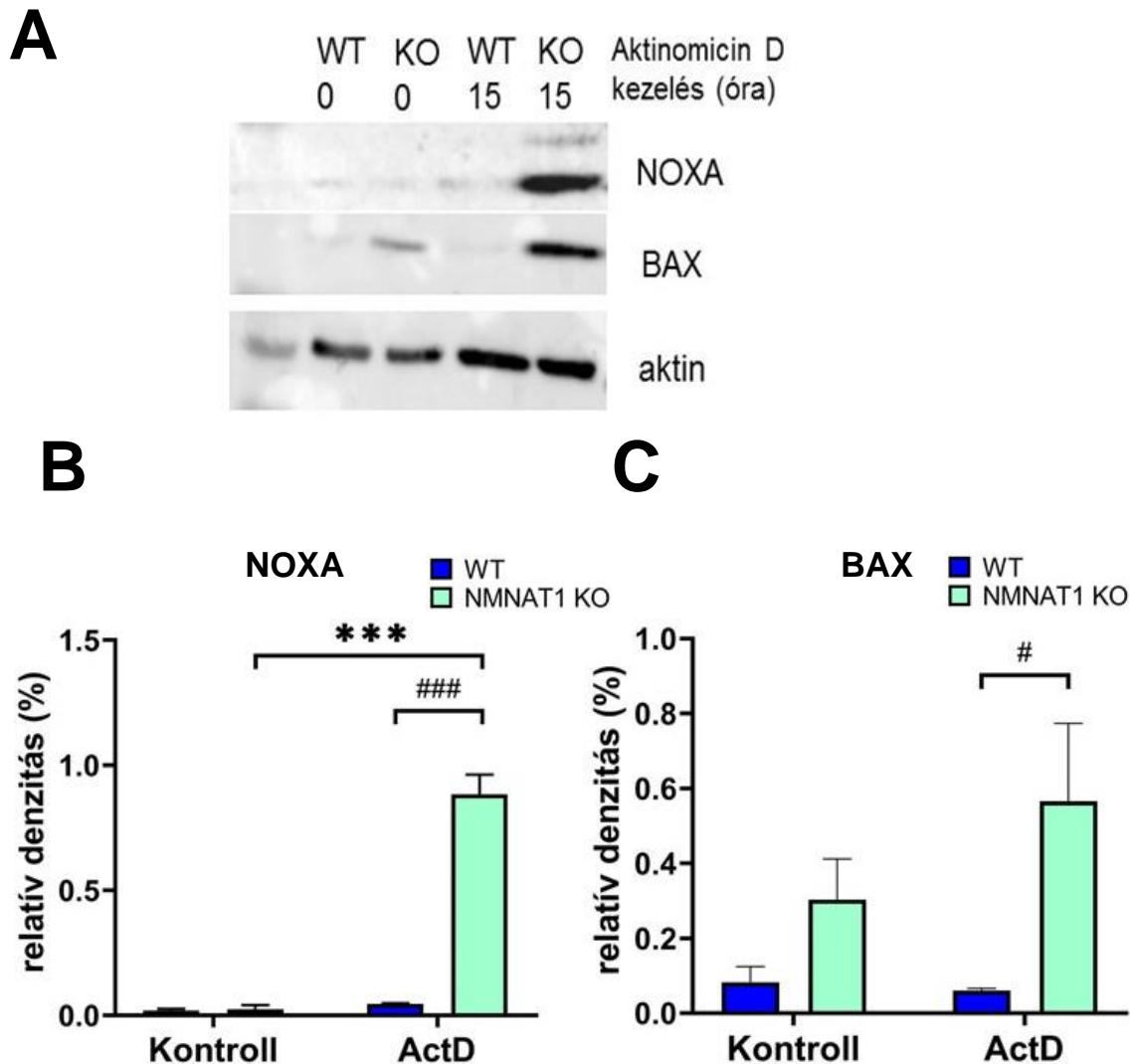
A p53 emelkedett acetilezése a p53-függő pro-apoptotikus gének fokozott expresszióját idézheti elő, ilyen például NOXA vagy BAX [139]. Ezen gének mRNS expresszióját qPCR módszerrel vizsgáltuk 15 órával az ActD kezelést követően (25A, B ábra). A NOXA gén expressziója mindkét sejtvonalban emelkedett (25A. ábra), viszont szignifikánsan magasabb szintet ért el az NMNAT1 KO sejtek esetében. Ezzel szemben, a BAX gén expressziója csak az NMNAT1 KO sejtvonal esetében mutatott szignifikáns emelkedést aktinomycin D kezelés hatására (25B. ábra).



25. ábra. Pro-apoptotikus gének indukciója Aktinomycin D kezelést követően.

A pro-apoptotikus NOXA (A) és a BAX (B) gének expressziós szintjét valós idejű kvantitatív PCR módszerrel határoztuk meg, 15 órával az aktinomycin D kezelés után. A csillagokkal jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Sidak tesztje; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). A kettős keresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a megfelelő kezeléseket esetén a vad típusú és NMNAT1 KO sejtvonalak között (Sidak teszt; ### $p < 0,001$).

A NOXA vagy BAX fehérje expressziós szintjét Western blottal (26A, B, C ábra) detektáltuk. Mind az NOXA (26A, B ábra), mind a BAX (26A, C ábra) fehérje szinten is szignifikánsan magasabb indukciót mutattak az NMNAT1 KO sejtekben, mint a WT sejtek esetén .



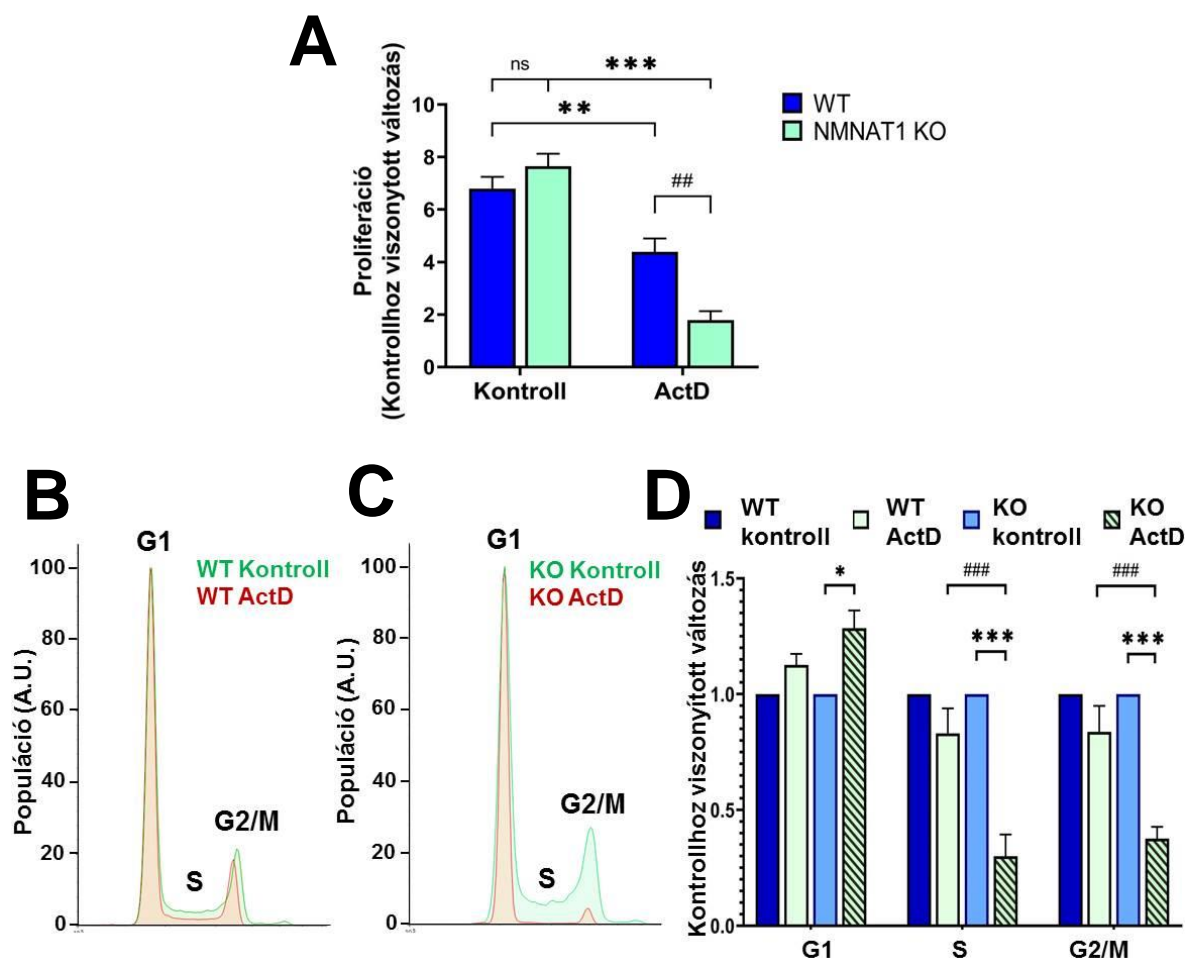
26. ábra. NOXA és BAX fehérjék indukciójának vizsgálata A NOXA és BAX gének expressziós szintjét western blot módszerrel fehérje szinten is meghatároztuk, reprezentatív blottok az A ábrán kerülnek bemutatásra. A B és C ábrákon 3-3 független blot denzitometriájának átlaga került bemutatásra \pm SEM, NOXA (B) BAX (C) A fehérje-expressziókat mindkét esetben a béta-aktin szintre normalizáltuk. A csillagokkal jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a kontrolltól (Sidak teszt; *** $p < 0,001$). A kettős keresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különbözőek a megfelelő kezeléseknél a vad típusú és NMNAT1 KO sejtvonalak között. (Sidak teszt; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$). A kísérletek Csikos Csaba közreműködésével készültek.

VI.4.6. Az NMNAT1 hiánya gátolja a sejtek proliferációját

VI.4.6.1. Sejtprolifерáció és sejtciklus vizsgálata

Mivel Az NMNAT1 KO sejtekben alacsonyabb NAD⁺-tartalom mérhető, az enzim hiánya a kezelés mellett csökkenti a sejtek életképességét, illetve korábbi kísérleteink alapján az NMNAT1 KO sejtek csökkent kolóniaképző aktivitással rendelkeznek (7B ábra). Ezért szerettük volna megvizsgálni az aktinomycin D kezelés proliferációra és sejtciklusra gyakorolt hatását. Korábbi irodalmi adatok is alátámasztják, hogy az aktinomycin D gátolja az MG63 humán oszteosarkóma sejtek proliferációs képességét [134]. A mi vizsgálati modellünkben a sejtek proliferációját HCA-val határoztuk meg. A vizsgálathoz digitális fázis-kontraszt felvételeket készítettünk az ActD kezelés előtt és négy nappal a kezelést követően, melyeken a képanalízis szoftver (Harmony) segítségével meghatároztuk az aktuális sejtszámokat (27. ábra). A négy napos időszak alatt a kezeletlen WT- és KO-sejtek száma megközelítőleg hétszeresére nőtt a platelt sejtszámhoz képest, és a két sejtvonal között nem volt szignifikáns különbség. Az ActD kezelés lelassította a sejtprolifерációt mind a WT, mind a KO sejtekben, de a KO sejtekben drámai mértékben csökkent a proliferáció vad típusú társaikhoz képest a kezelés hatására (27A ábra).

A különböző sejtciklus fázisokban mérhető sejtpopulációkat áramlási citometriával határoztuk meg (27B,C,D. ábra). Kezelés nélkül nem találtunk szignifikáns különbséget a két sejtvonal között, viszont ActD kezelés után az NMNAT1 KO sejtvonalban S és G2/M fázisok populációinak aránya jelentősen csökkent. Tehát, a sejtek a KO sejtvonal esetében nagyobb arányban tartózkodtak G1 fázisban, mint a WT vonal esetében. A WT sejtekben nem volt kimutatható szignifikáns változás a kezelést követően (27B,C,D ábra).

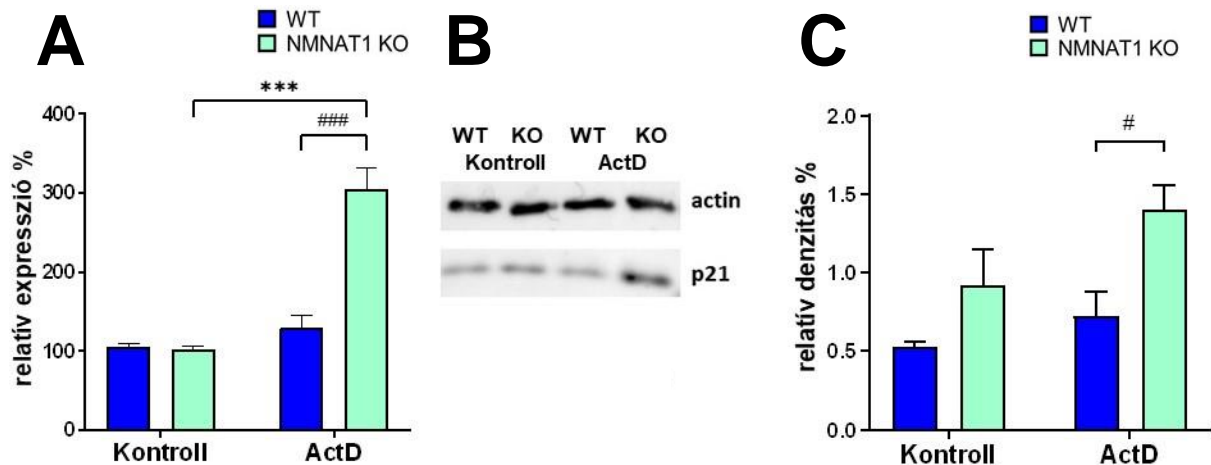


27. ábra. Az aktinomycin D hatása a sejtek proliferációjára és sejtciklusra.

