

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2757.

DANKÓ TITANILLA

Onkológia
című program

Programvezető: Dr. Bödör Csaba, tudományos főmunkatárs

Témavezető: Dr. Sebestyén Anna, kutatóprofesszor

Metabolikus folyamatok mint célpontok a daganatnövekedés gátlásában és ezek vizsgálata különböző tumormodellekben

Doktori értekezés

Dankó Titanilla

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sebestyén Anna, DSc, kutatóprofesszor

Hivatalos bírálók: Dr. Balázs Margit, DSc, egyetemi tanár
Dr. Hegyesi Hargita, PhD, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Kőhidai László, PhD, egyetemi docens

Tagok: Dr. Szász Attila Marcell, PhD, kutatásvezető

Budapest
2022

Tartalom

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	9
1.1. A daganatnövekedés jellemzői.....	9
1.2. A daganatsejtek anyagcsere változásai	12
1.3. A daganatszövet metabolikus heterogenitása, valamint ennek terápiás jelentősége.....	15
1.4. Anyagcseregátló kezelések daganatellenes hatásai.....	16
1.5. Az mTOR mint metabolikus csomópont szerepe a daganatok metabolikus alkalmazkodásában	18
1.5.1. mTOR-gátlók.....	22
1.6. Daganatnövekedés-gátló hatások és a sejthalál-mechanizmusok.....	23
1.6.1. Nekrózis.....	24
1.6.2. Apoptózis.....	24
1.6.3. Nekroptózis	26
1.6.4. Autofágia.....	28
1.6.5. Mitofágia	30
1.7. Innovatív gyógyszerkombinációk és megközelítések daganatterápiás jelentősége, tesztelése	32
1.7.1. A mitocanok és a tetraciklin típusú antibiotikumok potenciális daganatellenes hatásai.....	33
1.8. Az emlődaganatok csoportosítása és kezelési lehetőségei	35
1.9. Két- és háromdimenziós modellrendszerek.....	38
1.9.1. 3D sejttenyésztési technikák, a 3D bionyomtatás.....	39
2. Célkitűzés	42
3. Módszerek.....	43
3.1 Sejttenyésztés, <i>in vitro</i> kezelések.....	43

3.2	<i>In vitro</i> kezelések	44
3.3	<i>In vitro</i> proliferációs tesztek – Alamar blue és szulforodamin B tesztek..	45
3.4	Fehérje-expresszió vizsgálata hagyományos Western blot és Wes TM Simple módszerrel	46
3.5	Immunhisztokémiai festések	48
3.6	Nekrózis és apoptózis meghatározása, valamint sejtciklusanalízis áramlási citométerrel.....	51
3.7	<i>In vitro</i> fluoreszcens caspase-3 assay	51
3.8	<i>In vivo</i> xenograft modell	52
3.9	Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok	52
3.10	MitoTracker Red festés és konfokális mikroszkóp.....	53
3.11	3D bionyomtatott szövetszerű struktúrák vizsgálata konfokális mikroszkóp segítségével.....	53
3.12	Statisztikai analízis	53
4.	Eredmények	55
4.1	Rapamycin + doxiciklin sejtproliferációt gátló hatásai <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> .	55
4.1.1	Rapamycin + doxiciklin sejtproliferációt gátló hatása humán tumor-, illetve emlőcarcinoma sejtvonalakban	55
4.1.2	Apoptózis, nekrózis és nekroptózis indukció vizsgálata rapamycin + doxiciklin kombinációs kezelés hatására	58
4.1.3	Hosszútávú rapamycin + doxiciklin kezelés, illetve kezelés megvonás/megszakítás hatása a ZR75.1 humán emlőcarcinoma sejtekben <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i>	61
4.1.4	Autofágia és mitofágia indukció rapamycin és doxiciklin kezelés következtében	64
4.2	Metabolikus fehérjék, enzimek mennyiségének szöveti heterogenitása ...	70

4.3	Kezelésekkel szembeni érzékenység és metabolikus enzimexpressziós különbségek hagyományos 2D és 3D szferoidtenyészetekben és <i>in vivo</i> xenograft modellben.....	74
4.4	3D bionyomtatott <i>in vitro</i> szövetszerű ZR75.1 „tumorok” növekedési, morfológiai sajátosságainak jellemzői és hatóanyagérzékenysége	77
5.	Megbeszélés.....	83
6.	Következtetések	96
7.	Összefoglalás.....	97
8.	Summary	98
9.	Irodalomjegyzék.....	99
10.	Saját publikációk jegyzéke	129
11.	Köszönetnyilvánítás.....	133

Rövidítések jegyzéke

¹⁸ FDG PET/CT	2- ^[18F] -fluoro-2-deoxi-D-glükóz pozitronemissziós tomográfia/komputer tomográfia
2D	kétdimenziós
3D	háromdimenziós
4EBP	4E-binding protein
ACSS2	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 2
AKT	v-AKT murine thymoma viral oncogene homolog; protein kinase B
AMPK	5' AMP-activated protein kinase
APAF1	apoptotic protease activating factor 1
ATF4	activating transcription factor 4
Atg	autophagy related
ATP	adenozin-trifoszfát
BAK	Bcl-2 antagonist/killer
BAX	Bcl-2-associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-xL	B-cell lymphoma-extra large
BH3	Bcl-2 Homology 3
BID	BH3 interacting-domain death agonist
BNIP3	BNIP3L-BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3-like receptor
BPTES	bisz-2-(5-fenilacetamid-1, 2, 4-tiadizol-2-il)-etilszulfid
C	citokróm C
CAD	carbamoyl-phosphate synthetase 2, apartate transcarbamoylase, dihydroorotase
cIAP	cellular inhibitor of apoptosis proteins
CPT1A	Carnitine Palmitoyltransferase 1A
DD	death domain
DED	Death Effector Domain
DLP	digital light processing (digitális fényvezérelt nyomtatás)
eIF4A	eukaryotic translation initiation factor 4A
eIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
ER	estrogen receptor (ösztrogénreceptor)
FADD	Fas-associated death domain protein
FASN	Fatty acid synthase
FDA	Food and Drug Administration (Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatal, USA)
FKBP12	12-kDa FK506-binding protein
FOXO 1/3a	Forkhead Box O 1/3a
FUNDC1	FUN14 domain-containing 1 receptor
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GLS	Glutaminase
GLUT1	Glucose transporter 1

GLUT4	Glucose transporter 4
GSC3b	glycogen synthase kinase 3b
HER2	humán endotheliális receptor 2
HIF1 α	hypoxia-inducible factor 1-alpha
Hsp70	heat shock protein 70 kDa
IAP	inhibitors of apoptosis
KFERQ	konszenzus peptisszekvencia motívum
LAMP2A	Lysosome-associated membrane protein 2
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LDHA	Lactate dehydrogenase A
LDHB	Lactate dehydrogenase B
L-DON	6-diazo-5-oxo-L-norleucin
MAF1	repressor of RNA polymerase III transcription MAF1 homolog
MCL-1	myeloid cell leukemia 1
MCT1	Monocarboxylate transporter 1
MCT4	Monocarboxylate transporter 4
MDR	multidrog resistance
MLKL	Mixed Lineage Kinase Domain-Like
mtDNS	mitokondriális DNS
MTHDF2	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2
mTOR	mammalian/mechanistic target of rapamycin
mTORC1	mammalian/mechanistic target of rapamycin komplex 1
mTORC2	mammalian/mechanistic target of rapamycin komplex 2
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death
NDp52	CALCOCO2-Calcium binding and coiled-coil domain 2
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NIX	BNIP3L-BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3-like receptor
OPTN	optineurin
OXPHOS	oxidative phosphorylation (oxidatív foszforiláció)
P	phosphorylation (foszforiláció)
p62	ubiquitin-binding protein/Sequestosome-1
PARK2/Parkin	type of E3 ubiquitin ligase
PARP	poly-ADP-ribose polymerase
PD-1	programmed cell death protein 1
PDCD4	programmed cell death 4
PDHB	Pyruvate dehydrogenase E1 subunit beta
PDL-1	Programmed death-ligand 1
PE	foszfatidil-etanolamin
PI3K	foszfatidil-inozitol-3 kináz

PI3P	phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate
PIKK	PI3K-hoz kapcsolt protein kináz
PINK1	PTEN-induced kinase 1
PK	Pyruvate kinase
PKC	protein kinase C
PKM1	Pyruvate kinase M1
PKM2	Pyruvate kinase M2
Pol I	RNA polymerase III
Pol III	RNA polymerase III
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor- γ
PR	progesteron receptor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RICTOR	rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin
RIP	Receptor-Interacting Kinase
RIPK1	Receptor-Interacting Kinase 1
RIPK3	Receptor-Interacting Kinase 3
ROS	reactive oxygen species (reaktív oxigén gyök)
S6	ribosomal S6 protein
S6K1	p70 S6 kinase 1
SCID	severe combined immunodeficiency (súlyos kombinált immunhiány)
SDHA	Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A
SGK	serum- and glucocorticoid-induced protein kinase
SLA	stereolithography (szterolitográfias bionyomtatás)
SMAC	second mitochondrial-derived activator of caspases
SREBP-1	Sterol Regulatory Element-Binding Protein
TAX1BP	Tax1 Binding Protein
TAX1BP1	Tax1 Binding Protein 1
tBID	truncated BID
TBK1	TANK Binding Kinase 1
TCA	tricarboxylic acid cycle (trikarbonsavciklus)
Tel2	telomere maintenance 2
TFE3	transcription factor E3
TFEB	transcription factor EB
TIF-1A	transcription initiation factor 1A
TLR3	Toll-like receptor 3
TLR4	Toll-like receptor 4
TMS	tissue-mimetic structure (szövetszerű struktúra)
TNF	tumor necrosis factor
TNFR1	tumor necrosis factor receptor 1
TNFR1L	tumor necrosis factor receptor ligand

TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
TRAF2	TNF-receptor-associated factor 2
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TSC1	tuberous sclerosis complex 1
TSC2	tuberous sclerosis complex 2
Tti1	Tel two interacting protein 1
TUFm	Tu translation elongation factor, mitochondrial
Ub	ubikvitiniláció
UBF	upstream binding factor
ULK1	unc-51-like autophagy-activating kinase 1
UVRAG	UV radiation resistance associated
Vps	vacuolar protein sorting
WHO	World Health Organization, Egészségügyi Világszervezet
WIPI	WD-repeat protein interacting with phosphoinositides
WXXL	az LC3-mal interakcióba lépő régió
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
α -KG	alfa-ketoglutarát

1. Bevezetés

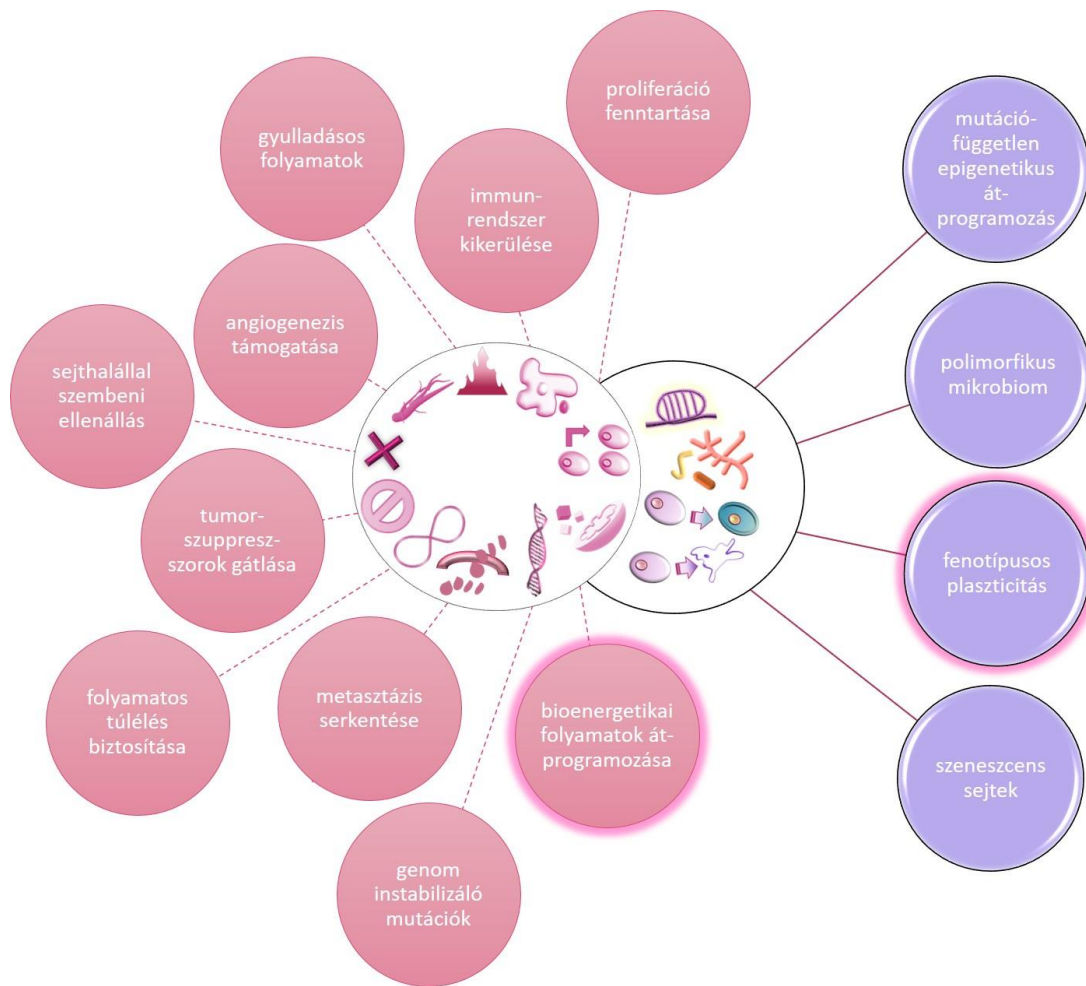
A daganatsejtek extrém alkalmazkodó képessége a normál sejtek számára már nem tolerálható környezeti feltételekhez jól ismert. Ez lehetővé teszi, hogy a daganatszövet a változó környezeti feltételek és terápiás kezelések mellett is túléljen, tovább növekedjen. A gyors alkalmazkodás következménye előbbiek mellett az adott kezelésekkel szembeni érzékenység megváltozása, elvesztése, a terápiarezisztencia kialakulása is, amelynek háttérében több, a daganat kialakulása és kezelése közben megjelenő szabályozási, genetikai változás áll. Ezek közé tartoznak a sejszintű anyagcsere (metabolikus)-változások is.

A daganatszövet progressziós változásairól a legtöbb adatot a különböző kezelések szövetet érintő hatásait összehasonlító vizsgálatokból (kontroll, illetve kezelt humán szövetek expressziós és mutációs változásának feltérképezése), illetve *in vitro* és *in vivo* kísérleti modellekből kaphatunk. A modellrendszerek és az alkalmazott vizsgálatok korlátai mellett, a szöveti heterogenitás általában nem értékelhető, a szöveti szerkezet hiánya vagy a nem humán mikrokörnyezet korlátozza az eredmények értékelését. A szöveti mikrokörnyezet, és ennek elemeként a háromdimenziós (3D) struktúra jelentősen megváltoztatja a sejtek proliferációját, túlélését, befolyásolhatja a sejtek anyagcseréjét, a szelekciós folyamatokban. A daganatellenes hatóanyagok fejlesztése és tesztelése ennek ellenére *in vitro*, még mindig jellemzően hagyományos kétdimenziós (2D) sejtenyészetekben zajlik. Ezekben a sejtek kezelőszerekre adott válaszai torzulhatnak (rezisztencia-, szenzitivitáskülönbségek), amely jelentősen módosíthatja a gyógyszerhatóanyag-tesztek eredményeit.

1.1. A daganatnövekedés jellemzői

Hanahan és *Weinberg* 2000-ben foglalta össze a daganatsejtek, -szövetek általános jellemzőit. Ezen sajátosságok közé sorolták a folyamatos túlélés biztosítását, a sejtproliferáció fenntartását, a metasztázisképződést, az angiogenezis támogatását, a tumorsuppresszorok, valamint a sejthalál gátlását [1]. A 2000-es évek új eredményei után 2011-ben a jellegzetességek újabb négy elemmel egészültek ki, amelyek a következők: az immunológiai (ellenőrző) folyamatok felügyeletének kikerülése, a daganatoknak kedvező gyulladási folyamatok megjelenése, a genominstabilitás és a daganatsejtek bioenergetikai folyamatainak megváltozása [2]. Az anyagcsere-folyamatok

változása teremti meg az intenzíven osztódó daganatsejtek túlélésének, proliferációjának és a megváltozott mikroköznyezethez való alkalmazkodásának bioenergetikai hátterét [3,4]. Ennek egyik feltétele a tumorszövetet alkotó sejtek metabolikus folyamatainak átrendeződése, átprogramozása (*metabolic rewiring*). Utóbbi folyamatok hátterének megismerése, feltárása az elmúlt két évtized daganatkutatásában jelent meg és válik egyre hangsúlyosabbá. A daganatok elmúlt évtizedekben megismert komplexitása és egyre több új kutatási eredmény pedig alátámasztja azt, hogy az egy évtizede leírt sajátságok újabb jellegzetességekkel egészüljenek ki. Hanahan 2022 év eleji közleményében újabb négy tényezővel egészítette ki a korábban összefoglalt tulajdonságokat. Az új tényezők a következők: a daganatsejtek fenotípusos plaszticitása, a szenescens sejtek kialakulása, a mutációktól független epigenetikus változások, valamint a mikrobiomösszetétel-változások szerepe (**1. ábra**) [5].



1. ábra A daganatsejtek kialakulását támogató tényezők összefoglalása. Az ábra bal részén a *Hanahan* és *Weinberg* által először 2000-ben összegyűjtött, majd 2010-ben kiegészített daganatokra jellemző sajátságok láthatók [1,2]. 2022-ben ezek négy újabb tényezővel egészültek ki: a mutációtól független epigenetikus átprogramozás, a polimorfikus mikrobiom, a fenotípusos plaszticitás és a szenescens sejtek kialakulása (jobb ábrarész) [5].

Munkacsoportunk a daganatok metabolikus váltoásaival, metabolikus plaszticitásával és azok potenciális terápiás célzásával foglalkozik. A malignus sejtekben felhalmozódó genetikai hibák, génszabályozási zavarok, a genetikai instabilitás, a jelátviteli szabályozás zavarai, különböző környezeti hatások vezetnek a daganatsejtek korlátlan és invazív proliferációjához és túléléséhez, a szervezet immunvédekező mechanizmusainak elégtelenségéhez, a metasztázisképzéshez, amelyben a bioenergetikai

egyensúly elvesztésének, a metabolikus változásoknak szerepe megkérdőjelezhetetlen [7-9].

1.2. A daganatsejtek anyagcsere változásai

A daganatsejtek bioenergetikai folyamatainak, azok változásainak és ennek akár az egész szervezet alapanyagcseréjét befolyásoló hatásainak vizsgálata a daganatkutatás egyik fontos területe napjainkban. Az intenzíven növekvő daganatszövet tumorsejtjei túlélésük, proliferációjuk és a folyamatosan változó mikrokörnyezeti alkalmazkodásuk érdekében az egész szövet, így a nem tumoros sejtek anyagcsere-folyamatait is átprogramozzák. A daganatterápiás fejlesztésekben megnőtt az igény arra, hogy a daganatok komplex metabolikus átrendeződését megismerve, a jelátviteli zavarok hátterében álló biológiai folyamatokat feltárjuk [4,9,10].

A daganatsejtek anyagcsere változásai számos jól ismert növekedést elősegítő változást támogatnak. Több onkogén és tumorszuppresszor fontos szabályozója az anyagcsere-folyamatoknak is. Az *AKT*, a *Myc*, a *Ras*, a *TP53* és a *HIF1* – mutáció vagy szabályozási zavar miatti – expresszió és aktivitás fokozódása érinti a sejtek metabolikus változásait is a tumorigenezisben. A vad *TP53* gátolja a glikolitikus fenotípus megjelenését (pl.: glükóztranszporter, hexokináz, foszfofruktokináz gátlása), míg funkcióvesztése hozzájárul a daganatok egyik jellegzetes anyagcsere változásához, az aerob glikolízis kialakulásához. A *Ras* aktiváció vagy *PI3K/AKT/mTOR*-útvonal aktivitásának fokozódása is több ponton támogatja a glikolitikus fenotípust. A *PTEN*-mutáció vagy más hatások miatt a *PI3K/AKT/mTOR*-útvonal konstitutív aktivációja fokozza például a glükóztranszporterek és több glikolitikus enzim expresszióját, segíti a Warburg-glikolízist, a „csonka” citrátciklus folyamatait és a zsírsavszintézist [11-13].

Otto Warburg az 1920-as években írta le a daganatsejtek megváltozott anyagcseréjét; amelyet fokozott, az oxigénszinttől független aerob glikolízis jellemez (glikolitikus fenotípusú sejtek) [14]. Ezt a folyamatot nevezzük *Warburg-jelenségnek* [15]. Ez energetikai szempontból ugyan kevésbé hatékony (1 mól glükózból így kisebb mennyiségű ATP keletkezik), de rendkívül gyorsan biztosítja a szükséges energiát és építőelemeket a növekedő, proliferáló sejteknek. A korai anyagcsere-vizsgálatokban a Warburg-fenotípust tekintették a daganatsejtek egyik legfontosabb metabolikus jellegzetességének; feltételezték, hogy ezzel párhuzamosan az oxidatív foszforiláció

(OXPHOS) folyamatai károsodnak egyes mitokondriális változásokkal összefüggésben (pl.: méretcsökkenés, szerkezeti eltérések, mtDNS-mutációk, a reaktív oxigén gyökök – ROS – hatásai). A későbbi vizsgálatok azonban kimutatták, hogy bioenergetikai szempontból az esetek többségében a mitokondriumok épek, illetve amennyiben károsodnak, akkor is képesek regenerálódni, akár más sejtekből újraszerveződni, repopulálódni, hogy amennyiben szükséges, biztosítsák az OXPHOS-folyamatok elérhetőségét [16].

Az aerob glikolitikus fenotípus támogatja a daganatsejtek túlélését változó oxigénkoncentráció mellett is. A daganatsejtek többségében mindez megnövekedett glükóz- és glutaminfelhasználással, valamint intenzív tejsavtermeléssel társulhat. Utóbbi hozzájárul a sejtek környezetében a pH csökkenéshez, amely több módon is segíti a daganatsejtek proliferációját és túlélését vagy akár terjedését, metasztázisképzését. Ezek közül az immunszuppresszív és más mikrokörnyezeti (pl.: bizonyos mátrixbontó enzimek mennyiségi és aktivitás növekedése) hatások vagy az úgynevezett *metabolikus szimbiózis* jelentősége egyre jobban ismert (pl.: a tejsav ismételt felhasználása a daganat- és stromasejtek esetén) [17-19].

A glikolízisben és a pentóz-foszfát úton keletkező NADPH részt vehet a képződő új sejtek membránjainak felépítésében és az oxidatív stressz (ezen keresztül akár daganatterápiás szerek) hatásainak csökkentésében, semlegesítésében, így rezisztencia mechanizmusokban is. Előbbiekén túl a glikolitikus intermedierek biztosítják a daganatsejtek számára a bioszintetikus folyamatok fenntarthatóságát, a lipid-, nukleinsav- és aminosavsintézis építőelemeit. Az intenzív glikolízist jellemzi az alacsony aktivitású piruvát-kináz (PK) PKM2 izomer fokozott expressziója. A PKM2 a piruvát tejsavvá átalakítását úgy segíti, hogy lassítja a PKM1-mediált piruvát citrátköri oxidációját. A kis mennyiségben keletkező piruvát az úgynevezett „csonka” citrátkörbe lép, ahol az acetyl-CoA-ból keletkező citrát elsősorban a citoplazmában zajló membránalkotók szintézisében vesz részt. A metabolikus egyensúly fenntartásához bizonyos daganatsejtekben a citrátkör feltöltésében a glutaminolízisnek, a glutaminhasznosításnak juthat kiemelt szerep. Ennek eredményeként alakulhat ki, hogy a glükózhasznosítás adja a termelődő tejsav 90%-át, míg a citrátköri intermedierek több mint 40%-a glutaminból származik. Ezzel párhuzamosan a glutaminoxidáció biztosíthatja a megtermelt ATP akár 30%-át. Mindezekkel összefüggésben a glükóztranszporterek mellett a

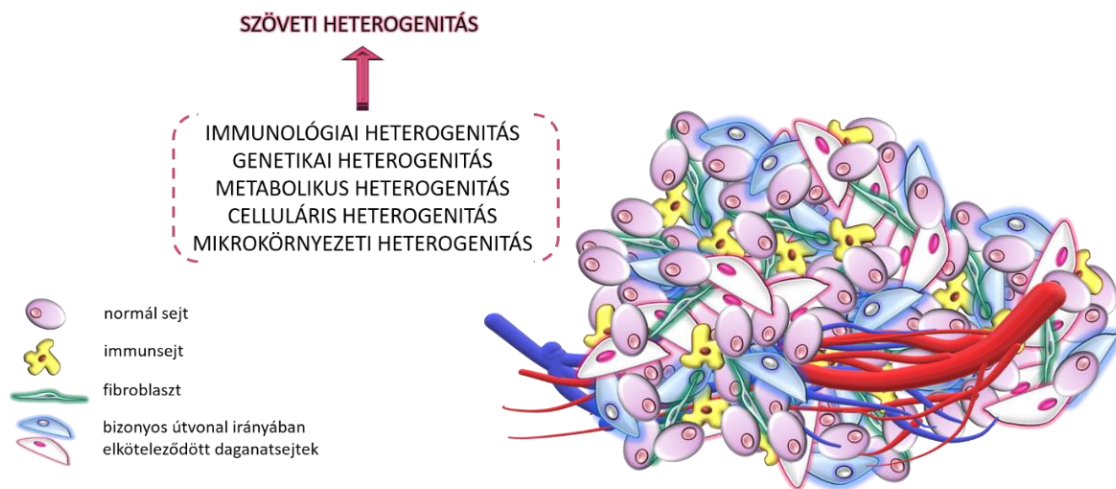
glutamintranszporterek és glutamináz, illetve más glutamin vagy más aminosav hasznosítást segítő enzimek expressziója nő meg [20-22]. Azok a daganatok, amelyekre az előbbi glikolitikus aktivitás túlsúlya jellemző ¹⁸FDG PET/CT-vel (2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxi-D-glükóz pozitronemissziós tomográfia/komputer tomográfia) glükóz felvételük és glikolitikus aktivitásuk miatt jól monitorozhatók. Az előbbi radiofarmakont a daganatszövetet vagy más gyulladást infiltráló immunsejtek is halmozhatják és vannak nem Warburg-fenotípusú tumorsejtek is (ezekben alternatív metabolikus útvonal, OXPHOS-aktivitás jellemző), így a PET-CT kiértékelése nagy szakértelmet igényel és ez az eljárás nem minden daganattípus esetében alkalmazható. Előfordul, hogy a stroma vagy a gyulladós sejtek termelte tejsavat megfelelő oxigénellátottság mellett a daganatsejtek hasznosítják. A tejsav ilyen irányú felhasználását nevezzük *reverz Warburg-effektus*-nak [21,23,24]. Előbbiekhez hasonlóan a tumorszöveten belül a sejtek metabolikus együttműködése valósulhat meg, ez a *metabolikus szimbiózis*, amelyben optimális tápanyaghasznosítás zajlik az elérhető források és a változó környezeti feltételek függvényében. Ilyenkor fontos energetikai szubsztrát lehet az acetát is, azokban a daganatsejtekben, amelyeket ACSS2 (Acyl-CoA synthetase short-chain family member 2) overexpresszió, acetáthasznosítás jellemez [25-27]. A sokoldalú metabolikus alkalmazkodás jellemzőjeként a daganatszövetben sokféle metabolikus fenotípusú tumorsejtet figyelhetünk meg, ez összefügghet a daganatszövet metabolikus plaszticitásával. Alapvetően két, illetve három metabolikus fenotípusról írnak a témához kapcsolódó közlemények, ezek a Warburg-, OXPHOS- és hibrid (mind a Warburg-folyamatok, mind az OXPHOS-folyamatok aktívak) fenotípusok [16,28].

Az elmúlt évek eredményei alátámasztják az úgynevezett daganatössejtek vagy össejtszerű, nyugvó sejtek daganatprogressziós jelentőségét [29-31]. Ezek a daganatsejtek rendelkeznek az össejtekre jellemző immortalitási és plaszticitási képességekkel, így a mikrokörnyezeti alkalmazkodás fontos tényezői lehetnek. A terápiát követően, ezek a nyugvó állapotban rekedt sejtek újra aktiválódva hozzájárulhatnak a primer daganat ismételt növekedéséhez vagy invazív növekedésükkel akár metasztázisok kialakulásához is [32-35]. A nyugvó, össejtszerű daganatsejteknek metabolikus jellegzetességeiről ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre (daganattípus függően vannak adatok OXPHOS- és Warburg-fenotípus megjelenésére is), az adott állapotok

pontatlan definiálásának, meghatározásának is van szerepe az eredmények különbségeiben [36].

1.3. A daganatszövet metabolikus heterogenitása, valamint ennek terápiás jelentősége

A daganatokra inter- és intratumorális heterogenitás jellemző. A daganatok sokfélesége és az egyén daganatainak jellegzetességei nyújtotta heterogenitáson túl a szövetet alkotó daganatos és nem daganatos sejtek (pl.: gyulladásozó elemek, erek, fibroblasztok) aránya, az extracelluláris mátrixalkotók változatossága, a szöveten belül az erektől való távolság és ennek következtében az O_2 és a tápanyagok koncentrációjának eltérései már önmagukban szöveti heterogenitást teremtenek. Az elmúlt húsz év eredményei igazolták a genetikai heterogenitást, az immunmikrokörnyezet eltéréseit, a szövetek metabolikus heterogenitását is. A modern terápiák mellett, ez a sokféle heterogenitás jelenti a legnagyobb kihívást, ezért is fontos a terápiarezisztencia hátterében rejlő folyamatok mind teljesebb megismerése és megértése (**2. ábra**). Ennek egyik kiemelt tényezője a daganatsejtek anyagcsere változásainak és metabolikus alkalmazkodásának feltárása [37,38].



2. ábra A daganatszövet komplexitása. A daganatszövet heterogenitása több tényezőtől/elemtől tevődik össze. A szövetet alkotó sejtek sokfélesége, a sejtek egyedi mikrokörnyezeti, celluláris, metabolikus, genetikai és immunológiai különbségei hozzájárulnak a szöveti heterogenitás kialakulásához, amely nagyban hozzájárulhat a terápiarezisztencia kialakulásához.

Mára elfogadott, a daganatsejtek anyagcsere-útvonal átprogramozásának, a szövet megváltozott metabolikus profiljának és a különböző bioenergetikai szubsztrátok hasznosításának, vagy akár az onkometabolitok megjelenésének a szerepe, ezek vizsgálata alapvető fontosságú a hatékonyabb terápiás készítmények kifejlesztésében. Nem véletlen, hogy egyre több esetben jelenik meg az igény a daganatok metabolikus zavarainak jellemzésére, metabolikus profil alapján történő osztályozására [3,4,39].

Ahogy korábban említettem, az úgynevezett *hibrid fenotípusú* sejtek különböző bioenergetikai források felhasználásához a Warburg-glikolízis és az OXPHOS-irányú folyamatok aktuális igényeiknek és környezeti feltételeiknek megfelelő aktivitását biztosítják. Ez a metabolikus flexibilitás és adaptációs kapacitás teszi ezeket a sejteket rendkívül veszélyessé [28], és nehezíti a terápiás célzásukat. Azt is fontos kiemelni, hogy a főbb metabolikus fenotípusok mellett számos átmenet is elképzelhető, például a daganatössejtek, nyugvó sejtek is alacsonyabb metabolikus aktivitással rendelkezhetnek [39].

1.4. Anyagcseregátló kezelések daganatellenes hatásai

Az évtizedek óta alkalmazott metabolikus célpontú kemoterápiás készítmények hatékony daganatellenes hatásai és a daganatsejtek jellegzetes metabolikus változásainak megismerése a tumorigenezisben, tumorprogresszióban, illetve az újabban megismert anyagcsere-folyamatok célzása elősegítheti a további terápiás fejlesztéseket.

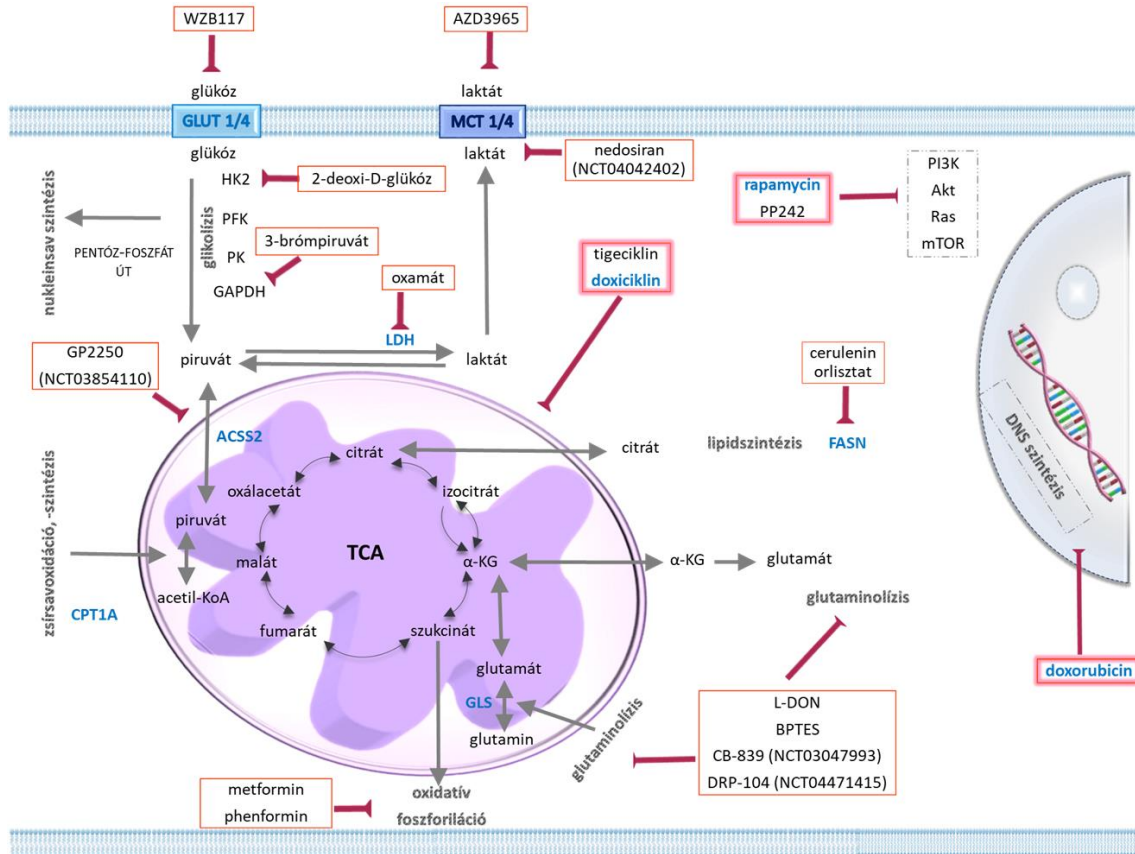
A legutóbbi időszakban újra fókuszba került a Warburg-effektus, a kutatások eredményei felhívták a figyelmet arra, hogy a magas glikolitikus aktivitású daganatokban a glikolízis gátlása hatásos lehet [40]. Glikolitikus enzim és transzporter gátlók (pl.: hexokináz-2-gátló: 2-deoxi-D-glükóz; laktát-dehidrogenáz-gátló: oxamát; GAPDH-gátló: 3-brómpiruvát; glükóztranszporter-gátlók: pl.: WZB117; monokarboxilát-transzporter-gátlók: pl.: AZD3965) korai vizsgálatai ígéretesnek bizonyultak, a fázisvizsgálatok során fellépő súlyos mellékhatások miatt azonban fel kellett függeszteni klinikai vizsgálataik többségét. A glikolízis gátlására vannak azonban közvetett lehetőségek is; pl.: az mTOR-gátlók is képesek a laktát- (nedosiran – NCT04042402 fázis III) vagy a priváttranszport gátlására (pl.: GP2250 – NCT03854110 fázis II vizsgálat) [41,42].

A glutaminmetabolizmust célzó kezelések a citrátkört feltöltő (anaplerotikus) folyamatok és a zsírsavanyagcsere gátlására irányulnak. A glutamintranszporterek

kompetitív gátlása azonban eddig nem vezetett eredményre, a vizsgálatok itt is súlyos mellékhatásokról számoltak be [43,44]. A GLS (Glutaminase) mindkét izoformáját gátló hatóanyag (6-diazo-5-oxo-L-norleucin, L-DON) elégtelen szelektivitása és ezzel összefüggésben az okozott mellékhatásai miatt volt sikertelen. Tesztelték a bisz-2-(5-fenilacetamid-1, 2, 4-tiadizol-2-il)-etilszulfidot (BPTES-t), ami csak az egyes izoformát gátolja, ez alacsony toxicitású ugyan, de nem elég hatékony. Újabb GLS-gátlók a CB-839 (NCT03047993 – fázis II), illetve a glutamin antagonistá DRP-104 (NCT04471415 – fázis II), amelyeket jelenleg is vizsgálnak [42,45].

A mitokondrium anyagcsere célzása esetében a mitokondriális fehérjeszintézis, és az OXPHOS folyamatainak gátlása merül fel. Egyes antibiotikumok (pl.: tige ciklin, doxiciklin) például a mitokondrium biogenezis gátló hatásuk alapján csökkenthetik a daganatnövekedést [46,47], erről részletesebben a disszertáció későbbi fejezetében írok. Antidiabetikus hatásai mellett a biguanid metformin és phenformin bizonyos megfontolások mellett alkalmazható a daganatellenes terápiában is. A két szer a légzési lánc mitokondriális komplex I-en keresztül gátolja az OXPHOS-t, serkenti az AMPK-útvonal aktivációját [48].

