

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Az NMNAT-1 enzim szerepe a daganatsejtekben

Kiss Alexandra

Témavezető: Dr. Hegedűs Csaba



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

AZ NMNAT-1 ENZIM SZEREPE A DAGANATSEJTEKBEN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: *Kiss Alexandra* okleveles *Klinikai Laboratóriumi Kutató MSc*

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

Témavezető: Dr. Hegedűs Csaba, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Járomi Luca, PhD
Dr. Matta Csaba, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Járomi Luca, PhD
Dr. Matta Csaba, PhD
Dr. Czimmerer Zsolt, PhD
Dr. Veréb Zoltán, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Sürgősségi Klinika
2022. szeptember 19. 13 óra

I. BEVEZETÉS

1.1. Az oszteoszarkóma

Az oszteoszarkóma a csontvázrendszert érintő rendkívül agresszív 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. A daganat az esetek túlnyomó részében a hosszú csontokban (pl.: combcsontban, a sípcsontban és a felkar csontjában) jelentkezik, de lapos csontokban is előfordulhat (pl.: állkapocscsont). A primer daganat mellett áttétek is kialakulhatnak, melyek többsége a tüdőben lokalizálódik. Más daganatok sugárkezelése hosszú távon szintén oszteoszarkóma kialakulásához vezethet.

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

Az oszteoszarkóma kemoterápiájában alkalmazott szerek közé tartozik a ciszplatin, a metotrexát és a doxorubicin. Ezen kívül, a nemrégiben elfogadott liposzómába kapszulázott szintetikus muramil-dipeptid analóg, a mifamurtid is alkalmazható. Továbbá az oszteoszarkóma a csont- és az azt körülvevő lágyrészt érintő daganat típusának, az Ewing-szarkómának a kezelésére az aktinomycin D-t is szokták alkalmazni.

A jelenleg ismert kezelésekkel szemben nagyfokú rezisztencia alakult ki az oszteoszarkóma kezelésekor, ami a sikertelenül kezelt esetek 90 %-áért felelős. A rezisztencia gyors kialakulása, a visszaeső betegek mindösszesen 20% -os megmentési arányában is tükröződik. Az oszteoszarkóma tehát egy rendkívül ellenálló, agresszív tumorfajta, kezelésében egyértelműen új perspektívák szükségesek, a betegek túlélési rátájának javításához.

1. 2. A NAD^+ szerkezete és funkciói

1.2.1. A NAD^+ szerkezete és szintézise

A nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+) az minden élő sejtekben megtalálható fontos biológiai kofaktor molekula. Felépítését tekintve egy niktonsavamid β -N-glikozidos kötéssel kapcsolódik egy D-ribózhhoz; a D-ribóz 5' szénatomjához pedig egy adenzin kapcsolódik egy pirofoszfáton keresztül.

A NAD^+ három különböző útvonalon keresztül szintetizálható: a Preiss-Handler útvonalon (PHP), nikotinsavból; a de novo szintézis (DNP) során triptofánból; valamint a

mentési útvonalon (SP) nikotinamidból (NAM). A NAD^+ -szintézis utolsó lépését az NMNAT enzimek katalizálják, melyek ATP-ből és NMN-ből szintetizálnak NAD^+ -ot.

1. 2. 2. NAD^+ szerepe az anyagcserében

A NAD^+ egy koenzim, amelynek számos létfontosságú szerepe van az emberi test anyagcseréjében. A legismertebb funkciója az elektrontranszport. Elektronhordozóként szolgál a glikolízis és a trikarbonsav (TCA) ciklusban, melyekből az elektronokat az elektrontranszport-láncnak juttatja el. Ezáltal az eukarióták hatékonyan képesek adenzin-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 zsírsavszintézisben vesz részt.

A NAD^+ metabolikus kofaktor funkciója mellett jelátviteli molekula szerepet is betölt. A sejtek kóros elváltozása a metabolikus utak alapvető átrendeződésével jár. A gyorsan osztódó sejtek anyagcseréjének egyik fő jellemzője a fokozott glikolitikus aktivitás, még abban az esetben is, ha megfelelő mennyiségű oxigén áll rendelkezésre. A NAD^+ ebben az esetben nem csupán a sejtek energiaigényét, hanem a pentóz-foszfát útvonalon keresztül, a fokozott sejtosztódás miatti megnövekedett nukleotid-igényt is kiszolgálja. Ezt nevezzük Warburg-effektusnak.

A NAD^+ részt vesz a mono- és poli-ADP riboziláció mechanizmusában, a fehérjék SIRT-függő deacetilezésben, a ciklikus ADP-ribóz és a nikotinsav-adenin-dinukleotid-foszfát (NAADP) előállításában. Ezen felül, a NAD^+ függő jelátviteli útvonalak részt vesznek számos nélkülözhetetlen biológiai folyamatban, úgy, mint a transzkripció -, a sejtciklus -, és a sejtanyagcsere szabályozásában a DNS-hibajavításában, és a cirkádian ritmus fenntartásában.