A sejtek proliferációjának mértékét HCA analízissel vizsgáltuk meg. Az aktinomycin D kezelés előtt és 4 nappal a kezelés után készült fázis-kontraszt képek alapján meghatároztuk a sejt számot. (A ábra). A sejtciklust áramlási citometriás módszerrel, propidium-jodid (PI) festéssel határoztuk meg, a mérés primer, sejt populációk arányát szemléltető görbéit mutatjuk be a B és C ábrán. A sejtciklus egyes fázisainak kvantitatív kiértékelése látható a D ábrán, melyen minden populációt a kezeltetlen kontroll sejtekhez viszonyítottunk. A csillagokkal jelölt oszlopok szignifikánsan eltérnek a kontroll mintáktól (Tukey-teszt; * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$). A kettős keresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és KO sejt vonalak esetén a megfelelő kezeléseknél (Tukey-teszt; ### $P < 0,001$). Az ábrázolt adatok 3 kísérlet átlaga \pm SEM. Dr. Demény Máté segítségével történt az áramlási citometria analízis beállítása.

VI.4.6.2. A SIRT1 enzim gátlásának hatása a sejtproliferációra

Az p53 fokozott acetilációja a proapoptotikus gének indukciója mellett a sejtproliferációra is hatással van, a p21 gén indukciója révén [140]. Az ActD indukálta a p21 mRNS- (28A. ábra) és a fehérje expressziót (28B és C ábra,) az NMNAT1 KO sejtekben, ezzel szemben, a WT sejtekben nem tapasztaltunk szignifikáns változást.

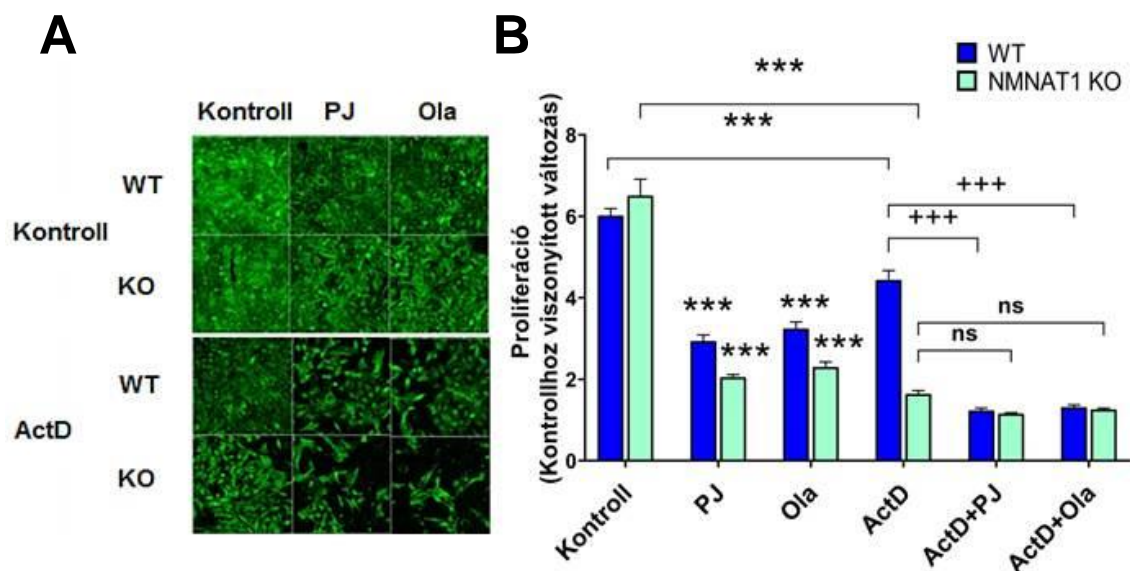


28. ábra. Az alacsony nukleáris NAD⁺ hatása a sejtproliferációra I

A p21 expressziós szintjét valós idejű kvantitatív PCR módszerrel határoztuk meg (A). A minták 15 órával az aktinomycin D-vel végzett kezelés után készültek. A csillaggal jelölt oszlopok szignifikánsan eltérnek a kontrolltól (Sidak teszt; *** $P < 0,001$). A kettős keresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT1 KO sejtvonalak között a megfelelő kezelések esetén (Sidak teszt; ### $P < 0,001$). A p21 gén expressziós szintjét fehérje szinten western blot módszerrel is meghatároztuk (B és C ábrák). Egy reprezentatív blotot mutatunk a B ábrán. A p21 relatív denzitása látható a C ábrán, normalizálva a béta-aktin szintjére. 3 független blot denzitásának átlaga látható a C ábrán. A kettős keresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú sejtek és az NMNAT1 KO sejtek között a megfelelő kezelések esetén (Sidak teszt; # $P < 0,05$). A kísérletek Csikos Csaba közreműködésével készültek.

VI.4.6.3. A PARP1 enzim gátlásának hatása a sejtproliferációra

Mivel irodalmi adatok alapján a PARP1 gátlása lassítja a sejtproliferációt [141], megvizsgáltuk az ActD kezelés által kiváltott PARP-aktiváció sejtproliferációra gyakorolt hatását (29A, B ábra). A PARP-inhibitorokkal (Olaparib és PJ34) történt előkezelés mindkét vonalon csökkentette a proliferációt. Kombinált kezelésként alkalmazva az ActD-t a PARP inhibitorokkal, azt tapasztaltuk, hogy a sejtek proliferációja jelentősen csökkent a vad típusú sejtekben, az NMNAT1 KO sejtek esetén viszont nem tapasztaltunk szignifikáns változást a csak aktinomycin D-vel kezelt mintákhoz képest. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy az NMNAT1 KO sejtek esetében a csökkent bazális NAD-szint nem zavarja a PARP bazális aktivitását (így az specifikus gátlószerekkel gátlható). ActD kezelés esetében azonban a gátolt sejtmagi NAD⁺-szintézis miatt az aktuálisan elérhető NAD-készlet nem elegendő a DNS károsodás hatására bekövetkező PARP1-aktivációhoz az NMNAT1 KO sejtekben. Emiatt korlátozott a sejtek DNS-hibajavítása, amely szintén hozzájárul a sejtek csökkent proliferációs képességéhez.

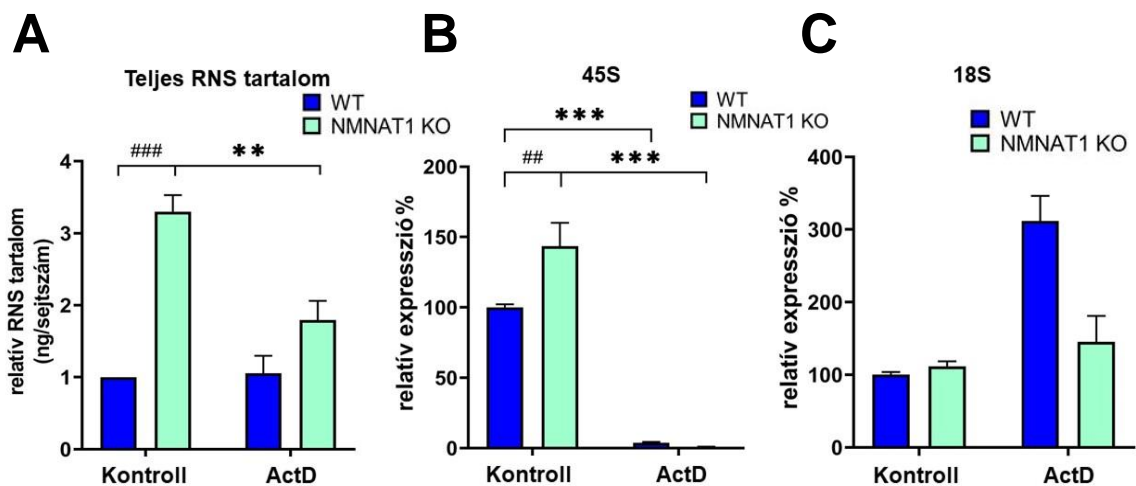


29. ábra. Az alacsony nukleáris NAD⁺ hatása a sejtproliferációra II

A vad típusú és NMNAT1 KO sejtek proliferációját HCA módszerrel határoztuk meg (A). Az előkezelések PJ34 (PJ) és Olaparib (Ola) PARP inhibitorokkal történtek. A sejtek számát a plátelés időpontjában (0. nap) és az 5. napon (4 nappal az aktinomycin D kezelés után) határoztuk meg. A felvételek analizését a B ábra mutatja. A csillagokkal jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek az 5. nap kontroll mintáitól (Sidak teszt; *** $p < 0,001$). A kettős keresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT1 KO sejtek között a megfelelő kezeléseik esetén (Sidak tesztje; ### $P < 0,001$, n.s.: nem szignifikáns). A „+” jelöléssel ellátott oszlopok szignifikánsan különböznek a csak ActD kezelés és az előkezelés+ActD kezelés esetén (Bonferroni teszt; +++ $P < 0,001$, n.s.: nem szignifikáns). Az ábrázolt adatok 3 kísérlet átlaga \pm SEM.

VI.4.7. Az NMNAT1 KO fenotípus és az actinomycin D - kezelés hatása az RNS-tartalomra

Azt már korábban kimutatták, hogy az NMNAT1 enzim és az ActD egyaránt befolyásolják az RNS szintézisét [21, 142]. Az RNS homeosztázisának vizsgálatához a kísérleteink során megmértük az összes RNS mennyiségét (30A. ábra), valamint a 45S (30B. ábra) és 18S (30C. ábra) riboszomális RNS-ek expresszióját. Megállapítottuk, hogy az NMNAT1 KO sejtek háromszor nagyobb össz-RNS-szinttel rendelkeznek, összehasonlítva vad típusú sejtekkel (30A. ábra). Az ActD kezelés szignifikánsan csökkentette az össz-RNS szintet az NMNAT1 KO sejtekben, míg a WT sejtekre nem volt hatással (30A. ábra). Az NMNAT1 hiánya növelte a 18S riboszomális RNS proformájának (45S) expresszióját (30B. ábra). A 45S RNS expresszióját mindkét sejtvonalban teljesen blokkolta az ActD kezelés (30B. ábra). Érdekes módon a két vonal között nem volt kimutatható különbség az érett 18S rRNS mennyiségében (30C. ábra). Az ActD kezelés megemelte a vad típusú sejtekben az érett 18S rRNS szintjét, de az NMNAT1 KO sejtek esetén nem okozott szignifikáns változást (30C. ábra).



30. ábra Az RNS-tartalom változása az NMNAT1 hiányában Aktinomicin D kezelést követően.

A relatív RNS-tartalmat a sejtszámolással és a minták teljes RNS-tartalmának mérésével határoztuk meg 24 órás ActD kezelés után. A csillaggal jelölt oszlopok szignifikánsan eltérnek a kontrolltól (Sidak teszt; ** $P < 0,01$). A kettős keresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT1 KO sejtvonal azonos kezelése esetén (Sidak teszt; #### $P < 0,001$). A 45S és 18S riboszomális RNS mennyiségét valós idejű kvantitatív PCR módszerrel határoztuk meg (B és C). A csillaggal jelölt oszlopok szignifikánsan eltérnek a kontrolltól (Sidak teszt; *** $P < 0,001$). A kettős keresztekkel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek a vad típusú és NMNAT1 KO sejtvonal azonos kezelése esetén (Sidak teszt; ## $P < 0,01$). Az ábrázolt adatok 3 kísérlet átlagát mutatják \pm SEM.

VII. MEGBESZÉLÉS

Az oszteoszarkóma a csontvázrendszer elsődleges rosszindulatú daganata. A daganatok többségben a hosszú csöves csontokban lokalizálódnak [22], de előfordulhatnak lapos csontokban is, pl az állkapocs csontjában [23]. Gyakran társul mellé áttét, ami legtöbb esetben a tüdőben alakul ki [24]. Az oszteoszarkóma rendkívül agresszív lefolyású betegség. Kezelése műtéti amputációval és kemoterápiával történik. A kemoterápia során használt szereket (metotrexát, ciszplatin, doxorubicin (adriamicin) és ifoszfamid), általában kombinációban alkalmaznak [46]. A betegek sikertelen gyógyulásának fő oka a kezelésekkal szembeni nagyfokú rezisztencia kialakulása [47, 48]. A gyakori rezisztencia pedig a visszaeső betegek mindösszesen 20% -os túlélési arányában tükröződik [32]. Az oszteoszarkóma tehát egy rendkívül ellenálló, agresszív tumorfajta, melynek kezelésében egyértelműen új perspektívákra van szükség a betegek túlélési rátájának javításához.

Az oszteoszarkóma kezelésében használt szerek a sejtek DNS-ére fejtik ki a hatásukat, viszont a sejtekben működő hibajavítási mechanizmusok sok esetben helyreállítják a kemoterápiás szer által okozott DNS-károsodást, ami a kemoterápia hatástalanságához vezet. Így a daganat kezelésének egy új perspektíváját jelentheti, a tumorsejtek DNS-károsodást követő hibajavítási mechanizmusok befolyásolása. Ennek során a rákos megbetegedésekben a kemoterápiás szerek által előidézett DNS károsodást követő helyreállításban defektust idéznek elő, különböző hibajavítási mechanizmusok gátlásával. A legismertebb példa a BRCA-negatív petefészekrák PARP-inhibitorokkal való kezelése [143].

A PARP-inhibitorokkal kapcsolatos ígéretes eredmények felhívják a figyelmet a PARiláció folyamatához nélkülözhetetlen szubsztrát, a NAD⁺ jelentőségére. Ezen kívül, egy másik jelentős NAD⁺-dependens enzimes család, a nukleáris SIRT enzimek, szintén befolyással bírnak a sejtek túlélésére, ezáltal ezek a fehérjék is potenciális kemoterápiás célpontok lehetnek.