Lipidanyagcserében az SREBP-1 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein) vagy a zsírsavfelvételben közreműködő CD36 gátlása merül fel. A lipidszintézis-gátlók közül a FASN-t (Fatty acid synthase-t) célzó szerek (pl.: cerulenin, orlisztat) preklinikai vizsgálatokban hatékonyak bizonyultak, de az eddigi klinikai vizsgálatok eredményei még nem egyértelműek [49,50]. Ígéretes célpont lehet a zsírsavoxidáció egyik kulcsenzimének, a CPT1A-nak (Carnitine Palmitoyltransferase 1A-nak) gátlása is [51]. **(3. ábra).** Előbbiekén túl az autofágia-gátló és serkentő kezelések alkalmazása is előtérbe került a különböző szolid daganatok fázisvizsgálataiban az elmúlt évtizedben.



3. ábra Metabolikus gátlók és támadáspontjaik vázlatos összefoglalása. Egyes, a disszertációban említésre kerülő metabolikus támadáspontú gátlószereket piros keretben emeltem ki. A kísérletekben vizsgált metabolikus enzimeket, illetve az alkalmazott kezelőszereket vastagított betűstílussal, kék színnel jelöltem. (ACSS2 – Acyl-CoA synthetase short-chain family member 2; CPT1A – Carnitine Palmitoyltransferase 1A; FASN – Fatty acid synthase; GLS; GLUT1/4 – Glucose transporter 1/4; LDH – Lactate dehydrogenase; MCT1/4 - Monocarboxylate transporter 1/4; α -KG – α -ketoglutarát)

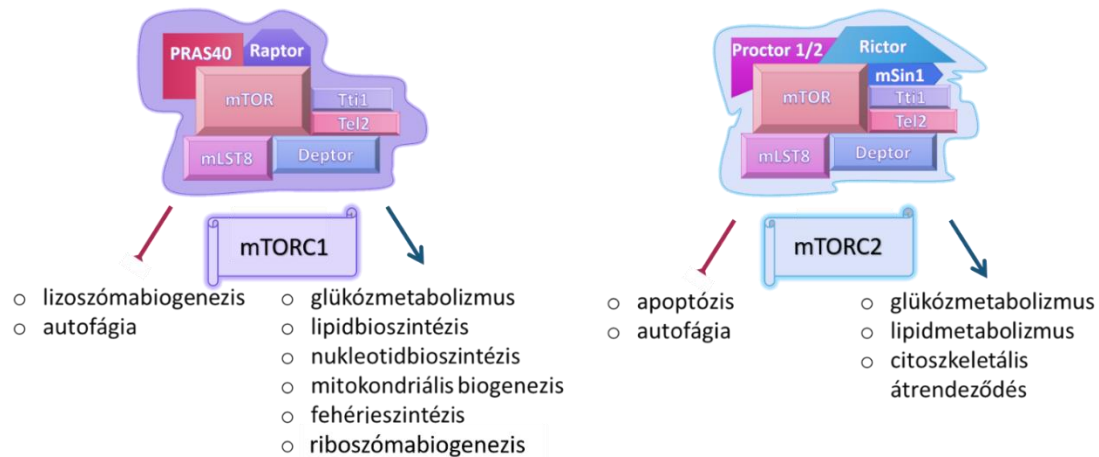
1.5. Az mTOR mint metabolikus csomópont szerepe a daganatok metabolikus alkalmazkodásában

A mechanistic/mammalian target of rapamycin (mTOR) a jelátviteli hálózatban megjelenő a környezetből érkező sokféle tényező hatásait és a sejt aktuális állapotát jellemző szignálokat integrálja (növekedési faktorok, tápanyagok, energiaszint, hipoxia, ROS-szint, stb.), és ennek megfelelően szabályozza a sejt növekedését, anyagcseréjét (felépítő és lebontó folyamatok, autofágia), valamint túlélését. Az elmúlt évtizedek kutatási eredményei igazolták, hogy az mTOR-kináz komplexeknek – mint a jelátviteli

útvonalak központi regulátorainak – fontos szerepük van az anyagcsere szabályozásában, a bioszintetikus és lebontó folyamatok egyensúlyának fenntartásában. Nem meglepő, hogy az útvonal hibás működése különböző szabályozási zavarokhoz, betegségek kialakulásához vezet (anyagcserebetegségek, neurodegeneratív betegségek, daganatok, öregedési stb.). Daganatproliferációval járó folyamatokban emelkedett mTOR-aktivitás figyelhető meg, amely támogatja: a növekedéshez szükséges fehérjék termelését; a tumorigén transzkripciós faktorok kifejeződését és aktivitását; a glikolitikus gének expresszióját; a pentóz-foszfát út, a glikolitikus és oxidatív folyamatok aktivitását, a fehérje-, zsír- és nukleotid-anyagcsereutak változását, végül serkenti a sejtnövekedést az autofágia gátlásával is [52].

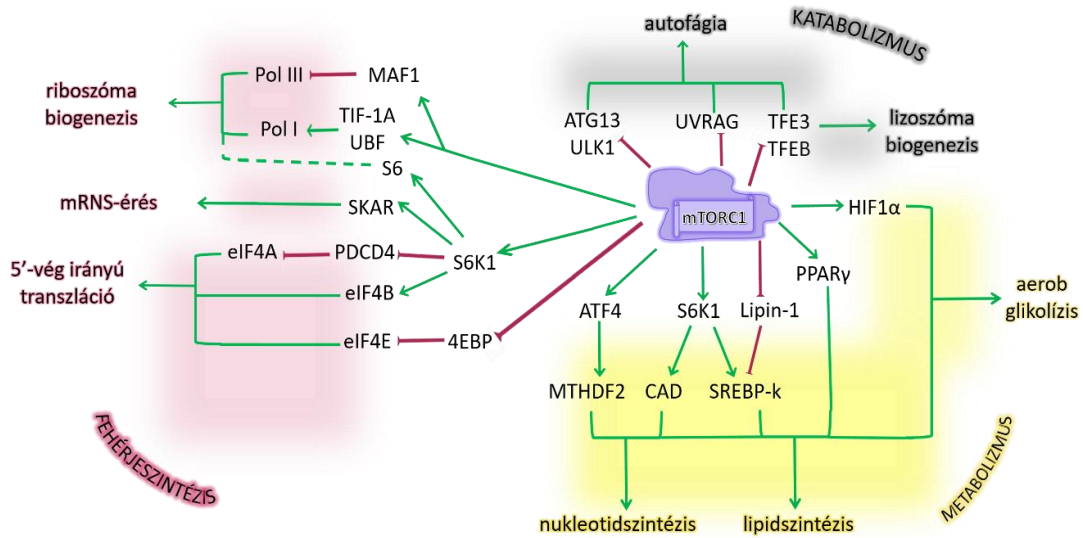
1964-ben *Sehgal* és munkatársai a Húsvét-szigeteken *Streptomyces hygroscopicus*, talajbaktériumból, egy új makrolid antibiotikumot mutattak ki (*Rapa Nui* – Húsvét-szigetek a helyi nyelven), a hatóanyagot *rapamycin*nek nevezték el [53]. Gombaellenes és immunszuppresszív hatásai után leírták, hogy a rapamycin daganatellenes, sőt neuroprotektív hatásokkal is rendelkezik [54,55]. A rapamycin hatásmechanizmusát és sejten belüli targetjét csak később azonosították; kimutatták, hogy a rapamycin az FKBP12-höz kötve fejti ki hatását [56,57], majd ezt követően izolálták az FKBP-rapamycin komplex által gátolt kinázt, amelyet végül *mechanistic target of rapamycin*nek (mTOR) nevezték el [58-60].

mTOR szerin-treonin protein kináz a jelátviteli hálózat fontos csomópontja, a PI3K-hoz kapcsolt protein kináz (PIKK) családba tartozik [61]. Kétféle (különböző katalitikus alegységből szerveződő) funkcionálisan és gátlóival szembeni érzékenysége szempontjából is eltérő komplexet alkot: az mTOR-komplex 1-et (mTORC1-et) és az mTOR-komplex 2-t (mTORC2-t). A komplexek megkülönböztető elemei a PRAS és a Raptor az mTORC1-ben, míg az mSin1, PRR5/Protor és a Rictor mTORC2-ben (közös elemek: Deptor, mTOR, mLST8, TTI1/TEL2) (**4. ábra**) [52,62].

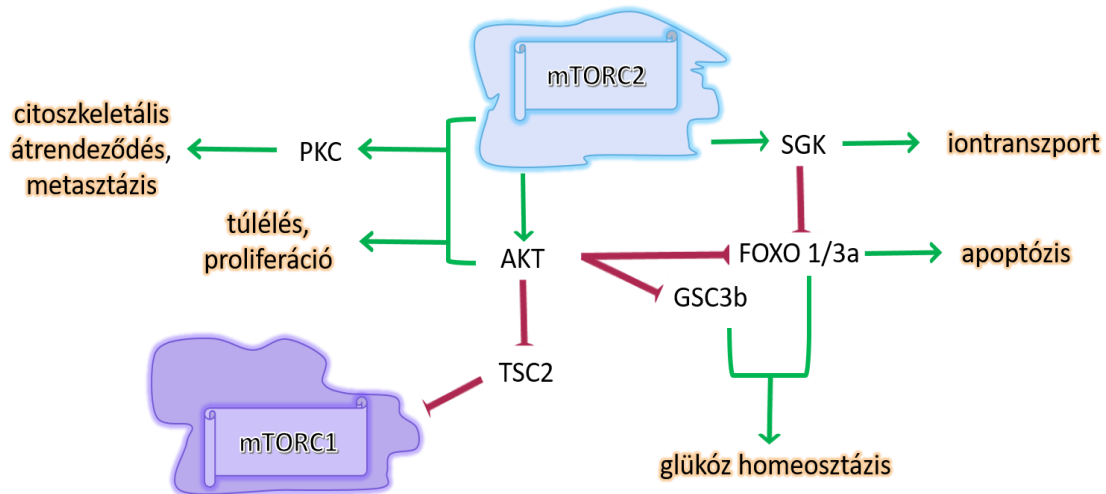


4. ábra Az mTOR-komplexek (mTORC1 és mTORC2) szerkezete és az általuk szabályozott, legjobban ismert biológiai hatások. A két komplex rendelkezik azonos alegységekkel: az mTOR (mTOR-kináz), az mLST8 (mammalian lethal with sec-13 protein 8) adaptor fehérje, a Deptor (DEP domain containing mTOR-interacting protein), valamint a Tti1 (Tel two interacting protein 1) és a Tel2 (telomere maintenance 2) által alkotott komplex. Az mTORC1 felépítésében részt vesz a Raptor (regulatory-associated protein of mTOR) és a PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa), míg az mTORC2-ben a Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), a Proctor 1/2 (protein observed with rictor 1 and 2) és az mSin1 (mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1). Az egyszerű kék nyilak aktiváló, míg a talpas bordó nyilak gátló szabályozást jelölnek (52. és 62. irodalom alapján módosítva).

Az mTORC1 számos felépítő folyamatban vesz részt – szerepe van a fehérje-, a lipid- és a nukleotidszintézis mellett a riboszóma biogenezisben is. Míg ezzel párhuzamosan gátol, negatívan szabályoz bizonyos katabolikus folyamatokat, az ubiquitinilációt (Ub-t), az autofágiát. Az mTORC2-nek fontos szerepe van a sejtek túlélésének biztosításában, a citoszkeletális rendszer újra szerveződésében [63-66]. A két komplex eltérő célfehérjének foszforilációjával biztosítja a szabályozó hatásokat. A legjobban ismert targetfehérjéket és a visszacsatolási szabályozó utakat az **5. és 6. ábrán** mutattam be [67,68].



5. ábra Az mTORC1-komplex által szabályozott fehérjék, az érintett biológiai folyamatok és célfehérjék. Az ábrán szereplő rövidítések magyarázata: 4EBP (4E-binding protein); ATF4 (activating transcription factor 4); ATG13 (autophagy related 13); CAD (carbamoyl-phosphate synthetase 2, apartate transcarbamoylase, dihydroorotase); eIF4A (eukaryotic translation initiation factor 4A); eIF4B (eukaryotic translation initiation factor 4B); eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E); HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1-alpha); MAF1 (repressor of RNA polymerase III transcription MAF1 homolog); MTHDF2 (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2); PDCD4 (programmed cell death 4); Pol I (RNA polymerase I); Pol III (RNA polymerase III); PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ); S6 (ribosomal S6 protein); S6K1 (p70 S6 kinase 1); SKAR (S6K1 Aly/REF-like target); SREBP-k (Sterol Regulatory Element Binding Proteins); TFE3 (transcription factor E3); TFEB (transcription factor EB); TIF-1A (transcription initiation factor 1A); UBF (upstream binding factor); ULK1 (unc-51-like autophagy-activating kinase 1); UVRAG (UV radiation resistance associated). Az egyszerű zöld nyilak aktivitáló, míg a talpas bordó nyilak gátló szabályozást jelölnek (52. irodalom alapján módosítva).



6. ábra Az mTORC2-komplex és a leginkább ismert, eddig az irodalomban kiemelt, általa szabályozott jelátviteli folyamatok. Az ábrán szereplő rövidítések magyarázata: 4EBP (4E-binding protein); AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1); FOXO 1/3a (Forkhead Box O 1/3a); GSK3b (glycogen synthase kinase 3b); HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1-alpha); PKC (protein kinase C); S6K1 (p70 S6 kinase 1); SGK (serum- and glucocorticoid-induced protein kinase); SREBP-k (Sterol Regulatory Element Binding Proteins); TSC2 (tuberous sclerosis complex 2). Az egyszerű zöld nyilak aktiváló, míg a talpas bordó nyilak gátló szabályozást jelölnek (52. irodalom alapján módosítva).

Ismert számos az mTOR-kináz komplex elemeit is érintő mutáció (pl.: mTOR-kináz aktiváló mutációk vagy *RICTOR*-amplifikációk, mutációk stb.), de a jelátviteli hálózatban található onkogén csomópontok mutációi, aktiválódása (pl.: *AKT*, *4EBP1*, *eIF4E*, *PIK3CA*, *Rheb*, *mTOR*, *RICTOR*, *S6K1* funkciónyeréses mutációja) vagy egyes tumorszuppresszorok kiesése (pl.: *PTEN*, *LKB1*, *TSC1/TSC2*, *FBXW7* funkcióvesztéses mutációja) miatt fellépő mTOR-komplex hiperaktiváció gyakrabban jelenik meg [65,66,69].

1.5.1. *mTOR*-gátlók

A rapamycint előbb fedezték fel, mint az mTOR-kinázt; az FKBP12 fehérjén keresztül köt az mTOR-kinázhoz, az mTORC1-komplexben, de az mTORC2-komplex szerkezeti különbségei miatt utóbbihoz kötődni nem képes. A rapamycin mTORC1-aktivitást gátló hatása jól ismert, hosszabbtávú kezelésekben egyes eredmények szerint azonban gátolhatja az mTORC2-komplexet is. A rapalógok (rapamycin származékai)

mellett kettős az mTORC1- és mTORC2-komplex gátlókat (pl.: PP242, Torin1/2), valamint duál mTOR-kinázt és más jelátviteli kinázokat is gátló inhibitorokat (pl.: NVP-BEZ235; gedatolisib – NCT03911973, NCT03698383 – fázis II; samatolisib – NCT03213678, NCT03155620 – fázis II) is fejlesztettek, fejlesztenek. Harmadik generációs (kombinált kináz gátlók pl.: RapaLink-1) és siRNS-alapú gátlók fejlesztése is zajlik a legkülönbözőbb terápiás célokkal, köztük a szervtranszplantációs immunszuppresszióban, előrehaladott daganatok kezelésében (pl.: vese-, emlődaganatok, köpenysejtes, illetve más high grade lymphomák és neurodegeneratív kórképek esetében is) [70,71]. A gátlók mellékhatásai hasonlóak valamennyi gátló, még az újgenerációs gátlók esetében is (pl.: gasztrointestinális tünetek: testsúlycsökkenés, diarrhea, hányás; metabolikus mellékhatások: hiperglikémia, hiperkoleszterinémia; hematológia tünetek: anaemia; bőrtünetek: kiütések és egyéb mellékhatások: fáradtság, köhögés). Daganatok esetében számos mTOR-gátló fázisvizsgálat zajlik, kombinációban a legkülönbözőbb kemoterápiás szerek érzékenyítésében és esetleg más célzott kezelésekkel szembeni rezisztenciamechanizmusok felfüggesztésében [72-74].

mTOR-gátló kezeléskor sok más célzott kezeléshez hasonlóan jellemzően inkább citosztatikus, mint citotoxikus hatások jelennek meg. Ilyen esetben a túlélő sejtekben aktiválódó autofágiás mechanizmusok támogatják a sejtek túlélését, így hozzájárulhatnak a rezisztenciafolyamatok aktiválódásához is. Az mTOR-kináz autofágiagátló hatásai jól jellemzettek [75,76]. Ismert azonban az is, hogy antimetabolikus kezelések – köztük a rapalógok és a metformin – csökkenthetik a daganatok kialakulásának esélyét is, amelyben inkább az öregedést késleltető és növekedési szignál gátló hatások szerepét hangsúlyozzák jelenleg [77].

1.6. Daganatnövekedés-gátló hatások és a sejthalál-mechanizmusok

Antimetabolikus kezelések kombinálásával korábbi vizsgálatainkban is több esetben (pl.: gliomasejtekben is) tapasztaltuk, hogy egyesek rendkívül hatásosak lehetnek *in vitro* [78,79]. Felmerült, hogy a jelentős proliferációgátló hatások háttérben sejtpusztulás, indukált sejthalál is megjelenhet.

Az elmúlt évtizedekben a Sejthalál Nomenklatúra Bizottság (Nomenclature Committee on Cell Death – NCCD) rendszeresen iránymutatásokat fogalmazott meg a sejthalálformák meghatározására morfológiai, biokémiai és funkcionális szempontokat szem előtt tartva. A nevezéktan frissítését, pontosítását legutóbb 2018-ban tették meg

[80]. Történetileg, a sejthalál-folyamatokat a morfológiai jellegzetességek és az elpusztult sejtekből származó fragmentumok kibocsátásának módja szerint három fő típust különítettek el. Az I. típusú sejthalálforma az apoptózis, a II. típusú sejthalál az autofágia, míg a III. típus a nekrozis [81,82]. Az új kategóriákban megjelentek a nekrozishoz hasonló jellemzőkkel rendelkező különböző típusok például a nekroptózis, a NETosis, a pironekrozis és a piroptózis. Az autofágiához kapcsoltn is többféle sejthalál-folyamatot írtak le ilyen például az autózis is. Az előbbieken felsoroltakon túl továbbiak is megemlíthetők például az entózis, a ferroptózis, a lizoszóma-függő sejthalál és a parthanatózis [80,83].

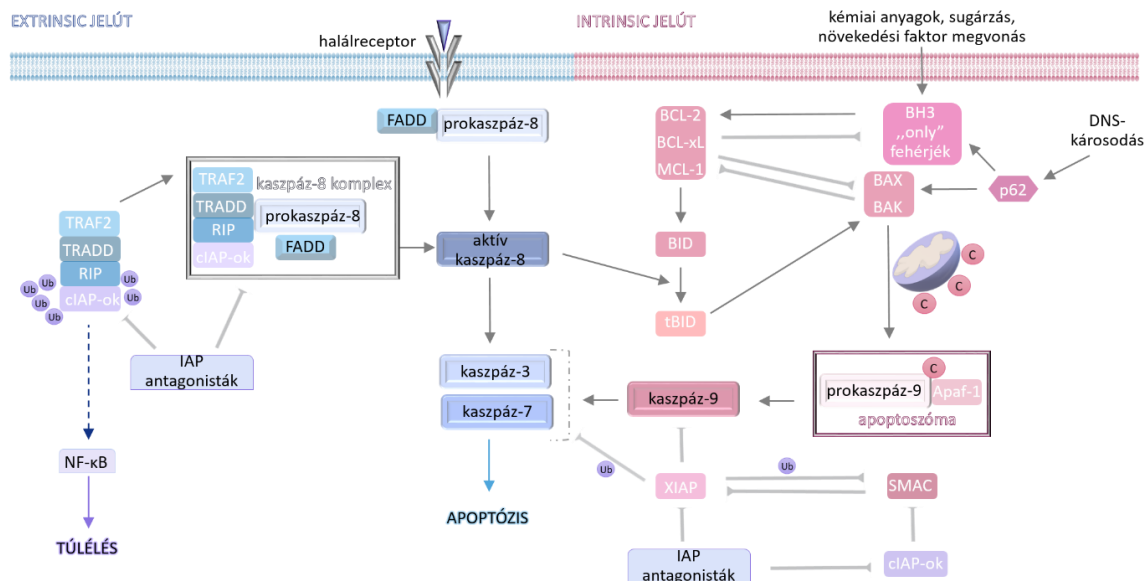
1.6.1. Nekrozis

A nekrozis az elsőként megfigyelt és leírt sejtpusztulási forma. Az elnevezés a görög *necros* (=halott) szóból származik. A folyamatban az adott sejt intenzíven meguzzad, a sejtmembrán felbomlik, és ennek következményként a sejt tartalma az extracelluláris térbe kerül. Párhuzamosan a sejtorganellumok is károsodnak, a sejtlízis eredményeképpen a környezetbe antigének kerülnek, ez pedig gyulladási folyamatokat indít el. Hagyományosan a nekrozis minden fajtáját szabályozatlan sejtpusztulási mechanizmusnak tekintették. Ezen sejthalálformát számos tényező indukálhatja, például vírális fertőzés (duplaszálú RNS), mitokondrium sérülése (mitokondriális DNS és ROS), DNS-károsodás, bakterális liposzacharidok megjelenése és TLR4-hez való kötődése. Fontos jellegzetesség, hogy a nekrozis energiát nem igényel, passzív folyamatnak tekinthető [84,85].

1.6.2. Apoptózis

Az apoptózis a programozott sejthalál-mechanizmusok egy formája, amely nemcsak a sejtet ért káros hatások eredménye lehet, hanem normál körülmények között, fiziológiai folyamatokban is nélkülözhetetlen, megújulást és szerkezetváltást eredményez a szövetekben (pl.: egyedfejlődés). Az apoptózist morfológiai szempontból sejtsugorodás, citoplazmakitüremkedés és -leválás (apoptotikus testek megjelenése), kromoszómakondenzáció (*pyknosis*), sejtmagfragmentáció (*karyorrhexis*), DNS-fragmentálódás, majd az apoptotikus testek fagocitózisa jellemzi [86,87]. A nekrozissal ellentétben, az apoptotikus folyamatok nem váltanak ki gyulladási választ, hiszen a sejtmembrán végig intakt marad, és nem passzív, hanem energiaigényes folyamat.

Az apoptózisban a cisztein-aszpartáz proteázok (kaspázok) kaszkádszerűen aktiválódnak. Kialakulásakor két fő útvonalat különítünk el: a belső, intrinsic és a külső, extrinsic utakat. Az intrinsic úton a sejthalál irányába történt elköteleződés után, a mitokondrium permeabilizációja következik be. Intrinsic sejthalált vált ki például DNS-károsodás, onkogén aktiváció, növekedési faktorok megvonása, endoplazmatikus retikulumból származó stressz vagy a mikrotubulus szétesése. A mitokondrium külső membránjának permeabilizációja véglegesen kijelöli a sejt lebontását, ezt követően aktiválódik a kaspáz aktivációs kaszkád. A citokróm C köti az apoptózis proteáz aktiváló faktor-1-et (APAF1), amelynek oligomerizációját követően kialakul az apoptoszóma, amely toborozza és aktiválja a kaspáz-9 iniciátor kaspázt. A következő lépésként a kaspáz-9 hasítja és aktiválja a végrehajtó kaspázokat, a kaspáz-3-at és a kaspáz-7-et. Az extrinsic sejthalálban a sejtfelszíni halálreceptorokhoz ligandjaik kötődnek (Fas, a TNFR1 vagy a TRAIL), majd a haláldomének (Death Domains – DD) a halál effektor domének (Death Effector Domain – DED) interakcióba lépnek és toborozzák az adaptor molekulákat (Fas-asszociált haláldomén fehérjét – FADD és a kaspáz-8-at), amelyek közvetlenül hasítják és aktiválják a kaspáz-3-at és kaspáz-7-et. Utóbbiak indítják be a sejt fehérjeinek és DNS-ének fragmentálását (**7. ábra**) [80,88,89].



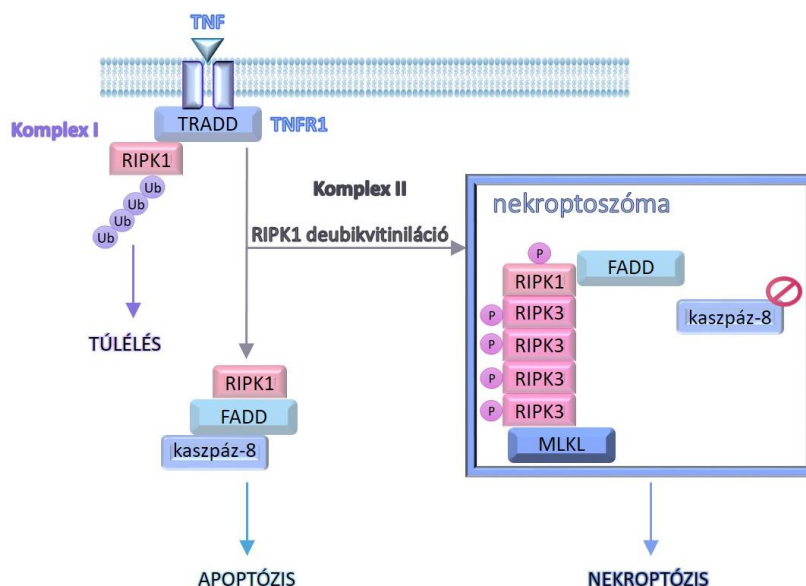
7. ábra Az apoptózis extrinsic és intrinsic jelátviteli útvonalainak vázlatos bemutatása. Az ábrán szereplő rövidítések: Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1); BAK (Bcl-2 antagonist/killer); BAX (Bcl-2-associated X protein); BCL-2 (B-cell lymphoma 2); BCL-xL (B-cell lymphoma-extra large); BH3 (Bcl-2 Homology 3); BID (BH3 interacting-domain death agonist); C (citokróm C); cIAP-ok (Cellular inhibitor of apoptosis proteins); FADD (Fas-associated death domain protein); IAP (inhibitors of apoptosis); MCL-1 (myeloid cell leukemia 1); NF-κB (nuclear factor kappa B); p62 (ubiquitin-binding protein/Sequestosome-1); RIP (receptor-interacting protein); SMAC (second mitochondrial-derived activator of caspases); tBID (truncated BID); TRADD (NF-receptor-associated death domain); TRAF2 (TNF-receptor-associated factor 2); Ub (ubikvitiniláció); XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) (88. irodalom alapján módosítva).

1.6.3. Nekroptózis

A nekroptózis a nekrozis és az apoptózis jegyeit is mutatja, átmeneti formának tekinthető, az apoptózishoz hasonlóan meghatározott jelátviteli folyamatok aktiválják, de ebben a folyamatban a membrán károsodása következik be. Így felfogható a nekrozis programozott formájának, aktiválásában a RIPK3 (Receptor-Interacting Kinase 3) és a MLKL (Mixed Lineage Kinase Domain-Like) pszeudokináz játszik fontos szerepet [90,91].

A nekroptózis halálreceptorok aktiválódását követi, de halálreceptoroktól függetlenül is bekövetkezhet (pl.: TLR3, TLR4, vírusfertőzés). A nekroptózist a gyulladáso

folyamatok kiváltásához is kötik, szerepe lehet a szklerózis multiplex, amyotrophias lateralis sclerosis és a Crohn-betegség kialakulásában is. Nem teljesen tisztázott, hogy a nekroptózis vezető szerepet tölt-e be előbbi betegségek kialakulásában vagy csak következménye a betegségeknek. A nekroptózis halálreceptor-ligand kapcsolat kialakulásával kezdődik, hogy mi történik ezt követően, azt az dönti el, hogy melyik komplex alakul ki a ligand megkötése után, apoptoszóma vagy nekroptoszóma. Nekroptózisban a RIPK1 folyamatos deubikvitinációja eredményeként a RIPK1 disszociál és ennek hatására két további molekulakomplex formálódik, ha ez az apoptoszóma, akkor a kaspáz-8-at aktiválja és apoptózis következik be. Nekroptoszóma szerelődik össze, ha a kaspáz-8 gátolt, és ez a folyamat már a nekroptózist serkenti. A nekroptoszóma RIPK1-et és RIPK3-at toboroz, majd a RIPK3 foszforilálja az MLKL-t, amely a plazmamembránhoz lokalizálódik és permeabilizálja azt (8. ábra) [92-94].



8. ábra A nekroptózis molekuláris mechanizmusának sematikus bemutatása.

Gyulladásos folyamatok során TNF-stimulus hatására a TNFR1-receptor aktiválódik. Amennyiben a receptorhoz ubikvitinilált RIPK1 kötődik, a sejt túlél (Komplex I). A RIPK1 folyamatos deubikvitinilálódása következtében a Komplex II aktiválódik, amely sejthalálhoz vezet. Ha a kaspáz-8 aktiválódik, akkor apoptoszóma alakul ki és apoptotikus sejthalál indul meg, míg a kaspáz-8 gátlásakor nekroptoszóma alakul ki membrán károsodás alakul ki. Az ábrán szereplő rövidítések: FADD (Fas-associated death domain protein); MLKL (mediator mixed-lineage kinase domain like); P (foszforiláció); RIPK1 (receptor-interacting protein kinase 1); RIPK3 (receptor-interacting protein kinase 3); TNF (tumor necrosis factor); TNFR1 (tumor necrosis factor

receptor 1); TRADD (TNFRSF1A-associated via death domain); Ub (ubikvitiniláció). (84. irodalom alapján módosítva).

1.6.4. Autofágia

Emlős szervezetekben az autofágiának három elsődleges típusát különíthetjük el – ezek a mikro- és a makroautofágia, valamint a *chaperon* (másnéven dajkafehérjék) által közvetített autofágia. Ezekben közös, hogy a lebontandó anyagokat lizoszómákba csomagolják (cargo), amelyek a lebontást követően újra felhasználhatóvá válnak [95,96].

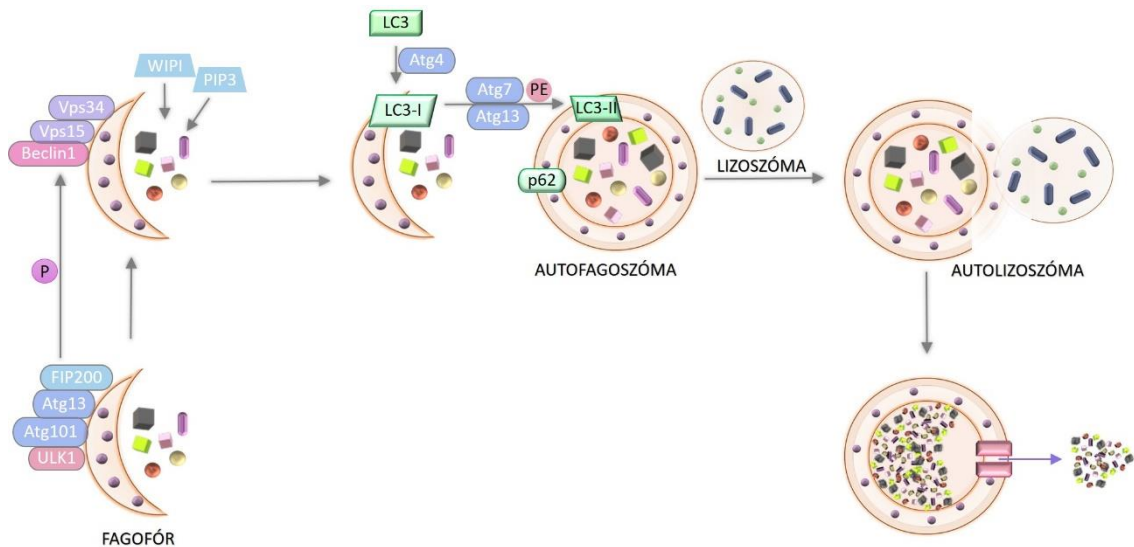
Mikroautofágiában a lizoszóma membrán invaginációjával citoplazma kerül a lizoszómába, majd savas pH aktivált lizoszómális hidrolázok végzik a lebontást [97]. A chaperon-mediált autofágiás mechanizmus egy speciális és szelektív lebontási stratégia, amely során a nem megfelelő térszerkezetű fehérjék (KFERQ aminosav szekvenciák) LAMP2A-receptorokon, csatornákon keresztül kerülnek lizoszómákba (chaperonok szerepe, pl.: Hsp70), majd bomlanak le [98].

A legjobban tanulmányozott autofágia, a makroautofágia, amelyben először létrejön egy félhold alakú izoláló membránzsák (*fagofór*), majd a fagofór további meghajlásával és azt követő záródásával alakul ki a kettős membránnal határolt *autofagoszóma*, amelynek tartalma gyakorlatilag megegyezik a citoplazmáéval. Ezt követően jön létre az *amfiszóma*, az autofagoszóma külső membránja és egy *késői endoszóma* (multivezikuláris test) egyesülésével. Következő lépésben létrejön az *autolizoszóma* – az amfiszóma és lizoszóma fúziója –, majd ennek tartalma és az autolizoszóma belső membránja is lebomlik [80,95].

A disszertációban a továbbiakban megjelenő autofágia kifejezése alatt kizárólagosan a makroautofágiát értem

Az autofág lebontómechanizmus finomhangolása komplex szabályozási mechanizmus alatt áll, ahol nagy jelentősége van a pozitív és negatív visszacsatolásoknak. A szabályozásban számos fehérje vesz részt. Az autofágia folyamatát szabályzó Atg fehérjéket 4 fő csoportba sorolhatjuk. Az 1. csoportba azok az Atg fehérjék tartoznak (Atg1, Atg11, Atg13, Atg17, Atg29, Atg31), amelyek a fagofór, valamint az autofagoszómák kialakulásáért felelősek (iniciációs Atg1/ULK1-2 komplex). A 2. csoport Atg-fehérjéinek (Atg2, Atg8/WIPI 1-2, Atg9) is szerepe van a fagofór membránjának kialakításában. A 3. csoport elemei (Vsp15, Vsp30 vagy Atg6/Beclin-1, Vsp34, Atg14) alkotják az úgynevezett foszfatidil-inozitol-3 kináz komplexet (PI3K),

amely a fagofór nukleációs helyén a membránlipidek foszforilációjával foszfatidil-inozitol-3-foszfáttá (PI3P) alakítja azokat. Ennek a komplexnek szerepe van a fagofór iniciációs és elongációs lépésben is. A 4. csoportba két ubikvitinszerű komplex tartozik: az Atg12 (elemei: Atg5, Atg7, Atg10, Atg12, Atg16) és az Atg18/LC3 (elemei: Atg3, Atg4, Atg7, Atg8/LC3) komplex az autofagoszóma kialakulásában és a membrán növekedésében fontos. A két ubikvitin komplex interakciója hozza létre az LC3-II (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) aktiválásával az autofagoszóma és lizoszóma fúzióját. Az LC3 két formában van jelen, a citoszolikus prekursor az LC3-I (LC3-A), ami előbbi foszfatidil-etanolammal való egyesülésével alakul át LC3-II-vé (LC3-B-vé) (9. ábra) [99-102].



9. ábra A makroautófágia sematikus ábrázolása. A kialakuló határoló membrán, fagofór, (inicializáció) a citoplazma elemeit fokozatosan körbeveszi (nukleáció-elongáció). A fagofór záródásával kialakul az autofagoszóma (érés, maturáció), majd ennek lizoszómával való egyesülése (fúzió) az autolizoszóma kialakulását eredményezi. A lizoszómális degradáció következtében megindul a makromolekulák lebontása, újrahasznosítása. Az ábrán szereplő rövidítések: Atg4 (autophagy related 4); Atg7 (autophagy related 7); Atg13 (autophagy related 13); Atg101 (autophagy related 101); FIP200 (FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa); LC3 (microtubule-associated protein-1 light chain 3/MAP1LC3); LC3-I (LC3' izoformája); LC3-II (lipidált LC3); P (foszforiláció); p62 (ubiquitin-binding protein/Sequestosome-1); PE (foszfatidil-etanolamin); PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate); ULK1 (Unc-51 like autophagy activating kinase 1); Vps15 (vacuolar protein sorting 15); Vps34 (vacuolar

protein sorting 34); WIPI (WD-repeat protein interacting with phosphoinositides) (88. irodalom alapján módosítva).

Az autofágia lehet nem szelektív, illetve szelektív a lebontandó anyagra nézve. Utóbbiban különböző autofág receptoroknak is van szerepe. Ezek közül legjobban tanulmányozott a p62, a BNP1, a TAX1BP vagy az optineurin [103-105]. A p62 interakcióba lép az ubikvitinilált cargóval, majd az LC3-II-höz köt, ennek eredményeként a p62 folyamatosan bomlik, így mennyiségének csökkenése összefügg az autofágia aktivációval [106].

Az autofágianak fontos szerepe van az exogén és az endogén eredetű stresszválaszokban például az éhezés, a tápanyaghiány, az inzulin vagy más növekedési faktor útvonal aktivitásváltozások, hipoxia és az endoplazmatikus retikulum stresszhatások esetén. Több, az autofágia folyamatát szabályozó fehérje, az mTOR-kinázhoz hasonlóan, foszforilációval, gátolja az autofágiában szerepet játszó fehérjék működését (pl.: ULK1/2 (Atg1), UVRAG, Atg13, TFE3, TFEB) [107].