1.2.3. A NAD^+ szerepe a PARiláció folyamatában

A PARP1 enzim katalitikus aktivitása során nagy mennyiségű NAD^+ -ot használ. Részt vesz olyan fontos sejt folyamatok szabályozásában, mint a DNS-replikáció, a génexpresszió, a DNS-javítás, a sejtadhézió és a migráció. Legismertebb funkciója a DNS-törések érzékelése és a báziskihasításos hibajavítás elősegítése. A DNS-törést követően az enzim aktiválódik, a két Zn-ujj domén segítségével, nagy affinitással kötődik a DNS-hez. 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. Ez a fehérjemódosítás kiemelkedően fontos a DNS-javító komplexek toborzása, és más fontos sejt események szabályozásának szempontjából, beleértve a transzkripciót, az apoptózist és a sejtciklus-szabályozást. A poli-ADP-riboziláció NAD^+ felhasználása a DNS-károsodás

mértékétől függ. Túlzott mértékű DNS-károsodás a PARP túlaktiválása révén kimerítheti a NAD^+ -ot, ezáltal lassítva a glikolízis, az elektronszállítás és az ATP-képződés sebességét.

A PARilációhoz szükséges NAD^+ előállításában az NMNAT1 enzim fontos szerepet játszik. 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. Feltételezhető, hogy az NMNAT1 hasonlóan segíti a PARP1 működését a DNS hibajavítás iniciációja során is.

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 letalítás útján fokozottan érzékennyé tehetjük ezeket a sejteket. 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.

1.2.4. 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. 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.

A p53 tumorszuppresszor fehérje a SIRT1 kölcsönható partnere, így képesek egymás működésének befolyásolására. Például a p53 súlyos DNS-károsodás esetén történő aktivációja szükséges a SIRT1 aktivációjához, mely deacetiláz funkcióját ellátva a p53 acetilációt gátolja. 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 acetilált p53 acetilációjának mértéke megemelkedik. 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.

1.3. NMNAT enzimek

Az NMNAT enzimek részt vesznek a NAD^+ előállításában, a mentési útvonalon és a Preiss-Handler útvonalon keresztül. A mentési útvonal során a nikotinamid foszforibosziltranszferáz (NAMPT) a nikotindamidot (Nam) nikotinamid mononukleotiddá (NMN) alakítja. Illetve a nikotinamid ribozidból (NR) nikotinamid ribozid kinázok a NMN-t képeznek. Majd az NMNAT enzimek NAD^+ -ot hoznak létre azáltal, hogy az a NMN-re adenililcsoportot hidrolizálnak az ATP-ről.

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. 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.

Az NMNAT1 enzimnek eddig leginkább idegrendszerben betöltött szerepét tanulmányozták. Ismert, hogy az NMNAT-1 jelenléte véd a hipoxia okozta dendrit-degenerációval szemben és jelentős szerepét mutatták ki az axonális degeneráció lassításában is. Továbbá kimutatták, hogy az NMNAT1 overexpressziója Waller-féle degeneráció folyamatában elősegíti a sérült axonok regenerációját.

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 sejtvonalon, doxorubicinnel történő kezelést követően. 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 idővel kiegyenlítődhet, viszont a nukleáris szinten jelentkező váratlan NAD^+ -igényt várhatóan nehezen tudják kompenzálni a sejtek egy akut genotoxikus stressz esetén. 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 gátlószerek kifejlesztése egy új irányvonal lehet az oszteosarkóma hatékony kezelésének szempontjából.

II. 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 tumorsejtek 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. 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) oszteosarkóma sejtvonal előállítása és ellenőrzése és jellemzése
- Ciszplatin kezelés hatásainak összehasonlítása vad típusú és NMNAT1 KO oszteosarkóma sejteken

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

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1. Sejtkultúra tenyésztése

A humán eredetű U2OS oszteoszarkóma sejtek tenyésztéséhez magas glükóz tartalmú (4500 mg/l) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) tápfolyadékot használtunk, melyet 10% FBS-sel, 5 % L-glutaminnal és 5% penicillin-sztreptomicin 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.