Az NMNAT enzimek mind a mentési és mind a Preiss-Handler útvonalon keresztül a NAD⁺ előállításában vesznek részt [51]. Az NMNAT-1 tumorokban betöltött szerepéről kevés információ áll rendelkezésre. Specifikus NMNAT1-inhibitorok jelenleg nem ismertek, így ezen enzim gátlásának következménye a tumorterápiában ismeretlen. Irodalmi adatok alapján viszont valószínűsíthető, hogy szerepe lehet a tumorsejtek

túlélésében, mert azt találták, hogy különböző kemoterápiás ágensek hatására az egyébként viszonylag alacsony expressziós szintje megemelkedik [21].

Az NMNAT1 tumor sejtvonalakban lévő expressziójáról sem léteztek korábbi irodalmi adatok. Ezért, elsőként az NMNAT1 fehérje expressziós szintjét vizsgáltuk meg több különböző szöveti eredetű humán tumor sejtvonalon. Minden vizsgált sejtvonalon kimutatható volt az NMNAT1 expressziója, de különbségeket tapasztaltunk annak mértékében. Mivel a fehérje szerepének tanulmányozására farmakológiai lehetőségünk nincs, ezért egy olyan átlagos szinten NMNAT1-et expresszáló sejtvonalat szerettünk volna találni, amely viszonylag könnyen transzdukálható. Az U2OS oszteoszarkóma sejtek többi vizsgált sejtvonálhoz képest átlagos NMNAT1 mRNS szintet mutattak (4. ábra). Munkánk első részében szerettünk volna feltárni az NMNAT1 oszteoszarkómában betöltött szerepét. Az ismert, hogy az NMNAT1 gén hiánya embrionális letalitáshoz vezet [98], viszont a gén sejtvonalakban történő inaktiválásának hatásaival kapcsolatosan nincsenek irodalmi adatok. Eredményeink azt mutatják, hogy az U2OS sejtek képesek voltak tolerálni az NMNAT1 gén inaktiválását anélkül, hogy csökkent életképességet vagy markáns morfológiai elváltozásokat mutattak volna. Az NMNAT1 KO sejtek legjelentősebb metabolikus változása a csökkent NAD^+ -szint volt, amely nem veszélyeztette a sejtek energia termelését nyugalmi állapotban, amint azt a változatlan ATP -tartalom is tükrözte (8B ábra). Az NMNAT1 KO és a vad típusú sejtek csökkent proliferációs képességet (klonogenitás) mutattak (7B ábra) és mérsékelten megnövekedett a glikolitikus aktivitásuk (8B ábra). A sejtek NAD^+ -készletének kétharmados csökkenése az NMNAT1 KO sejtekben kiemeli az NMNAT1 domináns szerepét az U2OS sejtek NAD^+ szintézisben. Korábbi vizsgálataink során emelkedett NMNAT2 expressziót tapasztaltunk NMNAT1 KO U2OS sejteken, ez azonban nem helyettesítheti teljes mértékben az NMNAT1 szerepét. A nukleáris és a citoplazmatikus terek között NAD^+ -készletek közötti csere ugyan lehetséges [127]. Azonban, a jelenség dinamikájának U2OS sejtekben történő feltárása további vizsgálatokat igényel.

A kutatásunk során az egyik legfőbb kérdés az volt, hogy oszteoszarkóma-terápiában használt kemoterápiás szerek befolyásolják-e az NMNAT1 expresszióját és ha igen, akkor hogyan befolyásolja a gén inaktiválása a kemoterápiás szerek hatását. Az NMNAT1 gén ciszplatin és doxorubicin által történő indukciója (5. ábra) arra utal, hogy a NAD^+ -függő folyamatok is részt vehetnek a sejtek túlélési folyamatiban, az ezekre a kemoterapeutikumokra adott válaszként. [120]. Ez Song és mtsai [21] eredményeivel

korrelál, miszerint doxorubicin kezelés hatására az NMNAT1 expressziója emelkedik. A ciszplatin szobahőmérsékleten szilárd, színe fehér, sötét sárga vagy sárgás-narancsszínű is lehet. Dimetil-primamidban és N, N-dimetil-formamidban oldódik a legjobban, azonban terápiás célra vizes oldatát használják [118]. A ciszplatin tumorölő hatásmechanizmusa abban rejlik, hogy első lépésként kovalens kötést képez a DNS-sel, a guanin imidazolgyűrűjének N7 pozíciójához kötődve [119]. Ezt monofunkcionális platina-DNS adduktumnak nevezik. Ezt követően a ciszplatin reagál egy második guanin bázissal, keresztkötést képez a DNS-en. Keresztkötések kialakulhatnak egy szálon belül vagy két DNS-szál között is. Az vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az NMNAT1 KO sejtek fokozott érzékenységet mutattak a ciszplatinnal szemben, amit a vad típusú sejtekhez képest csökkent életképesség és megnövekedett sejtpusztulás jelez. Az NMNAT1 KO sejtek ciszplatinnal indukált sejthalála mind az apoptózis, mind a nekroptózis jellemzőit mutatta (12. és 13. ábra).

Valószínűsíthető, hogy az NMNAT1 célzott gátlása más típusú daganatok esetében is előnyös lehet. Ezen állítást megerősítik a KmPlot adatbázis RNasec adatai is, melyek azt mutatják, hogy az alacsony NMNAT1-expresszió korrelál a szarkóma, hepatocelluláris karcinóma, hólyagkarcinóma, emlőrák, nyelőcső adenokarcinóma, vese papilláris karcinóma, hasnyálmirigy ductalis adenokarcinóma és méh corpus endometrium karcinóma betegek jobb túlélésével [144]. További vizsgálatot igényel annak megválaszolása, hogy az NMNAT1 gátlása terápiás előnyökkel jár-e más tumorok esetén.

Az NMNAT1 KO sejtekben mérhető alacsony NAD^+ -szint következményeként a csökkent PARilációs képesség és ezen sejtekben mért alacsonyabb életképesség erősen alátámasztja az NMNAT1 fontos szerepét a kemoszenzitizációs folyamatban. Feltételezzük, hogy a nukleáris NAD^+ -szintek túl alacsonyak lehetnek ahhoz, hogy támogassák a PARP1 fokozott aktivitását NMNAT1 KO sejtekben. A ciszplatin által okozott DNS károsodást és PARilációt okozott vad típusú sejtekben. Azonban, a PAR-képződés hiányzott az NMNAT1 KO sejtekben, ami feltételezhetően az alacsony NAD^+ mennyiség következménye. Ezen kívül, a hatékony PARP-inhibitor az olaparib fokozta a ciszplatin proliferáció-gátló hatását a vad típusú sejtekben. A PARP-1 anti-klonogén hatásban betöltött szerepét alátámasztják a publikálatlan adataink a PARP-1 és PARP-2 csendesített oszteoszarkóma sejtekkel végzett kísérletekből. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a PARP1 aktiváció túlélési tényezőként hat a DNS

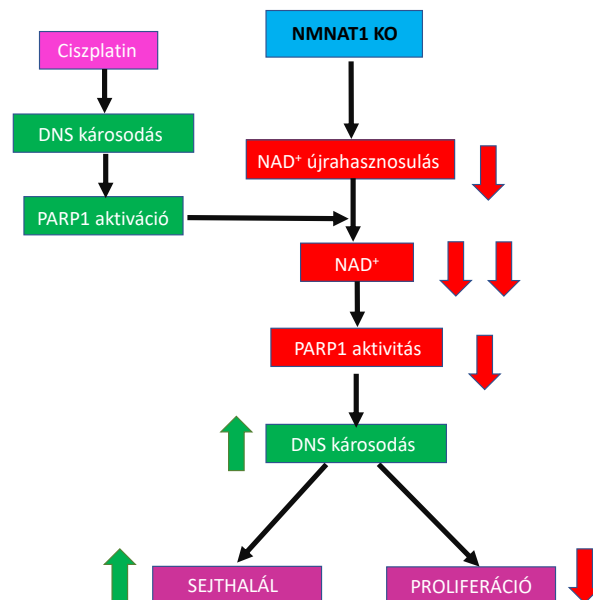
helyreállításán keresztül, mely összhangban van jelenlegi ismereteinkkel a PARiláció szerepéről a ciszplatin által kiváltott DNS-károsodások helyreállításában [145]. A PARP1 nem tud hozzájárulni a sejtek túléléséhez NMNAT1 KO sejtekben, mivel a csökkent NAD^+ mennyiség a PARiláció folyamatához nem elegendő. Így az NMNAT1 inaktiválás kemoszenzitizáló hatásának kulcsfontosságú következménye a PARiláció csökkenése, és ennek következtében a DNS hibajavításának romlása. Feltételezhető, hogy az NMNAT1 és a PARP1 közvetlenül kölcsönhatásba lép a DNS-károsodás helyén, hasonlóan az NMNAT1 és a PARP1 közötti közvetlen kölcsönhatáshoz a PARP1-függő promotereken [75]. Ez az interakció magában foglalhatja az NMNAT1 PAR polimerekhez való kötődését is [146]. A PARP1 (és ezáltal az NMNAT1) lehetséges szerepét az oszteoszarkóma sejtek kemoszenzitizációjában korábbi preklinikai vizsgálatok is alátámasztják. Ezek a tanulmányok a PARP1 expresszió és az oszteoszarkóma sejt túlélése közötti összefüggésről számoltak be. A PARP1 gén kiütéssel vagy PARP1-gátlással emelkedett az oszteoszarkóma sejtekben fokozott sejtpusztulást tapasztaltak [147-149]. A folyamatban lévő és befejezett klinikai vizsgálatok (pl. ClinicalTrials.gov ID: NCT01583543, NCT01858168 NCT02044120) szintén az olaparib és más PARP - gátlók osteosarcomára kifejtett hatásait vizsgálják.

Adataink azt sugallják, hogy az NMNAT1 KO sejtekben megfigyelt kemoszenzitizáció nagy része a PARiláció közvetett gátlásának köszönhető. Az azonban további kísérletek tárgya lehet, hogy az NMNAT1 inhibitorok hatása (amelyek még nem állnak rendelkezésre) mennyiben különbözhet a már klinikumban alkalmazott PARPi vegyületektől, a terápiás spektrum, a hatékonyság, a tolerálhatóság és a mellékhatások tekintetében, különböző típusú daganatok esetén. Feltételezzük, hogy a PARPi és az NMNAT1 inhibitorok hatása nagy valószínűséggel különbözni fog egy vagy több ilyen szempontból.

Feltételezhető, hogy az NMNAT1-hiányos oszteoszarkóma sejtek anyagcseréjében megfigyelt zavarok is szerepet játszhatnak a sejtek kémiai érzékenységében, tekintettel a NAD^+ központi szerepére az energia anyagcserében. Az NMNAT1 KO sejtekben enyhe eltolódást lehetett észlelni a glikolízis felé kezelés nélkül is, de az energiatermelés kiegyensúlyozott volt, amint azt a normál ATP-szint jelez. Ezzel szemben, a mitokondriális stresszteszt súlyosan károsodott légzési tartalékkapacitást állapított meg. A metabolikus szabályozás fontosságát a tumorok viselkedésében és a kemoszenzitivitásban több tanulmány is vizsgálta. Például integrált transzkriptomikai és

metabolomikai adatkészletek alapján megváltozott glikolízissel kapcsolatos mRNS-eket és metabolitokat azonosítottak oszteoszarkóma mintákban [150]. Ezenkívül a különböző mikroRNS -ek pozitívan (pl. MiRNA543) [151] vagy negatívan (például miRNA186) [152] szabályozzák mind az oszteoszarkóma proliferációját, mind a glikolízist. Továbbá úgy tűnik, hogy a glikolízis korrelál a kemoszenzitivitással (például a ciszplatin -érzékenységgel [153] vagy az oszteoszarkóma sejtek életképességével [154, 155]).

Összefoglalva, az NMNAT1 enzim az oszteoszarkóma kezelésének egy lehetséges célpontja. Az NMNAT1 gátlással együtt a kemoterápia részeként használt DNS-károsító szerek valószínűleg fokozott toxicitást okozhatnak. A szinergia mögött álló legfontosabb mechanizmusok közé tartozik a PARiláció függő DNS hibajavítási folyamatok és a metabolikus folyamatok megváltozása. Ezen eredményeink összegzését a 31. ábrán láthatjuk.



31. ábra: Ciszplatin által okozott sejtpusztulás mechanizmusa az NMNAT1 KO sejtekben.

Feltételeztük, hogy nem a ciszplatin az egyetlen olyan szer, mely fokozottan citotoxikus az NMNAT1-génhiányos sejtekre. Ezért munkánk második részében egy nagy áteresztőképességű citotoxicitási szűrést végeztünk, annak céljából, hogy olyan vegyületeket azonosítsunk, melyek az NMNAT1 hiányában fokozottan citotoxikusak az oszteoszarkóma sejtekre. Kísérleteinkhez egy, a Food and Drug Administration (FDA) által jóváhagyott, 774 db gyógyszer-hatóanyagot tartalmazó molekulakönyvtárt használtunk. Kilenc vegyületet azonosítottunk, amelyek fokozott toxicitást mutattak az NMNAT1 enzim hiányos U2OS oszteoszarkóma sejtekben, összehasonlítva vad típusú

sejtvonalal (17. ábra). A digoxin kivételével az összes többi találat megerősíthető volt a további kísérleteinkben (18. ábra). Figyelemre méltó, hogy minden validált találat ismert kemoterápiás szer. Közülük öt (daunorubicin, doxorubicin, idarubicin, epirubicin és mitoxantrone) antraciklinek, és a tenopozidhoz hasonlóan gátolják a topizomeráz II -t. Érdekes találat volt a bortezomib proteaszóma inhibitor, amelyet hematológiai rosszindulatú daganatok (pl. Myeloma multiplex, köpenysejtes limfóma és plazmasejt-leukémia) kezelésére használnak [156, 157]. A proteaszóma inhibitorok célba vehetik a tumorsejtek szaporodásával, sejtpusztulásával és angiogenezisével kapcsolatos folyamatokat olyan fehérjék expressziójának modulálásával, mint a p53, a Bcl-2, a Bax és az NFκB útvonal komponensei [158]. Az NMNAT1 és a bortezomib közötti kölcsönös kapcsolat jellegének feltárása további vizsgálatokat igényel. Az aktinomicin D (ActD, más néven daktinomicin) markáns, koncentrációfüggő, a vad típusú sejtekhez képest jelentősen magasabb toxicitást mutatott az NMNAT1 KO sejtekben, még alacsony koncentrációk esetén is. A fentiek alapján az aktinomicin D-t választottuk a további kísérleteinkhez, hogy feltárhassuk az NMNAT1 KO oszteoszarkóma sejtek aktinomicin D-vel szembeni fokozott érzékenysége mögött álló mechanizmusokat.