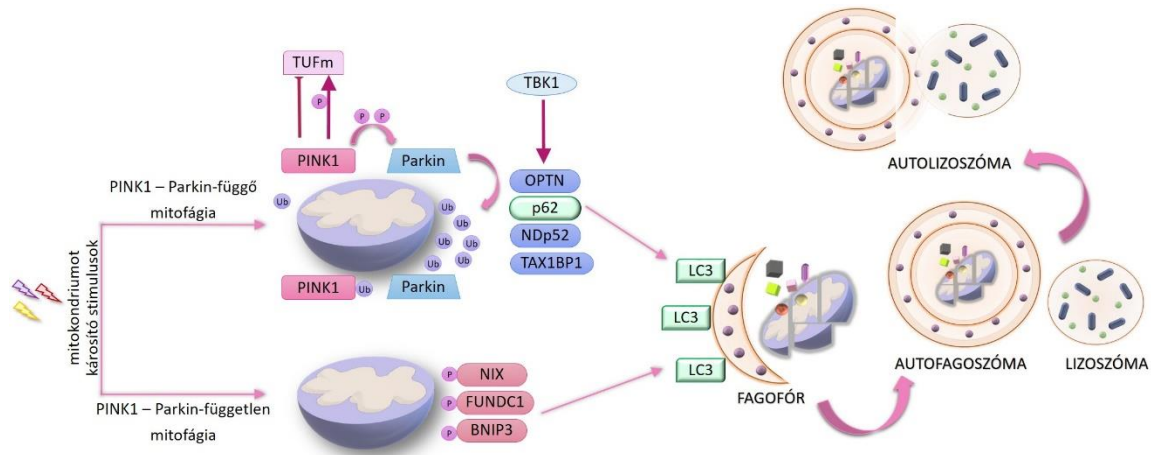
1.6.5. Mitofágia

Az úgynevezett nem-specifikus autofágiás folyamatokat a tápanyag- és az energiahiány váltja ki. A szelektív autofágiában a lebontandó elem organellespecifikus. Ennek megfelelően létezik például pexofágia (peroxisómák lebontása), illetve *mitofágia* (mitokondriumok lebontása) is. Emlős sejtekben a mitofágiának a károsodott mitokondriumok lebontása mellett más szerepe is lehet (pl.: vörösvérsejtek érése) [80, 95].

A mitofágia egyik módja, hogy a károsodott mitokondrium külső membránján megjelennek a PINK1 szerin-treonin kinázok (ezek ép mitokondriumokban a belső membránon található és proteolitikusan elhasadnak). A felhalmozódó PINK1 PARK2/Parkin E3 típusú ubikvitin-ligázt toboroz a külső membránhoz, így a mitokondrium külső membránfehérjéi ubikvitinilálódnak, majd lebomlanak. Ezt követően a p62 elősegíti a sérült mitokondrium LC3-hoz való kötődését, majd a fagofór membrán kialakulását és a mitokondrium lebontását.

Egy másik mód, amikor a mitofágia nem a károsodott mitokondriumok, hanem a feleslegessé vált mitokondriumok eltávolításához szükséges. Ebben az esetben a mitokondrium külső membránjában a BNIP3L/NIX fehérje WXXL motívumon (az LC3-

mal interakcióba lépő régió) keresztül kapcsolódik a kialakuló fagofór LC3 fehérjéjével és a GABARAP-pal, így segítve elő annak felismerését lebontását (**10. ábra**) [108-110].



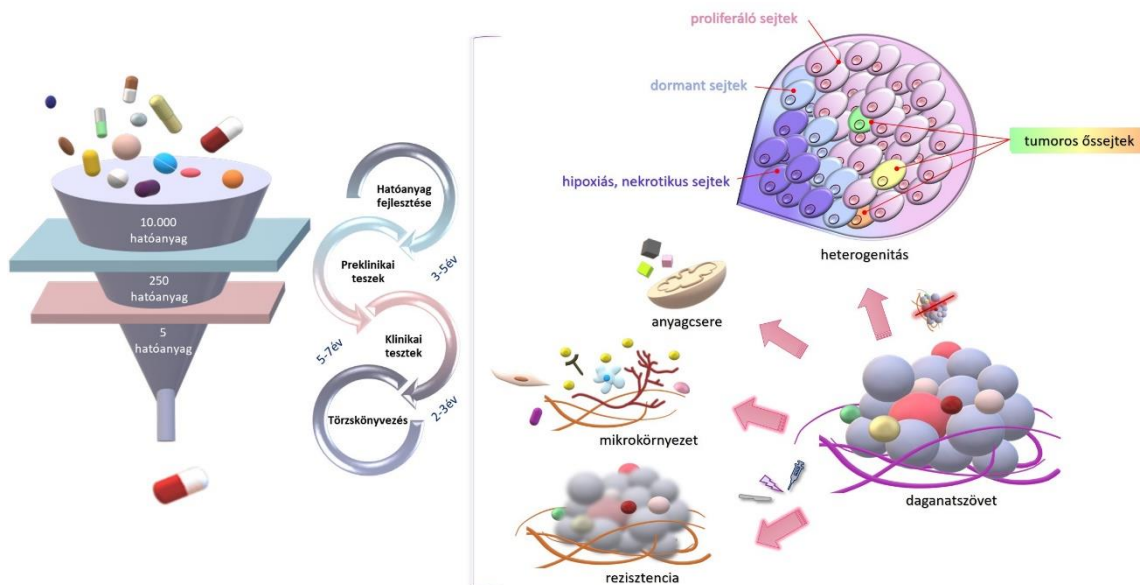
10. ábra A mitofágia molekuláris mechanizmusának sematikus ábrázolása. A mitokondriumot károsító stimulus hatására mitofágia következhet be. A PINK1 – Parkin-függő mód esetén, a károsító stimulust érzékelő PINK1 toborozza a Parkint, majd mitokondriális membránproteinek ubikvitinilációja történik. A PINK1 – Parkin-független út során a mitokondriumot receptorfehérjék ismerik fel, majd az LC3-mal kapcsolódva megkezdődhet a mitokondriumok lebontása. Az ábrán szereplő rövidítések: BNIP3 (BNIP3L-BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3-like receptor); FUNDC1 (FUN14 domain-containing 1 receptor); LC3 (microtubule-associated protein-1 light chain 3/MAP1LC3); NDp52 (CALCOCO2-Calcium binding and coiled-coil domain 2); NIX (BNIP3L-BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3-like receptor); OPTN (optineurin); P (foszforiláció); p62 (ubiquitin-binding protein/Sequestosome-1); PINK1 (PTEN-induced kinase 1); TAX1BP1 (Tax1 Binding Protein 1); TBK1 (TANK Binding Kinase 1); TUFm (Tu translation elongation factor, mitochondrial); Ub (ubikvitiniláció) (110. irodalom alapján módosítva).

Kísérleteinkben a sejthalálformák közül az apoptózist, a nekrozist, a nekroptózist, az autofágiát, valamint a mitofágiát vizsgáltuk, ezért további sejthalál formák ismertetésére nem térek ki.

1.7. Innovatív gyógyszerkombinációk és megközelítések daganatterápiás jelentősége, tesztelése

Vannak olyan, eredetileg nem daganatellenes terápiás indikációban alkalmazott gyógyszerek, amelyek képesek lehetnek daganatnövekedés gátlására is. A korábban elterjedt „*egy betegség egy hatóanyag elméletet*” felválthatja a gyógyszerhatóanyagok újrahaznosítása, ezt az újfajta gyógyszerkutatási megközelítést nevezzük gyógyszer repozicionálásnak (*drug repositioning/repurposing*). Ezzel az eljárással lerövidíthető a farmakológiai tesztelések időtartama és a kutatási költségek is csökkenthetők, hiszen korábban törzskönyvezett gyógyszerekkel az újabb klinikai vizsgálatok II./III. fázisban kezdődhetnek új betegség csoportok esetében [111,112].

Ilyen már korábban törzskönyvezett gyógyszerek a cukorbetegség kezelésére szolgáló metformin vagy gyulladáscsökkentő thalidomide. Kimutatták, hogy ezen szereknek citosztatikus hatásuk is van, amely kemoterápiás szerekkel kombinálva javíthatja a jelenlegi kezelési eredményeket. Óvatos megfontolást igényel azonban, hogy amennyiben egy potenciális daganatellenes szer *in vitro* körülmények között hatékonyak bizonyul, az *in vivo* és klinikai vizsgálatokban már nem mindig tapasztalhatók hasonló eredmények. Becslések szerint a potenciális gyógyszerjelöltek körülbelül csak 5-8%-a az, amely fázis I vizsgálatba lépés után engedélyezésre kerülhet. A fejlesztések eredményességében jelentős javulás az elmúlt évek során még nem történt (**11. ábra**) [111,113].



11. ábra A gyógyszerfejlesztések határfoka és ennek összefüggése a daganatszövet komplexitásával. A daganatszövet heterogenitása, a sejtek egyedi metabolikus különbségei, a mikrokörnyezet, a megjelenő rezisztens sejtek, amelyeket *in vitro* vizsgálatokban nehéz vagy nem lehet modellezni, okai lehetnek a preklinikai és klinikai vizsgálatok sikertelenségeinek.

1.7.1. A mitocanok és a tetraciklin típusú antibiotikumok potenciális daganatellenes hatásai

Ismert, hogy a mitokondriumok számos celluláris folyamatban kulcsszerepet töltenek be a sejtek anyagcsere-folyamataitól, a jelátviteli utakon át a sejthalál-mechanizmusokig. Ezzel összefüggésben a mitokondriumok farmakológiai célzása megjelent a daganatellenes terápiás fejlesztésekben [114].

A sejtekben az új mitokondriumok képződése, biogenezise és a károsodott szerkezetű vagy funkciójú, illetve feleslegessé váltak szelektív autofágiás lebontása között (mitofágia) [115,116] jól szabályozott egyensúly van. A mitofágiával kapcsolatosan leírták, hogy támogatni és gátolni is képes a daganatprogressziót. Ezzel összefüggésben a mitokondriumok minőségellenőrző folyamatainak gátlása ígéretes daganatellenes terápiás megközelítést jelenthet [115, 117]. *Neuzil* és munkatársai a 2010-es években alkották meg a *mitocan* akronímát az angol *mitochondria* (mitokondriumok) és a *cancer* (daganat) szavak összevonásával. A kifejezés olyan hatóanyagok csoportjára utal, amely daganatellenes hatását mitokondriális célpontokon keresztül fejtik ki [118-120]. Ilyen célzási megközelítések lehetnek például az elektrontranszportlánc, az

OXPHOS, a glikolízis, a trikarbonsavciklus (TCA-ciklus), az apoptotikus útvonalak, a ROS homeosztázis vagy akár a mitokondriális DNS célzása is [119,121-124].

A mitokondrium elsődleges funkciója az ATP-termelés az OXPHOS-on keresztül és olyan metabolitok előállítására, amelyek a sejtek bioenergetikai és bioszintetikus igényeit kielégítik. Előbbiekben túl szerepe van az apoptózisban, a Ca^{2+} homeosztázis fenntartásában, a redox szignalizációban, a szteroid szintézisben és a lipidmetabolizmusban is. A metabolikus hatásaival összefüggésben a mitokondrium kapcsolatban van más organelumokkal is (pl.: az endoplazmatikus retikulummal vagy a sejtmaggal) [125,126].

Számos tanulmány szerint a mitokondriális anyagcsere-folyamatok célzása alternatíva lehet a jelenlegi konvencionális kezelések kiegészítéseként. Ezek alkalmazása elősegítheti különösen magas kockázatú betegekben terápiás beavatkozások eredményeinek javítását. Általános megközelítésként javasolt például egyes FDA (Food and Drug Administration, az USA Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatala) által is jóváhagyott antibiotikumokat használni a mitokondriumok célzott befolyásolására.

A daganatokat, egy különleges metabolikus ökoszisztémának is tekinthetjük megjelenésüket és progressziójukat figyelembe véve, többek között már azért is, mert a tumorszövet felépítésében nem csak egyféle daganatsejt jelenik meg [127-129]. Ezzel függ össze a malignus őssejtszerű fenotípussal rendelkező sejtek (daganatőssejtek – *cancer stem cells*) megjelenése, amelyekben a mitokondriumok változásainak, képződésének és funkcióinak is fontos szabályozó szerepe lehet. Egyre több adat támasztja alá, hogy a mitokondriális turnoverk kiemelt jelentősége lehet a daganatőssejtek kialakulásában és fenntartásában [130-132]. A daganatőssejtek, illetve anyagcseréjük célzott gátlása pedig hozzájárulhat a daganatos betegek hosszabb túlélési esélyének növeléséhez.

A tetraciklin egy széles spektrumú antibiotikum, amelyet bakteriális fertőzésekben a baktériumok fehérjeszintézisének gátlójaként használnak; megakadályozva az aktivált aminoacil-tRNS bekötődését a bakteriális riboszóma 30S alegységének A-oldalához. Fontos, hogy a bakteriális riboszóma 30S alegysége homológiát mutat a 28S mitokondriális riboszómával, ez magyarázza a tetraciklin kezeléshez köthető kezelhető mértékű mellékhatásokat. A mitokondriumok szerkezeti és

funkcionális hasonlóságot mutatnak a baktériumokkal, amely magyarázza az antibiotikumok nem várt egyéb, köztük akár daganatellenes (úgynevezett *off-label/target*) hatásait [133,134]. A tetraciklin analóg antibiotikumok ígéretes mitokondriális biogenezis gátlók lehetnek daganatokban is (gátolva a tumorok energiatermelő folyamatait). A doxiciklin hatékony és stabil tetraciklin származék, ez volt az első FDA által is jóváhagyott tetraciklin az 1960-as években [127,131]. Az antibiotikumok tolerálható mellékhatásprofillal rendelkeznek (bár a mikrobiomra gyakorolt hatásai és ennek szerepe a daganatos progresszióban külön vizsgálatokat igényel), így repozicionált használatukkal a daganatössejtek is támadhatók lehetnek [131,132].

1.8. Az emlődaganatok csoportosítása és kezelési lehetőségei

Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization – WHO) 2020-as statisztikai adatainak becslése szerint az újonnan diagnosztizált daganatos megbetegedések száma elérheti az évi közel 20 millió esetet. A GLOBOCAN elemzése világviszonylatban az összes diagnosztizált új esetet figyelembe véve, beleértve a férfiakat is, az emlődaganatok (11,7%) állnak az első helyen, a nők daganatos betegségei között az emlődaganatok gyakorisága a 24,5% [135]. Magyarországon az adatok némileg eltérnek, hazánkban az emlődaganat a harmadik legnagyobb incidenciájú daganattípus. A magas prevalencia egyik oka a betegség kialakulását támogató kockázati faktorok felhalmozódása (pl.: genetikai háttér, környezeti és életmódbeli tényezők), de az újonnan azonosított esetszámok növekedéséhez hozzájárulhatnak az egyre szélesebb körben elterjedő prevenciós, szűrő-és regisztrációs programok is [136]. Köszönhetően a korszerű fejlesztéseknek, szűréseknek és kezelési lehetőségeknek a mortalitási ráta enyhé csökkenést mutat, de még így is jelentős ebben a daganattípusban.

A patomorfológiai (lobulális és duktális) besorolás mellett az elmúlt évek kutatási eredményeit figyelembe véve az emlődaganatokat genetikai és molekuláris sajátosságai alapján több szubtípusba sorolhatjuk, amelyek eltérő előfordulási gyakoriságúak, különböznek a klinikai lefolyásban és a terápiás érzékenységben, túlélési esélyekben.

A molekuláris osztályozás alapja a hormonreceptor (ösztrogén – ER és progeszteronreceptor – PR) és a humán endotheliális receptor 2 (HER2) kifejeződés. Elkülönítünk luminaris A és B (ER+ és/vagy PR+, HER2+/-), HER2+ (ER-, PR-; HER2+), illetve bazális jellegű/tripla negatív (ER-; PR-; HER2-) altípusokat. A multimoduláris terápiák fejlesztéseinek köszönhetően a betegek gyógyulási esélyei

növekedtek (70-80%). Ezzel szemben az előrehaladott, azaz metasztatikus emlődaganatok a jelenlegi új terápiás stratégiák ellenére sem gyógyítható betegségek, a terápia fő célja a túlélés meghosszabbítása és jó életminőség biztosítása.

Perou és Sorlie 2000-ben írta le az úgynevezett intrinsic kategorizálási rendszert, amely alapján az emlődaganatok 4 szubtypusát különíthetjük el. Ez alapján megkülönböztethető a luminal A és B, valamint a bazális és HER2 receptort expresszáló, illetve a tripla negatív tumorok csoportja. Ez a típusú klasszifikációs rendszer azonban módosult és a tumorterheltségen alapuló klinikai alapú eljárást felváltotta a biológiai központú megközelítés [137]. A klinikai gyakorlatban jelenleg úgynevezett helyettesítő besorolási rendszert használnak, amely mind a szövettani, mind a molekuláris jellemzőket figyelembe veszi, a betegek kezelése pedig multidiszciplináris megközelítést, managementet igényel (**1. táblázat**). [138,139].

1. táblázat Az emlődaganatok molekuláris szubtypusai és jellemzői [138,139]

Molekuláris szubtypusok				
	Luminal A	Luminal B	HER2+	Tripla negatív
gyakoriság	60-70%	10-20%	10-15%	10-15%
receptor-expresszió	ER+; PR+		HER2+	
szövettani grade, differenciáltság	alacsony grade, jól differenciált		magas grade, rosszul differenciált	
prognózis	jó		rossz	
terápia	Endokrin anti-ösztrogén, aromatáz inhibitor		trastuzumab	kemoterápia
metabolikus fenotípus – glükóz hasznosítása	reverz Warburg-fenotípus (OXPHOS)		Warburg-fenotípus	
glutamin-felhasználás	↓		↑	
lipid-metabolizmus	↑ koleszterinszintézis		↑ zsírsavszintézis	↑ koleszterin-felhasználás
antimetabolit célpontja	mitokondriális komplex I gátlása		zsírsavszintézis gátlása	glutamináz gátlása

A konvencionális lokális terápiák mellett az emlődaganatok kezelésében nagy szerepe van az endokrin terápiának (anti-ösztrogén – pl.: tamoxifen), és az anti-HER2 kezeléseknek, (anti-HER2-antitest – trastuzumab). Anti-ösztrogén kezelésekben alkalmazhatók az ösztrogén kompetitív inhibitorai (ösztrogénreceptor-gátlók pl.: tamoxifen, fulvestrant) vagy az ösztrogénszintézist gátló kezelések is (aromatázgátlók – anastrozol, letrozol, emestan), illetve olyan kezelések is, amelyek receptor jelátviteli utakon fejtik ki gátló hatásukat (pl.: everolimus – mTOR-gátlás, CDK4/6-gátlók – abemaciclib, palbociclib, ribociclib). Rezisztencia kialakulása esetén az elsővonalbeli terápia mellett lehetőség nyílik más terápiás lehetőségek felhasználására is. Potenciális célpont az mTOR-aktivitás gátlása exemestane kombinációban, illetve pl.: *PTEN*-mutációval rendelkező tumorokban. Míg tripla negatív daganatok esetében jelenleg elsősorban a hagyományos kemoterápiás protokollokat (platina, taxán és antracyclin származékok kombinációit) alkalmazzák [138-140].

A tripla negatív emlődaganatok esetében fontos bizonyos gének, illetve immunológiai sajátságok vizsgálata is a kezelés megkezdése előtt, ezek az eredmények befolyásolják az elsővonalbeli terápiás protokollt. PDL-1 státusz és a *BRCA*-mutációk vagy akár más homológ rekombinációs zavart eredményező mutációk meghatározása történhet, és amennyiben PDL-1 expresszió kimutatható, immunterápia alkalmazására nyílik lehetőség. Az immunellenőrzőpont inhibitorok közül a PDL-1-és PD-1-receptor inhibitorok a citotoxikus T-sejtek felszíni PD-1 receptorainak immunszuppresszív hatásait gátolják. Az öröklődő vagy szomatikus *BRCA*-mutációval rendelkező emlődaganatok esetében pedig lehetőség van poly-ADP-ribose polymerase (PARP) enzim gátlására is [141,142].

Az emlődaganatok esetében fontos rizikótényezők a hormonális változások és az elhízás is, amelyek alapján ennek a daganattípusnak kialakulásában a metabolikus változásoknak kitüntetett szerepe van. Az emlődaganatok altípusai különbséget mutatnak a metabolikus fenotípusukban is, amely összefüggésben áll az adott szubtípusra jellemző daganatnövekedéssel, inváziós képességgel, a terápia sikerességével és a fellépő terápia rezisztenciával is. A hormonreceptor pozitív szubtípusba tartozó emlődaganatok kevésbé függenek glükóz-, illetve glutaminfelhasználástól, képesek a stromasejtek termelte laktát hasznosítására. A HER2+ szubtípusra jellemző a megnövekedett zsírsavszintézis, valamint az emelkedett glükóz- és glutaminfelvétel. A tripla negatív

szubtípusú daganatok többségére jellemző számos metabolikus útvonal emelkedett aktivitója, így a magas aerob glikolízis, megváltozott aminosav (szerin) metabolizmus és általános glutaminfüggőség [144-146].

1.9. Két- és háromdimenziós modellrendszerek

Sok évtizeden át a kétdimenziós (2D) adherens/monolayer tenyészetek uralták a betegségmodellezést, citotoxicitási vizsgálatokat, és a gyógyszerfejlesztések első lépései is ebben a keretrendszerben valósultak meg. Mint minden modellnek előnyei mellett (pl.: könnyű kezelhetőség, biztosított reprodukálhatóság, költséghatékonyság) a 2D sejtkultúráknak is vannak korlátai. Például nem képesek az *in vivo* környezetet reprodukálni, számos fizikai tényező, a sejt-sejt/mátrix közötti kapcsolatok, citoskeletális átrendeződés miatt mesterséges polaritás jön létre, a nem daganatos szöveti sejttípusok hiányoznak, korlátlan a sejtek hozzáférése a tápanyagokhoz, az oxigénhez stb. [147-151]. Ezek a hátrányok napjainkra egyre nagyobb hangsúlyt kaptak, és még jobban feltűnnek, ha a gyógyszerfejlesztések hatásvizsgálatainak eredményességét is figyelembe vesszük.

Nem véletlen, hogy az elmúlt években megnőtt az igény régi/új típusú sejtenyésztéstechnikák megjelenésére. A 3D technológiai platformokra való átállás szükséges ahhoz, hogy a biológiai folyamatokat és azok háttérében rejlő mechanizmusokat jobban megismerhessük különös tekintettel a rezisztenciamechanizmusokra, a tumorevolúcióra. A sejtek természetes, natív környezetének megfelelő, minél pontosabb, de kontrol alatt tartható lemásolása jelenti az első alapvető lépést ahhoz, hogy a kísérleti rendszerekben használt modellek fiziológias szempontból minél pontosabbak legyenek [152]. Az elmúlt évtizedekben fejlődésnek indult háromdimenziós (3D) sejtenyésztés esetében, a 3D szferoid-, organoid tenyészetekben az eredmények azonban alig reprodukálhatók, és nem jelenítik meg a gyógyszerpenetrancia különbségeket sem. Előbbi modellekben a 3D, de nem szöveti struktúra még mindig távol áll az *in vivo* környezet modellezésétől.

Természetesen vannak *in vivo* modellek, ahol egerekben tumorigenezissel, vagy immunuszupprimált (pl.: SCID – severe combined immunodeficiency, súlyos kombinált immunhiány) egerekben humán tumorok, xenograftok is vizsgálhatók. Az állatkísérleteket azonban egyre nehezebb engedélyeztetni, törekedni kell a 3R-elvekre

(helyettesítés, csökkentés, tökéletesítés), így a vizsgálatok egyre drágábbak. Mindezek mellett az állatmodellekben tapasztalt megfigyelések értelmezése és interpretálása a humán szervezetre vonatkozóan is kihívásokat jelent [153,154].

A 3D modellrendszerek alkalmasabbak arra, hogy reprodukálják a mechanikai és biokémiai jellegzetességeket, pl.: a sejt-sejt, sejt-extracelluláris mátrix kapcsolatokat, a szöveti merevség és egyes faktorok gradiens szerinti eloszlása a daganatszövetben [155-157]. A legkorszerűbb megoldások, köztük a 3D bionyomatott modellek és tumormodellek folyamatos technológiai fejlesztései egyre újabb lehetőséget teremtenek a hatékonyabb gyógyszeresztelésre és akár a személyre szabott terápiák tesztelésére is [153].

1.9.1. 3D sejtenyésztési technikák, a 3D bionyomatás

Az elmúlt évek kutatásainak és fejlesztéseinek köszönhetően számos 3D daganatmodellt és tenyésztési protokollt fejlesztettek tovább, többek között a szferoid/organoid tenyészeteket, a scaffold/vázelemek használatát vagy az *organ-on-chip* mintájára a *cancer-on-chip* modellrendszert.

Általános még kokultúra tenyészetek esetében is, hogy ezekben sokféle sejttípusból összeszerveződő komplex struktúrát modellezni továbbra sem lehet, valamint az, hogy bizonyos esetekben az egyes kísérleti modellek reprodukálhatósága rendkívül alacsony [158].

Az additív gyártástechnológia [159] a 3D nyomtatás és így a 3D bionyomatás is, lehetővé teszi, hogy egyedi számítógéppel támogatott tervezéssel (CAD), gyorsan, egymásra épülő rétegenként készüljön el a tervezett struktúra. A 3D nyomtatás orvosi felhasználása előbbiekkal párhuzamosan rengeteget fejlődött az elmúlt évtizedekben – 3D nyomtatóval készülnek már különböző protézisek, ortézisek, implantátumok, anatómia modellek [160,161]. *Boland* és munkatársai írták le elsőként 2003-ban az első bionyomatási technikát, tintasugaras nyomtatási eljárással hozták létre (még csak) 2D szöveti szerkezetet [162]. Azóta számos módszert dolgoztak ki, amelyeket a sejt nyomtatásának módja szerint csoportosíthatunk: 1) csepp alapú bionyomatási módszer (*drop-based* – pl.: tintasugaras vagy lézeres bionyomatás); 2) filament alapú (pl.: *extrusion-based* – szálhúzásos bionyomatás) és 3) síkalapú (pl.: DLP – digitális fényvezérelt vagy szterolitográfias bionyomatás – SLA) nyomtatás.

Jelenleg a legelterjedtebb módozat a szálhúzáson alapuló technika, a többi módszerrel szembeni előnye a felbontóképesség (szálvastagság) megválaszthatósága – amely természetesen anyagfüggő –, a gyors kivitelezés és a viszonylagos költséghatékonyság [163].

Hagyományosan az orvostudományi célokra alkalmazott 3D nyomtatás során felhasznált anyagok inert és sejtmentesek voltak, akár a műanyag [164]. A fejlesztések eredményeként, ma már más típusú anyagokat is alkalmaznak a 3D bionyomtatás során, pl.: biokompatibilis/biodegradábilis anyagokat implantátumok készítéséhez vagy lágyszövetek rekonstrukciójához (pl.: csontpótlások, helyreállító plasztikai sebészet) [165,166].

Az egyik legújabb terület, amely a 3D nyomtatásból fejlődött ki, az az élősejtes 3D bionyomtatás, amelynek során mátrixanyagba kevert sejtekkel úgynevezett biotintával nyomtatunk, majd élő szövetszerű struktúrát alakíthatunk ki [167]. A biotintával szembeni követelményeket *Groll* és munkatársai a következőképpen foglalták össze: a biotinta olyan sejt készítmény, amely biológiailag aktív összetevőket és bioanyagokat tartalmaz és automatizált gyártási technológiával dolgozhatunk vele [168]. A 3D élősejtes bionyomtatási technika egy korszerű és innovatív megoldás lehet komplex, többféle sejt típusból álló struktúrák reprodukálható kialakításához. Egy ideális scaffold/vázal vagy biotintával szemben támasztott elsődleges kritérium, hogy megfelelő környezetet biztosítson a sejtadhézió, a proliferáció, a differenciáció és a migráció, illetve a sejt-mátrix közötti interakciók kialakulására.

A daganatsejtek egy igen összetett, sokféle sejt típusból és extracelluláris mátrixelemből felépülő heterogén környezetben alakulnak ki és fejlődnek [169]. A különböző biotinták olyan bioanyagok, amelyek hidrogélek keverékeiből és sejtekből állnak. A biotinta készülhet természetben is előforduló anyagokból, de akár szintetikus változatai is lehetnek [170]. A biotinta alapanyagnak megfelelő mechanikai és biodegradábilis tulajdonságokkal kell rendelkeznie. Fontos például a nyomtathatóság, illetve a későbbiekben a formamegtartás, így a biotintának meg kell felelni bizonyos mechanikai feltételeknek, pl.: könnyű alkalmazás és nagyfokú alakhűség/formamegtartás. Nem elhanyagolható, hogy a nyomtatáshoz felhasznált anyagok nem okozhatnak sejtpusztulást, majd a nyomtatást követően is biokompatibilisnek vagy biodegradábilisnek kell lenniük [171,172]. A leginkább elterjedt

biotinta-alapanyagok a különböző hidrogélek, fő összetevőjük a víz, utánozva a természetes sejtes környezetet [173]. A természetes hidrogélek eltérnek a szintetikus változatoktól – az előbbiek korlátozott mechanikai erővel rendelkeznek, de ezzel szemben gyors lebomlásra is képesek, míg az utóbbiak kevésbé biokompatibilisek, azonban jó nyomtathatósággal és megfelelő mechanikai tulajdonsággal bírnak. Ebből következik, hogy bizonyos csoportok természetes és szintetikus gélkeveréket, hibrid biotintát, használnak kihasználva azok előnyös tulajdonságait.

Természetesen az, hogy milyen típusú biotintát választunk számos tényezőtől is függ: 1) a bionyomtási technológia; 2) a modellezendő szövet jellegzetességei (pl.: merevség, mikrokörnyezeti elemek); 3) a formatartás szükségessége, illetve 4) az adott biotintának megfelelő keresztkötési eljárás és a felhasználás lehetősége; 5) előbbiek adott sejtek növekedését, differenciációját és túlélését befolyásoló hatásai. A keresztkötés stabilizálja a 3D bionyomtatott struktúrát megőrizve a biotinta sejtes elemeinek életképességét is. Ez fizikai és kémiai módosításokat okoz biotintában, biztosítja, hogy a nyomtatott rétegek egyben maradjanak. A keresztkötést kialakíthatjuk enzimátikus (pl.: fibrinalapú biotinta – fibrinogén trombin), ionos (alginát – CaCl_2), kémiai (alginát – tormaperoxidáz), fizikai (pl.: zselatin metakrilát – UV) vagy akár termikus (zselatin – magas hőmérséklet) úton is, és erre sor kerülhet közvetlenül a nyomtatás előtt, közben, sőt a nyomtatási folyamat végeztével is [174].

A 3D bionyomtatás fejlesztésével egy igen hatékony eszköze lesz a különböző betegségmodellek vagy akár személyre szabott terápiák tesztelésének. Ehhez azonban a 3D bionyomtatás protokollok standardizálása nélkülözhetetlen, amelyben több szempontú fejlesztések szükségesek: 1) nyomtatási útmutató protokollok kidolgozása; 2) a biotintaként alkalmazott anyagok egységesítése; 3) új bioanyagok létrehozása, amelyek kifinomultabb fizikai és biológiai sajátosságokkal rendelkeznek; 4) a 3D bionyomtatott struktúrák feldolgozásának fejlesztése, valamint az ezekhez szükséges tesztrendszerek kidolgozása [158,175].

2. Célkitűzés

Munkámban rapamycin, doxiciklin és doxorubicin kezelések hatásait vizsgáltam különböző daganatbiológiai modellekben. A kísérleteimben a proliferációgátlással párhuzamosan megjelenő sejthalál-folyamatok, illetve metabolikus változások mellett, különböző *in vitro* modellrendszerek (hagyományos 2D, 3D szferoid, valamint 3D bionyomtatott szövetszerű struktúrák és xenograft) metabolikus és más kezelésekkel szembeni érzékenységet, metabolikus változásokat reprezentáló szerepét is tanulmányoztam.

A vizsgálatok céljai a következők voltak:

1. Daganatsejtek, elsősorban humán emlőcarcinoma sejtek rapamycin, doxiciklin és kombinált kezelésekkel szembeni érzékenységének vizsgálata *in vitro* és *in vivo*.
2. Az előbbiekkal összefüggő tumornövekedés-gátlás metabolikus hátterének (mTOR-aktivitás és metabolikus változások) és lehetséges sejthalál-mechanizmusoknak a vizsgálata.
3. ZR75.1 humán emlőcarcinoma sejtek hagyományos 2D, 3D sejtenyésztési (ultra-low attachment plate és függőcsepp szferoidok) és *in vivo* modellrendszereinek összehasonlító vizsgálata, kiegészítve 3D bionyomtatott *in vitro* modellel:
 - metabolikus, morfológiai jellegzetességek és egyes kezelések (rapamycin, doxiciklin és doxorubicin mono- és kombinációs kezelések) hatásainak összehasonlítása.

3. Módszerek

3.1 *Sejttenyésztés, in vitro kezelések*

In vitro kísérleteinkben különböző szöveti eredetű humán tumorsejtvonalakat használtunk (colon carcinoma sejtvonalak: HT29 – ATCC-HTB-38 és RKO – ATCC-CRL- 2577; fibrosarcoma: HT1080 – ATCC-CCL-121; glioma/glioblastoma: U87 – ATCC HTB-14, U251 – ECACC-09063001 és U373-U – ECACC-08061901; tüdő adenocarcinoma: H1650 – ATCC-CRL-5883 és H1666 – ATCC-CRL-5885; melanoma: A2058 – ATCC-CRL-11147; prosztata carcinoma: Du145 – ATCC-HTB-81), köztük tíz humán emlőcarcinoma sejtvonalat is használtam. Ezek az emlőcarcinoma sejtvonalak reprezentálják a legfontosabb emlőtumor szubtypusokat: (a) luminal A (LumA): MCF7 – ATCC-HTB-22 és T47D – ATCC-HTB-133; (b) luminal B (LumB): BT474 – ATCC-HTB-20 és ZR75.1 – ATCC-CRL-1500; (c) HER2+: SKBR3 – ATCC-HTB-30 és MDA-MB-453 – ATCC-HTB-131; (d) tripla negatív emlőcarcinoma szubtypus: BT549 – ATCC-HTB-122, HS578T – ATCC-HTB-126, MDA-MB-231 – ATCC-HTB-26 és MDA-MB-468 – ATCC-HTB-132.

A sejteket igényeiknek megfelelően RPMI 1640, DMEM alacsony (1,5 g/l) vagy magas glükóztartalmú (4,5 g/l) alap tápfolyadékban tenyésztettük (Biosera – Nuaille, Franciaország), amelyekhez 10% főtális borjúsavót (FBS; Biosera), 2 vagy 4 mM L-glutamint (Biosera) és antibiotikumot (80 mg/2 ml gentamicin – Sandoz, Bazel, Svájc vagy 100 UI/ml penicillin-streptomycin – Biosera) adtunk. Az optimális növekedéshez 37 °C-os termosztátban 5% CO₂-szint és a megfelelő páratartalom mellett tartottuk fenn a tenyészeteket. 2D tenyésztési körülmények mellett proliferációs ütemüket figyelembe véve 2-3 naponta tápfolyadékcsere-t végeztünk, illetve passzáltuk a sejteket foszfátpufferes (PBS-es) mosást követő tripszin-EDTA (Biosera) emésztés segítségével. Előzetes kísérleteink alapján adott sejtvonalakhoz és tesztekhez a korábban meghatározott optimális kiindulási sejtszámot használtuk. A sejtek felszaporításához, fehérjeexpressziós-vizsgálatokhoz 25/75 cm² (T25/75) alapterületű felületkezelt tenyésztőflaskákat (Sarstedt, Nümbrecht, Németország), illetve a különböző proliferációs (Alamar blue – AB- és szulforodamin B – SRB-tesztek) és sejtpusztulás-vizsgálatokhoz 6- és 96-lyukú plate-eket (Sarstedt) használtunk. Indulási sejtszámok 3-5 x 10⁵ sejt/5 ml/T25, 5-8 x 10⁵ sejt/3 ml/6-os, illetve 2-5 x 10⁴ sejt/100 µl/96-os plate koncentrációkat használtunk.

Szferoid sejtenyészet létrehozásához egy speciális felületkezelésű tenyésztőlemezt használtunk. Az ultra-low attachment (ULA) típusú plate (Corning, Costar, Corning, NY, USA) kovalensen kötött hidrogél felületi rétege meggátolja a sejtek aljzathoz való letapadását, így szferoidokat hozhatunk létre. Egyes kísérleteinkben alkalmaztuk a függőcsepp technikát is a sejtek 3D környezetben való tenyésztéséhez. Ehhez Petri-csésze (Sarstedt, d =10 cm) fedőrészének belső oldalára cseppentettük a sejtuszpenziót, majd megfordítva azt visszahelyeztük az alsó részére. A párolgásból eredő térfogatveszteség miatt az utóbbi részébe PBS-oldatot mértünk. Szferoid kísérleteinkben 96-os plate-ekben 1×10^4 sejt/100 μ l (ULA-plate), illetve 1×10^4 sejt/20 μ l/csepp (függőcsepp) kiindulási sejt koncentrációval dolgoztunk ügyelve, hogy egysejtuszpenzióval kezdjük a kísérleteket (25G-s tűn átszívtuk a sejtuszpenziót).