III.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. A gyártó által javasolt protokollt alkalmaztuk a KO sejtek létrehozásához. A sejtek ~70-80 %-os konfluencia szintig növekedtek, ezt követően tripszin segítségével emésztettük fel őket, majd pedig antibiotikum-mentes médiumba vettük fel. Mintánként 10⁶ sejtet gyűjtöttünk, melyeket centrifugálást követően (100×g, 10 perc) 100 µl transzfekciós reagensben vettünk fel. Ezt követően 2.5 µl NMNAT1 CrisPR plazmidot és 2.5 µl Homology-directed repair (HDR) plazmidot adtunk a sejtekhez. A sejteket azonnal transzfekciós küvettába mértük át, és Amaxa Nucleofector II készülékkel, a protokollban az U2OS sejtvonalnak megfelelő programmal transzfektáltuk (X-001). A transzfektált sejtek szuszpenzióját ezt követően 6 lyukú plate-be pipettáztuk, mely előre melegített, antibiotikum-mentes sejttenyésztő médiumot tartalmazott. 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 Sztreptomicin (STREP) mentes magas glükóz tartalmú (4500 mg/l) DMEM tápfolyadékra cseréltük át, mely 10% FBS-sel, 5% L-glutamint tartalmazott.). A transzfekció hatékonyságának vizuális megerősítésére a transzfekciós rendszer részeként red fluorescent protein (RFP) szolgált, melyet fluorescens mikroszkóp segítségével detektálhatunk a transzfekciót követő napon 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. Ezt 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 mRNS szinten qPCR technikával, fehérje szinten pedig western blot módszer segítségével bizonyítottuk.

III.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-inhibítort (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 sejtörmelékot centrifugálással távolítottuk el (16100 ×g, 10 perc, 4 °C). A fehérje-koncentrációt a felülúszóból határoztuk meg, Direct Detect infravörös spektrométer segítségével. Ezt követően, a lizátumokat 5 x minta-(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 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. A blotképek dokumentálásához Bio-Rad ChemiDoc Imager készüléket használtunk. Az eredmények kiértékeléséhez ImageLab 6.0 szoftvert használtuk.

III.4. High Content Analysis (HCA)

III.4.1. γ H2AX detektálása

A sejteket (2×10^4 , 100 μ l/lyuk) speciális optikai sajátosságokkal rendelkező mikroplatebe pipettáztuk, 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 perccen 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-el, majd pedig 100 μ l PBS-t mértünk a lyukakba. A mikroszkópos felvételeket Opera Phenix High Content Analyzer készülékkel készítettük, 10x objektívvel (NA 0.3). A felvételek kiértékelését a beépített Harmony szoftverrel végeztük, melynek során három különböző sejtmorfológiát tudtunk elkülöníteni: normál sejteket, amelyek nem tartalmaztak foszfo-H2AX (γ -H2AX) jelet, pöttyözött sejtek, amik γ -H2AX góccokat tartalmaztak, és fragmentált sejteket amelyek kondenzált morfológiát mutattak, diffúz γ -H2AX jellel. A Harmony Analyzer szoftver segítségével automatizált módon határoztuk meg az egyes csoportokba tartozó sejtek számát és egymáshoz viszonyított arányát.

III.4.2. Kaszpáz aktiváció vizsgálata

A sejteket (2×10^4 /mL, 100 μ l/lyuk) 96 lyukú platebe pipettáztuk, majd 24 órán keresztül növesztettük. A következő napon fél órán keresztül előkezeltük a sejteket 50 μ M z-DEVD-FMK kaszpáz-gátlóval, majd 5 μ M ciszplatinnal (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 plate-eket 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 készült.

III.4.3. Sejtproliferáció mérése

A sejteket (10^3 db / 100 μ l / lyuk) Cell Carrier ultra 96 mikroplatekbe pipettáztuk és 24 órán át növesztettük. Másnap ActD-t (1,25 nM) adtunk hozzá, és a sejteket 4 napon keresztül inkubáltuk. A PARP inhibitorokkal végzett kísérletek során ActD kezelés előtt 30 perccel az

olaparibot (10 μM végkoncentrációban) vagy PJ34-et (10 μM végkoncentrációban) adtuk a sejtekhez. Négy nap elteltével a lemezeket Opera Phenix HCA analizátorba helyeztük, és a sejteket fáziskontrasztos mikroszkópos felvételek alapján készített képek segítségével számoltuk meg a Harmony szoftver segítségével.

III.5. Életképesség vizsgálata

Az életképesség vizsgálatára Calcein AM életképességi esszét használtunk. A sejteket 96-lyukú sejttenyésztő edényben növesztettük (2×10^4 /ml sejt, 100 μl /lyuk), 24 órán keresztül. A kísérleti paramétereknek megfelelően kezeltük a sejteket. A kezelési idő letelte után, a sejtek felülűsóját eltávolítottuk, majd 50 μl Calcein-AM oldattal festettük, 1 μM végkoncentrációban, 1 órán keresztül, 37 °C-on. A sejtekből felszabaduló fluorescens jelet (EX/EM: 485 nm/530 nm) Tecan Spark multimode reader-el mértük. Az életképességet a kezeltlen kontroll százalékában fejeztük ki.