Az aktinomicin D (ActD) egy polipeptid [159], amely bakteriosztatikus [160], HIV-szuppresszív [161] és daganatellenes [162] hatással rendelkezik. Az ActD stabil komplexeket képez kettős szálú DNS-sel [142], ami gátolja az RNS szintézist [163]. Az ActD -t daganatellenes antibiotikumként használják különböző rosszindulatú daganatok esetén, köztük Ewing -szarkóma (csont- és lágyrész -szarkóma) kezelésére [164]. Még nem teljesen feltárt, hogy az ActD milyen sejthalál úton fejt ki tumorölő hatását. A fellelhető irodalmi adatok szerint az ActD apoptotikus sejthalált okoz oszteoszarkóma sejtekben [134], de kaspáz-független, nem apoptotikus mechanizmusokat más sejttípusokban is leírtak (pl. Neuroblasztóma sejtvonalakban) [162].

A kaspáz-gátlóval és a receptor-interacting protein kináz 1 (RIP-1) enzimet gátló nekroptózis-gátlóval (nekrostatin-1) kapott adataink azt sugallják, hogy az apoptózis útvonala dominál az ActD-vel kezelt U2OS oszteoszarkóma sejtek esetén (19., 20A, B ábra), míg a nekroptózis jelentősége elhanyagolható (19. ábra). A kaspáz aktiválás mellett az ActD LDH felszabadulását okozott az NMNAT1 KO sejtekben az. Mivel a kaspáz inhibitor gátolta az LDH felszabadulását, ezért ez másodlagos nekrozisnak tekinthető (20C ábra)

Az NMNAT1-hiányos U2OS sejtek bazális NAD^+ -szintje 60 % -kal alacsonyabb volt, mint a vad típusú sejtekben, és az ActD kezelés további NAD^+ -csökkenést okozott (21A. ábra). Ezért feltételeztük, hogy két fő nukleáris NAD^+ -függő folyamat, a PARP enzimek általi PARiláció, és SIRT1-függő deacetiláció állhat az NMNAT1 KO tumor sejtek fokozott érzékenységének hátterében az ActD-vel kezelt oszteoszarkóma sejtekben.

Munkánk első részében (VI.2. fejezet) beszámoltunk arról, hogy a ciszplatinnal kezelt NMNAT1 KO sejtekben a PARP1 működése gátolt, ami fokozott DNS károsodást eredményezett. Az ActD esetében is DNS károsodást és PARP aktivációt tapasztaltunk a vad típusú sejtekben. Az NMNAT1-hiányos sejtekben súlyosabb DNS károsodást és korlátozott PARP-aktivációt tudtunk kimutatni (22-23. ábra). Hasonlóan a ciszplatinnal végzett megfigyeléseinkhez, a PARP-inhibitorokkal történt előkezelés esetén a sejtek proliferációja jelentősen csökkent mind a vad típusú és mind az NMNAT1 KO sejtekben (29. ábra), viszont az ActD kezelés hatására csak a vad típusú sejtekben tapasztaltunk további proliferáció-csökkenést a PARP-inhibitorok alkalmazásakor (29. ábra). Ez a megállapítás alátámasztja azt a feltételezésünket, miszerint az NMNAT1 KO fenotípus részben a NAD^+ -függő PARiláció gátlásán keresztül érzékenyíti a sejteket.

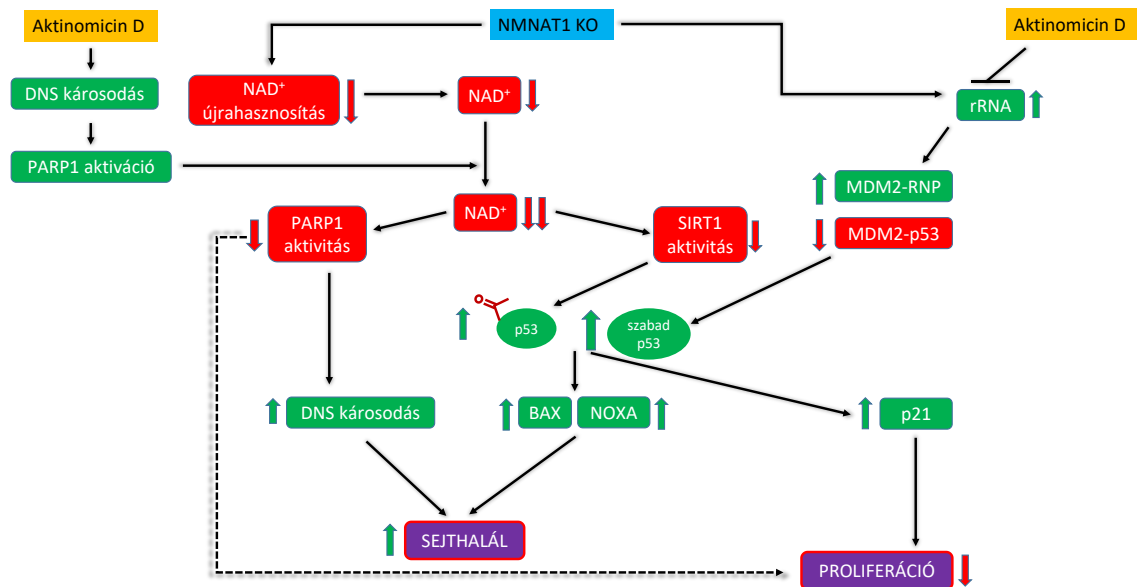
A III. típusú hiszton-deacetiláz enzim, a SIRT1 szintén egy NAD^+ -függő nukleáris enzim [165]. Szerepet játszik a DNS károsodásra adott válaszban [166]. A nukleáris SIRT-ek segítik a sejtek túlélését különböző stressz körülmények között, ami jelzi potenciális szerepüket a kemoszénitizációban.

Feltételezésünk szerint, az ActD kezelés esetén az NMNAT1-hiányos sejtekben a SIRT1 működése gátlódhat, mivel a SIRT1 aktivitás nagyon érzékeny a NAD^+ koncentráció csökkentésére, így az általa deacetilált fehérjék acetilezett formában maradhatnak. A p53 egy transzkripciós faktor, a SIRT1 egyik fő célfehérjéje, melynek fokozott acetilációja pro-apoptotikus és antiproliferatív gének expresszióját indukálhatja [167]. Az NMNAT1-génhiányos sejtekben az p53 fokozott acetilációját tapasztaltuk 20 órával az ActD kezelés után, mely szignifikánsan magasabb volt az NMNAT1 KO sejtekben a vad típusú sejtekhez képest (24. ábra). Ez az eredmény összhangban van a más irodalmi adatokkal, melyekben magasabb p53-acetilációt és apoptózist írtak le a SIRT1 gátlásakor [168]. A p53 fokozott acetilációja a p53-függő pro-apoptotikus gének (NOXA és BAX) expressziójának fokozódásához vezetett, a szakirodalmi adatokkal [97] összhangban az NMNAT1 KO-sejtekben (25-26. ábra).

A p53 aktiválása a sejtciklus leállítását is eredményezi a p21 indukciója révén [97]. A p21 emelkedését csak az ActD-vel kezelt NMNAT1 KO sejtekben tapasztaltuk (28. ábra). Az emelkedett p21 expresszió mellett az ActD-vel kezelt NMNAT1 KO sejtek alacsonyabb proliferációját is megfigyeltük (27A. ábra). Ezen kívül, a sejtciklus elemzés során jelentős csökkenést mutattunk ki mind az S, mind a G2/M fázisban az NMNAT1 hiányos sejtekben (27B, C, D ábra), ami összhangban van azzal a megállapítással, hogy az Aktinomicin D sejtciklus leállást okoz a G1 fázisban [169]. Eredményeink azt mutatják, hogy mind a SIRT1, mind a PARP1 egyidejű gátlása NAD⁺ -csökkentéssel indukálja a p21 expressziót és elősegíti a G1-megállást ActD-kezelés után. Ebből arra következtethetünk, hogy az NMNAT1 genetikai inaktiválása negatívan befolyásolja a sejtciklus előrehaladását, ezáltal a sejtek proliferációját.

Az NMNAT1-et és az ActD-t egy további mechanizmus is összekapcsolja a p53 aktivációjával, ez az rRNS-ek termelődésének szabályozása. A p53 képes kapcsolódni az MDM2 onkoproteinhez, amely közvetíti a p53 ubikvitinációt és a proteasóma-függő lebomlást [170]. Ez a mechanizmus alacsonyan tartja a nukleáris p53 szintjét. Riboszómális RNS hiányában az MDM2 kölcsönhatásba lép a riboszómális fehérjékkel, ezáltal gátlódik a p53-MDM2 kölcsönhatás, így csökken a p53 lebontása. Az ActD egy riboszóma biogenezis inhibitor, mivel gátolja az RNS szintézist [142]. Az NMNAT1 irodalmi adatok alapján részt vehet az rRNS szintézis szabályozásában, mivel a gén csendesítésének hatására rRNS-szintézis fokozódását tapasztalták [21]. Eredményeink alátámasztják mindkét megállapítást (30. ábra). Az NMNAT1 KO sejtekben a teljes RNS szint háromszoros emelkedését észleltük (30A. ábra). Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy azokban a sejtekben, amelyekben magas a bazális riboszómális biogenezis szintje (pl. NMNAT1 KO oszteosarkóma sejtek, 30A. ábra), az rRNS szintézis blokkolása (pl. ActD kezeléssel) több riboszómás fehérjét hagy kötetlenül, melyek képesek kapcsolódni az MDM2-hez. Ennek eredményeképpen nagy mennyiségű p53 szabadul fel, ami apoptotikus sejthalált vált ki. Ez kiegészítő mechanizmusként szolgálhat az NMNAT1 KO sejtekben megfigyelt fokozott apoptózishoz. Az érett 18S RNS csökkent mennyisége az ActD-vel kezelt NMNAT1 KO sejtekben a PARP gátlásából is eredhet, mivel a PARP1 szerepet játszik az RNS biogenezisében és metabolizmusában [171, 172]. Míg a PARP1 gátlása a γ -besugárzás követően mérsékli a

p21 és MDM2 p53-függő indukcióját és a G1-leállás gátlását [173, 174]. Az eredményeink összegzését a 32. ábrán mutatom be.



32. ábra: Az aktinomicin D által okozott sejtpusztulás mechanizmusa az NMNAT1 KO sejtekben .

Kutatásaink során az NMNAT1 enzimet az ActD -vel kezelt oszteoszarkóma sejtek túlélési tényezőjeként azonosítottuk. A mechanizmus magába foglalja a nukleáris enzimek NAD^+ -dal való táplálását: a) PARP1 általi hatékony DNS hibajavítást b) és SIRT1 enzim p53-függő sejthalál gátlását. Ismert, hogy a PARP1 [17, 175], vagy a SIRT1 [176] gátlása önmagában vagy kemoterápiával kombinálva hatékony a daganatok kezelésében vagy a tumor áttérjedésének gátlásában. Genotoxikus stressz esetén, a lassabb NAD^+ -újrateermelés korlátozza mind a PARP1-, mind a SIRT1-függő jelátviteli útvonalakat, ötvözve a két út gátlásának terápiás előnyeit. Eredményeink azt sugallják, hogy az NMNAT1 gátlása kombinálva az ActD-vel történő kezeléssel új terápiás módszert jelenthet az oszteoszarkóma kezelésére. Amint az izoforma-specifikus NMNAT1-inhibitorok elérhetővé válnak, új irányvonalat jelenthetnek az oszteoszarkóma vagy akár más típusú rákok kezelésében. A tumorsejtek érzékenységének fokozásával a kemoterápiás kezelés nagyobb hatékonysága érhető el, mely mellett vélhetően csökkenhet a citosztatikumok alkalmazásának ideje és/vagy dózisa, mely hozzájárulhat a tumorban szenvedő betegek jobb általános állapotához és a mellékhatások csökkentéséhez.

VIII. KONKLÚZIÓK

Az NMNAT1 knockout oszteoszarkóma sejtek fokozottan érzékenyek a ciszplatin kezelésre

- Sikeresen létrehoztunk U2OS oszteoszarkóma sejtekből egy NMNAT1 KO sejtvonalat.
- Az NMNAT1 KO sejtekben csökkent a NAD⁺-szint és a klonogén aktivitás.
- Csökkent DNS hibajavítás jellemző az NMNAT1 KO sejtekre
- A ciszplatin mind a nekrotikus, mind az apoptotikus sejthalál útvonalat indukálta.
- Ciszplatin kezelés hatására csökkent a NAD⁺ - és az ATP-tartalom az NMNAT1 KO sejtvonalba.
- Az NMNAT1 KO sejtekben gátolt a PARiláció folyamata.
- NMNAT1 KO tumor sejtek érzékenyebbek a ciszplatin kezelésre.