3D struktúrák (scaffoldok) létrehozásához extrúziós, „szálhúzáson” alapuló 3D bionyomatót használtunk (Bioscaffolder 3.2, GeSiM, Radeberg, Németország). Kétféle összetételű biotintát alkalmaztunk: 1) a struktúra alapját és annak szerkezetét meghatározó úgynevezett „vázgél” különböző koncentrációjú metilcellulóz (Merck-Sigma-Aldrich, Darmstadt, Németország) és alginát (Merck-Sigma-Aldrich) keverékéből, míg az élő sejtekkel összekevert hidrogél – „sejtes gél” – alacsony koncentrációjú alginát- és zselatintartalmú elegyből és sejtekből (1×10^6 – 1×10^7 sejt/ml ZR75.1 esetében) állt. 3D tervező szoftvert használtunk (GeSiM Robotics, GeSiM) a nyomtatási protokoll kialakításához. Vizsgálatainkban hatrétegű köralapú struktúrákat nyomtattunk rétegenként váltva a vázgél és sejtes gél biotintát. A nyomtatás további paraméterei (általános paraméterek: $r_{\text{scaffold}}=2,5$ mm, sejtes gél/vázgél specifikus paraméterek: szálmagasság 50/110 μ m, nyomtatási sebesség 6-10 mm/s, nyomás 20-425 kPa – sejt és biotinta összetétel függvényében). A scaffoldok keresztkötéséhez 200 mM-os CaCl_2 -oldatot használtunk, majd a scaffoldokat PBS-sel átöblítettük és 96-os tenyésztő plate-re a megfelelő tápfolyadékba helyeztük.

3.2 *In vitro* kezelések

A kísérletekben, a sejtek kirakását követő nap hagyományos 2D tenyésztéskor médiumcsere után, míg az ULA-plate-ek esetében plusz 100 μ l tenyésztőmédiummal frissítettük a tápfolyadékot a kezelés előtt. A 3D bionyomatott scaffoldok esetén a 72 órás kezelés megkezdése előtt 1-2 hétig előtenyésztést végeztünk, amely közben 2-3 naponta médiumot cseréltünk.

In vitro kísérleteinkben 0-96 órás rapamycin (R – mTORC1-gátló; 50 ng/ml; Merck-Sigma-Aldrich), doxiciklin-hiklát (D – tetraciklin analóg, mitokondriális biogenezt gátló antibiotikummal; Merck-Sigma-Aldrich), doxorubicin (Do – kemoterápiás szer; 50 ng/ml; Teva, Debrecen, Magyarország), klorokin (Chl – autofágia inhibitor; 50 μ M; Merck-Sigma-Aldich), necrostatin-1 (nec-1 – nekroptózis inhibitor; 50 μ M; Merck-Sigma-Aldrich) és Ac-DEVD-CHO (kaspáz-3 gátló; 1 μ M; Molecular Probes, Leiden, Hollandia) kezeléseket alkalmaztunk (az alkalmazott koncentrációkat mások és saját kísérleteink alapján választottuk).

A vizsgált kombinált kezelések hatásainak kvantitatív elemzéséhez a következő kombinációs index (CI) számítást használtunk:

$$CI = \frac{Ea+Eb}{Eab},$$

Ea és Eb az egyes monoterápiák hatása, míg Eab a két kezelőszer kombinált alkalmazásakor megfigyelt hatást jelöli. Ezek alapján háromféle kategóriát különíthetünk el: (a) nincs addicionális hatás: $CI > 1$; (b) additív hatás: $CI = 1$; és (c) szinergista hatás: $CI < 1$ [176,177].

Hosszútávú *in vitro* kezelésekből az egyes kezelések okozta hatások visszafordíthatóságát is tanulmányoztuk, ehhez a 72 órás előkezelést követően a sejteket két csoportba osztottuk. Az 1. csoportban a 72 órás kezelést követően megvontuk a kezelőszereket, majd anélkül tartottuk fent a sejteket. A 2. csoport esetén a 72 órás kezelést követően még 16 napig folytattuk folyamatosan kezelést. A két csoportban a sejtnövekedés függvényében a médiumcserék, illetve passzálások mellett a bekövetkező sejtszámváltozásokat regisztráltuk nyomon követve az összegezhető sejtszámot. A sejtszámolást tripánkék kizárásos festést követően Bürker-kamra segítségével végeztük. Növekedési görbék készítéséhez kumulatív sejtszámot határoztunk meg, *Adami* és munkatársai által leírt számítási módszer alapján [178]. Vagyis minden kezelési csoportnál a hosszútávú fenntartás során az egyes passzálások összesített sejtszámának meghatározásához a sejtek proliferációs rátáját megszoroztuk az előző passzálás során számított összesített sejtszámmal.

3.3 *In vitro* proliferációs tesztek – Alamar blue és szulforodamin B tesztek

A kezelőszerek sejtek proliferációs, metabolikus aktivitását befolyásoló hatásait 72 vagy 96 órás kezelési idő befejeztével Alamar blue (AB – Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) reagens segítségével határoztuk meg. Az AB egy redoxi indikátor,

a módszer alapja, hogy az élő sejtekkel arányosan metabolikus aktivitásuk következményeként a resazurin (kék) resorufinná (rózsaszín) redukálódik, a színváltozás kvantitatívan mérhető. A kezelés végén, az utolsó 4 órában 10 µl/100 µl (2D monolayer tenyészetek), illetve 20 µl/200 µl (3D szferoidok esetén) AB mellett tenyésztjük tovább a sejteket, majd a fluoreszcencia változását fluoriméterrel (Fluoroskan Ascent FL; LabSystems International; Ascent Software – Vantaa, Finnország) 570-590 nm-en határozzuk meg. A sejtek mennyiségi változásának megfelelően a kezeletlen kontrollsejtek %-ában adtuk meg a meghatározott fluoreszcencia értékeket. Minden kísérletben legalább 6 párhuzamossal dolgoztunk és több független kísérletet is végeztünk.

Az AB-vizsgálatokat követően a minták teljes fehérjetartalmának meghatározásához szulfurodamin B (SRB; Merck-Sigma-Aldrich) festést is alkalmaztunk. A kísérlet végén a sejteket a plate-en fixáltuk 50 µl/well 10%-os triklórecetsavval (Merck-Sigma-Aldrich), ezután 4 °C-on inkubáltuk (60 min), csapvízzel átmostuk és 0,4 m/v%-os SRB-t adtunk a wellékhez (50 µl/well). 15 perces inkubáció után a meg nem kötött SRB-festéket 1%-os ecetsavval kimostuk. Szárítást követően a sejtekhez kötött SRB-festéket 10 mM-os Tris base-oldatban oldottuk (Merck-Sigma-Aldrich). Az abszorbanciát Multiskan MS mikroplate reader (LabSystems International; Transmit Software – Vantaa, Finnország) segítségével mértük 570 nm-en. Az ULA-plate-ben fenntartott szferoid-tenyészeteknél nem tudtunk SRB-tesztet végezni, ezt sejtszámolással helyettesítettük. A 3D bonyomtatott scaffoldok fehérjetartalmának meghatározásához az SRB-protokollt módosítottuk (mSRB). A fixálás és az SRB-festés utáni mosásokat (csapvizet, illetve ecetsavas mosásokat) követő szárítási időt, valamint az SRB-festék visszaoldásának (Tris base-oldatban) idejét is megnöveltük. Előzetes eredményeink alapján a telítés megakadályozása érdekében megfelelően hígítottuk a festékolatot.

3.4 Fehérje-expresszió vizsgálata hagyományos Western blot és WesTM Simple módszerrel

A fehérjelizátumok mindkét módszer esetén a következők szerint történtek. A sejteket PBS-sel mostuk, majd a lízis puffer hozzáadását követően (150 mM NaCl + 50 mM Tris-HCl, pH = 7,5 + 10 mM NaF + 10% tömény glicerol + 1% NP40 + 1% PMFS + 2% Na₃VO₄ + 1% proteáz inhibitor koktél; Merck-Sigma-Aldrich) a sejteket

felkapartuk. Az összegyűjtött lizátumot vortexeltük, majd 20 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően a centrifugálással (15.000 g; 20 perc; 4 °C) elválasztott felülúszókhöz Bradford-reagenst adtunk (1:4 arányban), majd spektofotométerrel meghatároztuk a minták fehérjekoncentrációját (Bio-Rad, Leiden, Hollandia).

Az alap fehérje-expressziós szintek, illetve a kezelések hatására bekövetkező fehérjeszintű változások kimutatására hagyományos Western blot technikát és/vagy kapilláris-alapú WesTM Simple (Biotechne-ProteinSimple; San Jose, MN, USA) módszert használtunk.

Hagyományos Western blot módszerhez egyenlő mennyiségű (20-40 µg) fehérjelizátumot forraltunk (5 perc) 2-merkaptotanol-Laemli puffer (Bio-Rad) 1:20 arányú elegyében, majd SDS PAGE gélben (8-12,5%-os) elektroforézist végeztünk, és PVDF-membránra blottoltuk a minták fehérjeit (nedves blottolási rendszer, Bio-Rad). Ezután a membránokat elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk (**2. táblázat**). Loading kontrollként anti-β-aktint (1:2000; A2228; Merck-Sigma-Aldrich) használtunk. Előhíváskor Vectastain Elite ABC HRP Kit-et (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) és kemilumineszcens előhívást (Thermo Fisher Scientific, ECL Western Blotting Substrate) alkalmaztunk, C-digit (LI-COR Biotechnology; Lincoln, NE, USA) fotódokumentációs rendszert használva. A denzitometráláshoz az Image Studio Digits (LI-COR Biotechnology) programot használtuk.

WesTM Simple módszer segítségével vizsgáltunk egyes mTOR/AKT és metabolikus útvonalban érintett fehérjéket, amelyekhez anti-nyúl (Anti-Rabbit Detection Kit ProteinSimple DM-001) vagy anti-egér detektáló rendszert (Anti-Mouse Detection Kit ProteinSimple DM-002) használtunk. A minták futtatásához 12-230 kDa-os szeparációs modult (Separation Module ProteinSimple SM-W004) és a normalizációhoz anti-β-aktin ellenanyagot (1:50, A2228, Merck-Sigma-Aldrich) használtunk. A futtatásokban az alkalmazott elsődleges ellenanyagok függvényében 1 vagy 5 µg fehérjét vizsgáltunk fluoreszcens Master Mix-ben oldva 5 perces (95 °C-on) denaturálást követően. A vizsgálandó fehérjemintákat, a blokkoláshoz használt oldatot, az elsődleges (**2. táblázat**) és az azoknak megfelelő másodlagos ellenanyagokat és a kemilumineszcens reagenst egy speciális kialakítású WesTM Simple plate welljeibe pipettáztuk. Majd a munkacsoportunk által korábban leírt beállítások alapján [79] a következő lépéseket követve végeztük el az analízist: (1) mintaeltávolítás (395 V; 30 perc), (2) blokkolás (5

perc), (3) inkubálás a vizsgálni kívánt elsődleges ellenanyagokkal (30 perc), (4) az elsődleges ellenanyagoknak megfelelő másodlagos ellenanyagokkal való inkubáció (30 perc), (5) kemilumineszcens detektálás (luminol peroxidáz; 15 perc). Az adott ellenanyagnak megfelelően az elhívást 1-512 másodperces időintervallumban történt, majd az eredmények elemzéséhez a Compass for Simple Western szoftvert (Biotechnique-ProteinSimple) használtuk. Amennyiben szükséges volt, manuális korrekciót is alkalmaztunk az elektroferogramokon.

3.5 Immunhisztokémiai festések

Különböző molekuláris szubtypussal (luminal A – LumA, luminal B – LumB, HER2+ és tripla negatív – TN) diagnosztizált emlődaganatos betegek szövettani mintáinak vizsgálatát is elvégeztük (n = 10/szubtípus). A betegeket diagnosztizálására a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében került sor 2009 és 2017 között. A diagnózis idején a betegek átlagéletkora 59-68 év volt. A minimum 5 éves betegkövetés eredményei alapján a betegek 52,5%-a jelenleg is él, két betegnél recidíva, illetve másik két esetben metasztázis alakult ki a jelenlegi terápiás protokollok alkalmazása mellett. Az archivált szövetblokkok felhasználása a Semmelweis Egyetem Etikai Tanácsának (SE KREB 216/2020.) és az Egészségügyi Tudományos és Kutatási Tanácsának (7/2006-os engedélyszám) jóváhagyásával valósult meg.

Formalin-fixált és paraffinba ágyazott xenograftokból származó tumorszövetmintákon immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatokat is végeztünk. Deparaffinálást és endogén peroxidáz blokkolást követően, antigénfeltárást végeztünk (citrát puffer pH = 6), majd a lemezeket szobahőmérsékleten inkubáltuk az elsődleges ellenanyagokkal (**2. táblázat**). A következő lépésekben Novolink Polymer Detection System (Leica Biosystems; Deer Park, IL, USA) Kit-et és kromogénként a 3,3'-diaminobenzidint (DAB – Dako DAB Aligent; Santa Clara, CA, USA) használtunk. Hematoxilint használtunk a sejtmagok háttérfestéséhez. Az IHC-festések értékelését szkennelt metszeteken (Case Viewer program; 3D Histech, Budapest, Magyarország) két független vizsgáló végezte.

A Humán Protein Atlas (Protein Atlas version 21.0, <https://www.proteinatlas.org> [179]) adatbázisban fellelhető emlődaganatos betegminták szövetmintáinak elemzését is elvégeztük annak érdekében, hogy az IHC analíziseink során kapott szöveti heterogenitás eredményeket más betegmintákkal is összevessük.

Az ökológiai kutatásokból ismert Shannon-féle diverzitási index (SDI) egyre több daganatkutatással kapcsolatos közleményben jelenik meg a tumorszöveti minták intratumorális heterogenitásának értékelésének módszereként. Az SDI használata hasonlóképpen történik, ahogy azt a biológiában a sokféleség (biodiverzitás) számszerűsítésénél alkalmazzák, vagyis egy adathalmazból véletlenszerűen kiválasztott egyed rendszertani besorolásának megjóslásakor [180]. Daganatbiológiai vonatkozásban a tumorsejtpopulációk számának/eloszlásának becslése a következő képlet alapján történik [181]:

$$SDI = - \sum p_i \ln(p_i),$$

ahol a p_i az egyes immunfestések intenzitását jelzi a tumorszövetben.

Minden esetben a p_i -t két független megfigyelő határozta meg a *histo score* (H-score) értékelési módszer alapján [182]. A H-score értékeket a festődés intenzitásának (0/+/++/+++), valamint az adott intenzitással festődő (pozitív) daganatsejtek százalékos arányának szorzataként számítottuk.

A tumorsejtek jelenlétét a 3D bionyomatott ZR75.1 TMS-ekből indított xenograft modellben humán citokeratin ellenanyaggal (1:150; CK AE1/AE3 #M3515A; Dako, Aligent, Santa Clara, CA, USA) igazoltuk. Az antigénfeltárást követően (pH = 9) Leica Bond Max DAB kromogén (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA) segítségével detektáltuk az immunreakciót.

Egyes lokalizációs vizsgálatainkhoz fluoreszcens immunfestéseket is végeztünk, majd konfokális (Simmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet – Zeiss LSM780, Jéna, Németország – Zen Software, Jéna, Németország), illetve fluoreszcens (Nikon Eclipse E600, Nikon Corporation, Tokió, Japán – Lucia Cytogenetics Software, Laboratory Imaging, Prága, Csehország) mikroszkópos felvételeket készítettünk.

**2. táblázat A fehérje-expressziós és immunhisztokémiai vizsgálatokban használt
elsődleges ellenanyagok**

Elsődleges ellenanyag	Rövidítés	Gyártó	Katalógus szám	Hígítás			Target/funkció
				WB	Wes	IHC	
Acetyl-CoA carboxylase	ACC	Cell Signaling	#3676	-	-	1:100	lipidmetabolizmus, acetil-koenzim A karboxilálás
Acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	ACSS2	Cell Signaling	#3658	-	-	1:200	acetáthasznosítás
Alanine, serine, cysteine-preferring transporter 2	ASCT2	Bethyl	#A304-353A	-	-	1:250	glutamintranszporter
β -aktin	-	Merck-Sigma-Aldrich	#A2228	-	1:50	-	belső kontroll
β -F1-ATPase	ATPb	Abcam	#14730	-	-	1:100	mitokondriális oxidatív foszforiláció
Carnitine palmitoyltransferase 1A	CPT1A	Abcam	#128568	-	1:50	1:500	lipidmetabolizmus, zsírsav β -oxidáció
Cytochrome c oxidase subunit 4	COX4	Cell Signaling	#4850	-	1:50	-	terminális oxidáció
Fatty acid synthase	FASN	Cell Signaling	#3180	-	1:50	1:100	lipidmetabolizmus, zsírsavszintézis
Glucose transporter 1	GLUT1	Abcam	#652	-	-	1:400	glükóztranszporter
Glutaminase	GLS	Abcam	#156876	-	-	1:200	glutaminolízis
Hasított kaszpáz-3	-	Cell Signaling	#99664	-	-	1:1000	végrehajtó kaszpáz, fehérjehasítás az apoptózisban
Hexokinase 2	HK2	Cell Signaling	#2867	-	-	1:200	glikolízis
Microtubule-associated protein-1 light chain 3 B	LC3-B	Cell Signaling	#2775	1:500	-	1:100	autofágia indikátora
Lactate dehydrogenase A	LDHA	Cell Signaling	#3582	-	-	1:400	glikolízis
Lactate dehydrogenase B	LDHB	Abcam	#85319	-	1:50	-	glikolízis
p62	-	Abcam	#91526	1:1000	-	-	autofágia, ubikvitiniláció
phospho-The37/46-4EBP1	p-4EBP1	Cell Signaling	#2855	-	1:50	-	mTOR-komplex aktivitás
Phosphofruktokinase	PFKP	Cell Signaling	#8164	-	-	1:100	glikolízis
phospho- Ser79-acetyl-CoA carboxylase	p-ACC	Cell Signaling	#11818	-	-	1:100	lipidmetabolizmus, acetil-koenzim A karboxilálás
phospho-Ser235/236-ribosomal S6	p-S6	Cell Signalling	#4858	-	1:50	1:100	mTOR-komplex aktivitás
phospho-Ser473-Akt	p-Ser473-Akt	Cell Signaling	#4060	-	1:50	-	mTOR-komplex aktivitás
phospho-Ser2448-mTOR	p-mTOR	Cell Signaling	#2976	-	1:50	1:100	mTOR-komplex aktivitás
Pyruvate kinase isoenzyme M2	PKM2	Cell Signaling	#4053	-	1:50	-	glikolízis
Rictor	-	Bethyl	#A300-458A	-	-	1:1000	mTOR-komplex aktivitás
Receptor-Interacting Kinase 1	RIP1	Cell Signaling	#3493	1:1000	-	-	nekroptózis indikátora
translocase of the outer mitochondrial membrane	TOM20	Cell Signaling	#42406	-	-	1:500	mitokondriális preproteinek transzlokációja (külső membrán)

3.6 Nekrózis és apoptózis meghatározása, valamint sejtciklusanalízis áramlási citométerrel

A nekrózis, illetve apoptózis %-os arányának meghatározásához, elkülönítéséhez áramlási citométert használtunk. A nekrotizáló sejtek detektálásához propidium-jodidot (PI; 15 perces inkubáció, szobahőmérsékleten, sötétben, 1 mg/ml; Merck-Sigma-Aldrich) adtunk az előkészített, fixálatlan sejtmintáinkhoz, így a PI a károsodott membránnal rendelkező nekrotikus sejtek DNS-tartalmát festi csak meg. Az apoptózis és a sejtciklus meghatározásához [183] a sejteket fixáltuk 70%-os jéghideg etanollal, majd alkalikus extrakció (200 mM; Na₂HPO₄; pH = 7,4) és RNáz (100 µg/ml, Merck-Sigma-Aldrich) kezelés után végeztük el a PI-festést (1 mg/ml). Így valamennyi sejt DNS-tartalma festődik, és ez alapján az G1, S- és a G2-fázisban levő sejtek, illetve a csökkent DNS-tartalmú (szubG1) apoptotikus sejtek azonosítása is megtörténhet. A méréseket FACSCalibur típusú áramlási citométer (Beckman Coulter – Indianapolis, IN, USA) segítségével végeztük. Minden vizsgált minta esetében minimum 10.000 eseményt mértünk, az adatelemzés a Kaluza szoftverrel (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) történt.

3.7 In vitro fluoreszcens caspase-3 assay

Az indukált apoptózis kimutatásához az EnzChek Caspase-3 Assay Kit #1 (Molecular Probes) kaszpáz-3 aktivitás vizsgálatot is elvégeztük. A tesztet a gyártó protokollja alapján végeztük. Mintánként legkevesebb 1 x 10⁶ sejtet használtunk, majd centrifugálás után (10 perc; 1.000 rpm; szobahőmérséklet) a pellethez 50 µl 1x Cell Lysis Buffert adtunk és 30 percig jégen inkubáltuk a mintákat. Centrifugálás után (5 perc; 5.000 rpm; szobahőmérséklet) a felülúszókat 96-lyukú plate-ben, 50 µl/well 2x-es Reaction Bufferrel (400 µl 5x Reaction Buffer + 10 µl DTT + 590 µl desztillált vízben hígítva) egészítettük ki és hozzáadtuk a Z-DEVD-AMC-oldatot (1 µl). 30 perc után 355-460 nm-en Fluoroskan Ascent FL fluoriméterben detektáltuk a kaszpáz aktivitással arányos fluoreszcenciát (Labsystems International; Ascent Software). A jelintenzitás változásának nyomon követéséhez kinetikus mérési módot használtunk és 50 perces intervallumban 5 percenként ismételtük meg a leolvasást. A kapott eredményeket standard hígítási sorból (Z-DEVD-AMC és Reaction Bufferrel hígítva) készített és szerkesztett görbe adataival vetettük össze, illetve negatív kontrollként a kísérleti kezelési kontrollt, illetve Ac-DEVD-CHO inhibitor is használtunk.

3.8 *In vivo xenograft modell*

Az *in vivo* kísérletek során követtük az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács által megfogalmazott állatkísérletekre vonatkozó iránymutató szabályzatokat, amelyeket a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának etikai tanácsa felülvizsgált és jóváhagyott. A Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetének állatháza és munkacsoportunk *in vivo* kísérletek végzéséhez az alábbi hivatalos engedélyekkel rendelkezik: PE/EA/801-7/2020 és PEI/001/1733-2/2015.

Xenograft modellek létrehozásához $2,5 \times 10^6$ ZR75.1 humán emlőcarcinoma sejtet injektáltunk 8 hetes nőstény súlyos SCID egerek emlőtájékára. A tapintható tumorok megjelenése után (3-5 hét után), az egereket véletlenszerűen 5 csoportba osztottuk. A csoportokat a kezelési protokolloknak megfelelően az alábbiak szerint jelöltük: 1. csoport: kontroll – fiziológiás sóoldat (0,9%-os nátrium-klorid oldat, Fresenius Kabi; Bad Homburg, Németország) intraperitoneálisan; 2. csoport: Rapamune (hatóanyaga: rapamycin; Pfizer; Budapest, Magyarország) – 3 mg/kg *per os*; 3. csoport: doxiciklin (Merck-Sigma-Aldrich) – 5 mg/kg *per os*; 4. csoport: rapamycin + doxiciklin kombináció és 5. csoport: doxorubicin (TEVA; Debrecen, Magyarország) – 2 mg/kg intravénásan. A kezelési protokoll szerint a kezeléseket heti három alkalommal 3 vagy 6 hétig végeztük. A kezeléseket során a testtömeget és a tumorméretet rögzítettük, a változásokat nyomon követtük. A kísérlet végén a tumortérfogat meghatározásához a következő egyenletet használtuk [184]:

$$\frac{\pi}{6} \times \left[\frac{(2 \times \text{rövidebb átmérő}) + \text{hosszabb átmérő}}{3} \right]^3$$

A kísérletek végén a tumorok eltávolítása után azok tömegét regisztráltuk, a szövetekből formalin-fixált, paraffinba ágyazott blokkokat, illetve elektronmikroszkópos metszeteket is készítettünk további IHC-, illetve morfológiai vizsgálatokhoz.

3.9 *Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok*

A transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a tumorszöveteket 2%-os glutáraldehid és 2%-os ozmium-tetroxid (1:1) keverékével jégen fixáltuk. Mosás (0,1 M-os kakodilát pufferben), majd zsírtalanítás után alarditos beágyazást megelőzően a fixált mintákat víztelenítettük. A membránkontrasztosításhoz 1%-os uranil-acatát és 70%-os etanol keverékét használtunk (1 óra, sötétben, 4 °C-on). A víztelenítés befejeztével a

mintákat propilén-oxidban, majd propilén-oxid és araldit oldatok különböző arányú keverékeiben inkubáltuk. A vizsgálandó minták végül aralditba kerültek át. A műgyantás beágyazás után ultravékony metszetek készültek Reichert Ultracut (Bécs, Ausztria) mikrotom segítségével. További kontrasztosításhoz uranil-acetátot és ólom (II)-nitrátot alkalmaztunk. Az elkészült minták tanulmányozásához Hitachi H-7600 típusú (Tokió, Japán) transzmissziós elektronmikroszkópot használtunk.

3.10 MitoTracker Red festés és konfokális mikroszkóp

A 72 órás kezelés mitokondriumokat érintő morfológiai változásainak megfigyeléséhez MitoTracker Red CMXRos (1:10000, #M7512, Invitrogen) festéket használtunk 1 μ M (1x-es PBS-ben hígítva 100 μ l-es végtérfogatra) koncentrációban. 30 perces inkubációt és PBS-es mosást követően a sejteket 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk. Ezt követően fluoreszcens immunfestést végeztünk, blokkolás-permeabilizálás (10% FBS + 0,5% Triton-X + 300 mM glicin 20 perc) után LC3 (1:400; Cell Signaling Technology – CST, Leiden, Hollandia) és TOM20 (1:500; CST) antitesteket, illetve fluoreszcens másodlagos kecske anti-nyúl Alexa488 IgG ellenanyagot (1:400, #A27034, Thermo Fisher Scientific) használtunk. A mosások után Diamond Antifade Mountant (Invitrogen) fedőanyaggal fedtük a lemezeket és konfokális mikroszkóppal készítettünk felvételeket (Zeiss LSM780 – Zen Software, Jéna, Németország).

3.11 3D bionyomtatott szövetszerű struktúrák vizsgálata konfokális mikroszkóp segítségével

Konfokális mikroszkóppal tanulmányoztuk a 3D bionyomtatott és fenntartott TMS-ekben kialakuló luminális szerkezetet. A fluoreszcens immunjelöléshez előbb a mintákat 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk, a blokkoló oldat PBS-ben hígított FBS-t (5%) és Triton X100-at (0,3%) tartalmazott. Intracelluláris markerként a direkt fluoreszcens jelölésű phalloidin-Atto550-et (1:600; Merck-Sigma-Aldrich), valamint egyidejűleg a Diamond antifade mountant típusú fedőmédiumba kevert DAPI (1:600, #H3570, Invitrogen) festést használtuk. Az immunreakciót konfokális mikroszkóppal elemeztük (Leica Sp8 Lightning – LAS X Software; Leica Microsystems).

3.12 Statisztikai analízis

Az átlagokat és a szórásokat három független kísérlet minimum három vagy több párhuzamos mintájából számítottuk (az alkalmazott teszt függvényében). GraphPad

Prism szoftvert (9.1.2. verzió, La Jolla, CA, USA) használtuk az *in vitro* és *in vivo* kísérleteinkből származó adataink statisztikai elemzéséhez.

Statisztikai számításokhoz Student-féle t-tesztet, egy-, valamint kétszemponos variancia analízist (one-/two-way ANOVA) alkalmaztunk a szignifikancia értékek meghatározásához, melyhez Tukey-féle poszt hoc próbát is használtunk. $p \leq 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikáns eredményeknek, ezeket *-gal jelöltük az ábrákon.

4. Eredmények

4.1 Rapamycin + doxiciklin sejtproliferációt gátló hatásai in vitro és in vivo

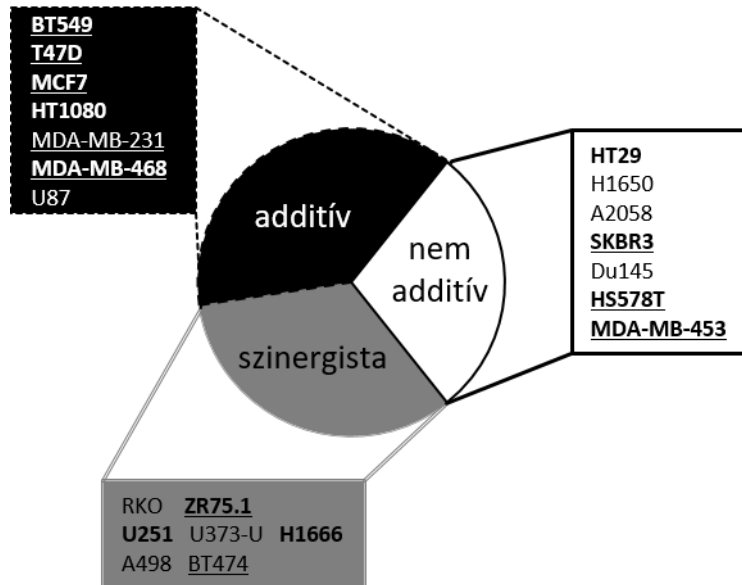
Egyre több adat van arról, hogy a rapamycin monoterápia (*in vitro*) csökkenheti a legkülönbözőbb daganatsejtek (köztük nemcsak lymphomák, leukémiák, hanem carcinomák, sarcomák és központi idegrendszeri daganatok) proliferációját. Ezek és saját korábbi például gliomasejtekkel végzett vizsgálataink más antimetabolikus kezelések és azok kombinált hatásainak potenciális jelentőségére, akár szignifikáns tumornövekedés-gátló hatására hívják fel a figyelmet.

Munkacsoportunk korábbi kísérleteiben, amelyekben részt vettem, tanulmányoztam magas malignitású glioma sejtvonalakban metabolikus célpontú szerek (rapamycin – mTORC1-gátló, doxiciklin – antibiotikum) sejtnövekedésre gyakorolt hatásait, valamint ezek kombinációját a konvencionális kemoterápiaként alkalmazott temozolomid kezeléssel. Ezeket a hatásokat glioma sejtvonalakban fehérjeszintű vizsgálatokkal is kiegészítettük, eredményeink igazolták metabolikus enzimek expresszióváltozásait a hatásokkal összefüggésben [78,79].

4.1.1 Rapamycin + doxiciklin sejtproliferációt gátló hatása humán tumor-, illetve emlőcarcinoma sejtvonalakban

Ezek az eredményeink felhívták a figyelmet a daganatok metabolikus jellegzetességeire, változékonyságára, heterogenitására, ezen belül az anyagcsere-útvonalak terápiás kezeléseket követő változására, amelynek kombinált gátlása hatékony terápiás eszköz lehet.

PhD-munkám során ezzel összefüggésben vizsgáltam, hogy a rapamycin és doxiciklin kezelés és kombinációi hogyan befolyásolják különböző szolid daganat eredetű sejtvonalak növekedését. A rapamycin + doxiciklin kombinációs kezelés a vizsgált sejtvonalak kétharmadában additív (BT549, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF7, T47D, HT1080 és U87 sejtvonal) vagy szinergista (BT474, ZR75.1, RKO, A498, H1666, U251 és U373-U sejtvonal) módon csökkentette a sejtproliferáció mértékét (**13. ábra**).



13. ábra *In vitro* rapamycin és doxiciklin kombinációs kezelés szignifikáns tumornövekedés-gátló hatása. (a) A rapamycin és doxiciklin kombinációs kezelés a vizsgált sejtek kétharmadában additív, illetve szinergista hatású. A kombinált kezelések Alamar blue teszt eredményei alapján a sejtvonalak három kategóriába sorolhatók (a gátlóhatásokból számítható kombinációs index segítségével): (a) additív; (b) nem additív és (c) szinergista hatású kategóriák. Az aláhúzás a humán emlőcarcinoma sejtvonalakat, míg a félkövér betűstílus azokat a sejtvonalakat jelöli, ahol 50%-nál nagyobb sejtproliferáció-gátlást tudtunk kimutatni kombinált kezelés után. $n = 3$.

Előbbi sejtvonalakból a humán emlőcarinoma sejtvonalakkal végeztük további vizsgálatainkat. A vizsgált tíz emlőcarinoma sejtvonalban sejtvonalfüggő (nem szubtypus alapján) különbségeket figyeltünk meg a rapamycin és a doxiciklin monoterápiás kezelésekkal szemben (**3. táblázat**). A vizsgált sejtvonalak esetében a rapamycin + doxiciklin kombinált kezelés azonban szignifikáns sejtnövekedés-gátlást eredményezett.

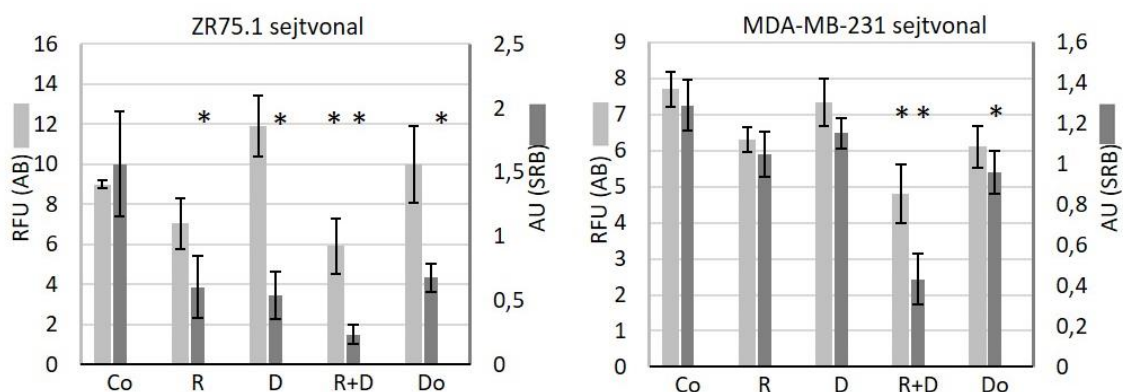
3. táblázat A vizsgált tíz humán emlőcarcinoma sejtvonalban rapamycin és doxiciklin kezelések (72 óra) Alamar blue teszttel meghatározott proliferációs változásai

Humán emlőcarcinoma sejtvonalak rapamycin, doxiciklin és doxorubicin kezelésekkel (72 óra) szembeni érzékenységi különbségei					
típus	sejtvonal	R	D	R + D	Do
luminal A	MCF7	74% ± 10%	94% ± 13%	65% ± 10%	75% ± 8%
	T47D	68% ± 3%	86% ± 4%	63% ± 2%	89% ± 3%
luminal B	ZR75.1	83% ± 6%	92% ± 6%	62% ± 3%	91% ± 7%
	BT474	74% ± 6%	20% ± 2%	16% ± 6%	25% ± 3%
HER2+	SKBR-3	56% ± 8%	85% ± 9%	39% ± 5%	31% ± 6%
	MDA-MB-453	57% ± 2%	67% ± 4%	26% ± 2%	25% ± 2%
tripla negatív	MDA-MB-231	88% ± 3%	82% ± 7%	66% ± 4%	59% ± 6%
	MDA-MB-468	82% ± 5%	43% ± 5%	29% ± 4%	39% ± 4%
	BT549	80% ± 2%	37% ± 4%	33% ± 5%	59% ± 5%
	HS578T	92% ± 6%	82% ± 5%	67% ± 2%	91% ± 4%

A sejtproliferáció mértékét a kontroll%-ban adtuk meg (a táblázatban feltüntetett adatok az átlagos értékek +/-szórás). A félkövér-dőlt betűstílussal jelölt szürke háttérű cellák azokat az értékeket jelölik, ahol a $p \leq 0,05$ -nek bizonyult. (Co – kontroll; R – rapamycin, 50 ng/ml; D – doxiciklin, 10 μ M; R+D – rapamycin + doxiciklin kombináció; Do – doxorubicin, 50 ng/ml). n = 3.

A sejtproliferációs eredményeinket elemezve, további vizsgálatok céljából két, különböző szubtypusba tartozó, a doxorubicinnel szemben eltérő érzékenységet mutató sejtvonalat, a ZR75.1 (luminal B) és az MDA-MB-231 (tripla negatív) carcinomát választottuk ki. Ezekben a monoterápiás kezelések nem eredményeztek jelentős (20%-nál nagyobb) sejtproliferáció csökkenést *in vitro*, a kombinált kezelés azonban AB- és SRB-tesztekkel is (a proliferációs gátlás hasonló volt mindkét proliferációs teszt esetében) jelentős/szignifikáns sejtnövekedés-gátlást eredményezett. A kombinációs eredményeket összehasonlítva egyes kezelőszerek hatásával tendenciózusan jelentősebb hatásokat mutattunk ki a kombinációkkal mindkét sejtvonal esetében. A kombinált kezelés eredményeképpen a ZR75.1 sejtvonal esetén a két szer szinergista, míg az MDA-MB-231 sejtnél additív sejtproliferáció csökkenést eredményező hatását igazoltuk (**14. ábra**). A rapamycin + doxiciklin kombináció hatásait összehasonlítva a sejtek doxorubicin érzékenységgel, azt figyeltük meg, hogy legalább a doxorubicin hatásához

hasonló, vagy a kevésbé érzékeny sejt esetében szignifikánsan nagyobb hatású a vizsgált kombinációs kezelés a két proliferációs teszttel, mint a doxorubicin kezelés (**14. ábra**). A két sejtvonal alap metabolikus aktivitás és metabolikus plaszticitás különbségeit is megfigyelhetjük a doxorubicin kezelés esetében. Már korábbi vizsgálatokban jellemezték és kimutatták intézetünkben a ZR75.1 sejtvonal kiegyensúlyozottabb metabolikus aktivitását, így az OXPHOS- és Warburg-folyamatok együttes jelentőségét [185,186]. Eredményeink szerint az SRB-tesztek jóval nagyobb mértékű sejtszámváltozást mutatnak a kezelésekből, míg a feltételezett metabolikus adaptáció a túlélő kevés sejtben olyan jelentős metabolikus változást okoz, amelynek következményeként a sejtben a NAD^+ , H^+/NADP^+ , H^+ szint emelkedése torzíthatja a teszteredményeket.