III.6. Klonogén aktivitás mérése

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

III.7. LDH-felszabadulás mérése

Az sejtek felülűsójába kiszabadult laktát dehidrogenáz (LDH) mennyiségének meghatározásához LDH-assay kit-et használtunk. A sejteket 96-lyukú sejttenyésztő platekben növesztettük (2×10^4 /ml sejt, 100 μl /lyuk), 24 órán keresztül. A következő napon a sejteket 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ciszplatinnal, vagy 40 nM ActD-vel kezeltük, 50 μM DEVD-fmk (kaspáz-gátlószer) vagy 1 μM Nec1 (nekroptózis-gátlószer) előkezelést (30 perc) követően 24 óráig. A pozitív kontrollokat a kít-hez mellékelt LDH lízispuffer segítségével készítettük el, melyet 1:10 arányban mértünk a sejteken lévő felülűsóhoz. A platet centrifugáltuk (800 $\times g$, 5 perc), majd a felülűsót legyűjtöttük egy üres 96 lyukú platebe. 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 multimode reader segítségével 490 nm-en detektáltuk az abszorbananciát.

III.8. Teljes sejtes NAD-szint mérése

NAD⁺-tartalom meghatározása NAD⁺-assay kittel történt. A sejteket 6 lyukú sejttenyésztő platekbe ültették ki és 24 órán át növesztették. Másnap a sejteket 5 µg/mL ciszplatinnal, 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 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 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 multimode reader mértük. A fluoreszcencia intenzitásokat fehérje-tartalomra normalizáltuk.

III.9. Teljes sejtes ATP-szint mérése

A sejteket 6 lyukú platekbe pipettáztuk. Másnap a sejteket kezeltük a megfelelő kezelésekkel (50 µM DEVD-FMK, 1 µM Necrostatin1, 5 µg/mL ciszplatin vagy 40nM ActD). A kezelési idő lejártát követően a sejteket PBS-sel mostuk, majd ATP-assay pufferben vettük fel. 1x10⁶ db sejt/minta sejtszámot használtunk. Ezt követően 5 percig 4°C at 13,000 ×g –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, Darmstadt, Germany). A méréshez 96-lyukú mikroplateket használtunk. A reakcióhoz szükséges vak az ATP-assay puffer volt, melyből 50 µL/lyuk mennyiséget használtunk. A standard sor elkészítéshez a 10mM –os standard oldatot hígítottuk úgy, hogy 0.2 – 1 nmol/lyuk koncentrációban legyen 50 µL/lyuk mennyiségben plateben. A pufferoldattal hígított mintákat is 50 µL/lyuk mennyiségben mértük a platbe. Az ATP reakció mix-ből 50 µL-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. ATP tartalmat fehérje mennyiségre normalizáltuk.

III.10. Sejtanyagcsere vizsgálata Seahorse metabolikus analízátorral

U2OS WT és NMNAT1 KO sejteket (1x10⁵ db sejt/lyuk) DMEM-ben plateltük XF96 cell culture mikroplatbe 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) cseréltük. A szenzorokat a kalibrációs oldatban 2 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk CO₂ hiányban. XF Cell Mito Stress analízist a gyártó utasításai szerint végeztük, a következő módosításokkal: A mitochondriális inhibitorok végső koncentrációja a következőkre módosítottuk: 2 μM oligomicin, 0.5 μM FCCP, és 1 μM antimicin-A. A mérést követően, mintáinkat 10% TCA-val fixáltuk, majd lyukanként meghatároztuk a fehérje tartalmat, szulforodamin B (SRB) esszé segítségével. Eredményeinket fehérje tartalomra normalizáltuk.

III.11. Szulforodamin B (SRB) esszé

A sejteket 10%-os triklór-ecetsavval fixáltuk egy éjszakán át 4 °C-on, majd desztillált vízzel mostuk és 0,4%-os SRB festékekkel festettük, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután a sejteket 1%-os ecetsavval mostuk, és a megkötött SRB festéket 10 mmol/l pufferolatlan Tris-szel oldottuk. Az optikai sűrűséget 540 nm-en mértük microplate reader-rel.

III.12. RNS izolálás sejtkultúrából

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

III.13. 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 μL mennyiségben vittük fel a plate-re, és az adatokat normalizáltuk a háztartási gének matematikai átlagához (36B4 és cyclophilin).

III.14. 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. Minden plate négy kezeletlen lyukat (CTL) tartalmazott.

A sejteket (2×10^4 db sejt / 100 μL / lyuk) 96-lyukú sejttenyésztő platekbe mértük és 24 órán át növesztettük. A könyvtár vegyületeit Tecan Freedom EVO folyadékkezelő robottal vittük a platekre, 10 μM végkoncentrációban. A sejteket 24 órán át inkubáltuk a molekulakönyvtár vegyületeivel. A sejtek életképességét Calcein-AM oldat hozzáadásával (50 μl/lyuk, 1 μM végkoncentráció) határoztuk meg. A sejteket 1 órán át inkubáltuk 37 °C-on, majd a fluoreszcens jelet (Ex / Em = 485/530 nm-en), Tecan Spark 20M plate-readerrel mértük. Az

életképességet a kezeletlen kontroll százalékában fejeztük ki, majd százalékos citotoxicitásban fejeztük ki.

III.15. 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, és 24 órán át. A sejtek életképességének meghatározására a fent leírtak szerint történt. A kapott életképességi adatokból citotoxicitást számoltunk.