Az NMNAT1 túlélési faktor az aktinomicin D-indukált oszteoszarkóma sejtvonalba

- Nagy áteresztőképességű szűrés (HTS) során, az FDA által jóváhagyott molekulakönyvtárból 8 olyan vegyületet azonosítottunk, melyek legalább 25%-kal nagyobb citotoxicitást okoztak az NMNAT1 KO sejtvonalon, mint a vad típusú U2OS sejteken.
- Az Aktinomicin D apoptotikus útvonal beindításával okoz sejtpusztulást.
- Az aktinomicin D az NMNAT1 KO oszteoszarkóma sejtvonalba fokozottabb citotoxicitást okozott a vad típusú oszteoszarkóma sejtekkel szemben.
- Az aktinomicin D kezelés NMNAT1 KO sejteken erőteljesebb DNS károsodást eredményezett.
- p53 fehérje fokozott acetilálódását és a BAX és a NOXA pro-apoptotikus gének fokozott expresszióját figyeltük meg kezelést követően az NMNAT1 KO sejtvonalba.
- Az aktinomicin D a proliferáció - és a sejtciklus gátlását okozta az NMNAT1 KO sejtvonalba
- Az aktinomicin D kezelés NMNAT1 KO sejtekben az rRNS szintézis gátlásával az MDM2-p53 apoptotikus sejthalál útvonalat aktiválja.

IX. ÖSSZEFOGLALÁS

A kemoterápia a daganatos betegek jelentős részénél nem éri el a kellő hatásosságot, jelentős mellékhatásai miatt kiemelkedően fontos a tumor sejtek kezeléssel szembeni érzékenységének fokozása. Az NMNAT enzimek a sejtek NAD⁺-szintézisében vesznek részt, ezáltal számos biokémiai folyamatot befolyásolhatnak [20]. Viszont kevés információval rendelkezünk a tumorsejtben betöltött szerepével kapcsolatban. Ezért munkánk során létrehoztunk egy NMNAT1-génhiányos (knock-out) oszteosarkóma sejtvonalat, melyet részletesen jellemeztünk. Az NMNAT1 KO sejtvonalon csökkent NAD⁺ szint mellett lassabb proliferáció volt megfigyelhető. Egy oszteosarkómában is használt kemoterápiás készítménnyel, a ciszplatinnal való kezelés hatását összehasonlítottuk a vad típusú és NMNAT1 KO oszteosarkóma sejteken. Az NMNAT1 KO sejtekben tovább csökkent csökkent a NAD⁺ mennyisége. A kezelés során mind a nekrotikus, mind az apoptotikus sejthalál útvonalat indukálódott, a kontroll sejtekben megjelenő PARiláció folyamata a KO mintákban elmaradt és csökkent a DNS hibajavítás mértéke. Összeségében eredményeink alapján kijelenthető, hogy az NMNAT1 KO tumor sejtek érzékenyebbek a ciszplatinnal való kezelésre.

Munkánk második részében egy nagy áteresztőképességű szűrővizsgálatot végeztünk el, annak céljából, hogy további, az NMNAT1 hiányában fokozott sejtpusztulást okozó gyógyszer-hatóanyagokat azonosíthassunk. A hatásos vegyületek közül az aktinomycin D-t választottuk további vizsgálatainkhoz. Az aktinomycin D az apoptotikus útvonal beindításával okozott sejtpusztulást, az NMNAT1 KO sejtvonalon fokozottabb citotoxicitást és DNS károsodást okozott. A kezelés hatására a p53 fehérje fokozott acetilálódását, valamint a BAX és a NOXA pro-apoptotikus gének fokozott expresszióját figyeltük meg. Emellett gátolt proliferációt, a sejtciklust és az rRNS szintézist tapasztaltunk az NMNAT1 KO oszteosarkóma sejtvonalon.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az NMNAT1 expressziójának vagy aktivitásának gátlása a jövőben hatékony célpont lehet a daganatok érzékenységének fokozásában. Illetve a jelenleg is használt citosztatikumok kombinált kezelés során nagyobb hatékonyság elérésével vélhetően csökkenhet az alkalmazás ideje és/vagy dózisa, mely hozzájárulhat a betegek jobb általános állapotához és a mellékhatások csökkentéséhez.

X. SUMMARY

Chemotherapy is not effective enough for a significant proportion of cancers and the side effects could be extremely harmful for the patients. That's why it is of high importance to increase the sensitivity of tumour cells. NMNAT enzymes are involved in the synthesis of NAD⁺ and may therefore influence a number of biochemical processes [20]. However, we have limited information about their role in tumour cells. Therefore, an NMNAT1 gene-deficient (knock-out) oszteoszarkóma cell line was generated. During the characterization of the cell line, we detected decreased NAD⁺ levels and proliferation of the NMNAT1 KO cell line. We compared the effect of cisplatin on wild-type and NMNAT1 KO oszteoszarkóma cells. Cisplatin induced necrotic and apoptotic cell death pathways. We observed reduced DNA repair in NMNAT1 KO cells. NAD⁺ - and ATP content was decreased in the KO cells, while, a highly blocked PARylation process could be detected. Our results show that NMNAT1 KO tumor cells are more sensitive to treatment with cisplatin.

In the second part of our work, a high-throughput screening assay was performed, to identify drug candidates that also cause increased cell death in the absence of NMNAT1. The effects of the hit compound was further characterised in wild-type and NMNAT1 KO oszteoszarkóma cells. This compound was actinomycin D, which caused apoptotic cell death in the osteosarcoma cells. Actinomycin D caused enhanced cytotoxicity and DNA damage in the NMNAT1 KO cell line. Increased acetylation of p53 protein, and increased expression of the pro-apoptotic genes BAX and NOXA were observed after the treatment. Inhibition of proliferation, cell cycle and rRNA synthesis were also observed in the NMNAT1 KO oszteoszarkóma cell line.

In conclusion, our findings suggest that inhibition of NMNAT1 expression or activity, may be an effective target for tumor therapy. Furtherly, in the case of currently used cytostatic agents, it is expected that the duration of the treatment and/or dose could be reduced in a therapy, combined with the inhibition of NMNAT1, to achieve greater efficacy, which may contribute to better overall patient outcome and reduction of side effects.

XI. IRODALOMJEGYZÉK

1. Sultani, G., A.F. Samsudeen, B. Osborne, and N. Turner. NAD(+) : A key metabolic regulator with great therapeutic potential. *J Neuroendocrinol* **2017**. *29*(10).
2. Oun, R., Y.E. Moussa, and N.J. Wheate. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans* **2018**. *47*(19): p. 6645-6653.
3. Keil, L. Bone Tumors: Primary Bone Cancers. *FP Essent* **2020**. *493*: p. 22-26.
4. Misaghi, A., A. Goldin, M. Awad, and A.A. Kulidjian. Osteosarcoma: a comprehensive review. *SICOT J* **2018**. *4*: p. 12.
5. Meazza, C. and P. Scanagatta. Metastatic osteosarcoma: a challenging multidisciplinary treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* **2016**. *16*(5): p. 543-56.
6. Kappel, A.D., J.D. Bernstock, D.F. Ditoro, and Y. Lu. Radiation-induced intracranial osteosarcoma of the anterior skull base after treatment of esthesioneuroblastoma. *BMJ Case Rep* **2021**. *14*(1).
7. Mendoza, P.R. and H.E. Grossniklaus. The Biology of Retinoblastoma. *Prog Mol Biol Transl Sci* **2015**. *134*: p. 503-16.
8. Santibanez-Koref, M.F., J.M. Birch, A.L. Hartley, P.H. Jones, A.W. Craft, T. Eden, D. Crowther, A.M. Kelsey, and M. Harris. p53 germline mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Lancet* **1991**. *338*(8781): p. 1490-1.
9. Lu, L., W. Jin, H. Liu, and L.L. Wang. RECQ DNA helicases and osteosarcoma. *Adv Exp Med Biol* **2014**. *804*: p. 129-45.
10. Buondonno, I., E. Gazzano, E. Tavanti, K. Chegaev, J. Kopecka, M. Fanelli, B. Rolando, R. Fruttero, A. Gasco, C. Hattinger, M. Serra, and C. Riganti. Endoplasmic reticulum-targeting doxorubicin: a new tool effective against doxorubicin-resistant osteosarcoma. *Cell Mol Life Sci* **2019**. *76*(3): p. 609-625.
11. Jimmy, R., C. Stern, K. Lisy, and S. White. Effectiveness of mifamurtide in addition to standard chemotherapy for high-grade osteosarcoma: a systematic review. *JBI Database System Rev Implement Rep* **2017**. *15*(8): p. 2113-2152.
12. Gaspar, N., D.S. Hawkins, U. Dirksen, I.J. Lewis, S. Ferrari, M.C. Le Deley, H. Kovar, R. Grimer, J. Whelan, L. Claude, O. Delattre, M. Paulussen, P. Picci, K. Sundby Hall, H. van den Berg, R. Ladenstein, J. Michon, L. Hjorth, I. Judson, R. Luksch, M.L. Bernstein, P. Marec-Berard, B. Brennan, A.W. Craft, R.B. Womer, H. Juergens, and O. Oberlin. Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. *J Clin Oncol* **2015**. *33*(27): p. 3036-46.
13. cancer.net. *Osteosarcoma—Childhood and Adolescence: Statistics*. 2020. <https://www.cancer.net/>, . 2020.
14. Ryu, K.W., D.S. Kim, and W.L. Kraus. New facets in the regulation of gene expression by ADP-ribosylation and poly(ADP-ribose) polymerases. *Chem Rev* **2015**. *115*(6): p. 2453-81.
15. Houtkooper, R.H., E. Pirinen, and J. Auwerx. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2012**. *13*(4): p. 225-238.
16. Berger, N.A., V.C. Besson, A.H. Boulares, A. Burkle, A. Chiarugi, R.S. Clark, N.J. Curtin, S. Cuzzocrea, T.M. Dawson, V.L. Dawson, G. Hasko, L. Liaudet, F. Moroni, P. Pacher, P. Radermacher, A.L. Salzman, S.H. Snyder, F.G. Soriano, R.P. Strosznajder, B. Sumegi, R.A. Swanson, and C. Szabo. Opportunities for the repurposing of PARP

- inhibitors for the therapy of non-oncological diseases. *Br J Pharmacol* **2018**. 175(2): p. 192-222.
17. Miwa, M. and M. Masutani. PolyADP-ribosylation and cancer. *Cancer Sci* **2007**. 98(10): p. 1528-35.
 18. Marti, J.M., M. Fernandez-Cortes, S. Serrano-Saenz, E. Zamudio-Martinez, D. Delgado-Bellido, A. Garcia-Diaz, and F.J. Oliver. The Multifactorial Role of PARP-1 in Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)* **2020**. 12(3).
 19. Bajrami, I., A. Kigozi, A. Van Weverwijk, R. Brough, J. Frankum, C.J. Lord, and A. Ashworth. Synthetic lethality of PARP and NAMPT inhibition in triple-negative breast cancer cells. *EMBO Mol Med* **2012**. 4(10): p. 1087-96.
 20. Berger, F., C. Lau, M. Dahlmann, and M. Ziegler. Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *J Biol Chem* **2005**. 280(43): p. 36334-41.
 21. Song, T., L. Yang, N. Kabra, L. Chen, J. Koomen, E.B. Haura, and J. Chen. The NAD⁺ synthesis enzyme nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT1) regulates ribosomal RNA transcription. *J Biol Chem* **2013**. 288(29): p. 20908-20917.
 22. Brown, H.K., M. Tellez-Gabriel, and D. Heymann. Cancer stem cells in osteosarcoma. *Cancer Lett* **2017**. 386: p. 189-195.
 23. Chaudhary, M. and S.D. Chaudhary. Osteosarcoma of jaws. *J Oral Maxillofac Pathol* **2012**. 16(2): p. 233-8.
 24. Huang, X., J. Zhao, J. Bai, H. Shen, B. Zhang, L. Deng, C. Sun, Y. Liu, J. Zhang, and J. Zheng. Risk and clinicopathological features of osteosarcoma metastasis to the lung: A population-based study. *J Bone Oncol* **2019**. 16: p. 100230.
 25. Chou, A.J. and R. Gorlick. Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions. *Expert Rev Anticancer Ther* **2006**. 6(7): p. 1075-85.
 26. Briccoli, A., M. Rocca, M. Salone, G.A. Guzzardella, A. Balladelli, and G. Bacci. High grade osteosarcoma of the extremities metastatic to the lung: long-term results in 323 patients treated combining surgery and chemotherapy, 1985-2005. *Surg Oncol* **2010**. 19(4): p. 193-9.
 27. Rosen, G., B. Caparros, A.G. Huvos, C. Kosloff, A. Nirenberg, A. Cacavio, R.C. Marcove, J.M. Lane, B. Mehta, and C. Urban. Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. *Cancer* **1982**. 49(6): p. 1221-30.
 28. Link, M.P., A.M. Goorin, A.W. Miser, A.A. Green, C.B. Pratt, J.B. Belasco, J. Pritchard, J.S. Malpas, A.R. Baker, J.A. Kirkpatrick, and et al. The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *N Engl J Med* **1986**. 314(25): p. 1600-6.
 29. Stiller, C.A., S.S. Bielack, G. Jundt, and E. Steliarova-Foucher. Bone tumours in European children and adolescents, 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer* **2006**. 42(13): p. 2124-35.
 30. Kaste, S.C., C.B. Pratt, A.M. Cain, D.J. Jones-Wallace, and B.N. Rao. Metastases detected at the time of diagnosis of primary pediatric extremity osteosarcoma at diagnosis: imaging features. *Cancer* **1999**. 86(8): p. 1602-8.
 31. Picci, P. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). *Orphanet J Rare Dis* **2007**. 2: p. 6.
 32. Harrison, D.J., D.S. Geller, J.D. Gill, V.O. Lewis, and R. Gorlick. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther* **2018**. 18(1): p. 39-50.
 33. Mirabello, L., R.J. Troisi, and S.A. Savage. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer* **2009**. 115(7): p. 1531-43.