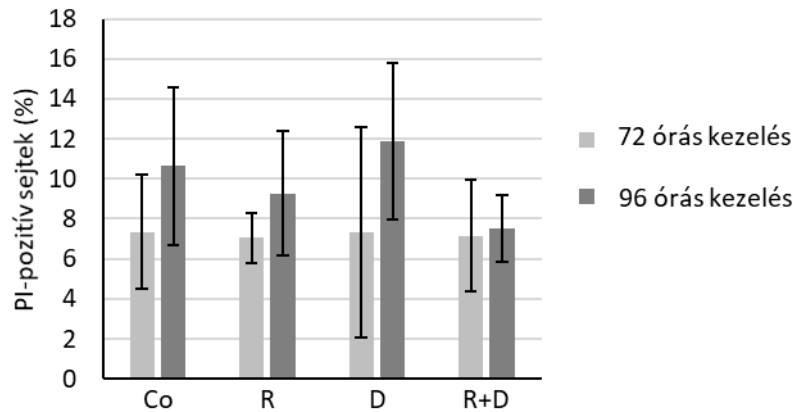


14. ábra Rapamycin, doxiciklin, illetve doxorubicin kezelések proliferációgátló hatása *in vitro* a ZR75.1 és az MDA-MB-231 sejtvonalakban. Alamar blue (AB) és szuforodamin B (SRB) tesztek eredményei 72 órás kezelés után. A diagramokon a relatív fluoreszcencia (*relative fluorescence unit* – RFU; AB-teszt), illetve abszorbancia egységben (*absorbance unit* – AU, SRB-teszt) mutattam be az adatokat (átlag +/- szórás). * $p \leq 0,05$. (Co – kontroll; R – rapamycin, 50 ng/ml; D – doxiciklin, 10 μM ; R+D – rapamycin + doxiciklin kombináció; Do – doxorubicin, 50 ng/ml). $n = 3$.

4.1.2 Apoptózis, nekrozis és nekroptózis indukció vizsgálata rapamycin + doxiciklin kombinációs kezelés hatására

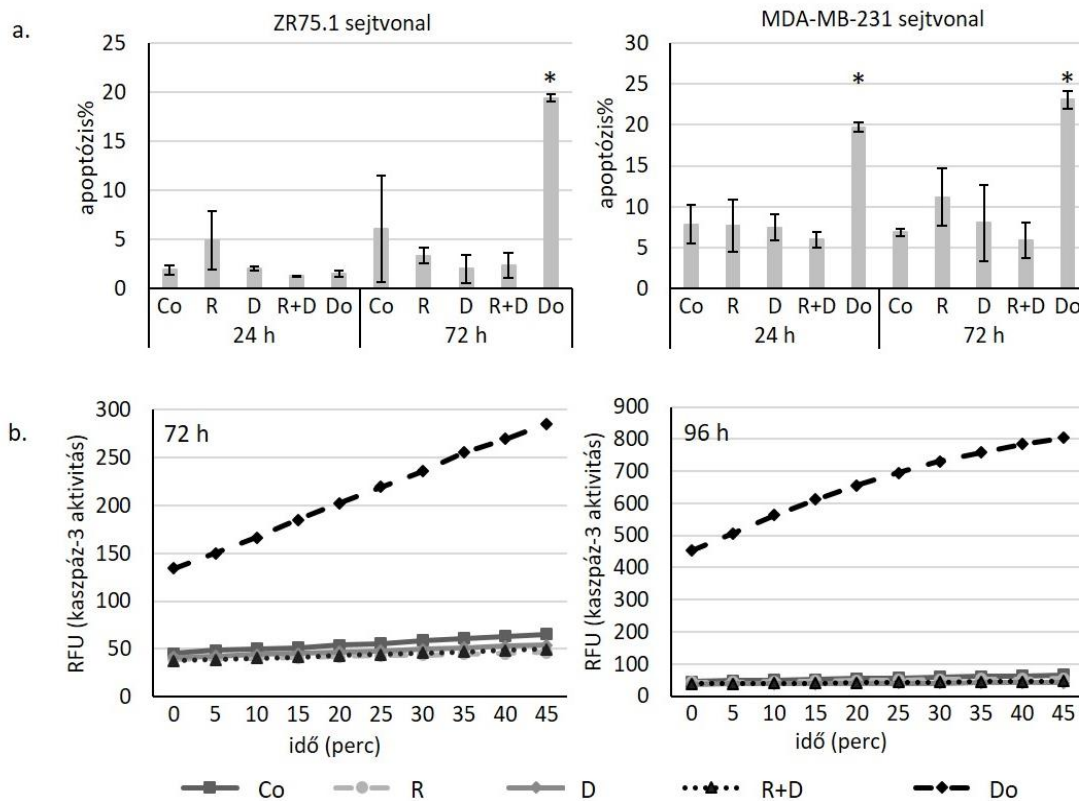
Annak érdekében, hogy meghatározzuk, milyen sejthalál-mechanizmus áll a rapamycin + doxiciklin kezelés eredményeként megfigyelt közel 40%-os proliferációgátlás háttérében, a sejteket PI-vel festettük, majd áramlási citométerrel meghatároztuk a nekrotikus sejtek %-os arányát. Eredményeink szerint, nincs szignifikáns különbség a PI-pozitív sejtek arányában, indukált nekrozist sem 72, sem 96 órás kezelt mintákban nem tudtunk igazolni. Ugyanazon mintákban ezt követően

alkoholos fixálás, alkalikus puffer, majd PI-festés után a sejtek DNS-tartalmát vizsgáltuk áramlási citometerrel. Csökkent DNS-tartalmú (szubG1) apoptotikus sejtek mennyiségének emelkedését, vagyis indukált apoptózist sem 24 órás, sem 72 órás mintáinkban nem tudtunk a kezelések után igazolni (ZR75.1 és MDA-MB-231) (**15. ábra**).



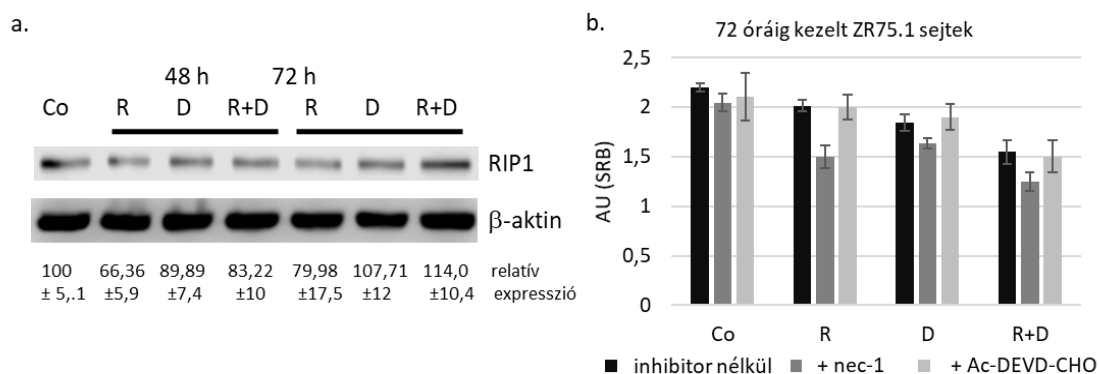
15. ábra Indukált nekrozis nem igazolható rapamycin és doxiciklin kezelések után 72 és 96 órával. Áramlási citometria vizsgálat (propidium-jodid (PI) festett natív kontroll és kezelt ZR75.1 sejtekben). Az átlag és +/- szórás adatokat ábrázoltuk (Co – kontroll; R – rapamycin, 50 ng/ml; D – doxiciklin, 10 μ M; R+D – rapamycin + doxiciklin kombináció). n = 3. Nincs szignifikáns különbség a kezelések hatásai között.

Ezt követően a ZR75.1 sejtvonalon folytattuk vizsgálatainkat, eredményünket, miszerint nincs apoptózis, mint indukált sejthalál az *in vitro* modellrendszerünkben, kaspáz-3 aktivitás méréssel (Z-DEVD-AMC szubsztrát alkalmazása) is alátámasztottuk *in vitro*. A vizsgált mintáinkban emelkedett kaspáz-aktivitást kizárólag a doxorubicin monoterápia esetén tudtunk kimutatni (72, illetve 96 órás kezelt mintáinkban) – amelyet, mint pozitív kontroll használtunk a vizsgálatokban. Hasonló megerősítő eredményünk, hogy az Ac-DEVD-CHO kaspázgátló kezelésnek sem volt hatása ZR75.1 sejtekben indukált növekedésgátló hatásokban (**16. ábra**).



16. ábra Rapamycin és doxiciklin hatásában sem mutatható ki indukált apoptózis (ZR75.1 és MDA-MB-231). a.) 24 és 72 órás kezelés után a ZR75.1 és MDA-MB-231 sejtekben detektált apoptotikus sejtek %-a. A doxorubicin kezelés mint pozitív kontroll szerepel. b.) Kaspáz-3 aktivitás vizsgálat Z-DEVD-AMC szubsztráttal 72, illetve 96 óráig rapamycinnel és doxiciklinnel kezelt ZR75.1 sejtekben. (Co – kontroll; R – rapamycin, 50 ng/ml; D – doxiciklin, 10 μ M; R+D – rapamycin + doxiciklin kombináció; Do – doxorubicin, 50 ng/ml; Ac-DEVD-CHO – 1 μ M; RFU – *relative fluorescence unit*). n = 3. * p \leq 0.05.

A nekroptózis esetleges megjelenését kezeléseinkben (48 és 72 órás minták) RIP1 fehérje-expresszió vizsgálatunk (Western blot eredmények) segítségével sikerült kizárni, nem találtunk expresszióváltozást a ZR75.1 sejtekben. Eredményeinket megerősítettük necrostatin-1 (nec-1) kombinált kezeléssel is. A kezelések, és így a rapamycin + doxiciklin kezelés proliferációgátló hatásait nem függesztette fel a necrostatin kezelés, bár a nekroptózis inhibitornak inkább kismértékű antiproliferatív hatása volt (**17. ábra**).



17. ábra A nekroptózis és apoptózis indukció hiánya a rapamycin + doxiciklin kezelt ZR75.1 sejtekben. a.) RIP1 expresszió vizsgálata Western blot analízissel 48 és 72 órás rapamycin és doxiciklin kezelések után (az ábra bal oldala – reprezentatív Western blot kép). b.) A necrostatin-1 (nec-1) és az Ac-DEVD-CHO (kaspáz-3 inhibitor) sem gátolta a rapamycin és doxiciklin kombináció proliferációcsökkentő hatását (72 órás Alamar blue teszt eredmények relatív fluoreszcencia értékei – *relative fluorescence unit* – RFU). (Co – kontroll; R – rapamycin, 50 ng/ml; D – doxiciklin, 10 μ M; R+D – rapamycin + doxiciklin kombináció; Do – doxorubicin, 50 ng/ml, nec-1 – 50 μ M; Ac-DEVD-CHO – 1 μ M). n = 3.

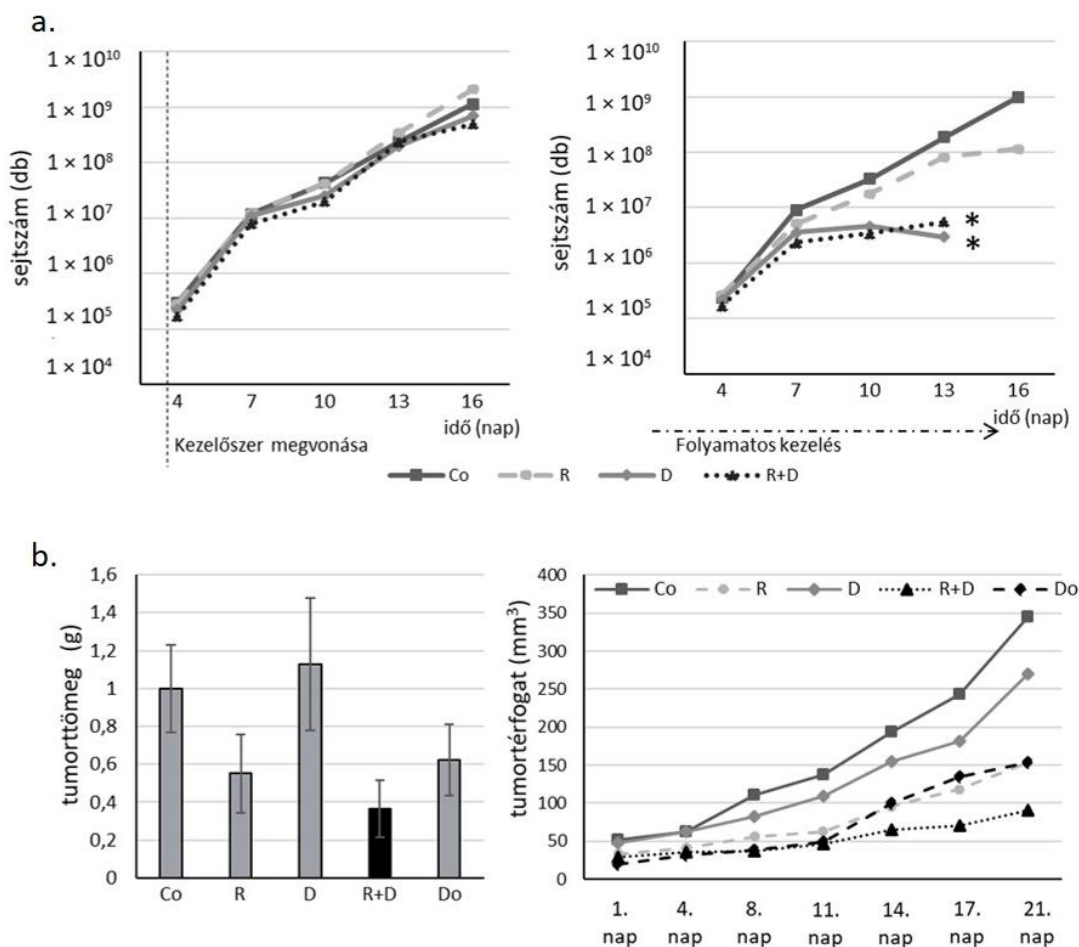
4.1.3 Hosszútávú rapamycin + doxiciklin kezelés, illetve kezelés megvonás/megszakítás hatása a ZR75.1 humán emlőcarcinoma sejtekben *in vitro* és *in vivo*

A rapamycin és a doxiciklin kezelések hosszútávú hatásait, a hatások visszafordíthatóságát ZR75.1 *in vitro* sejt és *in vivo* xenograft modellekben vizsgáltuk a továbbiakban.

A 3 napos *in vitro* kezeléseket felfüggesztve azt figyeltük meg, hogy sejtproliferáció-gátló hatások megszűnnek, ismét növekedni kezdenek a sejtek. Ebben a kísérleti csoportban a kezelőszermegvonást követő közel 2 hétben csupán az egyes kezelések hatására 72 óra alatt kialakult sejtnövekedés-hátrány maradt meg. A párhuzamosan 16 napig folyamatosan kezelt *in vitro* tenyészetben azonban a hosszútávú doxiciklin monoterápia és a rapamycin és kombinációja szignifikánsan csökkentette a sejtnövekedést (**18. ábra a**), a sejtproliferáció teljesen leállt, a kezelt sejtek 2 hét után már nem voltak életképesek.

Hasonló eredménnyel zárult a háromhetes *in vivo* kezelés is, melyben a rapamycin és a rapamycin és doxiciklin kombináció is szignifikáns tumornövekedés csökkenést

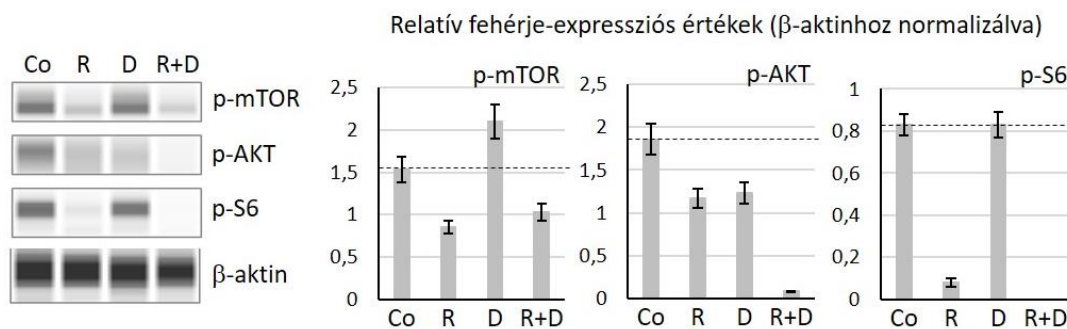
eredményezett ZR75.1 xenograftok esetében. Az *in vitro* megfigyeltekkel ellentétben, a doxiciklin monoterápia nem csökkentette a tumorméret növekedését *in vivo* modellünkben. A Rapamune + doxiciklin kombináció hatásosabbnak bizonyult összehasonlítva a hagyományos doxorubicin kemoterápiával, illetve a Rapamune monoterápiával szemben *in vivo* folyamatosan fenntartott kezeléseinkben **(23. ábra a)**. Az *in vivo* kezelés megvonása a megszakítás nélküli kezeléshez képest szignifikánsan kisebb mértékű növekedésgátló hatást mutatott. A kombinációban alkalmazott kezelőszerek nem tudták eliminálni az összes tumorsejtet, a kezeletlen tumorok ismételten növekedni kezdtek **(23. ábra b)**. Eredményeink alapján, az *in vivo* kezelés tumornövekedés-gátló hatása visszafordítható a kezelés megvonásával, a túlélő tumorsejtek újra növekednek.



18. ábra A rapamycin/Rapamune és doxiciklin kombinációs kezelések hosszútávú hatásai ZR75.1 sejtekben. a.) *In vitro* rapamycin és doxiciklin kezelés hatása a ZR75.1 sejtek hosszútávú növekedésére (16 napos növekedési görbe). A baloldali ábrán 72 órás rapamycin és doxiciklin kombinációs előkezelés után megvontuk a kezeléseket, jobboldali ábrán bemutatott kísérletben folyamatosan alkalmaztuk a kezeléseket. 3 naponta passzáltuk a tenyészeteket, a bemutatott grafikonon a kumulatív sejtszámokat tüntettem fel (Co – kontroll; R – rapamycin, 50 ng/ml; D – doxiciklin, 10 μ M; R+D – rapamycin + doxiciklin kombináció). *-gal a sejtporilferáció megszűnését jelöltem (már nem volt élő sejt). b.) ZR75.1 xenograftok 21 napos kezelésének végén eltávolított tumortömegek (bal ábrarész) és a folyamatosan regisztrált tumortérfogat-növekedés nyomon követése (jobb ábrarész) (Co – kontroll; R – Rapamune 3 mg/kg; D – doxiciklin 5 mg/kg; R+D – Rapamune + doxiciklin kombináció; Do – doxorubicin, 2 mg/kg). n = 3.

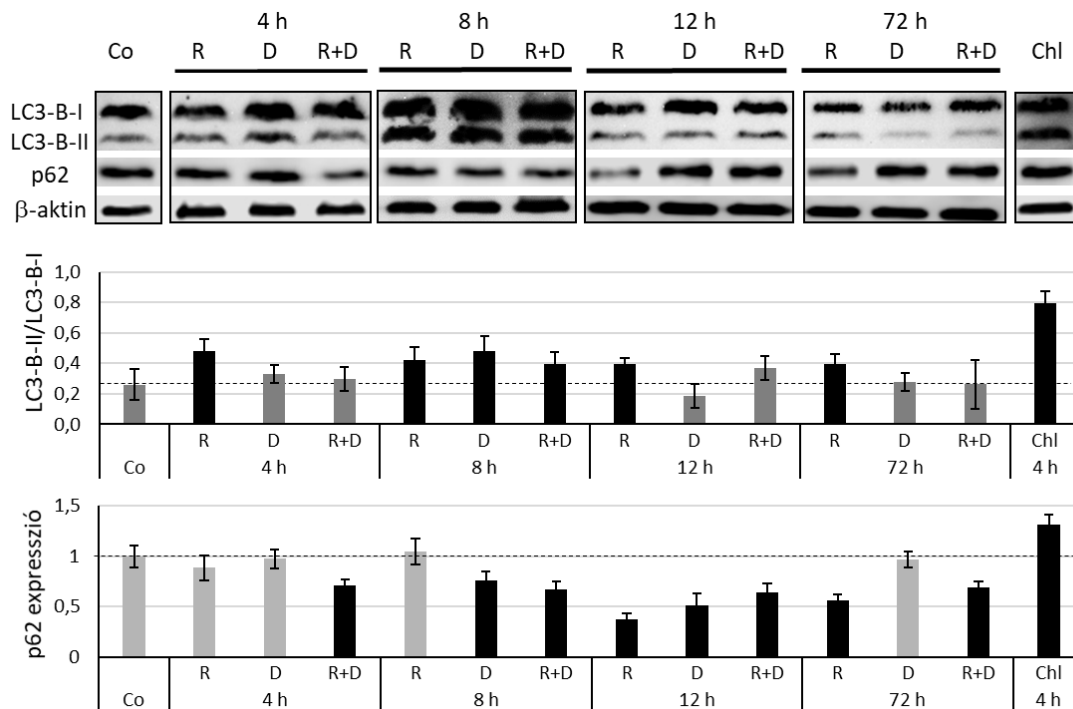
4.1.4 Autofágia és mitofágia indukció rapamycin és doxiciklin kezelés következtében

A rapamycin jól ismert mTOR-aktivitás gátló hatásait igazoltuk az mTOR-aktivitáshoz kapcsolódó fehérjék (p-mTOR, p-AKT és p-S6) expresszió változásainak kimutatásával. A doxiciklin monoterápia nem befolyásolta a p-mTOR és a p-S6 fehérjék szintjét, de egy enyhe p-Ser473-AKT fehérje-expresszió csökkenést detektáltunk a kontroll mintához képest (**19. ábra**). A kombinált kezelések a rapamycin monoterápiához hasonló, de nagyobb mennyiségi változást okoztak, gyakorlatilag kimutathatatlaná tették WesTM Simple-lel a fehérjék aktív, foszforilált formáit a ZR75.1 sejtekben.



19. ábra mTOR-aktivitás csökkenése *in vitro* rapamycinnel és doxiciklinnel kezelt ZR75.1 sejtvonalban. A foszforilált fehérjék expresszióját WesTM Simple-lel vizsgáltuk, loading kontrollként β -aktint használtunk (reprezentatív WesTM Simple kép). Az eredmények analízisekor fehérjemennyiségeket β -aktinhez normalizáltuk, a szaggatott vonal a kontroll minták normalizált értékeit jelöli, az adatok az átlag \pm szórás értékeket mutatják. (Co – kontroll; R – rapamycin, 50 ng/ml; D – doxiciklin, 10 μ M; R+D – rapamycin + doxiciklin kombináció).

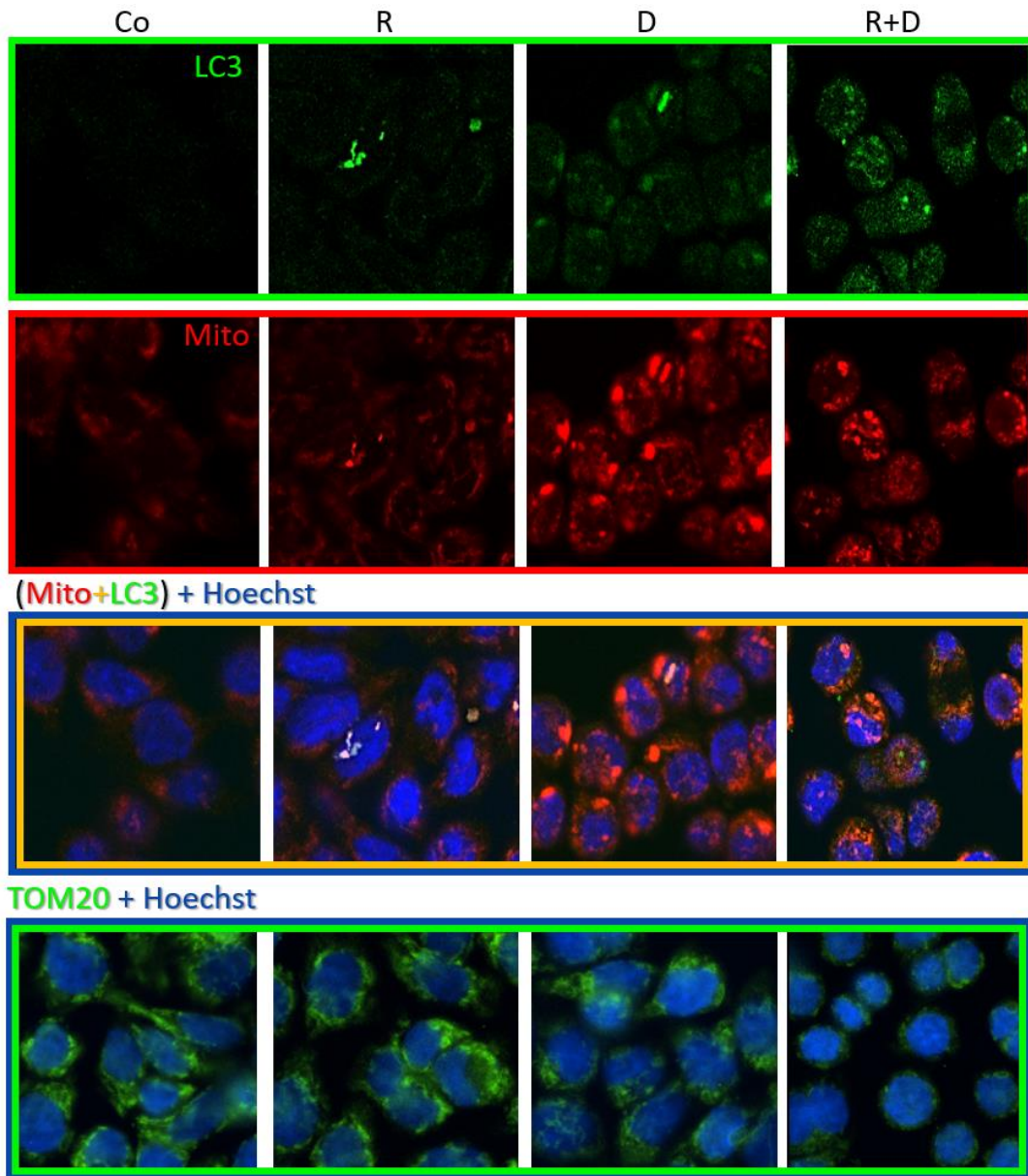
Az autofágia megjelenésének igazolásához, az LC3-B két formájának arányát és a p62 fehérje mennyiségének időfüggő változását vizsgáltuk. Az LC3-B-II/LC3-B-I aránya 8 óránál szignifikáns változást mutatott (csökkent), amelyet a p62 csökkenése is megerősített. A rapamycin, valamint a kombinációs kezelés korai szakaszában tehát megfigyelhetjük az autofágia aktivációját (**20. ábra**).



20. ábra Az autofágia aktivitásával összefüggő fehérje expressziós változások *in vitro* rapamycin és doxiciklin kezelt ZR75.1 sejtvonalban. Az LC3-B-I/II és p62 fehérjéket Western blottal vizsgáltuk (az ábra felső része egy reprezentatív Western blot képet mutat). A kísérleteinkben klorokin (Chl) kezelt sejteket használtuk pozitív kontrollként, és a β -aktinhoz normalizáltuk a denzitometrálta eredményeket. A denzitometrálás után kapott LC3-B-I/II arányt és a p62 relatív fehérje-expressziós értékeket az ábra középső és alsó részén mutatom be. A szaggatott vonal a kezeletlen kontroll minták értékeit jelzi. Az átlag és +/- szórási értékeket ábrázoltam. (Co – kontroll; R – rapamycin, 50 ng/ml; D – doxiciklin, 10 μ M; R+D – rapamycin + doxiciklin kombináció; Chl – klorokin, 50 μ M).

LC3 fluoreszcens immunjelölés igazolta, hogy a rapamycin és a doxiciklin monoterápia enyhén, míg a kombinációjuk jelentősen fokozza az autofagoszómák felhalmozódását *in vitro*. MitoTracker és TOM20 festést használtunk a sejtek mitokondriumainak további vizsgálatához. A MitoTracker legintenzívebb festődése az összecsapódott organelleumok egy előre nem várt morfológiai jellemzőjét mutatta, amely a doxiciklinnel kezelt sejtek hibás működésű mitokondriumaira utal. Az LC3 és a MitoTracker kolokalizációja, valamint a TOM20 fehérje mennyiségének csökkenése

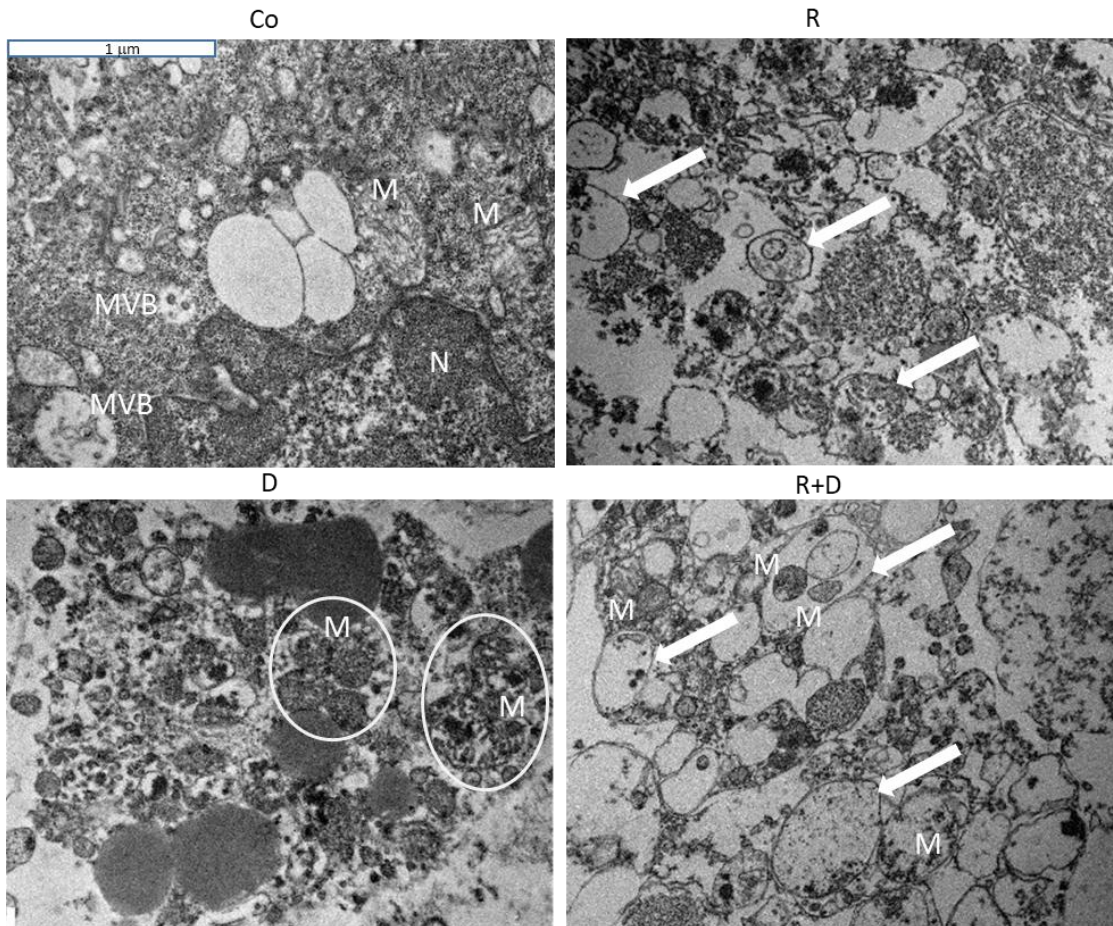
felhívja a figyelmet arra, hogy a rapamycin + doxiciklin kombinációs kezelés hatására mitofágia következik be (21. ábra).



21. ábra Mitokondrium és autofagoszóma markerfestések *in vitro* 72 órás rapamycin és doxiciklin kezeléseket követően ZR75.1 sejtekben. Fluoreszcens konfokális mikroszkópos képek a festődési intenzitást és a MitoTracker (Mito; piros), LC3 (zöld) és együttes megjelenésüket (*merged* képek), illetve a TOM20 (szintén zöld) sejten belüli megoszlását mutatják. Hoechst festést használtunk a sejtmagok festéséhez (kék festődés). (nagyítás 63x; Co – kontroll; R – rapamycin, 50 ng/ml; D – doxiciklin, 10 μ M; R+D – rapamycin + doxiciklin kombináció).

A ZR75.1 xenograft szövetminták transzmissziós elektronmikroszkópos elemzésével igazolni tudtuk az előbbieket *in vivo* is. Eredményeink szerint a Rapamune stimulálta az autofág vakuólumok feldúsulását, a doxiciklinnel kezelt tumorokban, a tumorsejteket jellemezte az összezsugorodott és károsodott struktúrájú mitokondriumok megjelenése és ezek az organellek összezsugorodtak, összezsapzódtak. Autofág vakuólumok és degradálódó mitokondriumok megjelentek a Rapamune + doxiciklin kombinációval kezelt tumorsejtekben, sőt a kombinált kezelés hatására degradálódó mitokondriumokat autofagoszómák szekvesztrálták is (**22. ábra**).

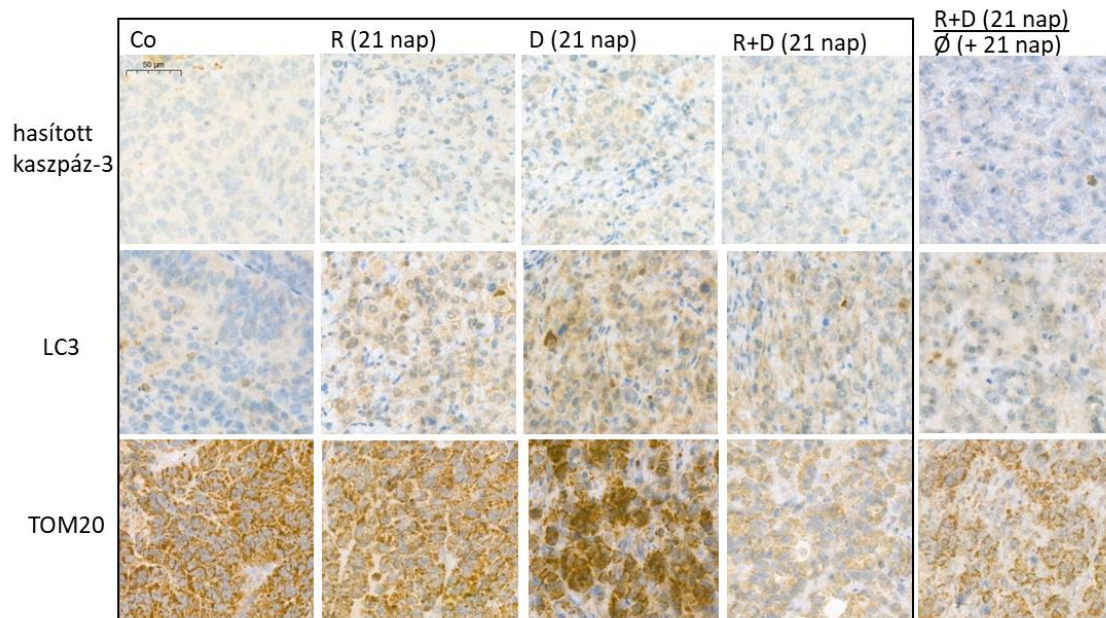
Ezek az eredményeink megerősítik a mitofágia – vagyis egy következményesen fellépő szelektív autofágiás folyamat – jelenlétét, amely a hosszútávú *in vitro* és a háromhetes *in vivo* kombinációs kezelések eredményeként sejthalált idéz elő a tumorsejtekben, tumorszövetben.



22. ábra Hosszútávú Rapamune + doxiciklin kezelés morfológiai hatásai ZR75.1 xenograftokban. 3 hétig kezelt xenograft tumorok transzmissziós elektronmikroszkópos felvételei. Rapamune és doxiciklin kombinációs kezelés eredményeként mitofágiát detektáltunk, a károsodott struktúrájú mitokondriumok megjelenését figyeltük meg autofág vakuólumokban. (mitokondriumok - M; az összezsapzódott mitokondriumokat bekereteztük, autofág vakuólumok - (nyíl); sejtmag - N, multivezikuláris testek – MVB; nagyítás 20.000x). (Co – kontroll; R – Rapamune 3 mg/kg; D – doxiciklin 5 mg/kg; R+D – Rapamune + doxiciklin kombináció; Ø nincs kezelés).