III.16. Sejtciklus-analízis áramlási citometriával

1. A sejtciklus szinkronizálása

A sejtciklus szinkronizálása szérum-éheztetéssel történt. A sejteket T25 sejtenyésztő flaszokban növesztettük 1 napig, és amikor elérték a kb. 60% -os konfluenciát, a sejteket egyszer PBS-sel mostuk, és 24 órán át a szérummentes tápfolyadékban tartottuk őket. 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 μ l PBS-ben szuszpendáltuk. Ezután lassan 3 ml 70% -os jéghideg etanolt 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 μ l PBS-sel szuszpendáltuk, majd 50 μ l RNáz-A oldatot és 5 μ l propidium-jodidot (PI) mértünk a sejtekhez. A mintákat az elemzés előtt szobahőmérsékleten 1 órán át sötétben inkubáltuk.

- RNáz-A oldat: 50 mg RNáz A-t feloldunk 50 ml PBS-ben és 0,1% Tween-20 és 5 mM EDTA-ban. Az oldatot 95 °C-os vízfürdőbe tettük 30 percre. Ezt követően az oldat jégen 1 órán át hűlt. Az oldat csapadékát 0,2 μ m-es szűrővel eltávolítottuk.
- Propidium-jodid (PI) oldat: A PI törzsoldatot dH₂O-ban, a koncentráció 1 mg / ml végkoncentrációra hígítottuk.

3. Sejtciklus elemzés áramlási citometriával

Az elemzést a Novocyte 3000 áramlási citométerrel végeztük.

III.17. Statisztikai analízis

A kísérleteket legalább háromszor elvégeztük, a három kísérlet számított átlagát ábrázoltuk \pm SEM. A statisztikai elemzéshez a GraphPad Prism 9-et 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.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. Tumorsejtek NMNAT1-expressziójának vizsgálata és NMNAT1 génhiányos sejtvonala előállítása.

IV.1.1. NMNAT1-expresszió vizsgálata humán tumor sejtvonalaiban

Az irodalomban kevés információ érhető el tumor sejtvonalaik NMNAT1 mRNS expressziós szintjéről. Ezért tizenegy különböző humán tumor sejtvonalaiban vizsgáltuk meg az NMNAT1 mRNS-expresszióját. Az transzkriptum az összes sejtvonalaiban 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 sejtvonalaiban szignifikánsan alacsonyabb expressziót tapasztaltunk. A további vizsgálatainkhoz egy átlagos NMNAT1 mRNS expressziót mutató sejtvonala - az oszteosarkóma eredetű U2OS-t – választottuk.

IV.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. Ez korábbi irodalmi eredményekkel korrelál, miszerint doxorubicin kezelés hatására az NMNAT1 expressziója emelkedik. Ez alapján valószínűsíthető, hogy az enzimnek fontos szerepe lehet a DNS-károsodást követően, a sejtek túlélésében. További vizsgálatainkat ciszplatinnal végeztük.

IV.1.3. NMNAT1-génhiányos sejtvonala 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 puomicin-rezisztens sejteket szelektáltuk, és az NMNAT1 knockout (KO) sejtekből áramlási citometriával történő szortolással egysejt-klónokat nyertünk. Az NMNAT1 KO sejtek NMNAT1-expresszióját mRNS és fehérje szinten is megvizsgáltuk. Egyik NMNAT1 KO klón esetében sem volt tapasztaltunk jelentős NMNAT1 mRNS expressziót. További kísérleteinkhez az 1B6 klónt használtuk. Western blot módszer segítségével bizonyítottuk, hogy az NMNAT1 fehérje nem mutatható ki az 1B6 elnevezésű klónból származó sejtvonalaiban.

IV.1.4. Az NMNAT1 KO sejtek jellemzése

IV.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 fiziológiás sajátosságát (életképesség, proliferáció, NAD^+ - és ATP-tartalom, metabolikus útvonalak aktivitása, kemoszenzitivitás). Vizsgálataink alapján, a vad típusú és az NMNAT1 KO sejtvonaltak életképességében nincs különbség. Ezzel szemben, a kolóniaképző aktivitás csökkent az NMNAT1 enzim hiányában.

IV.1.4.2. NAD^+ - és ATP-tartalom mérése

A teljes sejtes NAD^+ -szint mérését elvégezve elmondható, hogy az NMNAT1 KO sejtek NAD^+ -tartalma vad típusú sejtvonalthoz (WT) képest körülbelül az egyharmadára csökkent 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.

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

A metabolikus útvonalak vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az NMNAT1 hiánya nem befolyásolta a sejtlegzést, amit a változatlan mértékű oxigénfogyasztás jelez. Viszont a glikolitikus aktivitás szignifikánsan magasabbnak bizonyult NMNAT1 hiányában a vad típusú sejtvonalthoz képest.