34. Ottaviani, G. and N. Jaffe. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res* **2009**. *152*: p. 3-13.
35. Ritter, J. and S.S. Bielack. Osteosarcoma. *Ann Oncol* **2010**. *21 Suppl 7*: p. vii320-5.
36. Vanel, D., M. Henry-Amar, J. Lumbroso, E. Lemalet, D. Couanet, J.D. Piekarski, J. Masselot, A. Boddaert, C. Kalifa, T. Le Chevalier, and et al. Pulmonary evaluation of patients with osteosarcoma: roles of standard radiography, tomography, CT, scintigraphy, and tomoscintigraphy. *AJR Am J Roentgenol* **1984**. *143(3)*: p. 519-23.
37. Zhang, X. and Z. Guan. PET/CT in the diagnosis and prognosis of osteosarcoma. *Front Biosci (Landmark Ed)* **2018**. *23*: p. 2157-2165.
38. Kundu, Z.S. Classification, imaging, biopsy and staging of osteosarcoma. *Indian J Orthop* **2014**. *48(3)*: p. 238-46.
39. Brown, K.T., S.V. Kattapuram, and D.I. Rosenthal. Computed tomography analysis of bone tumors: patterns of cortical destruction and soft tissue extension. *Skeletal Radiol* **1986**. *15(6)*: p. 448-51.
40. Im, H.J., T.S. Kim, S.Y. Park, H.S. Min, J.H. Kim, H.G. Kang, S.E. Park, M.M. Kwon, J.H. Yoon, H.J. Park, S.K. Kim, and B.K. Park. Prediction of tumour necrosis fractions using metabolic and volumetric 18F-FDG PET/CT indices, after one course and at the completion of neoadjuvant chemotherapy, in children and young adults with osteosarcoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2012**. *39(1)*: p. 39-49.
41. Eaton, B.R., R. Schwarz, R. Vatner, B. Yeh, L. Claude, D.J. Indelicato, and N. Laack. Osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer* **2021**. *68 Suppl 2*: p. e28352.
42. Postma, A., A. Kingma, J.H. De Ruiter, H. Schraffordt Koops, R.P. Veth, L.N. Goeken, and W.A. Kamps. Quality of life in bone tumor patients comparing limb salvage and amputation of the lower extremity. *J Surg Oncol* **1992**. *51(1)*: p. 47-51.
43. Wei-wei, L., W. Qiu-liang, W. Guo-hao, C. Zhi-hua, and Z. Zong-yuan. Clinicopathologic features, treatment, and prognosis of postirradiation osteosarcoma in patients with nasopharyngeal cancer. *Laryngoscope* **2005**. *115(9)*: p. 1574-9.
44. Liao, L.Q., H.H. Yan, J.H. Mai, W.W. Liu, H. Li, Z.M. Guo, Z.Y. Zeng, and X.K. Liu. Radiation-induced osteosarcoma of the maxilla and mandible after radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *Chin J Cancer* **2016**. *35(1)*: p. 89.
45. Schwarz, R., O. Bruland, A. Cassoni, P. Schomberg, and S. Bielack. The role of radiotherapy in osteosarcoma. *Cancer Treat Res* **2009**. *152*: p. 147-64.
46. Bacci, G., S. Ferrari, M. Mercuri, A. Longhi, R. Capanna, A. Tienghi, A. Brach del Prever, A. Comandone, M. Cesari, G. Bernini, and P. Picci. Neoadjuvant chemotherapy for extremity osteosarcoma--preliminary results of the Rizzoli's 4th study. *Acta Oncol* **1998**. *37(1)*: p. 41-8.
47. Mansoori, B., A. Mohammadi, S. Davudian, S. Shirjang, and B. Baradaran. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull* **2017**. *7(3)*: p. 339-348.
48. Zahreddine, H. and K.L. Borden. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front Pharmacol* **2013**. *4*: p. 28.
49. Wunderlich Lívius, S.A., *A biokémia alapjai*. 2014.
50. Dutta, S., W. Rock, R.J. Cook, A. Kohen, and C.M. Cheatum. Two-dimensional infrared spectroscopy of azido-nicotinamide adenine dinucleotide in water. *J Chem Phys* **2011**. *135(5)*: p. 055106.
51. Bieganowski, P. and C. Brenner. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell* **2004**. *117(4)*: p. 495-502.
52. Revollo, J.R., A.A. Grimm, and S. Imai. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem* **2004**. *279(49)*: p. 50754-63.

53. Preiss, J. and P. Handler. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. I. Identification of intermediates. *J Biol Chem* **1958**. 233(2): p. 488-92.
54. Kulikova, V., K. Shabalin, K. Nerinovski, C. Dolle, M. Niere, A. Yakimov, P. Redpath, M. Khodorkovskiy, M.E. Migaud, M. Ziegler, and A. Nikiforov. Generation, Release, and Uptake of the NAD Precursor Nicotinic Acid Riboside by Human Cells. *J Biol Chem* **2015**. 290(45): p. 27124-27137.
55. Terakata, M., T. Fukuwatari, E. Kadota, M. Sano, M. Kanai, T. Nakamura, H. Funakoshi, and K. Shibata. The niacin required for optimum growth can be synthesized from L-tryptophan in growing mice lacking tryptophan-2,3-dioxygenase. *J Nutr* **2013**. 143(7): p. 1046-51.
56. Gergely, P., *Szerves és bioorganikus kémia*. 2000: Semmelweis kiadó.
57. Covarrubias, A.J., R. Perrone, A. Grozio, and E. Verdin. NAD(+) metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2021**. 22(2): p. 119-141.
58. Kim, M.Y., T. Zhang, and W.L. Kraus. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD+ into a nuclear signal. *Genes Dev* **2005**. 19(17): p. 1951-67.
59. Pavlova, N.N. and C.B. Thompson. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab* **2016**. 23(1): p. 27-47.
60. Chiarugi, A., C. Dolle, R. Felici, and M. Ziegler. The NAD metabolome--a key determinant of cancer cell biology. *Nat Rev Cancer* **2012**. 12(11): p. 741-52.
61. Berger, F., M.H. Ramirez-Hernandez, and M. Ziegler. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem Sci* **2004**. 29(3): p. 111-8.
62. Houtkooper, R.H., C. Canto, R.J. Wanders, and J. Auwerx. The secret life of NAD+: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr Rev* **2010**. 31(2): p. 194-223.
63. Vyas, S., M. Chesarone-Cataldo, T. Todorova, Y.H. Huang, and P. Chang. A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology. *Nat Commun* **2013**. 4: p. 2240.
64. Luscher, B., I. Ahel, M. Altmeyer, A. Ashworth, P. Bai, P. Chang, M. Cohen, D. Corda, F. Dantzer, M.D. Daugherty, T.M. Dawson, V.L. Dawson, S. Deindl, A.R. Fehr, K.L.H. Feijs, D.V. Filippov, J.P. Gagne, G. Grimaldi, S. Guettler, N.C. Hoch, M.O. Hottiger, P. Korn, W.L. Kraus, A. Ladurner, L. Lehtio, A.K.L. Leung, C.J. Lord, A. Mangerich, I. Matic, J. Matthews, G.L. Moldovan, J. Moss, G. Natoli, M.L. Nielsen, M. Niepel, F. Nolte, J. Pascal, B.M. Paschal, K. Pawlowski, G.G. Poirier, S. Smith, G. Timinszky, Z.Q. Wang, J. Yelamos, X. Yu, R. Zaja, and M. Ziegler. ADP-ribosyltransferases, an update on function and nomenclature. *FEBS J* **2021**.
65. Ame, J.C., C. Spenlehauer, and G. de Murcia. The PARP superfamily. *Bioessays* **2004**. 26(8): p. 882-93.
66. Virag, L. and C. Szabo. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* **2002**. 54(3): p. 375-429.
67. Virag, L. Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. *Curr Vasc Pharmacol* **2005**. 3(3): p. 209-14.
68. Burkle, A. and L. Virag. Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes. *Mol Aspects Med* **2013**. 34(6): p. 1046-65.
69. Farmer, H., N. McCabe, C.J. Lord, A.N. Tutt, D.A. Johnson, T.B. Richardson, M. Santarosa, K.J. Dillon, I. Hickson, C. Knights, N.M. Martin, S.P. Jackson, G.C. Smith, and A. Ashworth. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **2005**. 434(7035): p. 917-21.
70. Langelier, M.F., J.L. Planck, S. Roy, and J.M. Pascal. Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity. *J Biol Chem* **2011**. 286(12): p. 10690-701.

71. Kauppinen, T.M. and R.A. Swanson. The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease. *Neuroscience* **2007**. 145(4): p. 1267-72.
72. Alano, C.C., W. Ying, and R.A. Swanson. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires NAD⁺ depletion and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* **2004**. 279(18): p. 18895-902.
73. Fiorillo, C., V. Ponziani, L. Giannini, C. Cecchi, A. Celli, C. Nediani, A.M. Perna, P. Liguori, N. Nassi, L. Formigli, A. Tani, and P. Nassi. Beneficial effects of poly (ADP-ribose) polymerase inhibition against the reperfusion injury in heart transplantation. *Free Radic Res* **2003**. 37(3): p. 331-9.
74. Levrard, S., C. Vannay-Bouchiche, B. Pesse, P. Pacher, F. Feihl, B. Waeber, and L. Liaudet. Peroxynitrite is a major trigger of cardiomyocyte apoptosis in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* **2006**. 41(6): p. 886-95.
75. Zhang, T., J.G. Berrocal, J. Yao, M.E. DuMond, R. Krishnakumar, D.D. Ruhl, K.W. Ryu, M.J. Gamble, and W.L. Kraus. Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent gene expression through promoter-directed recruitment of a nuclear NAD⁺ synthase. *J Biol Chem* **2012**. 287(15): p. 12405-16.
76. Wang, L., C. Liang, F. Li, D. Guan, X. Wu, X. Fu, A. Lu, and G. Zhang. PARP1 in Carcinomas and PARP1 Inhibitors as Antineoplastic Drugs. *Int J Mol Sci* **2017**. 18(10).
77. Pilie, P.G., C.M. Gay, L.A. Byers, M.J. O'Connor, and T.A. Yap. PARP Inhibitors: Extending Benefit Beyond BRCA-Mutant Cancers. *Clin Cancer Res* **2019**. 25(13): p. 3759-3771.
78. Slade, D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. *Genes Dev* **2020**. 34(5-6): p. 360-394.
79. Bryant, H.E., N. Schultz, H.D. Thomas, K.M. Parker, D. Flower, E. Lopez, S. Kyle, M. Meuth, N.J. Curtin, and T. Helleday. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **2005**. 434(7035): p. 913-7.
80. Drean, A., C.J. Lord, and A. Ashworth. PARP inhibitor combination therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* **2016**. 108: p. 73-85.
81. Thomas, H.D., C.R. Calabrese, M.A. Batey, S. Canan, Z. Hostomsky, S. Kyle, K.A. Maegley, D.R. Newell, D. Skalitzky, L.Z. Wang, S.E. Webber, and N.J. Curtin. Preclinical selection of a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor for clinical trial. *Mol Cancer Ther* **2007**. 6(3): p. 945-56.
82. Zhang, J., S.M. Lee, S. Shannon, B. Gao, W. Chen, A. Chen, R. Divekar, M.W. McBurney, H. Braley-Mullen, H. Zaghouni, and D. Fang. The type III histone deacetylase Sirt1 is essential for maintenance of T cell tolerance in mice. *J Clin Invest* **2009**. 119(10): p. 3048-58.
83. Wang, R.H., K. Sengupta, C. Li, H.S. Kim, L. Cao, C. Xiao, S. Kim, X. Xu, Y. Zheng, B. Chilton, R. Jia, Z.M. Zheng, E. Appella, X.W. Wang, T. Ried, and C.X. Deng. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell* **2008**. 14(4): p. 312-23.
84. Inoue, T., M. Hiratsuka, M. Osaki, and M. Oshimura. The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation. *Cell Cycle* **2007**. 6(9): p. 1011-8.
85. Imai, S., C.M. Armstrong, M. Kaeberlein, and L. Guarente. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **2000**. 403(6771): p. 795-800.
86. He, W., J.C. Newman, M.Z. Wang, L. Ho, and E. Verdin. Mitochondrial sirtuins: regulators of protein acylation and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **2012**. 23(9): p. 467-76.