A ZR75.1 xenograft tumorok IHC-festéseinek értékelése is igazolta, a kezeléseknél megjelenő szelektív autofágiás folyamatokat és az apoptózis hiányát *in vivo*. Xenograft tumormodellünkben nem volt kimutatható emelkedés egyik kezelés esetében sem a hasított kaspáz-3 pozitív sejtek számában. Az LC3 mennyiségében szöveti szinten emelkedést tudtunk kimutatni mindhárom kezelés esetében, a kombinált rapamycin + doxiciklin kezelésben is (**23. ábra**). Előbbiek mellett a TOM20 festés igazolta az *in vitro* detektált mitokondriumok strukturális károsodását – a TOM20 festés

intenzitása is csökkenő tendenciát mutatott a három hétig kezelt mintákban. A TOM20 és az LC3 festéseink azt is igazolták, hogy a kezelés felfüggesztése után 21 nappal a túlélő sejtekben a mitokondriális funkciók helyreállhatnak szöveti szinten. Ezek az eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy ZR75.1 humán emlőcarcinoma sejtvonal magas metabolikus plaszticitással, adaptációs képességgel rendelkezik, ahogy azt korábbi metabolikus jellemzéssel foglalkozó munkáinkban kiemeltük [187]. Ugyanakkor azt is mutatják az *in vivo* és *in vitro* vizsgálataink, hogy a hosszútávú *in vivo* Rapamune + doxiciklin kombinációs kezeléseink jelentős tumornövekedés-gátlást eredményezhetnek, amely kiemeli a kísérleteinkben is vizsgált antimetabolikus kezelési kombinációk jelentőségét.

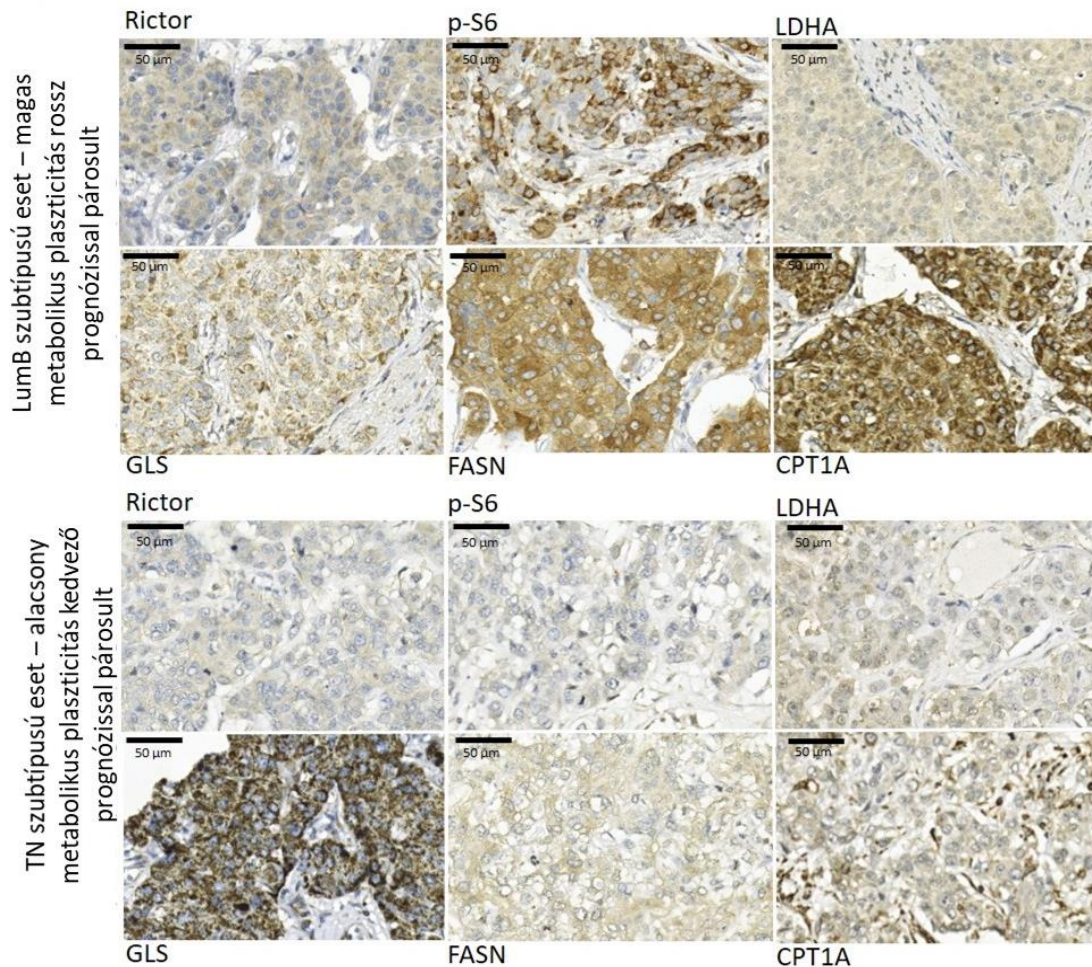


23. ábra Hosszútávú (21 nap) rapamycin + doxiciklin kezelés hatásai *in vivo* (ZR75.1 xenograftok). Hasított kaspáz-3 (apoptózis markere), LC3 (az LC3-B-I és II autofagoszóma fehérje) és a TOM20 (mitokondriális marker) immunhisztokémiai (IHC) festések ZR75.1 xenograft metszetekben. 21 nap kezelés utáni szövetek, illetve 21 napig kezelt majd a következő 21 napban kezelőszermegvonás utáni szövetminták vizsgálata (a fehérjék mennyiségi változásait követtük IHC vizsgálattal a szövetben; DAB – barna – kromogén és hematoxin háttérfestés, nagyítási skála 50 µm-t jelöl; Co – kontroll; R – Rapamune 3 mg/kg; D – doxiciklin 5 mg/kg; R+D – Rapamune + doxiciklin kombináció; Ø nincs kezelés).

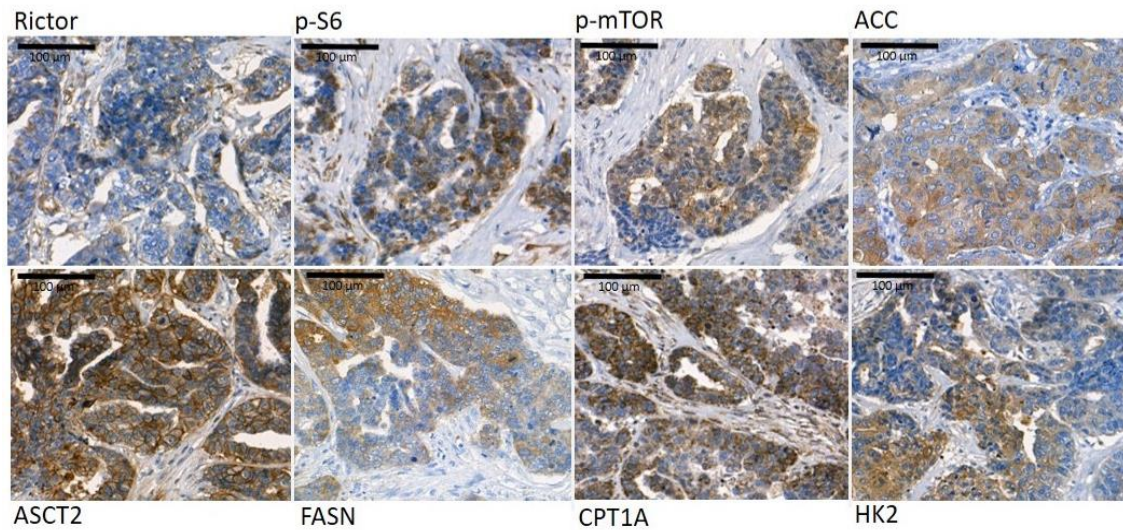
4.2 Metabolikus fehérjék, enzimek mennyiségének szöveti heterogenitása

A szöveti heterogenitás, illetve ennek megjelenése jól ismert a patológiai diagnosztikában. A daganatok metabolikus jellegzetességeit és a metabolikus szöveti heterogenitását számos módszerrel lehet tanulmányozni (pl.: IHC).

Korábbi vizsgálatunkban humán emlődaganatos betegek szövetmintának metabolikus plaszticitásának értékeléséhez hat, mTOR-aktivással összefüggő fehérje, illetve metabolikus enzim (p-S6, Rictor, LDHA – Lactate dehydrogenase A, GLS, CPT1A, FASN) expressziójának analizisét végeztük el [187]. A megfigyelt metabolikus plaszticitás – magas mTOR-aktivitás érték mellett, további négy vizsgált metabolikus enzim közül legalább kettő esetében magas H-score értékek – a rosszabb, míg annak hiánya a betegség jobb prognózisával, hosszabb betegségmentes és teljes túléléssel függ össze. Azt tapasztaltuk továbbá, hogy a fehérjék expressziókülönbségei csak részben mutatnak összefüggést a daganatszubbtypussal, míg a metabolikus plaszticitás progressziós jelentősége szubbtypus független. Ezen munkánkat követően számos daganat esetében értékeltük a szövetek metabolikus jellegzetességeit az mTOR (p-mTOR, p-S6, Rictor), valamint a glikolízis (GLUT1, LDHA, HK2 – Hexokinase 2, PFKP – Phosphofruktokinase), a glutaminolízis (ASCT2 – Alanine, serine, cytein-preferring transporter 2, GLS) és egyéb metabolikus jelutak markereinek (ATPb – β -F1-ATPase, CPT1A, FASN, ACSS2, ACC – Acetyl CoA carboxylase) vizsgáltával. Az új, szintén az emlődaganatokat reprezentáló IHC (n = 40; 10 eset minden főbb szubbtypusból) festésekben a vártnak megfelelően igen jelentős szöveti heterogenitást figyeltünk meg, míg csak egy-egy festés esetében (pl.: GLS és ATPb) volt hasonló intenzitású festődés valamennyi, a szövetben megjelenő tumorsejtben (**24. és 25. ábra**).



24. ábra Metabolikus enzimexpresszióval összefüggő metabolikus plaszticitás emlődaganat-szubtípusfüggetlen prognosztikai jelentősége. Eltérő szöveti metabolikus plaszticitás és jelentőségének bemutatása két emlődaganatos beteg esetében: a luminal B (LumB) szubtípusba tartozó esetben metabolikus plaszticitás – a magas mTOR-aktivitás mellett legalább két metabolikus útvonal elemének emelkedett/magas expressziója a daganatszövetben – volt megfigyelhető (a Rictor, a p-S6, a GLS – Glutaminase, a FASN – Fatty acid synthase és a CPT1A – Carnitine palmitoyltransferase 1A intenzív immunfestések) és ebben az esetben a teljes túlélés csupán 14 hónap volt; a másik tripla negatív (TN) szubtípusú esetben metabolikus plaszticitás hiánya igazolódott és a TN esetekben várható rosszabb prognózissal ellentétben ez hosszabb teljes túléléssel párosult (201 hónap). 3,3'-diaminobenzidint (DAB) (barna) használtunk kromogénként. A méretskála az ábrákon feltüntetésre került.



25. ábra Emlődaganatok szöveti heterogenitásának bemutatása. Különböző metabolikus enzimek (Rictor, p-S6, p-mTOR, ACC – Acetyl-CoA carboxylase, ASCT2 – Alanine, serine, cysteine-preferring transporter 2, FASN – Fatty acid synthase, CPT1A – Carnitine palmitoyltransferase 1A, HK2 – Hexokinase 2) immunfestésének – heterogén szöveti megjelenésének – reprezentatív képei a vizsgált emlődaganatos esetekben. 3,3'-diaminobenzidint (DAB) (barna) használtunk kromogénként. A méretskála az ábrákon feltüntetésre került.

A metabolikus markerek expresszióját heterogenitás szempontjából értékeltük nemcsak ezekben a szöveti mintákban, hanem a Human Protein Atlas adatbázisban fellelhető IHC mintákban (az adatbázisban további 7-12 mintát tudtunk értékelni, adott ellenanyagok esetében) is. Az *in situ* fehérje-expresszió megoszlását akkor tekintettük heterogénnek a tumortípusban, ha az értékelt szövetminták több mint 40%-ában patológusok segítségével intratumorális heterogenitást azonosítottunk. Elemzésünk során intratumorális heterogenitást 10 metabolikus marker festődésénél tudtunk kimutatni (**4. táblázat**). Kizárólag az ATPb, az LDHA, a GLS és az ACSS2 estében találtunk homogén festődéseket, a szöveti heterogenitás hiányát a vizsgált IHC minták jelentős részében. Annak ellenére, hogy a legtöbb, a Human Protein Atlas adatbázisában vizsgálatunk idején elérhető emlőcarcinoma a HER2+ szubtypusba tartozott, az elemzésünk megerősítette, majdnem minden előbbi marker heterogén IHC festődését. Kivétel csupán az ATPb és a CPT1A volt, melyek esetében eltérő festődési mintázatot találtunk az adatbázisban (**4. táblázat**). Az adatbázis elemzése felhívta a figyelmet további, saját mintáinkban nem

vizsgált szöveti szintű metabolikus különbségekre (emelkedett heterogenitás) is (pl.: PKM2 – Pyruvate kinase isoenzyme M2 – CAB019421, MCT1 – Monocarboxylate transporter 1 – HPA003324, PDHB – Pyruvate dehydrogenase E1 subunit beta – HPA036745, SDHA – Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A – CAB034929).

4. táblázat A vizsgált metabolikus enzimek szöveti heterogenitás értékelésének összefoglalása

A festődési heterogenitás értékelése (heterogén festődést mutató esetek száma/összes vizsgált eset száma; %)							
	elvégzett IHC analízis				adatok a Human Protein Atlas-ból		
	LumA	LumB	HER2+	TN	heterogenitás (%)	heterogenitás (%)	referencia ellenanyag
Rictor	7/8	5/9	6/8	3/7	60%	42% (5/12)	HPA037802
p-S6	8/9	8/10	8/8	8/10	87%	n/a	n/a
p-mTOR	9/10	10/10	7/9	6/10	84%	n/a	n/a
GLUT1	4/10	6/10	9/9	7/10	67%	90% (10/11)	CAB002759
LDHA	2/10	4/10	3/9	2/10	28%	30% (4/12)	CAB015336
HK2	6/9	9/10	7/8	6/10	76%	30% (3/10)	HPA028587
PFKP	2/9	4/10	6/8	5/8	49%	46% (5/11)	HPA018257
ASCT2	8/10	10/10	8/8	9/10	92%	75% (9/12)	HPA035240
GLS	1/7	2/9	3/7	4/8	32%	18% (2/11)	HPA036223
FASN	4/10	6/10	5/9	4/9	45%	55% (6/11)	HPA006461
CPT1A	6/9	1/10	5/9	4/9	43%	30% (3/12)	HPA008835
ACC	4/8	6/10	6/6	3/8	59%	67% (8/12)	HPA063018
ACSS2	2/10	1/10	4/9	2/10	23%	33% (4/12)	HPA004141
ATPb	0/8	1/8	3/7	1/8	16%	50% (5/10)	HPA001528

Rövidítések: ACC – Acetyl-CoA carboxylase; ASCT2 – Alanine, serine, cysteine-preferring transporter 2; ATPb – β -F1-ATP-ase; CPT1A – Carnitine palmitoyltransferase 1A; FASN – Fatty acid synthase; GLS – Glutaminase; GLUT1 – Glucose transporter 1; HK2 – Hexokinase 2; LumA – luminal A; LumB – luminal B; LDHA – Lactate Dehydrogenase A; PFKP – Phosphofruktokinase; p-mTOR – phospho-Ser2448-mTOR; p-S6 – phospho-Ser235/236-ribosomal S6; TN – trippla negatív emlődaganat
n/a – nincs adat

4.3 Kezelésekkel szembeni érzékenység és metabolikus enzimexpressziós különbségek hagyományos 2D és 3D szferoidtenyészetekben és *in vivo* xenograft modellben

Korábbi munkánkban összehasonlítottuk bizonyos metabolikus enzimek expresszióját, illetve az mTOR, a GLS, a glikolízis és a lipidmetabolizmus inhibitoraival szembeni érzékenységét *in vitro* 2D kísérletekben. Ezen eredményeink rámutattak arra, hogy a metabolikus gátlószerek kombinált alkalmazása – pl.: a rapamycin és a doxiciklin – jelentős proliferációgátlást eredményezhet a legkülönbözőbb daganatsejtek, így az emlőcarcinoma sejtvonalak többségében is [177].

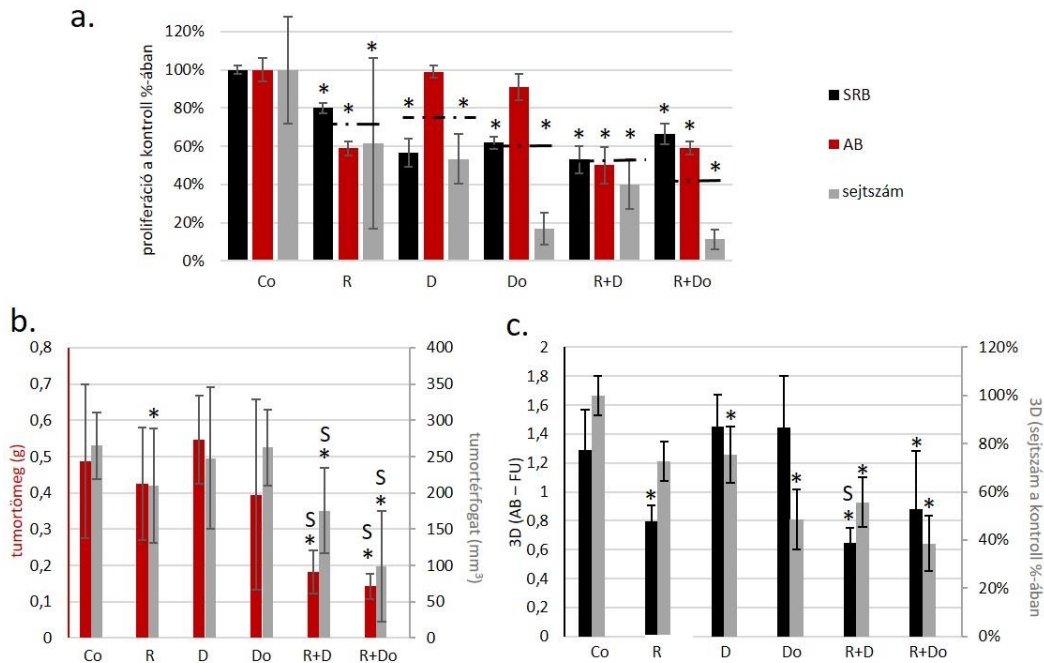
Munkámban összehasonlítottuk a ZR75.1 sejtvonal hagyományos (2D) sejttenyészet és az ebből a sejtvonalból létrehozott *in vivo* xenograft rapamycin, doxiciklin és doxorubicin (kemoterápiás szer) érzékenységét, és ezzel párhuzamosan kombinációs kezelések érzékenységnövelő hatásait is teszteltük.

72 órás *in vitro* kezelések után AB és SRB proliferációs tesztet és/vagy sejtszámolást végeztünk. Párhuzamosan, a ZR75.1 xenograftokban 21 napos kezelések tumornövekedést befolyásoló hatásait is vizsgáltuk. *In vitro* 2D tenyészetekben valamennyi kezelés gátolta a sejtek proliferációját – és a vártnak megfelelően a kombinált kezelések voltak a leghatékonyabbak (**26. ábra a**). A regisztrált tumortérfogatok és a végső tumortömeg alapján azonban a ZR75.1 sejtek *in vivo* rezisztensek voltak a monoterápiás kezelésekkal szemben, de a rapamycin kombinációban alkalmazva érzékenyítette az *in vivo* növekvő tumort, áttörte a rezisztenciát (**26. ábra b**).

A 2D és a 3D sejttenyésztési körülmények tumorsejtek *in vitro* érzékenységét befolyásoló hatásának különbségeinek tanulmányozásához az előbbieket kiegészítő, szélesebb körben elterjedt kétféle 3D sejttenyésztési módszert is alkalmaztunk (ULA – plate-eket és függőcsepp sejtkultúrákat). Ezekben az esetekben AB-teszttel és sejtszámolással követtük az ULA-plate-eken növekvő szferoidsejtek proliferációs változásait. Míg függőcsepp-sejttenyészetekben a módszer tulajdonságaiból adódóan (ez a technika sokkal korlátozottabban alkalmazható számos vizsgálatban) a kezelések hatásait proliferációs tesztekkel nem, csak sejtszámolással tudtuk nyomon követni.

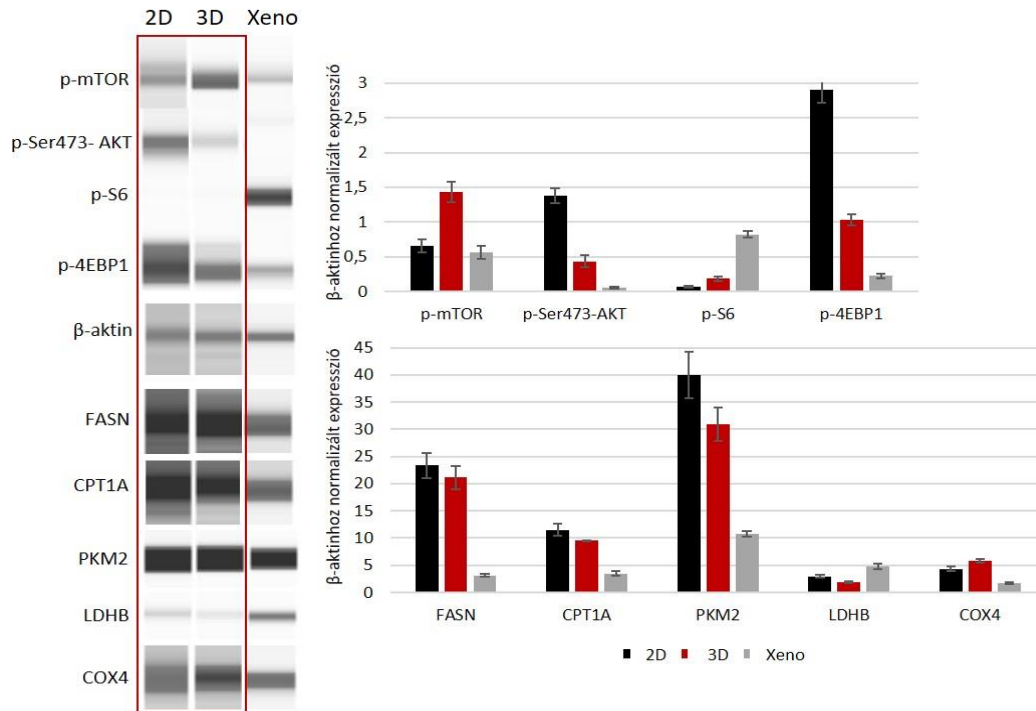
Fontos megjegyezni, hogy az AB/SRB-tesztek és a sejtszámolás eredményeiben tapasztalt eltérések hátterében például metabolikus, illetve apoptotikus hatások is állhatnak (metabolikus adaptáció befolyásolja a metabolikus tesztek eredményeit, illetve az apoptotikus sejtek fehérjetartalma az SRB-tesztek eredményeit zavarhatja meg, pl.:

doxorubicin). Az *in vivo* kapott eredményeinkkel ellentétben, az ULA-plate-eken és a függőcseppben képződött szferoidok, az *in vitro* 2D tenyészetekhez hasonlóan rapamycin és doxorubicin érzékenynek bizonyultak, de a doxiciklin kezelés a 2D tenyészetekben tapasztaltakkal ellentétben nem okozott szignifikáns sejtproliferáció-csökkenést (26. ábra c).



26. ábra Rapamycin, doxiciklin és doxorubicin érzékenység különbségek *in vitro* a 2D és 3D szferoidtenyészetekben (függőcsepp vagy ultra-low attachment plate), illetve *in vivo* xenograft modellekben. a.) A ZR75.1 sejtek szenzitivitása 2D tenyészetben (proliferációs eredmények *in vitro* 72 órás kezelések után). A szaggatott vonal a háromféle proliferációs értékelésben kapott eredmények átlagát mutatja (Alamar blue – AB, szulfurodamin B – SRB és sejtszámolás). b.) A tumorok tömege és a végleges tumorméretekből számolt tumortérfogatok a ZR75.1 xenograftok 21 napos kezelése után. (Rapamune 3 mg/kg; doxiciklin 5 mg/kg; doxorubicin, 2 mg/kg). c.) Alamar blue (AB) tesztet és sejtszámolást végeztünk az ULA plate-ekben képződött ZR75.1 szferoidok *in vitro* sejtproliferációjának vizsgálatához 72 órás kezelését követően. Az *in vitro* eredményeket a kontroll %-ában adtuk meg, a bemutatott kísérletek párhuzamosaihoz tartozó szórások feltüntetésével. (Co – kontroll; R – rapamycin, 50 ng/ml; D – doxiciklin, 10 μ M; R+D – rapamycin + doxiciklin kombináció; Do – doxorubicin, 50 ng/ml, nec-1 – 50 μ M). Szinergista kombinációs hatást S-sel jelöltük (kombinációs index számítás alapján), * $p < 0,05$.

Az érzékenységi vizsgálatokat kiegészítve adott modellrendszerek mTOR és más metabolikus fehérje-expresszióját WesTM Simple technikával is összehasonlítottuk. A 2D, a 3D szferoid sejttenyészetekben és a xenograft modellben az mTOR-aktivitás jelentősen eltért. A két *in vitro* modellrendszer esetében azonban jelentős hasonlóságokat mutatott a vizsgált fehérjék (p-mTOR, p-Ser473-AKT, p-S6, p-4EBP-1, FASN, CPT1A, PKM2, LDHB, COX4) mennyisége (27. ábra).



27. ábra Metabolikus enzimexpressziós különbségek a 2D és 3D szferoid-tenyészetekben (függőcseppben vagy ultra-low attachment plate-ekben képződött szferoidok), illetve *in vivo* xenograft modellekben. A fenntartási és tenyésztési körülmények befolyásolják a ZR75.1 sejtek (2D és függőcsepp) és a xenograft (Xeno) tumorok fehérje-expressziós mintázatát. Bizonyos, az mTOR-aktivitáshoz köthető (p-mTOR, p-(Ser473)-AKT, p-S6, p-4EBP1) és egyes metabolikus enzimek (FASN – Fatty acid synthase, CPT1A - Carnitine palmitoyltransferase 1A, PKM2 – Pyruvate kinase M2, LDHB – Lactate dehydrogenase B, COX4 – Cytochrome c oxidase subunit 4) expresszióit WesTM Simple technikával vizsgáltuk (bal oldali ábrarész). A normalizált fehérje-expressziós különbségek elemzéséhez β-aktin normalizálást végeztünk (jobb oldali ábrarész) a WesTM Simple Compass for Simple Western program értékelésének segítségével. A 2D és a szferoid tenyészetek enzimexpressziós hasonlóságait és eltérését az *in vivo* ZR75.1 xenograft modellétől piros keret emeli ki.

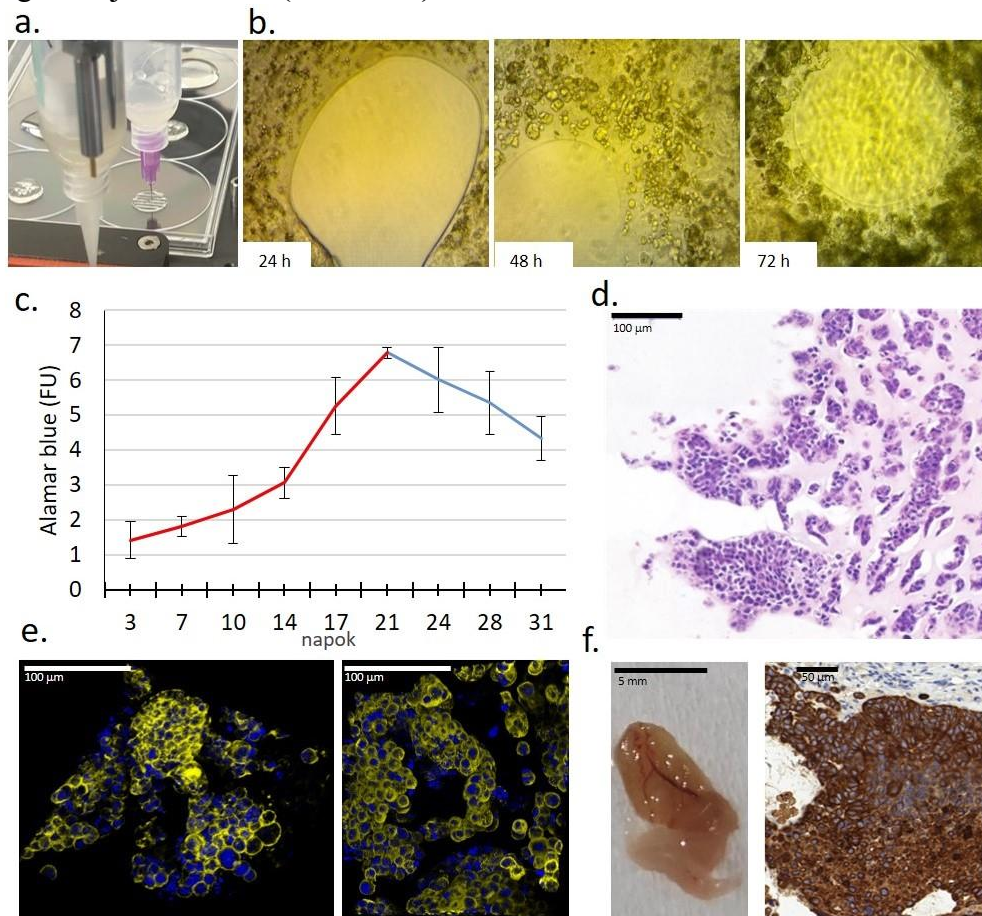
A legmagasabb mTOR-aktivitást a 3D szferoidokban detektáltuk. Az mTORC1- és mTORC2-komplex aktivitásban jellegzetes eltérést mutattak az *in vitro* és az *in vivo* modellrendszerek. Xenograft modellben az *in vivo* növekvő daganatsejtek magasabb mTOR-aktivitásra utalóan S6K aktivációt (p-S6) és csökkenő mTORC2-aktivitást (p-Ser473-AKT) mutattak. Azonban, az *in vitro* 2D és 3D sejtvonal modellrendszerekben, a magasabb mTOR-aktivitás (p-mTOR) az emelkedett mTORC2-komplex aktivitással állhat összefüggésben (p-Ser473-AKT), hiszen *in vitro* mTORC1-aktivitásra utaló foszforilált S6 kinázt nem vagy csak nagyon alacsony mennyiségben tudunk kimutatni, igaz a foszforilált 4EBP1 szintje relatíve magas maradt az *in vitro* 2D és 3D modelljeinkben. Más vizsgált metabolikus enzimexpressziók (pl.: FASN, CPT1A, PKM2 és LDHB) is sokkal nagyobb hasonlóságot mutattak a hagyományos 2D tenyészetek és a 3D szferoidok között, viszont jelentősen eltértek az *in vivo* növekvő daganatokban kimutatott expressziós eredményektől. Ezek a változások kiemelik a mikro környezet és a 3D-ben *in vivo* növekvő tumorok eltéréseit, amelyet a különböző modellekben megfigyeltünk a kiegyensúlyozott metabolikus tulajdonságokkal rendelkező ZR75.1 sejtek felhasználásával.

4.4 3D bionyomtatott *in vitro* szövetszerű ZR75.1 „tumorok” növekedési, morfológiai sajátosságainak jellemzői és hatóanyagérzékenysége

Az előbbi kísérleti eredményeink is megerősítik, hogy szükséges új *in vitro* modellek fejlesztése. Ehhez egy újfajta *in vitro* 3D tenyésztési módszert alakítottunk ki; 3D bionyomtatóval létrehozott szövetszerű struktúrákban (tumor szövetet reprezentáló – *tissue mimetic structure* – TMS) tanulmányoztuk *in vitro* a ZR75.1 sejtvonal növekedését, érzékenységét, összehasonlítottuk a TMS-ben növekvő tumorsejtek esetében tapasztalt rapamycin, doxiciklin és doxorubicin mono- és kombinációs kezelések hatásait a korábbi modellekben (2D sejtkultúra, 3D szferoidok, valamint *in vivo* xenograftok) kapott eredményekkel. A 3D bionyomtatott ZR75.1 sejtek időfüggő növekedését 3, 7, 10, illetve hosszabb tenyésztési idő mellett követtük (28. ábra c). A TMS-ek morfológiai sajátosságait a 3D bionyomtatás után közvetlenül vagy hosszabb, akár 10-14 nap tenyésztés után konfokális, illetve hagyományos patomorfológiai vizsgálatokkal is vizsgáltuk. A hematoxilin-eozin festés alapján a 10/14 napos TMS-ekből, a xenograft tumorokból, illetve hasonló típusú humán emlőtumorokból készült szöveti metszetek hasonló morfológiai jellegzetességeket mutatnak. A 3D bionyomtatást követően *in vitro*

tenyésztett TMS-ekben formálódó/kialakult luminális szerkezet kialakulását konfokális mikroszkópos felvételeinken is megfigyeltük (phalloidin és DAPI jelöléssel) (28. ábra d, e).

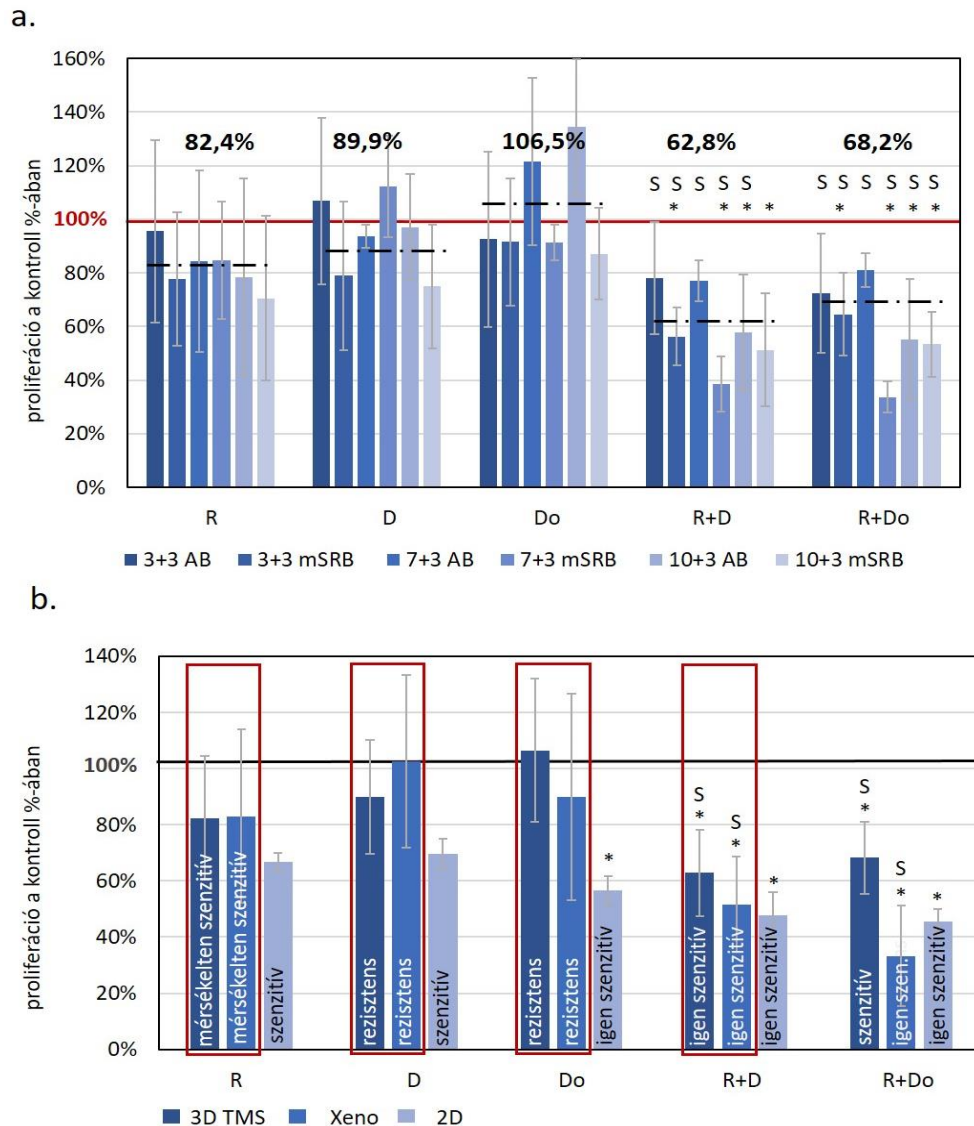
Vizsgáltuk a nyomtatott TMS-ek tumorigenitását is. A SCID egerekbe xenotranszplantált TMS-ek növekedésnek indultak és beereződtek. IHC festéssel (humán citokeratin ellenanyag) kimutattuk, hogy a TMS-ek 1-2 hetes *in vitro* fenntartás, majd xenotranszplantáció és hosszútávú *in vitro* növekedés után is megőrzik a TMS-ek humán emlődaganatsejt eredetüket (28. ábra f).



28. ábra A ZR75.1 humán emlőcarcinoma sejtvonal 3D bionyomatott szövetszerű modelljének jellegzetességei. a.) Két, egymástól függetlenül működő adagoló egység segítségével készültek el a 3D bionyomatott szövetszerű struktúrák (TMS-ek); b.) A ZR75.1 3D bionyomatott TMS-ekben növekedését inverz mikroszkóppal (Olympus CK-2) is monitoroztuk. Az ábrán bemutatott fotódokumentáció a tenyésztés/fenntartás 24., 48. és 72. órájában készült.; c.) A 3D bionyomatott TMS-ekben a ZR75.1 sejtek proliferációját, növekedési ütemét Alamar blue (AB) teszttel követtük. A TMS-ek fenntartásának első 3 hetében a sejtek szignifikáns növekedést mutattak, ezt a sejtek

emelkedő metabolikus aktivitása is igazolta (piros vonalrész); d.) A formalin-fixált, parafinba ágyazott 3D bionyomatott ZR75.1 TMS-ekből készült sejtek hematoxilin-eozin (H&E) festése. A méretskála az ábrán fel van tüntetve.; e.) A ZR75.1 sejt vonal 3D bionyomatott TMS-eiben *in vitro* tenyésztés mellett kialakult luminális struktúrákról konfokális mikroszkóppal (Leica Sp8 Lightning – LAS X Software) készült képei (festések: phalloidin – sárga és DAPI – kék). A bal ábrarészen a kontroll, míg a jobb oldalin a rapamycin + doxiciklin kombinációval kezelt TMS-ek láthatók. A méretskála az ábrán fel van tüntetve.; f.) Igazolni tudtuk a 3D bionyomatott ZR75.1 TMS-ek tumorigenitását. A képen egy beereződött *in vivo* növekvő 3D bionyomatott TMS látható (bal ábrarész), a jobb oldali ábra pedig az ebből a xenograftumorból készült metszet citokeratin festésének immunpozitivitását mutatja. 3,3'-diaminobenzidint (DAB – barna) kromogént és hematoxilin háttérfestést alkalmaztunk.