IV.2. Az NMNAT1 szerepének vizsgálata ciszplatinnal kezelt oszteoszarkóma sejteken

IV.2.1. Életképesség vizsgálata

Az NMNAT1 fehérje expressziójának emelkedése tapasztalható, doxorubicin vagy ciszplatin kezelés hatására. A KO sejtek kemoszenzitivitásának vizsgálata céljából egy ciszplatin koncentráció sor (0-40 $\mu\text{g/ml}$) segítségével hasonlítottuk össze a két sejtvonalt ciszplatinnal szembeni érzékenységét. Megállapítottuk, hogy az NMNAT1 hiánya fokozott sejtpusztulást eredményezett a vad típusú sejtekhez képest.

IV.2.2. DNS-károsodás vizsgálata

A kettős DNS-szálszakadások (DSB) kimutatására leggyakrabban a H2AX hiszton-variáns foszforilációjának detektálását használják. A H2AX foszforilációját ($\gamma\text{-H2AX}$) immuncitokémiával detektáltuk. 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 sejtmorfológiát 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. A ciszplatin H2AX-foszforilációt (γ -H2AX képződést) okozott vad típusú sejtekben is, 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).

IV.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 sejtmembrán-permeabilis, fluorogén kaszpáz-3/7 szubsztráttal végeztük. Ciszplatin kezelés mellett kaszpáz gátlószerekkel (z - DEVD - FMK-val) kezeltük elő a sejteket. 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 fluoreszcens jel statisztikai kiértékelését végeztük el. Az NMNAT1 KO sejtekben jelentős mértékű kaszpáz-aktivációt tapasztaltunk, mely gátolható volt a kaszpáz-inhibitor alkalmazásával.

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

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

Szignifikánsan alacsonyabb bazális NAD⁺-szintet mértünk az NMNAT1 KO sejtekben, mely tovább csökkent a ciszplatin kezelés hatására. Ciszplatin kezelés hatására az NMNAT1 KO sejtek ATP-szintjében szintén drámai változást figyeltünk meg, míg a vad típusú sejtekben nem tapasztaltunk változást. A kaszpáz-inhibitor és a nekroptózis-inhibitor is jelentősen gátolta az ATP-veszteséget, tehát az ATP-szint csökkenése részben a károsodott energiatermelés és az aktív sejthalálformák lezajlásához szükséges fokozott ATP-felhasználás miatt következik be.

IV.2.5. Metabolikus útvonalak vizsgálata

A sejtek energiatermelő útvonalainak a jellemzése során a sejtlégzés mérésére az oxigénfogyasztás sebességét (OCR), a glikolízis mértékének meghatározására pedig az extracelluláris savasodási sebességet (ECAR) vizsgáltuk meg. A két sejtvonál közötti bazális légzésben nem volt megfigyelhető jelentős különbség. Az elvégzett mitokondriális stressz teszt szintén hasonló értékeket mutatott mindkét sejtvonalban. A ciszplatin kezelés azonban az NMNAT1 KO sejtekben teljesen megszüntette a mitokondriális légzési tartalék-kapacitást. A bazális glikolitikus aktivitás szignifikánsan magasabbnak bizonyult az NMNAT1 KO sejtvonalban. A glikolitikus stressztesztekben kezelés nélkül és ciszplatin kezeléssel sem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket a két sejtvonál között. 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 jellemezi. 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.

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

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. 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 csak ciszplatinnal kezelt sejtek esetében, de az NMNAT1 KO sejtekben további csökkenést nem lehetett kimutatni. 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.

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

IV.3.1 Nagy áteresztőképességű szűrővizsgálat

Nagy áteresztőképességű szűrést végeztünk (HTS- High Throughput Screening) párhuzamosan a vad típusú és NMNAT1 knockout sejteken, Tecan Freedom EVO robot használatával, egy olyan vegyületeknyvtárral, 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 tapasztalunk a vad típusú sejtekhez képest. A kritériumoknak kilenc vegyület felelt meg: bortezomib, aktinomycin-D, digoxin, tenipozid és öt antraciklin (idarubicin, daunorubicin, doxorubicin, mitoxantron, epirubicin).

IV.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 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 koncentrációt is. Kilenc vegyület közül 8 esetben igazolható volt az NMNAT1 KO fenotípus érzékenyítő hatása. Minden azonosított antraciklin hatása igazolható volt. Az aktinomicin D, a bortezomib és a tenipozid szintén jelentős növekedést okozott a KO sejt vonal citotoxicitásában a WT sejtekhez képest. A digoxin esetén is mindkét sejt vonalban koncentráció-függő citotoxicitást tapasztaltunk, de a toxicitás a KO sejt vonalon ebben az esetben nem volt szignifikánsan magasabb a vad típusú sejtekhez képest.

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. Mivel a tumorölő mechanizmusának molekuláris háttere még csak részben feltárt, NMNAT1 enzimmel kapcsolatos interakciókról pedig jelenleg nincs irodalmi adat. Ezért további vizsgálatainkhoz az aktinomicin D-t választottuk.