87. Choudhary, C., B.T. Weinert, Y. Nishida, E. Verdin, and M. Mann. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**. *15*(8): p. 536-50.
88. Haigis, M.C., R. Mostoslavsky, K.M. Haigis, K. Fahie, D.C. Christodoulou, A.J. Murphy, D.M. Valenzuela, G.D. Yancopoulos, M. Karow, G. Blander, C. Wolberger, T.A. Prolla, R. Weindruch, F.W. Alt, and L. Guarente. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* **2006**. *126*(5): p. 941-54.
89. Liszt, G., E. Ford, M. Kurtev, and L. Guarente. Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* **2005**. *280*(22): p. 21313-20.
90. Ong, A.L.C. and T.S. Ramasamy. Role of Sirtuin1-p53 regulatory axis in aging, cancer and cellular reprogramming. *Ageing Res Rev* **2018**. *43*: p. 64-80.
91. Lin, Z. and D. Fang. The Roles of SIRT1 in Cancer. *Genes Cancer* **2013**. *4*(3-4): p. 97-104.
92. Luo, J., A.Y. Nikolaev, S. Imai, D. Chen, F. Su, A. Shiloh, L. Guarente, and W. Gu. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* **2001**. *107*(2): p. 137-48.
93. Lin, R.W., C.J. Ho, H.W. Chen, Y.H. Pao, L.E. Chen, M.C. Yang, S.B. Huang, S. Wang, C.H. Chen, and C. Wang. P53 enhances apoptosis induced by doxorubicin only under conditions of severe DNA damage. *Cell Cycle* **2018**. *17*(17): p. 2175-2186.
94. Lowe, S.W. and A.W. Lin. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* **2000**. *21*(3): p. 485-95.
95. Ming, L., P. Wang, A. Bank, J. Yu, and L. Zhang. PUMA Dissociates Bax and Bcl-X(L) to induce apoptosis in colon cancer cells. *J Biol Chem* **2006**. *281*(23): p. 16034-42.
96. Schuler, M. and D.R. Green. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* **2001**. *29*(Pt 6): p. 684-8.
97. Reed, S.M. and D.E. Quelle. p53 Acetylation: Regulation and Consequences. *Cancers (Basel)* **2014**. *7*(1): p. 30-69.
98. Conforti, L., L. Janeckova, D. Wagner, F. Mazzola, L. Cialabrini, M. Di Stefano, G. Orsomando, G. Magni, C. Bendotti, N. Smyth, and M. Coleman. Reducing expression of NAD⁺ synthesizing enzyme NMNAT1 does not affect the rate of Wallerian degeneration. *FEBS J* **2011**. *278*(15): p. 2666-79.
99. Wen, Y., R.G. Zhai, and M.D. Kim. The role of autophagy in Nmnat-mediated protection against hypoxia-induced dendrite degeneration. *Mol Cell Neurosci* **2013**. *52*: p. 140-51.
100. Conforti, L., A. Wilbrey, G. Morreale, L. Janeckova, B. Beirowski, R. Adalbert, F. Mazzola, M. Di Stefano, R. Hartley, E. Babetto, T. Smith, J. Gilley, R.A. Billington, A.A. Genazzani, R.R. Ribchester, G. Magni, and M. Coleman. Wld S protein requires Nmnat activity and a short N-terminal sequence to protect axons in mice. *J Cell Biol* **2009**. *184*(4): p. 491-500.
101. Shen, H., K.L. Hyrc, and M.P. Goldberg. Maintaining energy homeostasis is an essential component of Wld(S)-mediated axon protection. *Neurobiol Dis* **2013**. *59*: p. 69-79.
102. Babetto, E., B. Beirowski, L. Janeckova, R. Brown, J. Gilley, D. Thomson, R.R. Ribchester, and M.P. Coleman. Targeting NMNAT1 to axons and synapses transforms its neuroprotective potency in vivo. *J Neurosci* **2010**. *30*(40): p. 13291-304.
103. Sasaki, Y., T. Nakagawa, X. Mao, A. DiAntonio, and J. Milbrandt. NMNAT1 inhibits axon degeneration via blockade of SARM1-mediated NAD(+) depletion. *Elife* **2016**. *5*.
104. Brazill, J.M., C. Li, Y. Zhu, and R.G. Zhai. NMNAT: It's an NAD(+) synthase... It's a chaperone... It's a neuroprotector. *Curr Opin Genet Dev* **2017**. *44*: p. 156-162.
105. Perrault, I., S. Hanein, X. Zanlonghi, V. Serre, M. Nicouleau, S. Defoort-Delhemmes, N. Delphin, L. Fares-Taie, S. Gerber, O. Xerri, C. Edelson, A. Goldenberg, A. Duncombe, G. Le Meur, C. Hamel, E. Silva, P. Nitschke, P. Calvas, A. Munnich, O. Roche, H. Dollfus, J. Kaplan, and J.M. Rozet. Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital

- amaurosis with early-onset severe macular and optic atrophy. *Nat Genet* **2012**. *44*(9): p. 975-7.
106. Koenekoop, R.K., H. Wang, J. Majewski, X. Wang, I. Lopez, H. Ren, Y. Chen, Y. Li, G.A. Fishman, M. Genead, J. Schwartzentruber, N. Solanki, E.I. Traboulsi, J. Cheng, C.V. Logan, M. McKibbin, B.E. Hayward, D.A. Parry, C.A. Johnson, M. Nageeb, C. Finding of Rare Disease Genes Canada, J.A. Poulter, M.D. Mohamed, H. Jafri, Y. Rashid, G.R. Taylor, V. Keser, G. Mardon, H. Xu, C.F. Inglehearn, Q. Fu, C. Toomes, and R. Chen. Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis and identify a new disease pathway for retinal degeneration. *Nat Genet* **2012**. *44*(9): p. 1035-9.
 107. Falk, M.J., Q. Zhang, E. Nakamaru-Ogiso, C. Kannabiran, Z. Fonseca-Kelly, C. Chakarova, I. Audo, D.S. Mackay, C. Zeitz, A.D. Borman, M. Staniszevska, R. Shukla, L. Palavalli, S. Mohand-Said, N.H. Waseem, S. Jalali, J.C. Perin, E. Place, J. Ostrovsky, R. Xiao, S.S. Bhattacharya, M. Consugar, A.R. Webster, J.A. Sahel, A.T. Moore, E.L. Berson, Q. Liu, X. Gai, and E.A. Pierce. NMNAT1 mutations cause Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* **2012**. *44*(9): p. 1040-5.
 108. Chiang, P.W., J. Wang, Y. Chen, Q. Fu, J. Zhong, Y. Chen, X. Yi, R. Wu, H. Gan, Y. Shi, Y. Chen, C. Barnett, D. Wheaton, M. Day, J. Sutherland, E. Heon, R.G. Weleber, L.A. Gabriel, P. Cong, K. Chuang, S. Ye, J.M. Sallum, and M. Qi. Exome sequencing identifies NMNAT1 mutations as a cause of Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* **2012**. *44*(9): p. 972-4.
 109. Gilley, J., P.R. Mayer, G. Yu, and M.P. Coleman. Low levels of NMNAT2 compromise axon development and survival. *Hum Mol Genet* **2019**. *28*(3): p. 448-458.
 110. Yan, T., Y. Feng, J. Zheng, X. Ge, Y. Zhang, D. Wu, J. Zhao, and Q. Zhai. Nmnat2 delays axon degeneration in superior cervical ganglia dependent on its NAD synthesis activity. *Neurochem Int* **2010**. *56*(1): p. 101-6.
 111. Ljungberg, M.C., Y.O. Ali, J. Zhu, C.S. Wu, K. Oka, R.G. Zhai, and H.C. Lu. CREB-activity and nmnat2 transcription are down-regulated prior to neurodegeneration, while NMNAT2 over-expression is neuroprotective, in a mouse model of human tauopathy. *Hum Mol Genet* **2012**. *21*(2): p. 251-67.
 112. Galindo, R., M. Banks Greenberg, T. Araki, Y. Sasaki, N. Mehta, J. Milbrandt, and D.M. Holtzman. NMNAT3 is protective against the effects of neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Ann Clin Transl Neurol* **2017**. *4*(10): p. 722-738.
 113. Liu, F., A. Arias-Vasquez, K. Slegers, Y.S. Aulchenko, M. Kayser, P. Sanchez-Juan, B.J. Feng, A.M. Bertoli-Avella, J. van Swieten, T.I. Axenovich, P. Heutink, C. van Broeckhoven, B.A. Oostra, and C.M. van Duijn. A genomewide screen for late-onset Alzheimer disease in a genetically isolated Dutch population. *Am J Hum Genet* **2007**. *81*(1): p. 17-31.
 114. Yaku, K., K. Okabe, K. Hikosaka, and T. Nakagawa. NAD Metabolism in Cancer Therapeutics. *Front Oncol* **2018**. *8*: p. 622.
 115. Chen, X., Y. Qian, and S. Wu. The Warburg effect: evolving interpretations of an established concept. *Free Radic Biol Med* **2015**. *79*: p. 253-63.
 116. Aladdin, A., R. Kiraly, P. Boto, Z. Regdon, and K. Tar. Juvenile Huntington's Disease Skin Fibroblasts Respond with Elevated Parkin Level and Increased Proteasome Activity as a Potential Mechanism to Counterbalance the Pathological Consequences of Mutant Huntingtin Protein. *Int J Mol Sci* **2019**. *20*(21).
 117. Kovacs, P., T. Csonka, T. Kovacs, Z. Sari, G. Ujlaki, A. Sipos, Z. Karanyi, D. Szeocs, C. Hegedus, K. Uray, L. Janko, M. Kiss, B. Kiss, D. Laoui, L. Virag, G. Mehes, P. Bai, and E. Miko. Lithocholic Acid, a Metabolite of the Microbiome, Increases Oxidative Stress in Breast Cancer. *Cancers (Basel)* **2019**. *11*(9).
 118. CANCER, I.A.F.R.O. Some antineoplastic and immunosuppressive agents. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* **1981**. *26*: p. 1-411.

119. Eastman, A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol Ther* **1987**. 34(2): p. 155-66.
120. Dasari, S. and P.B. Tchounwou. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* **2014**. 740: p. 364-78.
121. Bakker, B.M., K.M. Overkamp, A.J. van Maris, P. Kotter, M.A. Luttik, J.P. van Dijken, and J.T. Pronk. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **2001**. 25(1): p. 15-37.
122. Nielsen, T.T., N.B. Stottrup, B. Lofgren, and H.E. Botker. Metabolic fingerprint of ischaemic cardioprotection: importance of the malate-aspartate shuttle. *Cardiovasc Res* **2011**. 91(3): p. 382-91.
123. Satrustegui, J. and L.K. Bak. Fluctuations in Cytosolic Calcium Regulate the Neuronal Malate-Aspartate NADH Shuttle: Implications for Neuronal Energy Metabolism. *Neurochem Res* **2015**. 40(12): p. 2425-30.
124. Huang, X., M. Okafuji, F. Traganos, E. Luther, E. Holden, and Z. Darzynkiewicz. Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin. *Cytometry A* **2004**. 58(2): p. 99-110.
125. Spincemaille, P., H. Alborzina, J. Dekervel, P. Windmolders, J. van Pelt, D. Cassiman, O. Cheneval, D.J. Craik, J. Schur, I. Ott, S. Wolfl, B.P. Cammue, and K. Thevissen. The plant decapeptide OSIP108 can alleviate mitochondrial dysfunction induced by cisplatin in human cells. *Molecules* **2014**. 19(9): p. 15088-102.
126. Rytelowski, M., J.G. Tong, A. Buensuceso, H.S. Leong, S. Maleki Vareki, R. Figueredo, C. Di Cresce, S.Y. Wu, S.M. Herbrich, K.A. Baggerly, L. Romanow, T. Shepherd, B.J. Deroo, A.K. Sood, A.F. Chambers, M. Vincent, P.J. Ferguson, and J. Koropatnick. BRCA2 inhibition enhances cisplatin-mediated alterations in tumor cell proliferation, metabolism, and metastasis. *Mol Oncol* **2014**. 8(8): p. 1429-40.
127. Cambronne, X.A., M.L. Stewart, D. Kim, A.M. Jones-Brunette, R.K. Morgan, D.L. Farrens, M.S. Cohen, and R.H. Goodman. Biosensor reveals multiple sources for mitochondrial NAD(+). *Science* **2016**. 352(6292): p. 1474-7.
128. Farber, S., G. D'Angio, A. Evans, and A. Mitus. Clinical studies on actinomycin D with special reference to Wilms' tumor in children. *Ann N Y Acad Sci* **1960**. 89: p. 421-5.
129. Falini, B., L. Brunetti, and M.P. Martelli. Dactinomycin in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* **2015**. 373(12): p. 1180-2.
130. Liu, X.F., L. Xiang, Q. Zhou, J.P. Carralot, M. Prunotto, G. Niederfellner, and I. Pastan. Actinomycin D enhances killing of cancer cells by immunotoxin RG7787 through activation of the extrinsic pathway of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**. 113(38): p. 10666-71.
131. Kleeff, J., M. Kornmann, H. Sawhney, and M. Korc. Actinomycin D induces apoptosis and inhibits growth of pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* **2000**. 86(3): p. 399-407.
132. Perry, R.P. and D.E. Kelley. Persistent synthesis of 5S RNA when production of 28S and 18S ribosomal RNA is inhibited by low doses of actinomycin D. *J Cell Physiol* **1968**. 72(3): p. 235-46.
133. Perry, R.P. and D.E. Kelley. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species. *J Cell Physiol* **1970**. 76(2): p. 127-39.
134. Lu, D.F., Y.S. Wang, C. Li, G.J. Wei, R. Chen, D.M. Dong, and M. Yao. Actinomycin D inhibits cell proliferations and promotes apoptosis in osteosarcoma cells. *Int J Clin Exp Med* **2015**. 8(2): p. 1904-11.
135. Graves, D.E. and R.M. Wadkins. 7-Azidoactinomycin D: a novel probe for examining actinomycin D-DNA interactions. *J Biol Chem* **1989**. 264(13): p. 7262-6.