3, 7, illetve 10 napos *in vitro* fenntartás után a bionyomatott TMS-eken 72 órás kezeléseket végeztünk, és ezt összevettük az *in vivo* növekvő ZR75.1 xenograftok, valamint az ULA-plate-eken képződött szferoidsejtek érzékenységeivel. Az AB- és az SRB-tesztek igazolták, hogy a bionyomatott ZR75.1 TMS-ek rapamycin érzékenysége csökkent, és párhuzamosan doxiciklin és doxorubicin rezisztensnek bizonyultak, ahogy azt az *in vivo* kísérleteknél is megfigyeltük. Az elvégzett érzékenységi különbséget összehasonlító vizsgálataink alapján, a 3D bionyomatott *in vitro* TMS-ekben kapott érzékenységi vizsgálatok mutatták a legnagyobb hasonlóságot az *in vivo* körülményekhez **(29. ábra)**.



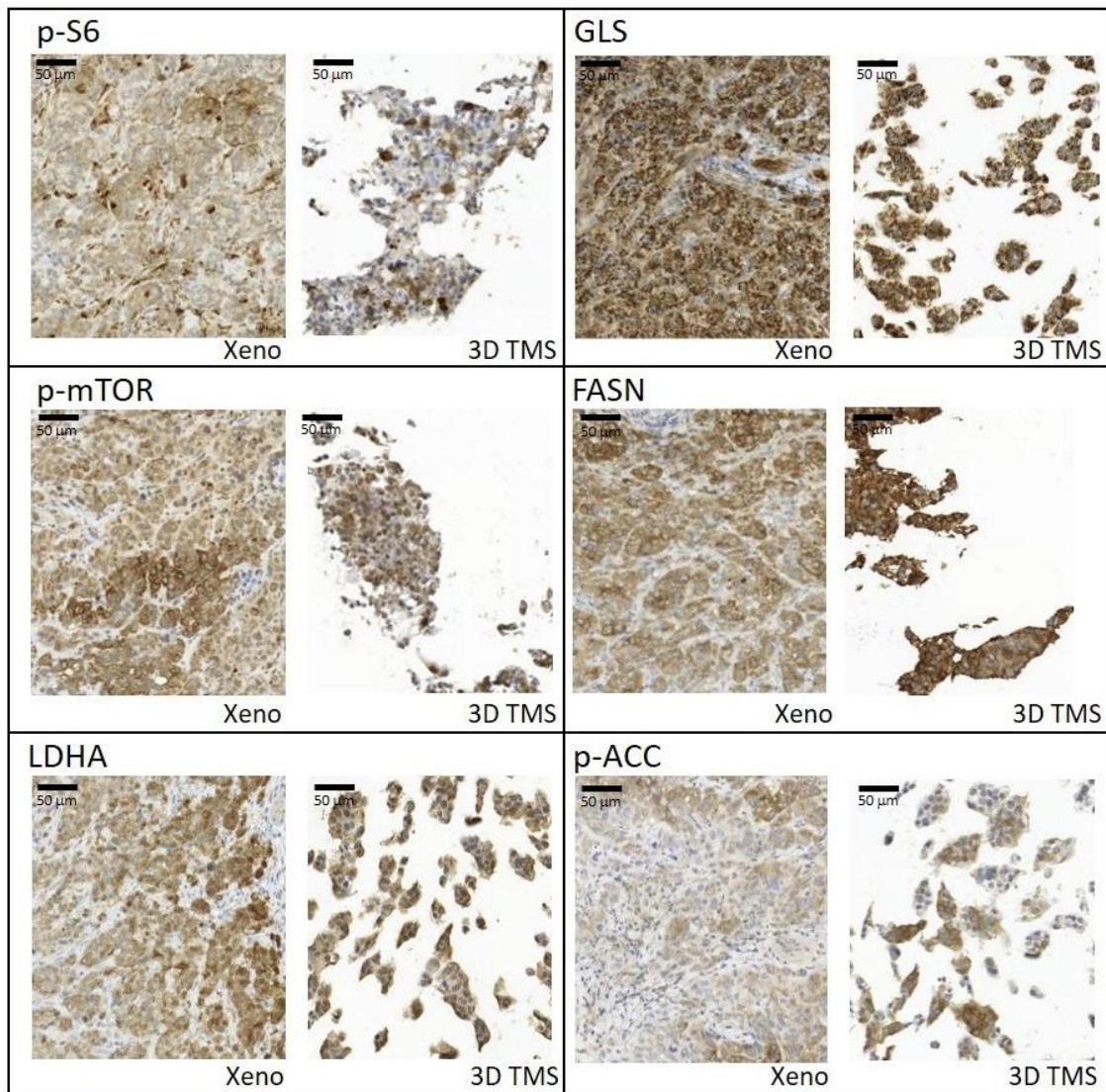
29. ábra A rapamycin, doxiciklin és a doxorubicin *in vitro* hatásai a ZR75.1 3D bonyomtatott szövetszerű struktúrákban (TMS-ek), jól reprezentálják az *in vivo* xenograft modell eredményeket. a.) Alamar blue (AB) és módosított szulforodamin B (mSRB) teszteket használtunk, a ZR75.1 sejtvonal 3D bonyomtatott TMS-ek rapamycin, doxiciklin és doxorubicin mono- és kombinációs kezelésekkkel szembeni érzékenységének követésére. A kezelési intervallum 72 óra volt, melyet megelőzött egy 3, 5, illetve 7 napos előtenyésztés (3 + 3; 7 + 3; 10 + 3 nap). A szaggatott vonalak a három különböző előtenyésztési és kezelési időintervallum kétféle proliferációs tesztjeinek (AB és SRB) a kontroll %-ában (a piros vonal a kontroll 100%-ot jelöli) kifejezett átlagát mutatják (a bemutatott vizsgálatokban 6-6 párhuzamossal dolgoztunk). (Co – kontroll; R – rapamycin, 50 ng/ml; D – doxiciklin, 10 μ M; Do – doxorubicin, 50 ng/ml); b.) A

ZR75.1 sejtvonal 3D bionyomatott, xenograft modelljeiben és 2D tenyészetekben kapott kezelési eredmények összehasonlító elemzését mutatja. A piros keret a ZR75.1 sejtvonal 3D bionyomatott TMS-ek (3D TMS) és a xenograftok (Xeno) érzékenységbeli hasonlóságait emeli ki. A kezeletlen kontroll sejtek proliferációjához viszonyítva a következőképpen határoztuk meg a kategóriákat: rezisztens ~90%; szenzitív 60-80%, valamint igen szenzitív sejtek <60%-os proliferációs értékek mellett. Co – kontroll; R – rapamycin/Rapamune, 50 ng/ml-3 mg/kg; D – doxiciklin, 10 µM-5 mg/kg; Do – doxorubicin, 50 ng/ml-2 mg/kg). Szinergista kombinációs hatást S-sel jelöltük (kombinációs index számítás alapján), * $p < 0,05$.

Azt is sikerült igazolnunk valamennyi ZR75.1 emlőcarcinoma modellrendszerünkben, hogy a rapamycin kombinációban alkalmazva mind a metabolikus, mind a kemoterápiás szerrel szemben érzékenyíti a sejteket.

Az eredményeink kiemelték a 3D bionyomatott szövetszerű struktúra (3D TMS) modell releváns eredményeit az *in vivo* eredményekkel összehasonlítva, amely egy jól használható *in vitro* modellre hívja fel a figyelmet.

A továbbiakban formalin-fixált, paraffinba ágyazott 3D bionyomatott TMS-ek és xenograftok mTOR-aktivitását jellemző marker és metabolikus fehérje immunfestéseinek *in situ* heterogenitását is megvizsgáltuk. Számos metabolikus fehérje-expressziós mintázata és ezek heterogén festődése a 3D bionyomatott és xenograft daganatmodellekben hasonló heterogenitást mutatott. Ezek a korábban leírt humán szövetekben tapasztaltakhoz hasonlóan bizonyultak, bár egyes esetekben azért megfigyeltünk eltéréseket a humán szövetekhez képest. A GLS és az ATPb intenzív homogén festődést mutatott a modell szövetekben, hasonlóan a humán szövetekhez, és a legtöbb metabolikus enzim (pl.: p-mTOR, FASN, p-ACC, p-S6) esetében visszaigazoltuk a modellekben is az intratumorális fehérje mennyiségi különbségeket (heterogén festődési mintázatot). Érdekes különbség azonban, hogy kísérleti modelljeinkben a metabolikus adaptációs mechanizmus tekintetében az LDHA magasabb heterogenitást eredményezett (3D bionyomatott TMS-ek és xenograftok), mint a reprezentatív betegmintákban (30. ábra).



30. ábra Metabolikus enzimexpresszió szöveti heterogenitásának megjelenése és hasonlósága ZR75.1 xenograft (Xeno) és a 3D bionyomtatott szövetszerű struktúrákban (3D TMS-ek). Anti-p-S6, -GLS, -p-mTOR, -FASN (Fatty acid synthase), -LDHA (Lactate dehydrogenase A) és -p-ACC (Acetyl-CoA carboxylase) immunfestések 3,3'-diaminobenzidín (DAB) (barna) kromogénnel és hematoxiniln háttérfestéssel. A méretekála az első ábrán került feltüntetésre.

5. Megbeszélés

Függetlenül a jelenlegi fejlesztésektől, daganatmegelőzési stratégiáktól és az alkalmazott terápiaiktól, még mindig a daganatos megbetegedések jelentik az egyik vezető halálokot világszerte. Az emlődaganatok következményeként bekövetkező halálozások a daganat okozta mortalitásnak ~6,9%-át adják [138]. Számos új terápiás megoldást alkalmaznak már jelenleg is, azonban a relapszusok és a metasztázisok magas száma is alátámasztja, hogy további és akár jobb targetek azonosítása szükséges az emlődaganatok kezelésében.

Az mTOR-komplexek központi szabályzó szereppel bírnak a jelátviteli hálózatban, ideértve a metabolikus átrendeződés folyamatait a tumorképződés során. Az mTOR-hiperaktivitás jellemző a daganatok jelentős részére, és sok esetben mértéke összefüggést mutat rosszabb prognózissal is [12,52]. A rapamycin analógokat (azaz a rapalógokat) többféle malignitás terápiás kezelése részeként alkalmazhatják (pl.: előrehaladott emlőtumorsejtekben is), de az eddig tesztelt rapalógok monoterápiában és az kombinációkban sem tudtak átütő sikert elérni [188].

Az egyre jobban megismerhetővé váló tumorevolúció, a tumorsejtek adaptációs mechanizmusai, az úgynevezett alvó/dormant/nyugvó sejtek jelenléte, valamint ezekkel összefüggésben a később kiújuló daganatok megjelenése hozzájárul a tumorprogresszióhoz [189,190]. A daganatsejtek speciális metabolikus szükségleteinek kielégítését, még kemoterápiás kezelések mellett is, segíthetik a metabolikus alkalmazkodási mechanizmusok, alternatív metabolikus útvonalak aktiválódása magas metabolikus plaszticitású, jelentős metabolikus heterogenitású daganatok esetében [190,191]. Az előbbieket segítő metabolikus folyamatok célzása, kezelőszer kombinációik alkalmazása új terápiás alternatívákat jelenhetnek az elkövetkező időszak terápiafejlesztési stratégiáiban [191,192]. Jelenleg is futó klinikai fázisvizsgálatokban például metformint/fenformint, glutamináz- és zsírsavanyagcserét gátló szereket, valamint autofágia indukálók/gátlókat is bevonnak, hogy a terápia közben a túlélő sejtekben aktiválódó bioenergetikai folyamatokat gátolják [128,193-195]. Ezek alkalmazásához, tervezéséhez azonban elengedhetetlen, hogy feltérképezzük a jelenlegi kezelések metabolikus következményeit és terápia rezisztenciával való összefüggéseit.

A célzott kezelések többsége (beleértve az EGFR- vagy más multikináz-gátlókat), hatással van az mTOR-kináz aktivitására (általában gátló hatású) és az ezzel összefüggő metabolikus eseményekre is. Az mTOR-gátlók csökkentik a glikolitikus aktivitást, a glutaminolízist és lipidszintézist is gátolják, míg serkentik a lipioxidációs folyamatokat direkt vagy indirekt módon is (adott gének regulációja, vagy pl.: kapcsolódó metabolikus enzimek fehérjeszintézisének gátlásán keresztül) [12,196,197]. A változások csökkenthetik a daganatsejtek proliferációját, de elősegíthetik, hogy a sejtek az extracelluláris környezet függvényében egy sokkal rezisztensebb, nyugvó állapotba kerüljenek minimális energiafelhasználással biztosítva a sejtek túlélését. Ilyen esetekben a kezelést túlélő sejtekben autofágiás folyamatok is beindulhatnak, amely egy tranzien bioenergetikai adaptációs mechanizmus [198]. Számos szabályozott sejtpusztulással járó mechanizmust is leírtak, azonban az autofágia indukálta kezelések korai vagy késő hatásaként. Amíg az apoptózis, a nekrozis és a nekroptózis eredendően közvetlen sejthalálformának tekinthető, addig az autofágia felfogható egy ideiglenes túlélési mechanizmusnak is. A határ az autofágiafüggő és a más típusú sejthalál-mechanizmusok között nem éles, így az autofágiának főleg kontextusfüggő szerepe van [199-201].

Az mTOR-inhibitorok indukálják az autofágiát, amely az autofagoszómák mennyiségi növekedésével társul, de a krónikus kezelés sejthalált is okozhat a daganatsejtekben. Jól ismert, hogy az autofágia szabályozása az aktuálisan elérhető/hozzáférhető tápanyagok és az mTOR-jelút szabályozása, kontrollja alatt van [202]. Ezeket figyelembe véve, az mTOR-aktivitás gátolja az autofágiát, míg az mTOR-gátlás szerepet játszhat az autofágiafüggő túlélésben, de az autofágiafüggő sejthalál bekövetkezésében is [203]. Az autofágiafüggő sejthalál-mechanizmusok még kevésbé jellemzettek a tumorbiológiai kutatásokban.

Korábbi mTOR-gátlással kapcsolatos *in vitro* kísérleteinkben leírtuk, hogy bizonyos kemoterápiás szerek rapalóg kombinációi érzékenyíthetik a kezelt sejteket [79,204,205]. Bizonyos antibiotikumoknak, köztük a doxiciklinnek is ismertek úgynevezett *off-target* hatásai a mitokondrium biogenezis gátló hatásaikon keresztül, így potenciális daganatellenes hatásaik lehetnek. Az antimikrobiális gyógyszerek ezek alapján konvencionális kemoterápiával vagy célzott terápiával kombinálva a klinikai gyakorlatban terápiás előnyt nyújthatnak, mellékhatásaik pedig kevésbé súlyosak [206-208].

Korábban munkacsoportunk leírta gliomamodellekben, hogy a doxiciklin hatása szinergizál a rapamycinnel, illetve a temozolomiddal kombinációban [79]. Jelen kísérleteinkben kimutattuk, hogy a rapamycin + doxiciklin kombináció a legkülönbözőbb szolid tumorokban tumornövekedés-gátló hatású, illetve jellemeztük hatását *in vitro* és *in vivo* sejtvonallal modelljeinkben. Eredményeink kiemelik, hogy különböző metabolikus útvonalak együttes gátlása szignifikánsan csökkentheti a tumornövekedést *in vitro* és *in vivo* is.

Az mTOR-gátlás glikolízist, glutaminolízist és a lipidmetabolizmust gátló hatásait [12,209] kombinálva mitokondriális funkciógátlással széles spektrumú metabolikus gátlást hozhatunk létre, amely meggátolhatja a metabolikus adaptációs lehetőségeket, hosszabbtávon a sejtek pusztulását is előidézve. A rapamycin + doxiciklin kombinációs kísérleteink eredményei is alátámasztják ezt a lehetőséget. Több mint 50%-os proliferáció csökkenést mutattunk ki a vizsgált szolid daganateredetű sejtvonalak kétharmadában.

A kombinációs terápiák metabolikus következményi egyre jobban ismertek nemcsak a tumorsejtekben, a teljes szervezetben és a betegekben is [210,211]. Számos mTOR-inhibitor kombinációs vizsgálat és klinikai fázisvizsgálat van folyamatban [212-215], ezek sikerei még egyelőre nem jelentősek, hiszen ahogy saját eredményünk is mutatta a daganatnövekedést újra beindíthatják a kezelést túlélő sejtek az inkább citosztatikus mintsem citotoxikus hatású kezeléseket esetében [198,216]. Egyre több bizonyíték van azonban arra is, hogy mTOR-inhibitorok kemoterápiás szer kombinációi (pl.: ciszplatinnal), kemoterápiás dózis csökkentése mellett további előnyökkel is járhatnak pl.: emlőtumorok esetében is [216-219].

Ezeket az elképzeléseket támogatják azok az eredmények, amelyek a különböző kemoterápiás kezeléseket sejt szintű metabolikus átrendeződéseit, metabolikus változásait jellemzik. Ilyen esetekben autofágia, OXPHOS-átrendeződések, Warburg-effektus, reverz Warburg-effektus terápia-, illetve sejt típusfüggő módon jelenhet meg [220,221]. Példaként, a doxorubicin DNS-károsodást és következményként apoptózist eredményez, ezzel egyidőben pedig metabolizmus-interferáló hatásai is vannak. Előbbiek mellett alternatívaként felmerülhet metabolikus inhibitorok kombinációban való alkalmazása is, OXPHOS vagy glikolízis folyamatainak egyidejű célzása, amely hozzájárulhat előrehaladott emlőtumorok terápia érzékenyítéséhez/szenzitizálásához is [222-224]. A mitokondriális bioenergetikai folyamatok célzása korábban is felmerült összefüggésben

a dormant (alvó), összejszerű fenotípusok kimutatásával és ezekben a sejtekben jellemzett citrátköri aktivációval kapcsolatban is [128]. Több eredmény igazolta például bizonyos antibiotikumok gátló hatásait a dormant emlőtumorsejtek túlélésében, metabolikus aktivitásában [225].

A rapamycin + doxiciklin kezelés hatását korábban TSC2 KO vesetumormodelleken tesztelték, a kutatócsoportunk ezt a kombinációt vizsgálta glioma modellekben más rapalógok mellett [79], majd PhD-munkámban a rapamycin + doxiciklin kombináció tumornövekedés-gátló hatását több különböző carcinomában igazoltam. Ennek jelentőségét megerősítik azok a klinikai adatok, amely szerint az antibiotikumok (pl.: doxiciklin) alkalomszerű terápiás használata emlőtumrok kezelése közben meghosszabbíthatja betegek túlélését [47]. Bár az is igaz, hogy egyes mikrobiom-vizsgálatához köthető tanulmányok felhívják a figyelmet arra is, hogy az antibiotikumok használata hozzájárul a mikrobiom diverzitásának csökkenéséhez, amelynek negatív hatása is lehet a tumorprogresszióra [226]. *In vitro* és *in vivo* eredményeink megerősítik a folyamatos/periodikus antibiotikumhasználat jelentőségét, az antibiotikumok használata kiegészítő terápiás alternatíva is lehet, de a mellékhatások és a túlélési előnyök mérlegelése mindenképpen szükséges.

Munkámban elsőként végeztünk részletes elemzést a rapamycin + doxiciklin kombináció antitumorális hatásával kapcsolatban humán emlőcarcinoma modellekben. Az antitumorális hatás csökkenő mTOR-aktivitással és proliferációgátlással jellemezhető. Bár a doxiciklin önmagában nem befolyásolta jelentősen az mTOR-aktivitást, a doxiciklin kombináció gyakorlatilag eliminálta az mTORC1- és mTORC2-aktivitását (a p-S6 és a p-AKT nem volt detektálható WesTM Simple technikával). Ezzel összefüggésben megnövekedett az autofág vakuólumok mennyisége a sejtekben a doxiciklin mono- vagy kombinációs kezelést követően. 72 és 96 órás *in vitro* kezelések során nem tudtunk kimutatni sem apoptózist, sem nekrozist vagy nekroptózist. A hatások hosszabb távú következményeként sejthalál-mechanizmusok aktiválódhattak, elsősorban a kombinációs kezeléseknél, ahol a folyamatos hosszútávú kezelés a sejtkultúra kipusztulásához vezetett. A rapamycin ilyen hosszútávú kezelést követő sejthalál-indukáló hatásait más kombinációkban is leírták [219]. A doxiciklin OXPHOS-mechanizmusokat gátló hatásaira alapozott, más terápiás kombinációk, hasonló toxikus

hatását korábban hangsúlyozták OXPHOS-függő *mammosphere* kultúrákban emlőcarcinoma őssejtek esetében is [225].

Az autofágiafüggő sejthalál jellegzetességei közül a rapamycin + doxiciklin kezelés után *in vitro* és az *in vivo* modelljeinkben megfigyeltük: 1) az autofág vakuólumok felhalmozódását a pusztuló sejtekben apoptózis vagy nekrozis jelei nélkül; 2) az LC3-II és a p62 vagy más autofágia fluxot igazoló fehérjeszintjeinek dinamikus változását; 3) a patofiziológiás éhezés stimulusra adott választ (mTOR-gátlás következményeinek igazolása); illetve 4) az autofágiafüggő sejthalál-mechanizmusokhoz köthető morfológiai változások közül a mitokondrium dezintegrációját [199,201,227] is. Kimutattuk a mitokondriummassza deplécióját autofagoszómákban, amely a mitofágia (mitokondriális degradáció) jele. Hasonlóan ehhez, más kísérletekben is leírták, hogy más metabolikus stressz kiváltotta gátlások, számos bioenergetikai mechanizmus blokkolása – gátolva a metabolikus adaptációt – aktiválhat mitofágiát [228], sejtpusztulást daganatsejtekben. Vizsgálatainkban az alkalmazott antibiotikumkezelés metabolikus összeomlást (katasztrófát) eredményezett azokban a sejtekben, amelyek így nem tudtak OXPHOS-ra váltani, a mitokondriumok repopulációjának hiányában (gátolt mitokondrium biogenezis).

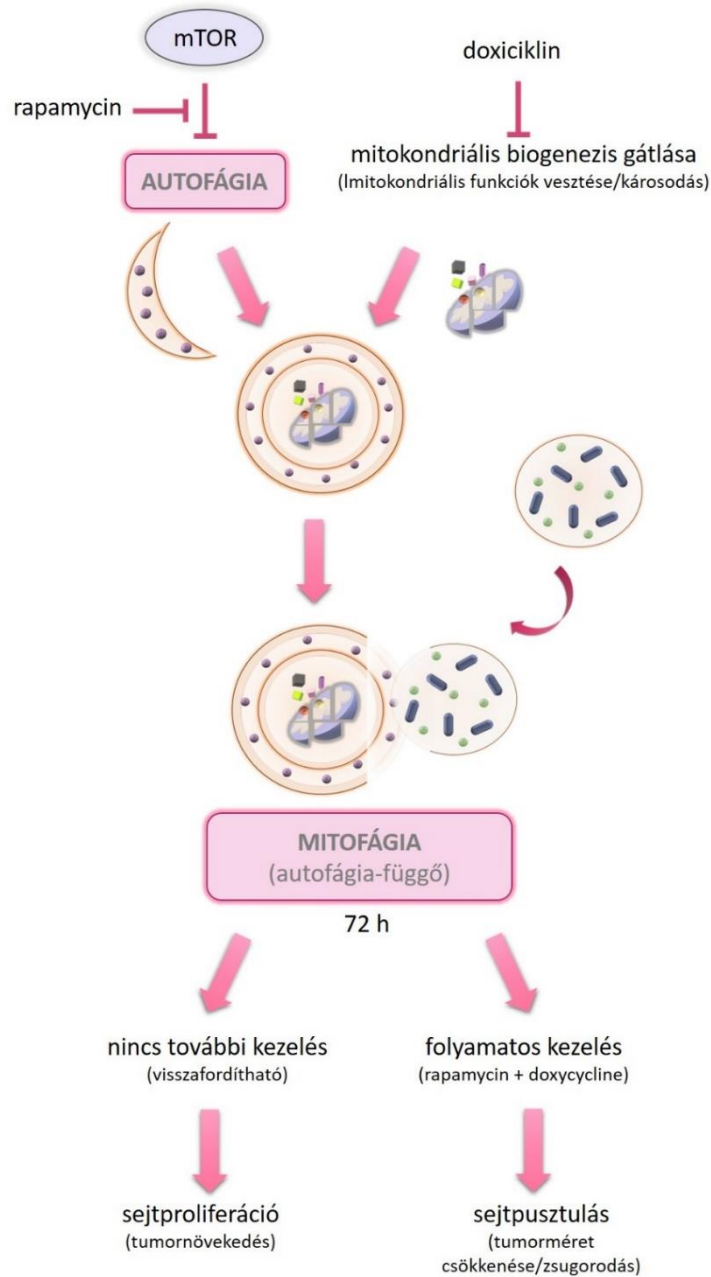
Nem elhanyagolható azonban, hogy számos daganat esetén leírták – típustól függően –, hogy az autofágia és a mitofágia indukálta mitokondrium degradáció és a metabolikus prekursorok újrahasznosítása védelmet is nyújthat a sejthalál ellen [229,230]. Emiatt fontos, hogy a rövidtávú kezeléseink és az *in vivo* alkalmazott kezelőszer megvonásos eredményeink azt mutatták, hogy elsősorban a folyamatos, hosszabb kezeléseknél lehet valódi *in vivo* tumornövekedés gátló, tumorpusztító szerepe az ilyen antimetabolikus kezelések esetében.

A mitokondriumok számának és minőségének szabályozása komplex folyamat, amelyet a hipoxia, a metabolikus stressz, valamint a mitokondriális károsodás is befolyásolni képes – ide értve a depolarizációt, mitokondrium fúziót/fragmentációt- (*fission*), a mitobiogenezist és a mitofágiát. Az mTOR-inaktiváció és a csökkent AMPK-aktiváció közvetlenül képes mitofágiát aktiválni [231]. Bár a nem szelektív autofágia, beleértve a mitofágiát is, összetett folyamat, és a szerepe tumortípustól és stádiumtól is függő módon változik [232-234]. Eredményeink alapján a rapamycin + doxiciklin kezelés

autofágiát és autofagoszóma eredetű mitokondrium szekvesztrációt indukál, valamint elősegíti a végső autolizoszomális mitokondrium degradációt, vagyis a mitofágiát.

Jelen vizsgálatokban a kimutatott autofágiafüggő mitofágia egy speciális sejtpusztulási mechanizmus a metabolikus szabályozásában felborult (metabolikusan összeomlott), degradálódott károsodott mitokondriummal rendelkező sejtek esetében, mivel az mTOR-gátlás és mitokondrium biogenezis gátlása mellett a sejtek nem képesek a mitokondriumaik regenerációjára [235]. Mások és saját eredményeink a terápia indukálta szelektív autofágia folyamatával kapcsolatban a tumorprogresszió esetén azt sugallják, hogy az ilyen metabolikus kombinációk (a mitokondriális funkciók és az mTOR-útvonal együttes célzása) új, metabolikus katasztrófát előidéző terápiás stratégiát jelenthetnek. Ezzel összefüggésben a mitokondriális folyamatok, valamint az mTOR-útvonal kombinált gátlása, a terápia indukálta szelektív autofágia, új terápiás stratégia lehet **(31. ábra)**.

Kísérleti eredményeink alapján javasolhatók, más antimetabolikus kezelőszer kombinációk is, de fontos szem előtt tartani, hogy minden daganatszövetre jellemző lehet a metabolikus heterogenitás, az összetett metabolikus szimbiózis. A háttérben zajló mechanizmusok feltárása segíthet a metabolikus adaptációs mechanizmusok célzásában, a terápia rezisztencia áttörésében, régi és az új gyógyszerjelöltek és kombinációk alkalmazásában a jövőben.



31. ábra A rapamycin és a doxiciklin autofágia-függő mitofágiát indukált ZR75.1 humán emlőcarcinoma sejtekben. A vázlatos ábra a rapamycin + doxiciklin kombinációs kezelés hatásmechanizmusát mutatja be. Eredményeink alapján a rapamycin + doxiciklin kezelés autofágiát indukált, következtében az autofagoszómák mitokondriumokkal fuzionáltak 72 órás *in vitro* kezeléseink során – amely mitofágiára és autolizoszomális degradációs folyamatokra utal. A tumor méretének szignifikáns csökkenését is megfigyeltük 3 hetes folyamatos *in vivo* kezelés után, míg ezzel szemben a kezelőszerek megvonása az ismételt tumornövekedéshez vezetett.

Az *in vitro* és *in vivo* kísérleti eredményeink, a kezelések megvonását követően megjelent reverzibilis daganatprogresszió és a gyakran kialakuló relapszusok, terápiarezisztencia felhívta figyelmünket a magas intratumorális szöveti heterogenitás jelentőségére, amelyet számos tanulmány jelenleg is hangsúlyoz [135,236]. Ezzel összefüggésben, vizsgálatainkban humán emlőcarcinomákban igazoltuk, hogy az mTOR-aktivitás mellett, a legkülönbözőbb metabolikus fehérjék mennyisége jelentős *in situ* heterogenitást mutat a szövetekben. Ez a heterogenitás az *in vitro* modellekben, nem vagy csak alig jelenhet meg. Ez is magyarázhatja, hogy a technológiai fejlesztések ellenére a potenciális gyógyszerjelölt hatóanyagok közül kevesebb mint 10% az, mely állatkísérleti modellek után klinikai fázisvizsgálatba léphet, és még kisebb azok aránya (~3%), amelyet a fázisvizsgálatok eredményei alapján törzkönyvezhetnek [236-238]. A hagyományos 2D sejttenyésztési modellek ugyan jelentősen hozzájárulnak a daganatkutatás és a terápiás szerek fejlesztéséhez, azonban a 3D szöveti környezet hiánya korlátozza a szöveti heterogenitás vizsgálatának és figyelembe vételének lehetőségét. Természetesen használunk állatmodelleket is (pl.: egér, patkány tumorigenezis modellek vagy xenograftok létrehozása SCID egerekben), beleértve a génmanipulált egereket is [239]. Ezekben a daganatfejlődés és progresszió már megjelenik és adott a 3D szöveti környezet is, de ezek vagy nem humán tumorsejtek vagy hiányzik a humán mikrokörnyezet. Számos humán emlőcarcinoma sejtvonal, illetve primer izolált emlődaganatsejtek is felhasználhatók *in vitro* kísérletekben. Reneszánszukat élük a 3D tenyészetek, megjelentek az organoidok és 3D bionyomtatott modellek [157,240,241]. Utóbbiak, az organoidok és a 3D modellek esetében azonban a standardizáció és egyéb tényezők hiánya korlátozza a kísérletek reprodukálhatóságát és a módszerek validálását. Az új preklinikai rendszerek részletes jellemzése, karakterizálása és optimalizálása elengedhetetlen. Hiányoznak azok a tanulmányok, amelyek a különböző modellrendszereket hasonlítják össze ugyanazon sejtvonal segítségével [242]. Munkám másik részében egy humán emlőcarcinoma sejtvonal, a ZR75.1 jellegzetességeit, proliferációját és szenzitivitását, a korábban leírt rapamycin szenzitiváló hatásait vizsgáltuk *in vitro* hagyományos 2D, többféle 3D sejttenyészetekben, 3D bionyomtatással létrehozott szövetszerű struktúrában, illetve *in vivo* körülmények között. Előbbi modellekben elsőként végeztünk összehasonlító vizsgálatokat – vizsgáltuk a sejtek, vagy szövetek morfológiáját, különböző hatóanyagok mono- és kombinációs

kezeléseinek hatását, továbbá a fehérje-expresszió különbségeket, illetve immunfestések segítségével a metabolikus enzim expressziós mintázatok szöveti heterogenitását. Eredményeink alapján, a 3D bionyomtatott TMS modell áll legközelebb az *in vivo* egérmodellekben növekvő tumorokhoz és így a humán szövetekhez. Az általunk bevezetett 3D bionyomtatás protokollja és a létrehozott TMS-ek megfelelő alternatív megoldást adhatnak a hagyományos 2D és 3D tenyésztési eljárások mellett, lehetőséget teremtve bizonyos állatkísérletek helyettesítésére, az állatkísérletek számának csökkentésére. Beállítottunk többféle módszert a sejtek biológiai aktivitásának monitorozásához, morfológiai jellemzésekhez, az élő/pusztult sejtarány, a sejttartalom, illetve a sejtszintű metabolikus aktivitás meghatározásához. A TMS-ek tumorigén képességének igazolásához a nyomtatott modelleket SCID egerekbe implantáltuk, majd folyamatosan regisztráltuk a tumor *in vivo* növekedését. A kísérleti modellünk alkalmasnak bizonyult gyógyszerhatóanyag-tesztekhez, molekuláris és patomorfológiai célú vizsgálatokhoz.

Mások is hoztak már létre 3D szferoid és biofabrikációval készített 3D modellt emlőcarcinoma sejtekkel is. A legtöbb ilyen vizsgálat, a kevésbé agresszív MCF7 (luminal A) sejtvonalat vagy pár, a tripla negatív szubtypusba sorolható sejtvonalat (MDA-MB-231 vagy MDA-MB-468) helyezi a kutatás fókuszába [243-248]. A mi vizsgálataink középpontjában egy luminal B molekuláris szubtypusú humán emlőcarcinoma sejtvonal, a ZR75.1 volt. A modellsejtvonal kiválasztásának főbb szempontjai a sejtvonal lumenformáló képessége és agresszívebb fenotípusa, illetve a korábbi vizsgálatainkból ismert szenzitivitási és metabolikus jellegzetességei voltak (kiegyensúlyozott metabolikus fenotípusú sejtvonal). Kísérleti körülményeink mellett a 3D bionyomtatott modellrendszerünkben igazolni tudtuk, a sejt-sejt kapcsolatok kialakulását, a lumenformálást és a vizsgált fehérjék mintázatának alapján a szövetszerű heterogenitás megjelenését is.

A biofabrikációs eljárással létrehozott biokompatibilis *in vitro* környezet (életképes és proliferáló sejtek biztosítása) kialakításakor több lényeges kritériumnak meg kell felelni, így az alkalmazott biotinta összetétele és a nyomtatást követő további lépések körültekintő előkészítést és tervezést igényelnek. Különböző szferoid és scaffold nyomtatások alkalmával igen változatos összetételű hidrogéleket alkalmaznak biotintaként [249,250]. Előzetes kísérleteinknek megfelelően, figyelembe véve mások 3D

szferoidok bionyomtatással kapcsolatos úttörő munkáit, kutatócsoportunk is alginátalapú hidrogélt választott az emlőcarcinoma sejtek biotinta alapanyagaként [243,246,248]. Az alginátalapú biotinta előnyös választás a humán eredetű sejtekkel való bionyomtatáshoz, mivel a hidrogél stabilizálásához a keresztkötések kialakításához CaCl_2 -oldatot használunk elkerülve más biotinták polimerizációjához használt sejtkárosító behatásokat pl.: UV-vel történő keresztkötés a GelMA hidrogélek esetében [251].

Emlőcarcinoma sejtekből létrehozott 3D bionyomtatott szferoidtenyészetekben a szferoidok növekedési jellemzőit, méreteloszlását és különböző tesztekkel az élő/elpusztult sejtek arányát jellemezték [252], de ezekben szövetszerű struktúrák kialakítására nem törekedtek. Más vizsgálatokban, egyes fehérjék expresszióváltozásait jellemezték (pl.: MMP, EMT, őssejt markerek, integrinek, sejt-sejt kapcsolatok) vagy bizonyos gyógyszerekkel (pl.: doxorubicin, paclitaxel, 5-FU) szembeni érzékenységi vizsgálatokat végeztek [243,253-255]. Meglepő, de eddig csak a 2D és a 3D *in vitro* rendszerek pontosabb széleskörű összehasonlító vizsgálatait végezték el. Bizonyos emlőcarcinoma sejtvonalak esetén leírták, hogy például a doxorubicin-érzékenység vagy nem változott vagy csökkent a 3D tenyésztési körülmények mellett [24,247,254,256-258]. Ezen eltérések hátterében állhatnak az alkalmazott proliferációs/viabilitási tesztek különbségei, a választott sejtípusok egyedi különbségei, a 3D tenyésztési technikák eltérései is. Gyógyszerérzékenységi vizsgálatokban a viabilitási tesztek használata nagy körültekintést igényel, az élő és pusztult sejtek arányának calceinnel és/vagy PI-festéssel végezhető meghatározásakor pl.: az multidrog resistance (MDR)-transzporterek expressziójának változásai is torzíthatják az eredményeket (az MDR egyik szubsztrátja lehet a calcein is) [259]. Vizsgálatainkban ezért a proliferációval arányos változások közül metabolikus aktivitás alapú és összfehérje méréseket is beállítottunk. A kétféle teszt együttes alkalmazásával törekedtünk arra, hogy kiküszöböljük az egyetlen tesztrendszer alkalmazásából és annak korlátaiból eredő esetlegesen félrevezető értelmezés lehetőségét (pl.: a potenciális metabolikus adaptációs mechanizmusok torzító hatásai – AB, MTT; illetve a kísérletben elpusztult sejtek fehérjetartalmának az összfehérjetartalomba való mérése – SRB esetén).