IV.4. Az NMNAT1 szerepének vizsgálata aktinomycin D-vel kezelt oszteoszarkóma sejteken

IV.4.1. Az aktinomycin D által kiváltott sejthalál jellemzése

Megvizsgáltuk, hogy hogyan változik az aktinomycin D-vel kezelt sejtek életképessége az apoptózis vagy nekroptózis specifikus gátlása mellett. Az aktinomycin 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 Aktinomycin D-vel kezelt vad típusú és NMNAT1 KO sejtek életképességét, míg a Nec1 előkezelés nem okozott változást az életképességben, a csak aktinomycin D-vel kezeltékhez viszonyítva.

A sejtek apoptotikus pusztulásának további vizsgálatát high content analízissel végeztük egy kinetikus esszé segítségével, a kaszpáz-3 inhibitor DEVD-fmk jelenlétében. Az aktinomycin D kezelés mindkét sejtvonalon a kaszpáz-3 aktivitásának jelentős emelkedését okozta, amelyet a kaszpáz-3 inhibitor hatékonyan gátolni tudott. Az NMNAT1 KO sejtvonalon a kaszpáz-3 aktiváció már korábban kimutatható volt, és a kaszpáz-pozitív sejtek aránya több mint kétszer annyi volt, mint a vad típusú sejtekben mérhető kaszpáz-3 pozitivitás aránya.

A nekrotikus sejtpusztulás lehetséges jelenlétét a felülúszók laktát-dehidrogenáz (LDH) szintjének mérésével vizsgáltuk 24 órával az Aktinomycin D kezelés után. 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 kaszpáz-3 inhibitor képes volt teljesen blokkolni.

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

Az NMNAT enzimek a NAD⁺ szintézisében két útvonalon keresztül is részt vesznek (mentési és a Preiss-Handler útvonalon). Így az enzim hiánya és az aktinomycin D kezelés hatására megfigyelt szignifikánsan magasabb citotoxicitás az NMNAT1 KO sejtvonalon, ebből arra következtethetünk, hogy a KO sejtek NAD⁺ és ATP tartalmának esetleges változását érdemes megvizsgálni. Mint már korábban bemutattam, a bazális NAD⁺ szintek az NMNAT1 KO sejtekben szignifikánsan alacsonyabbak, mint a vad típusú U2OS sejtekben. Az aktinomycin D szignifikáns csökkenést okozott a NAD⁺ szintben, mindkét sejtvonalon esetében. A KO sejtvonalon a NAD⁺-szintet a kezelt vad típusú minták körülbelül 1/5-ére változtatta. 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. A korábbi eredményeink alapján bazális ATP szintek nem különböznek szignifikánsan a WT és a KO sejtekben. 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.

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

A vad típusú U2OS sejtekben nem volt kimutatható jelentős DNS-károsodás. A KO sejtekben azonban az ActD kezelés után 6 órával magas szintű DNS károsodást tapasztaltunk. 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. Ezért megvizsgáltuk, hogy milyen módon változik a DNS károsodás hatására a PARP1 enzim által szintetizált poli-ADP-ribóz (PAR) polimer mennyisége az NMNAT1 génhianyos sejteken. A PARilációt western blot alkalmazásával detektáltuk, anti-PAR antitest (10H) alkalmazásával. A vad típusú sejtekben 6 órával az ActD-kezelés után fokozott PARP-aktiválódás volt kimutatható, míg a KO-sejteknél a PARP-aktiváció jelentősen csökkent, valószínűleg az alacsony NAD⁺ -tartalom miatt.

IV.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. Mivel a SIRT1 egy NAD⁺-függő deacetiláz enzim, aktivitásának csökkenése várhatóan a célfehérjéinek acetileződésének emelkedését okozza (pl. p53-as fehérje). A p53 Lys382-es fehérje oldalláncon történő acetilezését western-blot segítségével detektáltuk. 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.

IV.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 a NOXA vagy a BAX. Ezen gének mRNS expresszióját QPCR módszerrel vizsgáltuk, 15 órával az ActD kezelést követően. A NOXA gén expressziója mindkét sejtvonalban emelkedett, 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. A NOXA vagy

BAX fehérje expressziós szintjét Western blottal detektáltuk. Mind az NOXA, mind a BAX fehérje szinten is szignifikánsan magasabb indukciót mutattak az NMNAT1 KO sejtekben, mint a WT sejtek esetén .

IV.4.6. Az NMNAT1 hiánya gátolja a sejtek proliferációját

IV.4.6.1. Sejtprolifерáció és sejtciklus vizsgálata

A 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. 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.

A különböző sejtciklus-fázisokban lévő sejtpopulációk arányát áramlási citometriával határoztuk meg. 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.

IV.4.6.2. A SIRT1 enzim gátlásának hatása a sejtprolifерációra

Az p53 fokozott acetilációja a proapoptotikus gének indukciója mellett a sejtprolifерációra is hatással van, a p21 gén indukciója révén. Az ActD indukálta a p21 mRNS- és a fehérje expressziót az NMNAT1 KO sejtekben, ezzel szemben, a WT sejtekben nem tapasztaltunk szignifikáns változást.