136. Canto, C. and J. Auwerx. Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD(+)? *Pharmacol Rev* **2012**. *64(1)*: p. 166-87.
137. Luna, A., M.I. Aladjem, and K.W. Kohn. SIRT1/PARP1 crosstalk: connecting DNA damage and metabolism. *Genome Integr* **2013**. *4(1)*: p. 6.
138. Peck, B., C.Y. Chen, K.K. Ho, P. Di Fruscia, S.S. Myatt, R.C. Coombes, M.J. Fuchter, C.D. Hsiao, and E.W. Lam. SIRT inhibitors induce cell death and p53 acetylation through targeting both SIRT1 and SIRT2. *Mol Cancer Ther* **2010**. *9(4)*: p. 844-55.
139. Zheng, J., L. Zhuo, D. Ran, Y. Ma, T. Luo, H. Zhao, R. Song, H. Zou, J. Zhu, J. Gu, J. Bian, Y. Yuan, and Z. Liu. Cadmium induces apoptosis via generating reactive oxygen species to activate mitochondrial p53 pathway in primary rat osteoblasts. *Toxicology* **2020**. *446*: p. 152611.
140. Curtin, N.J. and C. Szabo. Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond. *Mol Aspects Med* **2013**. *34(6)*: p. 1217-56.
141. Gossmann, T.I. and M. Ziegler. Sequence divergence and diversity suggests ongoing functional diversification of vertebrate NAD metabolism. *DNA Repair (Amst)* **2014**. *23*: p. 39-48.
142. Krugh, T.R. Association of actinomycin D and deoxyribodinucleotides as a model for binding of the drug to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1972**. *69(7)*: p. 1911-4.
143. Lopez-Camarillo, C., D.G. Rincon, E. Ruiz-Garcia, H. Astudillo-de la Vega, and L.A. Marchat. DNA Repair Proteins as Therapeutic Targets in Ovarian Cancer. *Curr Protein Pept Sci* **2019**. *20(4)*: p. 316-323.
144. Nagy, A., A. Lanczky, O. Menyhart, and B. Gyorffy. Validation of miRNA prognostic power in hepatocellular carcinoma using expression data of independent datasets. *Sci Rep* **2018**. *8(1)*: p. 9227.
145. McQuade, R.M., V. Stojanovska, J.C. Bornstein, and K. Nurgali. PARP inhibition in platinum-based chemotherapy: Chemopotentiation and neuroprotection. *Pharmacol Res* **2018**. *137*: p. 104-113.
146. Berger, F., C. Lau, and M. Ziegler. Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity by the phosphorylation state of the nuclear NAD biosynthetic enzyme NMN adenylyl transferase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**. *104(10)*: p. 3765-70.
147. Park, H.J., J.S. Bae, K.M. Kim, Y.J. Moon, S.H. Park, S.H. Ha, U.K. Hussein, Z. Zhang, H.S. Park, B.H. Park, W.S. Moon, J.R. Kim, and K.Y. Jang. The PARP inhibitor olaparib potentiates the effect of the DNA damaging agent doxorubicin in osteosarcoma. *J Exp Clin Cancer Res* **2018**. *37(1)*: p. 107.
148. Li, S., Z. Cui, and X. Meng. Knockdown of PARP-1 Inhibits Proliferation and ERK Signals, Increasing Drug Sensitivity in Osteosarcoma U2OS Cells. *Oncol Res* **2016**. *24(4)*: p. 279-86.
149. Engert, F., M. Kovac, D. Baumhoer, M. Nathrath, and S. Fulda. Osteosarcoma cells with genetic signatures of BRCAness are susceptible to the PARP inhibitor talazoparib alone or in combination with chemotherapeutics. *Oncotarget* **2017**. *8(30)*: p. 48794-48806.
150. Chen, K., C. Zhu, M. Cai, D. Fu, B. Cheng, Z. Cai, G. Li, and J. Liu. Integrative metabolome and transcriptome profiling reveals discordant glycolysis process between osteosarcoma and normal osteoblastic cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **2014**. *140(10)*: p. 1715-21.
151. Zhang, H., X. Guo, X. Feng, T. Wang, Z. Hu, X. Que, Q. Tian, T. Zhu, G. Guo, W. Huang, and X. Li. MiRNA-543 promotes osteosarcoma cell proliferation and glycolysis by partially suppressing PRMT9 and stabilizing HIF-1alpha protein. *Oncotarget* **2017**. *8(2)*: p. 2342-2355.
152. Xiao, Q., Z. Wei, Y. Li, X. Zhou, J. Chen, T. Wang, G. Shao, M. Zhang, and Z. Zhang. miR186 functions as a tumor suppressor in osteosarcoma cells by suppressing the malignant phenotype and aerobic glycolysis. *Oncol Rep* **2018**. *39(6)*: p. 2703-2710.

153. Song, Y.D., D.D. Li, Y. Guan, Y.L. Wang, and J. Zheng. miR-214 modulates cisplatin sensitivity of osteosarcoma cells through regulation of anaerobic glycolysis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **2017**. 63(9): p. 75-79.
154. Han, X., Y. Yang, Y. Sun, L. Qin, and Y. Yang. LncRNA TUG1 affects cell viability by regulating glycolysis in osteosarcoma cells. *Gene* **2018**. 674: p. 87-92.
155. Mizushima, E., T. Tsukahara, M. Emori, K. Murata, A. Akamatsu, Y. Shibayama, S. Hamada, Y. Watanabe, M. Kaya, Y. Hirohashi, T. Kanaseki, M. Nakatsugawa, T. Kubo, T. Yamashita, N. Sato, and T. Torigoe. Osteosarcoma-initiating cells show high aerobic glycolysis and attenuation of oxidative phosphorylation mediated by LIN28B. *Cancer Sci* **2020**. 111(1): p. 36-46.
156. Tabchi, S., R. Nair, C. Kunacheewa, K.K. Patel, H.C. Lee, S.K. Thomas, B. Amini, S. Ahmed, R.S. Mehta, Q. Bashir, M.H. Qazilbash, D.M. Weber, R.Z. Orłowski, R. Alexanian, L. Feng, and E.E. Manasanch. Retrospective Review of the Use of High-Dose Cyclophosphamide, Bortezomib, Doxorubicin, and Dexamethasone for the Treatment of Multiple Myeloma and Plasma Cell Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **2019**. 19(9): p. 560-569.
157. Robak, P. and T. Robak. Bortezomib for the Treatment of Hematologic Malignancies: 15 Years Later. *Drugs R D* **2019**. 19(2): p. 73-92.
158. Roeten, M.S.F., J. Cloos, and G. Jansen. Positioning of proteasome inhibitors in therapy of solid malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* **2018**. 81(2): p. 227-243.
159. Hurwitz, J., J.J. Furth, M. Malamy, and M. Alexander. The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis. III. The inhibition of the enzymatic synthesis of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid by actinomycin D and proflavin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1962**. 48: p. 1222-30.
160. Dworkin, M. Sensitivity of gliding bacteria to actinomycin D. *J Bacteriol* **1969**. 98(2): p. 851-2.
161. Guo, J., T. Wu, J. Bess, L.E. Henderson, and J.G. Levin. Actinomycin D inhibits human immunodeficiency virus type 1 minus-strand transfer in in vitro and endogenous reverse transcriptase assays. *J Virol* **1998**. 72(8): p. 6716-24.
162. Cortes, C.L., S.R. Veiga, E. Almacellas, J. Hernandez-Losa, J.C. Ferreres, S.C. Kozma, S. Ambrosio, G. Thomas, and A. Tauler. Effect of low doses of actinomycin D on neuroblastoma cell lines. *Mol Cancer* **2016**. 15: p. 1.
163. Sobell, H.M. Actinomycin and DNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1985**. 82(16): p. 5328-31.
164. (2022)., N.C.f.B.I. *PubChem Compound Summary for CID 88065965*. 2022; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/88065965>.
165. Yang, T., R. Zhou, S. Yu, S. Yu, Z. Cui, P. Hu, J. Liu, Q. Qiao, and J. Zhang. Cytoplasmic SIRT1 inhibits cell migration and invasion by impeding epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma. *Mol Cell Biochem* **2019**. 459(1-2): p. 157-169.
166. Gorospe, M. and R. de Cabo. AsSIRTing the DNA damage response. *Trends Cell Biol* **2008**. 18(2): p. 77-83.
167. Sykes, S.M., H.S. Mellert, M.A. Holbert, K. Li, R. Marmorstein, W.S. Lane, and S.B. McMahon. Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* **2006**. 24(6): p. 841-51.
168. Yun, U.J., I.H. Lee, J.S. Lee, J. Shim, and Y.N. Kim. Ginsenoside Rp1, A Ginsenoside Derivative, Augments Anti-Cancer Effects of Actinomycin D via Downregulation of an AKT-SIRT1 Pathway. *Cancers (Basel)* **2020**. 12(3).
169. Kim, H.K., M.Y. Kong, M.J. Jeong, D.C. Han, J.D. Choi, H.Y. Kim, K.S. Yoon, J.M. Kim, K.H. Son, and B.M. Kwon. Investigation of cell cycle arrest effects of actinomycin D at G1 phase using proteomic methods in B104-1-1 cells. *Int J Biochem Cell Biol* **2005**. 37(9): p. 1921-9.

170. Brighenti, E., D. Trere, and M. Derenzini. Targeted cancer therapy with ribosome biogenesis inhibitors: a real possibility? *Oncotarget* **2015**. 6(36): p. 38617-27.
171. Engbrecht, M. and A. Mangerich. The Nucleolus and PARP1 in Cancer Biology. *Cancers (Basel)* **2020**. 12(7).
172. Eleazer, R. and Y.N. Fondufe-Mittendorf. The multifaceted role of PARP1 in RNA biogenesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2021**. 12(2): p. e1617.
173. Masutani, M., H. Nakagama, and T. Sugimura. Poly(ADP-ribosyl)ation in relation to cancer and autoimmune disease. *Cell Mol Life Sci* **2005**. 62(7-8): p. 769-83.
174. Nozaki, T., M. Masutani, T. Akagawa, T. Sugimura, and H. Esumi. Suppression of G1 arrest and enhancement of G2 arrest by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase: possible involvement of poly(ADP-ribosyl)ation in cell cycle arrest following gamma-irradiation. *Jpn J Cancer Res* **1994**. 85(11): p. 1094-8.
175. Vormoor, B. and N.J. Curtin. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in Ewing sarcoma. *Curr Opin Oncol* **2014**. 26(4): p. 428-33.
176. Liu, T., P.Y. Liu, and G.M. Marshall. The critical role of the class III histone deacetylase SIRT1 in cancer. *Cancer Res* **2009**. 69(5): p. 1702-5.

XII. PUBLIKÁCIÓS LISTA



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/86/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kiss Alexandra
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kiss, A.**, Csikos, C., Regdon, Z., Polgár, Z., Virág, L., Hegedűs, C.: NMNAT1 Is a Survival Factor in Actinomycin D-Induced Osteosarcoma Cell Death.
Int. J. Mol. Sci. 22 (16), 1-17, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22168869>
IF: 5.923 (2020)
2. **Kiss, A.**, Ráduly, A. P., Regdon, Z., Polgár, Z., Tarapcsák, S., Sturniolo, I., El-Hamoly, T., Virág, L., Hegedűs, C.: Targeting nuclear NAD⁺ synthesis inhibits DNA repair, impairs metabolic adaptation increases chemosensitivity of U-2OS osteosarcoma cells.
Cancers (Basel). 12 (5), 1-27, 2020.
IF: 6.639





További közlemények

3. Guti, E., Regdon, Z., Sturniolo, I., **Kiss, A.**, Kovács, K., Demény, M. Á., Szőör, Á., Vereb, G., Szöllősi, J., Hegedűs, C., Polgár, Z., Virág, L.: The multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor sunitinib induces resistance of HER2 positive breast cancer cells to trastuzumab-mediated ADCC.
Cancer Immunol. Immunother. [Epub ahead of print], 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-022-03146-z>
IF: 6.968 (2020)
4. Regdon, Z., Demény, M. Á., Kovács, K., Hajnádý, Z., Nagy-Pénzes, M., Bakondi, E., **Kiss, A.**, Hegedűs, C., Virág, L.: High-Content Screening identifies inhibitors of oxidative stress-induced parthanatos: cytoprotective and anti-inflammatory effects of ciclopirox.
Br. J. Pharmacol. 2021, 1-19, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.15344>
IF: 8.739 (2020)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 28,269

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 12,562

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

Debrecen, 2022.02.17.



XIII. TÁRGYSZAVAK

daganat

kemoterápia

kemoszenzitivitás

NAD⁺

NMNAT1

osteosarcoma

sejthalál

apoptózis

ciszplatin

nagy áteresztőképességű szűrővizsgálat

aktinomicin D

XIV. KEYWORDS

cancer

chemotherapy

chemosensitivity

NAD⁺

NMNAT1

osteosarcoma

cell death

apoptosis

cisplatin

high throughput screening

actinomycin D

XV. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani elsősorban témavezetőmnek Dr. Hegedűs Csabának, a munkám során nyújtott nagyon sok segítségért, a sok hasznos tapasztalat átadásáért, a türeleméért és barátságáért.

Köszönöm Intézetünk vezetőjének, Prof. Dr. Virág Lászlónak, hogy lehetővé tette a munkámat az általa vezetett Intézetben, és tanácsaival segítette a kutatásomat.

Köszönettel tartozok munkatársaimnak, Varga Dávidnak, Hajnády Zoltánnak, Nagy-Pénzes Máténak, Tankáné Farkas Andreának, Demény Máténak, Kovács Katalinnak, Kókai Endrének, Polgár Zsuzsannának, Berta Katalinnak, Isotta Sturniolonak, Regdon Zsoltnak, Guti Elizának, Skopál Adriennek, Herbály Mihálynénak, Olajosné Gulyás Erikának a laboratóriumban nyújtott szakmai segítségért és baráti hangulatért.

Illetve szeretnék köszönetet mondani a barátaimnak, és a családomnak, legfőképpen a szüleimnek és testvéreimnek, akik támogattak és bátorítottak céljaim elérésében.

Pályázatok és támogatók:

ÚNKP 2020 pályázatnak: *ÚNKP-20-3-II-DE-179*

Kiemelkedő publikációs tevékenység és TDK hallgató témavezetése: EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009

GINOP TumorDNS: GINOP-2.3.2-15-2016-00020

GINOP stay alive: GINOP-2.3.2-15-2016-00048

XVI. FÜGGELÉK