IV.4.6.3. A PARP1 enzim gátlásának hatása a sejtprolifерációra

Mivel irodalmi adatok alapján a PARP1 gátlása lassítja a sejtprolifерációt, megvizsgáltuk az ActD kezelés által kiváltott PARP-aktiváció sejtprolifерációra gyakorolt hatását. 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 aktinomicin 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 gátolható). ActD kezelés esetében azonban a gátolt sejtmagi NAD⁺-szintézis miatt az aktuálisan elérhető NAD-készlet nem elégséges 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.

IV.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 befolyásolja az RNS szintézisét. Az RNS homeosztázisának vizsgálatához a kísérleteink során megmértük az összes RNS mennyiségét, valamint a 45S és 18S riboszómális RNS-ek expresszióját. Megállapítottuk, hogy az NMNAT1 KO sejtek háromszor nagyobb össz-RNS-szinttel rendelkeznek, összehasonlítva vad típusú sejtekkel. Az ActD kezelés szignifikánsan csökkentette az össz-RNS szintet az NMNAT1 KO sejtekben, míg a WT sejtekre nem volt hatással. Az NMNAT1 hiánya növelte a 18S riboszómális RNS pro-formájának (45S) expresszióját. A 45S RNS expresszióját mindkét sejtvonalban teljesen blokkolta az ActD kezelés. Érdekes módon a két vonal között nem volt kimutatható különbség az érett 18S rRNS mennyiségében. Az ActD kezelés megemelte a vad típusú sejtekben az érett 18S rRNS szintjét, de az NMNAT1 KO sejtek esetén nem okozott szignifikáns változást.

V. KONKLÚZIÓK

Az NMNAT1 knockout oszteoszarkóma sejtek fokozottan érzékenyek ciszplatinra

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

Az NMNAT1 túlélési faktor az actinomycin D indukált oszteoszarkóma sejtvonaltban

- Nagy áteresztőképességű szűrés (HTS) során, az FDA által jóváhagyott molekulakönyvtárból 8 olyan vegyületet azonosítottunk, melyek legalább 25%-kal nagyobb citotoxicitást okoztak az NMNAT1 KO sejtvonaltan, mint a vad típusú U2OS sejteken.
- Az Actinomycin D apoptotikus út vonal beindításával okoz sejtpusztulást U2OS sejteken.
- Az aktinomicin D az NMNAT1 KO oszteoszarkóma sejt vonal fokozott citotoxicitását okozta a vad típusú oszteoszarkóma sejtekkel szemben.
- p53 fehérje fokozott acetilálódását és a BAX és a NOXA proapoptotikus gének fokozott expresszióját figyeltük meg kezelést követően az NMNAT1 KO sejt vonaltban.
- Az aktinomicin D kezelés NMNAT1 KO sejteken erőteljesebb DNS-károsodást eredményezett.
- Az aktinomicin D a proliferáció és sejt ciklus gátlását okozta az NMNAT1 KO sejt vonaltban
- Az rRNS szintézis gátlását okozza az aktinomicin D kezelés.

VI. 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. Viszont kevés információval rendelkezünk a tumorsejtben betöltött szerepével kapcsolatban. Ezért munkánk során létrehoztunk egy NMNAT1-génhiányos (knock-out) oszteoszarkóma sejtvonalat, melyet részletesen jellemeztünk. Az NMNAT1 KO sejtvonalba csökkent NAD⁺ szint mellett lassabb proliferáció volt megfigyelhető. Egy oszteoszarkómában is használt kemoterápiás készítménnyel, a ciszplatinnal való kezelés hatását összehasonlítottuk a vad típusú és NMNAT1 KO oszteoszarkóma sejteken. Az NMNAT1 KO sejtekben ciszplatin kezelés hatására tovább 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. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy az NMNAT1 KO tumor sejtek érzékenyebbek a ciszplatin-kezelésre.

Munkánk második részében egy nagy áteresztőképességű szűrővizsgálatot végeztünk el, annak céljából, hogy további, az NMNAT1 hiányában fokozott sejtpusztulást okozó gyógyszerhatóanyagokat azonosíthassunk. A hatásos vegyületek közül az aktinomicin D-t választottuk további vizsgálatainkhoz. Az aktinomicin D az apoptotikus útvonal beindításával okozott sejtpusztulást, az NMNAT1 KO sejtvonalba 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, proliferáció, a sejtciklus és az rRNS szintézis gátlását tapasztaltunk az NMNAT1 KO oszteoszarkóma sejtvonalba.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az NMNAT1 expressziójának vagy aktivitásának gátlása a jövőben hatékony célpont lehet a daganatok érzékenységének fokozásában. Illetve a jelenleg is használt citosztatikumokkal 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.



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., Szöőr, 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.