A vizsgálatunk újszerűsége, hogy ugyanazon sejtvonallal felhasználásával, a ZR75.1 modellekben hasonlítottuk össze a 2D tenyészeteket, a 3D szferoidokat, a 3D bionyomtatott TMS-ek *in vitro* és ezzel egyidejűleg az *in vivo* xenograftok tumorsejt populációt is

számos tekintetben, beleértve a hatóanyagokkal szembeni érzékenységet és bizonyos metabolikus fehérjék expresszióit és *in situ* eloszlását (expressziós mintázatát). Összehasonlító elemzéseink alapján, a 3D bonyomtatott TMS modell mutatta a legnagyobb fokú hasonlóságot az *in vivo* körülményekhez. A doxorubicin mellett, az mTOR-gátló rapamycin, valamint a mitokondriális biogenezis gátló antibiotikum, a doxiciklin és kombinációik hatásait is teszteltük a korábbi rapamycin + doxiciklin hatásmechanizmus vizsgálatainkat ezzel kiegészítve. Az *in vivo* monoterápiás kezeléseknél kimutatott rezisztenciát 3D bonyomtatott TMS-ekben is tapasztaltuk, de a 2D és 3D szferoid tenyészetek jóval érzékenyebbeknek bizonyultak kísérleteinkben. A rapamycin és a doxiciklin metabolikus átrendeződést indukálhat, mindez – figyelembe véve, hogy a 3D struktúrák metabolikus folyamatai esetében jelentős változásokat figyelhetünk meg – részben magyarázhatja az adott expressziós és érzékenységi különbségeket [260,261]. Más vizsgálatok és eredmények is kiemelik, hogy szükségszerű a 3D tenyésztési rendszerek vagy az *in vivo* modellek alkalmazása az mTOR-gátlás vagy egyéb sejtszintű metabolikus szabályozási mechanizmusok hatásainak vizsgálatához [262,263].

A bemutatott kvantitatív összehasonlító fehérje-expressziós vizsgálatunk során a 2D és a 3D szferoidtenyészetek nagyobb mértékű metabolikus hasonlóságát igazolták a WesTM Simple eredmények és ez jelentősen eltért a xenograft modellekben tapasztaltakhoz képest. A xenograft és 3D bonyomtatott struktúrák esetében a szöveti metabolikus enzim expressziós mintázatok összehasonlítására volt lehetőségünk, a vizsgált metabolikus fehérjék többségében a xenograftokhoz, illetve a humán tumorokhoz hasonló *in situ* „szöveti” metabolikus heterogenitást is sikerült igazolnunk.

Összefoglalva elmondható, hogy 3D bonyomtatással olyan új, szövetszerű *in vitro* daganatmodellek hozhatók létre, amelyek jelentősen közelebb állnak az *in vivo* növekvő tumorszövetekhez.

Vitathatatlan tény, hogy a monolayer, 3D sejt kultúrák nagyban hozzájárultak bizonyos alap sejtbiológiai ismertekhez és igen fontos kísérleti modellrendszert nyújtanak ahhoz, hogy az alapvető intracelluláris folyamatokat megismerjük, akár (részben) megértsük. A terápia rezisztencia kialakulásában és a daganat progresszióban azonban rendkívül összetett mechanizmusok játszanak szerepet. A bemutatott új 3D bonyomtatással készült modellek lehetőséget adnak arra, hogy előbbieket 3D

környezetben vizsgáljuk. A várhatóan hamarosan megjelenő 3D bionyomtatással kombinált *patient-derived* xenograft modellek rövid és hosszabb időtávú *in vitro* tenyésztéshez alkalmas új precíziós daganatmodellek létrehozását segíthetik. Hasonló vizsgálatokat több kutatócsoport kezdett, melyek során fejlesztik a sejtizolálási technikákat, optimalizálják a biotintákat és a nyomtatási protokollokat, valamint vizsgálják a nyomtatott struktúrák fenntartásának lehetőségeit, illetve esetleg még komplexebb többsejtes modellek kialakításának lehetőségét is [264-266]. Utóbbi, a *tissue engineering* (szöveti mérnökség), egy olyan kutatási irány, amely alkalmazása esetében nemcsak daganatsejteket és más nem daganatos (normál) sejteket (pl.: *cancer-associated fibroblastok*, erek, adipociák) alkalmaznak, hanem úgynevezett *organ-on-chip* és mikrofluidikai módszerekkel kombinálják ezeket. Ezek a rendszerek egyre komplexebb tumormodellek kialakítására adhatnak lehetőséget több daganattípus esetében is, pl.: colon, emlő- és tüdődaganatok, gliomák, illetve osteosarcomák [242,267-271]. Előbbiekhez hasonlóan a daganatprogresszió komplexitásának modellezése, különös tekintettel a metasztázisképződésre, számos módszer kombinálását igényli mint például a mikrofluidika és az *in vitro* modellrendszerek kombinálása [267,272-274]. *Moccia* és *Haase* foglalta össze azokat a folyamatosan fejlődő ismereteket és eszközöket, módszereket és lehetőségeket, amelyeket sokkal összetettebb emlődaganatmodellek kialakításához és tanulmányozásához használhatunk fel a jövőben [275,276]. Ezek és más típusú modellek felhasználása fontos lehet számos orvosi biológiai kutatásban, így a daganatkutatásban is az elkövetkező években.

A vizsgálatainkban bevezetett és kialakított 3D bionyomtatott humán emlőcarcinoma szövetszerű kultúrák nagy előrelépést jelenthetnek, mert jobban reprezentálják az *in vivo* környezeti feltételeket, így alkalmasak daganatbiológiai vizsgálatokhoz és gyógyszerhatóanyag-tesztekhez is. Nem elhanyagolható, főleg saját tumormetabolizmus vizsgálataink esetében, hogy: a.) ezek a 3D bionyomtatott tenyészetek jobban reprezentálják a tumorok, tumorszövetek metabolikus jellegzetességeit, heterogenitását, b.) bennük a dolgozatban részleteiben tanulmányozott és jellemzett, potenciális klinikai jelentőségű rapamycin + doxiciklin kezelések hatásai pontosabban jellemezhetők. Az ilyen és hasonló 3D bionyomtatott daganatszövetszerű struktúrák, és a sejtnyomtatás kombinálása, fejlesztései további biofabrikációs megoldásokkal segíthetik új, *patient-derived* gyógyszerterveztek kialakítását, valamint a

hatékonyabb alapkutatási, daganatterápiás target kiválasztási és hatóanyag preszelekciós eljárások és fejlesztések megjelenését, így az állatkísérletek és a sikertelen klinikai fázisvizsgálatok számának csökkentését a jövőben.

6. Következtetések

- I. A rapamycin + doxiciklin kombinációs kezelés szignifikánsan gátolja a vizsgált humán daganatsejtvonalak kétharmadának *in vitro* növekedését.
- II. A rövidtávú rapamycin + doxiciklin kezelés hatása ugyan visszafordítható, a folyamatos hosszútávú kezelések azonban rendkívül hatásosnak humán emlőcarcinoma *in vitro* és *in vivo* modellekben.
- III. A rapamycin + doxiciklin kezelés nekrozis, apoptózis és nekroptózis független autofágiafüggő sejthalálformát, mitofágiát indukált a ZR75.1 humán emlőcarcinoma sejtekben.
- IV. A 3D bionyomtatással szövetszerű *in vitro* modellt alakítottunk ki ZR75.1 sejtekkel, amely alkalmas daganatmodell kísérletekre.
- V. A ZR75.1 humán emlőcarcinoma sejtvonalmodellek (hagyományos 2D, kétféle 3D szferoidmodellek, 3D bionyomtatott tenyészetek és *in vivo* xenograftok), jellegzetességeit összehasonlítva a 3D bionyomtatott *in vitro* modellek jellegzetességei állnak a legközelebb az *in vivo* ZR75.1 humán emlőcarcinoma xenograftmodellhez.
- VI. A rapamycin kombinációs kezelések jelentős mértékben fokozták a tumornövekedést gátló hatásokat, segítették a rezisztenciamechanizmusok felfüggesztését valamennyi vizsgált ZR75.1 emlőcarcinoma modellrendszerben.

7. Összefoglalás

A daganatnövekedés, progresszió és terápia közben bekövetkező metabolikus változások, az anyagcsere-folyamatok átprogramozása elősegíti a terápiarezisztencia kialakulását. Munkámban humán daganatsejtvonalakban és többféle *in vitro* és *in vivo* modellrendszerben vizsgáltuk mTOR-alapú kombinációs kezelések, köztük részletesebben a rapamycin + doxiciklin tumornövekedést gátló hatásait, az mTOR-aktivitást, az autofágiát és más metabolikus folyamatokat befolyásoló szerepét.

Hagyományos 2D, 3D mellett, 3D bonyomtatott *in vitro* tenyészetekkel és *in vivo* xenograft modellekkel dolgoztunk. A proliferáció gátlást, egyes sejthalál-folyamatokat, azok morfológiai következményeit és jelentőségét többféle teszttel, áramlási citometriával, kombinált inhibitor kezelésekkel, míg a fehérje szintű változásokat Western blottal, WesTM Simple technikával, immunfestésekkel vizsgáltuk. A sejthalál következtében kialakult morfológiai változásokat transzmissziós elektronmikroszkóppal és konfokális mikroszkóppal is vizsgáltuk, igazoltuk.

A rapamycin doxiciklinnel kombinációban a vizsgált több mint húsz különböző típusú daganatsejtvonal kétharmadában. A rövidtávú kezelés szignifikánsan, de reverzibilisen, míg a folyamatos kezelés tartósan gátolta a tumornövekedést. Kimutattuk, hogy a rapamycin + doxiciklin nem apoptózist, nekrozist vagy nekroptózist okoz, hanem a károsodott mitokondriális struktúrák lebontása és ezzel összefüggő sejtpusztulás, mitofágia jellemzi. A rapamycin terápiás érzékenyítő hatását 3D bonyomtatott tumormodellekben is vizsgálva, a 3D bonyomtatott ZR75.1 emlőcarcinoma modellek alkalmazhatóságát a hagyományos 2D és 3D *in vitro* tenyészetekével és a xenograft modellekével is összehasonlítottuk. A kialakított 3D szövetszerű struktúrákban (TMS) jellemeztük a hosszútávú *in vitro* tenyésztéskor formálódó „szöveteket”. Kimutattuk, hogy a 3D nyomtatott TMS-ek mutatják a legnagyobb hasonlóságot az *in vivo* xenograft modellben tapasztalt érzékenységbeni, fehérje-expressziós mintázatokkal ugyanazon tumorsejtvonal felhasználásakor. Eredményeink szerint: a.) a metabolikus stressz, az mTOR-hiperaktivitás és a mitokondriális funkciók együttes, kombinációs célzása hatásos lehet daganatellenes kezelésekben, és b.) a 3D bonyomtatott tumormodellek számos területen segíthetik a tumormodell fejlesztéseket, illetve hozzájárulhatnak az állatkísérletek számának csökkentéséhez, a klinikai fázisvizsgálatok sikerességének javításához.

8. Summary

Metabolic alterations and reprogramming, which can occur during tumor growth, progression, and therapies, initiate therapy resistance development. In my work, we studied the mTOR-based combination treatments using human cancer cell lines and various *in vitro* and *in vivo* model systems. A detailed analysis was made to study the effects of rapamycin plus doxycycline combination on tumor growth inhibition and its influencing role regarding to mTOR activity, autophagy, and other metabolic processes.

Beside applying traditional 2D and 3D cell culturing techniques, we used *in vitro* 3D bioprinted and *in vivo* xenograft models. To study proliferation inhibition, certain cell death forms, flow cytometric measurements, and inhibitor treatments were used. For protein expression analyses, Western blot, WesTM Simple technique, and immunohistochemistry were applied. The morphological consequences of the studied cell death forms were detected with transmission and confocal microscopy.

Based on our results, rapamycin plus doxycycline could reduce the cell proliferation significantly in the two thirds of the tested 20 cell lines with various origin. The antiproliferative effect of short-term treatments seemed to be reversible, however, continuous treatment inhibited tumor growth significantly. We proved that rapamycin plus doxycycline combination did not initiate apoptosis, necrosis or necroptosis. Instead, the degradation of disrupted mitochondrial structures was characteristic for the cell death and tumor size reduction as a part of mitophagic processes. We studied the therapeutic sensitizing effect of rapamycin on 3D bioprinted tumor models. To determine the metabolic feature, the tissue characteristics, the applicability of these structures, we performed a comparative analysis using various cell culturing models, including traditional 2D, 3D *in vitro* cultures and xenograft models of the human breast cancer cell line, ZR75.1. The forming “tissue-like” structures were also characterized during long-term *in vitro* culturing of TMSs. We showed that the sensitivity and protein expression patterns of TMSs were much more similar to the *in vivo* xenograft model derived from the same cell line than to other model systems. Our results highlight that: a.) targeting metabolic stress, mTOR hyperactivity, and mitochondrial functions simultaneously could be an effective antitumoral therapeutic alternative; b.) 3D bioprinted models can assist for tumor model developments. This technique can contribute to reduce the number of animal experiments and improve the success rate of clinical phase trials.

9. Irodalomjegyzék

- 1 Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57-70.
- 2 Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-674.
- 3 Sebestyén A, Hujber Z, Jeney A, Kopper L. (2016) Tumormetabolizmus. *KLINIKAI ONKOLÓGIA 3 : (2)* pp. 127-134. , 8 p.
- 4 Kroemer G, Pouyssegur J. (2008) Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 13(6):472-482.
- 5 Hanahan D. (2022) Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*, 12(1):31-46.
- 6 Jeney A., és Kralovánszky J. Bevezetés az onkofarmakológiába. In: *Onkofarmakológia*. Szerk.: Jeney A, Kralovánszky J, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2009, p. 45-57
- 7 Beyođlu D, Idle JR. (2021) Metabolic rewiring and the characterization of oncometabolites. *Cancers*, 13(12):2900.
- 8 Erez A, DeBerardinis RJ. (2015) Metabolic dysregulation in monogenic disorders and cancer - Finding method in madness. *Nat Rev Cancer*, 15(7):440–448.
- 9 Wei Q, Qian Y, Yu J, Wong CC. (2020) Metabolic rewiring in the promotion of cancer metastasis: mechanisms and therapeutic implications. *Oncogene*, 39(39):6139-6156.
- 10 Li J, Eu JQ, Kong LR, Wang L, Lim YC, Goh BC, Wong ALA. (2020) Targeting Metabolism in Cancer Cells and the Tumour Microenvironment for Cancer Therapy. *Molecules*, 25(20):4831.
- 11 Gomes AS, Ramos H, Soares J, Saraiva L. (2018) p53 and glucose metabolism: an orchestra to be directed in cancer therapy. *Pharmacol Res*, 131:75-86.
- 12 Mossmann D, Park S, Hall MN. (2018) mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer. *Nat Rev Cancer*, 18(12):744-757.

- 13 Saxton RA, Sabatini DM. (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168(6):960-976.
- 14 Warburg O, Minami S. (1923) Versuche an Überlebendem Carcinom-gewebe. *Klinische Wochenschrift*, 2(17):776–777.
- 15 Racker E. (1972) Bioenergetics and the Problem of Tumor Growth: An understanding of the mechanism of the generation and control of biological energy may shed light on the problem of tumor growth. *American scientist*, 1972:56–63.
- 16 Jia D, Park JH, Jung KH, Levine H, Kaiparettu BA. (2018) Elucidating the Metabolic Plasticity of Cancer: Mitochondrial Reprogramming and Hybrid Metabolic States. *Cells*, 7(3):21.
- 17 Potter M, Newport E, Morten KJ. (2016) The Warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans*, 44(5):1499-1505.
- 18 Kalyanaraman B. (2017) Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *Redox Biol*, 12:833-842.
- 19 Gillies RJ. (2022) Cancer heterogeneity and metastasis: life at the edge. *Clin Exp Metastasis*, 39(1):15-19.
- 20 Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930):1029-1033.
- 21 Seyfried TN, Flores RE, Poff AM, D'Agostino DP. (2014) Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis*, 35(3):515-527.
- 22 DeBerardinis RJ, Thompson CB. (2012) Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us? *Cell*, 148(6):1132-1144.
- 23 Verwer EE, Kavanagh TR, Mischler WJ, Feng Y, Takahashi K, Wang S, Shoup TM, Neelamegam R, Yang J, Guehl NJ, Ran C, Masefski W, Cui Y, El-Chemaly S, Sadow PM, Oldham WM, Kijewski MF, El Fakhri G, Normandin MD, Priolo C. (2018) [18F]Fluorocholine and [18F]Fluoroacetate PET as Imaging

- Biomarkers to Assess Phosphatidylcholine and Mitochondrial Metabolism in Preclinical Models of TSC and LAM. *Clin Cancer Res*, 24(23):5925-5938.
- 24 Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Fortina P, Addya S, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. (2009) The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*, 8(23):3984-4001.
- 25 Comerford SA, Huang Z, Du X, Wang Y, Cai L, Witkiewicz AK, Walters H, Tantawy MN, Fu A, Manning HC, Horton JD, Hammer RE, McKnight SL, Tu BP. (2014) Acetate dependence of tumors. *Cell*, 159(7):1591-1602.
- 26 Payen VL, Mina E, Van Hée VF, Porporato PE, Sonveaux P. (2020) Monocarboxylate transporters in cancer. *Mol Metab*, 33:48-66.
- 27 Lau AN, Heiden MG. (2020) Metabolism in the tumor microenvironment. *Annual Review of Cancer Biology*, 4(1):17–40.
- 28 Yu L, Lu M, Jia D, Ma J, Ben-Jacob E, Levine H, Kaiparettu BA, Onuchic JN. (2017) Modeling the Genetic Regulation of Cancer Metabolism: Interplay between Glycolysis and Oxidative Phosphorylation. *Cancer Res*, 77(7):1564-1574.
- 29 Deshmukh A, Deshpande K, Arfuso F, Newsholme P, Dharmarajan A. (2016) Cancer stem cell metabolism: a potential target for cancer therapy. *Mol Cancer*, 15(1):69.
- 30 Yasuda T, Ishimoto T, Baba H. (2017) Conflicting metabolic alterations in cancer stem cells and regulation by the stromal niche. *Regenerative Therapy*, 17:8–12.
- 31 Sancho P, Barneda D, Heeschen C. (2016) Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *British Journal of Cancer*, 114(12):1305–1312.
- 32 Zhang D, Tang DG, Rycaj K. (2018) Cancer stem cells: Regulation programs, immunological properties and immunotherapy. *Semin Cancer Biol*, 52(Pt 2):94-106.

- 33 Yadav AS, Pandey PR, Butti R, Radharani NNV, Roy S, Bhalara SR, Gorain M, Kundu GC, Kumar D. (2018) The Biology and Therapeutic Implications of Tumor Dormancy and Reactivation. *Front Oncol*, 8:72.
- 34 Sotgia F, Fiorillo M, Lisanti MP. (2019) Hallmarks of the cancer cell of origin: Comparisons with "energetic" cancer stem cells (e-CSCs). *Aging (Albany NY)*, 11(3):1065-1068.
- 35 Bighetti-Trevisan RL, Sousa LO, Castilho RM, Almeida LO. (2019) Cancer Stem Cells: Powerful Targets to Improve Current Anticancer Therapeutics. *Stem Cells Int*, 2019:9618065.
- 36 Talukdar S, Bhoopathi P, Emdad L, Das S, Sarkar D, Fisher PB. (2019) Dormancy and cancer stem cells: An enigma for cancer therapeutic targeting. *Adv Cancer Res*, 141:43-84.
- 37 Wu D, Wang DC, Cheng Y, Qian M, Zhang M, Shen Q, Wang X. (2017) Roles of tumor heterogeneity in the development of drug resistance: A call for precision therapy. *Semin Cancer Biol*, 42:13-19.
- 38 Vander Linden C, Corbet C. (2020) Reconciling environment-mediated metabolic heterogeneity with the oncogene-driven cancer paradigm in precision oncology. *Semin Cell Dev Biol*, 98:202-210.
- 39 McGranahan N, Swanton C. (2017) Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*, 168(4):613-628.
- 40 Luengo A, Gui DY, Vander Heiden MG. (2017) Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chem Biol*, 24(9):1161-1180.
- 41 Fan T, Sun G, Sun X, Zhao L, Zhong R, Peng Y. (2019) Tumor Energy Metabolism and Potential of 3-Bromopyruvate as an Inhibitor of Aerobic Glycolysis: Implications in Tumor Treatment. *Cancers (Basel)*, 11(3):317.
- 42 Sebestyén A, Dankó T, Sztankovics D, Moldvai D, Raffay R, Cervi C, Krencz I, Zsiros V, Jeney A, Petóvári G. (2021) The role of metabolic ecosystem in cancer progression - metabolic plasticity and mTOR hyperactivity in tumor tissues. *Cancer Metastasis Rev*, 40(4):989-1033.

- 43 Lukey MJ, Wilson KF, Cerione RA. (2013) Therapeutic strategies impacting cancer cell glutamine metabolism. *Future Med Chem*, 5(14):1685-700.
- 44 Weyandt JD, Thompson CB, Giaccia AJ, Rathmell WK. *Metabolic Alterations in Cancer and Their Potential as Therapeutic Targets*. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2017;37:825-832.
- 45 Matés JM, Di Paola FJ, Campos-Sandoval JA, Mazurek S, Márquez J. (2020) Therapeutic targeting of glutaminolysis as an essential strategy to combat cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 98:34-43.
- 46 Kuntz EM, Baquero P, Michie AM, Dunn K, Tardito S, Holyoake TL, Helgason GV, Gottlieb E. (2017) Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat Med*, 23(10):1234-1240.
- 47 Scatena C, Roncella M, Di Paolo A, Aretini P, Menicagli M, Fanelli G, Marini C, Mazzanti CM, Ghilli M, Sotgia F, Lisanti MP, Naccarato AG. (2018) Doxycycline, an Inhibitor of Mitochondrial Biogenesis, Effectively Reduces Cancer Stem Cells (CSCs) in Early Breast Cancer Patients: A Clinical Pilot Study. *Front Oncol*, 8:452.
- 48 Hur KY, Lee MS. (2015) New mechanisms of metformin action: Focusing on mitochondria and the gut. *J Diabetes Investig*, 6(6):600-609.
- 49 Carvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, Bastos DC, Agostini M, Rangel AL, Veiga SS, Raposo HF, Oliveira HC, Loda M, Coletta RD, Graner E. (2008) Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. *Int J Cancer*, 123(11):2557-2565.
- 50 Zadra G, Ribeiro CF, Chetta P, Ho Y, Cacciatore S, Gao X, Syamala S, Bango C, Photopoulos C, Huang Y, Tyekucheva S, Bastos DC, Tchaicha J, Lawney B, Uo T, D'Anello L, Csibi A, Kalekar R, Larimer B, Ellis L, Butler LM, Morrissey C, McGovern K, Palombella VJ, Kutok JL, Mahmood U, Bosari S, Adams J, Peluso S, Dehm SM, Plymate SR, Loda M. (2019) Inhibition of de novo lipogenesis

- targets androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(2):631-640.
- 51 Corbet C, Feron O. (2017) Emerging roles of lipid metabolism in cancer progression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 20(4):254-260.
- 52 Liu GY, Sabatini DM. (2020) mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(4):183-203.
- 53 Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*, 28(10):721-726.
- 54 Martel RR, Klicius J, Galet S. (1977) Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol*, 55(1):48-51.
- 55 Eng CP, Sehgal SN, Vézina C. (1984) Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot (Tokyo)*, 37(10):1231-1237.
- 56 Bierer BE, Mattila PS, Standaert RF, Herzenberg LA, Burakoff SJ, Crabtree G, Schreiber SL. (1990) Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(23):9231-9235.
- 57 Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J. (1992) Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell*, 69(7):1227-1236.
- 58 Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL. (1994) A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, 369(6483):756-758.
- 59 Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. (1994) RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*, 78(1):35-43.

- 60 Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, Williams JM, Dumont FJ, Wiederrecht G, Abraham RT. (1995) Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem*, 270(2):815-822.
- 61 Keith CT, Schreiber SL. (1995) PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science*, 270(5233):50-51.
- 62 Sangüesa G, Roglans N, Baena M, Velázquez AM, Laguna JC, Alegret M. (2019) mTOR is a Key Protein Involved in the Metabolic Effects of Simple Sugars. *Int J Mol Sci*, 20(5):1117.
- 63 Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüeegg MA, Hall A, Hall MN. (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, 6(11):1122-1128.
- 64 Liu L, Das S, Losert W, Parent CA. (2010) mTORC2 regulates neutrophil chemotaxis in a cAMP- and RhoA-dependent fashion. *Dev Cell*, 19(6):845-857.
- 65 Schmidt KM, Dietrich P, Hackl C, Guenzle J, Bronsert P, Wagner C, Fichtner-Feigl S, Schlitt HJ, Geissler EK, Hellerbrand C, Lang SA. (2018) Inhibition of mTORC2/RICTOR Impairs Melanoma Hepatic Metastasis. *Neoplasia*, 20(12):1198-1208.
- 66 Morrison Joly M, Williams MM, Hicks DJ, Jones B, Sanchez V, Young CD, Sarbassov DD, Muller WJ, Brantley-Sieders D, Cook RS. (2017) Two distinct mTORC2-dependent pathways converge on Rac1 to drive breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res*, 19(1):74.
- 67 Humphrey SJ, Yang G, Yang P, Fazakerley DJ, Stöckli J, Yang JY, James DE. (2013) Dynamic adipocyte phosphoproteome reveals that Akt directly regulates mTORC2. *Cell Metab*, 17(6):1009-1020.
- 68 Ebner M, Sinkovics B, Szczygieł M, Ribeiro DW, Yudushkin I. (2017) Localization of mTORC2 activity inside cells. *J Cell Biol*, 216(2):343-353.
- 69 Menon S, Manning BD. (2008) Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene*, 27 Suppl 2(0 2):S43-51.

- 70 Ong PS, Wang LZ, Dai X, Tseng SH, Loo SJ, Sethi G. (2016) Judicious Toggling of mTOR Activity to Combat Insulin Resistance and Cancer: Current Evidence and Perspectives. *Front Pharmacol*, 7:395.
- 71 Rodrik-Outmezguine VS, Okaniwa M, Yao Z, Novotny CJ, McWhirter C, Banaji A, Won H, Wong W, Berger M, de Stanchina E, Barratt DG, Cosulich S, Klinowska T, Rosen N, Shokat KM. (2016) Overcoming mTOR resistance mutations with a new-generation mTOR inhibitor. *Nature*, 534(7606):272-276.
- 72 Taberero J, Rojo F, Calvo E, Burris H, Judson I, Hazell K, Martinelli E, Ramon y Cajal S, Jones S, Vidal L, Shand N, Macarulla T, Ramos FJ, Dimitrijevic S, Zoellner U, Tang P, Stumm M, Lane HA, Lebwohl D, Baselga J. (2008) Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*, 26(10):1603-1610.
- 73 Ghobrial IM, Siegel DS, Vij R, Berdeja JG, Richardson PG, Neuwirth R, Patel CG, Zohren F, Wolf JL. (2016) TAK-228 (formerly MLN0128), an investigational oral dual TORC1/2 inhibitor: A phase I dose escalation study in patients with relapsed or refractory multiple myeloma, non-Hodgkin lymphoma, or Waldenström's macroglobulinemia. *Am J Hematol*, 91(4):400-405.
- 74 Rodrik-Outmezguine VS, Okaniwa M, Yao Z, Novotny CJ, McWhirter C, Banaji A, Won H, Wong W, Berger M, de Stanchina E, Barratt DG, Cosulich S, Klinowska T, Rosen, N, Shokat KM. (2016). Overcoming mTOR resistance mutations with a new-generation mTOR inhibitor. *Nature*, 534(7606), 272–276.
- 75 Kim YM, Jung CH, Seo M, Kim EK, Park JM, Bae SS, Kim DH. (2015) mTORC1 phosphorylates UVRAG to negatively regulate autophagosome and endosome maturation. *Mol Cell*, 57(2):207-218.
- 76 Settembre C, Zoncu R, Medina DL, Vetrini F, Erdin S, Erdin S, Huynh T, Ferron M, Karsenty G, Vellard MC, Facchinetti V, Sabatini DM, Ballabio A. (2012) A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J*, 31(5):1095-1108.

- 77 Martina JA, Chen Y, Gucek M, Puertollano R. (2012) MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy*, 8(6):903-914.
- 78 Petóvári G, Hujber Z, Krencz I, Dankó T, Nagy N, Tóth F, Raffay R, Mészáros K, Rajnai H, Vetlényi E, Takács-Vellai K, Jeney A, Sebestyén A. (2018) Targeting cellular metabolism using rapamycin and/or doxycycline enhances anti-tumour effects in human glioma cells. *Cancer Cell Int*, 18:211.
- 79 Petóvári G, Dankó T, Krencz I, Hujber Z, Rajnai H, Vetlényi E, Raffay R, Pápay J, Jeney A, Sebestyén A. (2020) Inhibition of Metabolic Shift can Decrease Therapy Resistance in Human High-Grade Glioma Cells. *Pathol Oncol Res*, 26(1):23-33.
- 80 Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov AV, Arama E, Baehrecke EH, Barlev NA, Bazan NG, Bernassola F, Bertrand MJM, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Boya P, Brenner C, Campanella M, Candi E, Carmona-Gutierrez D, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, Conrad M, Cubillos-Ruiz JR, Czabotar PE, D'Angiolella V, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, DeBerardinis RJ, Deshmukh M, Di Daniele N, Di Virgilio F, Dixit VM, Dixon SJ, Duckett CS, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Elrod JW, Fimia GM, Fulda S, García-Sáez AJ, Garg AD, Garrido C, Gavathiotis E, Golstein P, Gottlieb E, Green DR, Greene LA, Gronemeyer H, Gross A, Hajnoczky G, Hardwick JM, Harris IS, Hengartner MO, Hetz C, Ichijo H, Jäättelä M, Joseph B, Jost PJ, Juin PP, Kaiser WJ, Karin M, Kaufmann T, Kepp O, Kimchi A, Kitis RN, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lee SW, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, López-Otín C, Lowe SW, Luedde T, Lugli E, MacFarlane M, Madeo F, Malewicz M, Malorni W, Manic G, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Mehlen P, Meier P, Melino S, Miao EA, Molkenkin JD, Moll UM, Muñoz-Pinedo C, Nagata S, Nuñez G, Oberst A, Oren M, Overholtzer M, Pagano M, Panaretakis T, Pasparakis M, Penninger JM, Pereira DM, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JHM, Puthalakath

- H, Rabinovich GA, Rehm M, Rizzuto R, Rodrigues CMP, Rubinsztein DC, Rudel T, Ryan KM, Sayan E, Scorrano L, Shao F, Shi Y, Silke J, Simon HU, Sistigu A, Stockwell BR, Strasser A, Szabadkai G, Tait SWG, Tang D, Tavernarakis N, Thorburn A, Tsujimoto Y, Turk B, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Vander Heiden MG, Villunger A, Virgin HW, Vousden KH, Vucic D, Wagner EF, Walczak H, Wallach D, Wang Y, Wells JA, Wood W, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Zitvogel L, Melino G, Kroemer G. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, 25(3):486-541.
- 81 Schweichel JU, Merker HJ. (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 7(3):253-266.
- 82 Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. (2007) Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*, 14(7):1237-1243.
- 83 Nirmala JG, Lopus M. (2020) Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biol Toxicol*, 36(2):145-164.
- 84 Conrad M, Angeli JP, Vandenabeele P, Stockwell BR. (2016) Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 15(5):348-366.
- 85 Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. (2015) Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer*, 14:48.
- 86 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4):239-257.
- 87 Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73(8):2013-2026.
- 88 Izadi M, Ali TA, Pourkarimi E. (2021) Over Fifty Years of Life, Death, and Cannibalism: A Historical Recollection of Apoptosis and Autophagy. *Int J Mol Sci*, 22(22):12466.

- 89 Legrand AJ, Konstantinou M, Goode EF, Meier P. (2019) The Diversification of Cell Death and Immunity: Memento Mori. *Mol Cell*, 76(2):232-242.
- 90 Moriwaki K, Chan FK. (2013) RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes Dev*, 27(15):1640-1649.
- 91 Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang HC, Choksi S, Liu J, Ward Y, Wu LG, Liu ZG. (2014) Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol*, 16(1):55-65.
- 92 Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, Liu ZG. (1999) Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev*, 13(19):2514-2526.
- 93 Wang H, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang LF, Wang FS, Wang X. (2014) Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol Cell*, 54(1):133-146.
- 94 Seifert L, Miller G. (2017) Molecular Pathways: The Necrosome-A Target for Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*, 23(5):1132-1136.
- 95 Parzych KR, Klionsky DJ. (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 20(3):460-473.
- 96 Yang Z, Klionsky DJ. (2010) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 22(2):124-131.
- 97 Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB. (2009) A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*, 5(5):649-662.
- 98 Massey A, Kiffin R, Cuervo AM. (2004) Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(12):2420-2434.
- 99 Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y. (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*, 5(4):539-545.

- 100 Kaur J, Debnath J. (2015) Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(8), 461–472.
- 101 Towers CG, Wodetzki D, Thorburn A. (2020) Autophagy and cancer: Modulation of cell death pathways and cancer cell adaptations. *J Cell Biol*, 219(1):e201909033.
- 102 Huang R, Xu Y, Wan W, Shou X, Qian J, You Z, Liu B, Chang C, Zhou T, Lippincott-Schwartz J, Liu W. (2015) Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. *Mol Cell*, 57(3):456-466.
- 103 Anding AL, Baehrecke EH. (2017) Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. *Dev Cell*, 41(1):10-22.
- 104 Turco E, Savova A, Gere F, Ferrari L, Romanov J, Schuschnig M, Martens S. (2021) Reconstitution defines the roles of p62, NBR1 and TAX1BP1 in ubiquitin condensate formation and autophagy initiation. *Nat Commun*, 12(1):5212.
- 105 Sánchez-Martín P, Saito T, Komatsu M. (2019) p62/SQSTM1: 'Jack of all trades' in health and cancer. *FEBS J*, 286(1):8-23.
- 106 Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T. (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 171(4):603-614.
- 107 Kim YM, Jung CH, Seo M, Kim EK, Park JM, Bae SS, Kim DH. (2015) mTORC1 phosphorylates UVRAG to negatively regulate autophagosome and endosome maturation. *Mol Cell*, 57(2):207-218.
- 108 Youle RJ, Narendra DP. (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(1):9-14.
- 109 Poole LP, Macleod KF. (2021) Mitophagy in tumorigenesis and metastasis. *Cell Mol Life Sci*, 78(8):3817-3851.

- 110 Zhu CL, Yao RQ, Li LX, Li P, Xie J, Wang JF, Deng XM. (2021) Mechanism of Mitophagy and Its Role in Sepsis Induced Organ Dysfunction: A Review. *Front Cell Dev Biol*, 9:664896.
- 111 Kummar S, Gutierrez M, Doroshow JH, Murgu AJ. (2006) Drug development in oncology: classical cytotoxics and molecularly targeted agents. *Br J Clin Pharmacol*, 62(1):15-26.
- 112 Schein CH. (2021) Repurposing approved drugs for cancer therapy. *Br Med Bull*, 137(1):13-27
- 113 Evans WE, Relling MV. (2004) Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature*, 429(6990):464-468.
- 114 Skoda J, Borankova K, Jansson PJ, Huang ML, Veselska R, Richardson DR. (2019) Pharmacological targeting of mitochondria in cancer stem cells: An ancient organelle at the crossroad of novel anti-cancer therapies. *Pharmacol Res*, 139:298-313.
- 115 Chourasia AH, Boland ML, Macleod KF. (2015) Mitophagy and cancer. *Cancer Metab*, 3:4.
- 116 Yan C, Li TS. (2018) Dual Role of Mitophagy in Cancer Drug Resistance. *Anticancer Res*, 38(2):617-621.
- 117 Kulikov AV, Luchkina EA, Gogvadze V, Zhivotovsky B. (2017) Mitophagy: Link to cancer development and therapy. *Biochem Biophys Res Commun*, 482(3):432-439.
- 118 Biasutto L, Dong LF, Zoratti M, Neuzil J. (2010) Mitochondrially targeted anti-cancer agents. *Mitochondrion*, 10(6):670-681.
- 119 Dong L, Gopalan V, Holland O, Neuzil J. (2020) Mitocans Revisited: Mitochondrial Targeting as Efficient Anti-Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*, 21(21):7941.

- 120 Neuzil J, Dong LF, Rohlena J, Truksa J, Ralph SJ. (2013) Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion*, 13(3):199-208.
- 121 Cui Q, Wen S, Huang P. (2017) Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach: recent updates. *Future Med Chem*, 9(9):929-949.
- 122 Rohlenova K, Sachaphibulkij K, Stursa J, Bezawork-Geleta A, Blecha J, Endaya B, Werner L, Cerny J, Zobalova R, Goodwin J, Spacek T, Alizadeh Pesdar E, Yan B, Nguyen MN, Vondrusova M, Sobol M, Jezek P, Hozak P, Truksa J, Rohlena J, Dong LF, Neuzil J. (2017) Selective Disruption of Respiratory Supercomplexes as a New Strategy to Suppress Her2high Breast Cancer. *Antioxid Redox Signal*, 26(2):84-103
- 123 Noh I, Lee D, Kim H, Jeong CU, Lee Y, Ahn JO, Hyun H, Park JH, Kim YC. (2017) Enhanced Photodynamic Cancer Treatment by Mitochondria-Targeting and Brominated Near-Infrared Fluorophores. *Adv Sci (Weinh)*, 5(3):1700481.
- 124 Du X, Zhang P, Fu H, Ahsan HM, Gao J, Chen Q. (2019) Smart mitochondrial-targeted cancer therapy: Subcellular distribution, selective TrxR2 inhibition accompany with declined antioxidant capacity. *Int J Pharm*, 555:346-355.
- 125 Weinberg SE, Chandel NS. (2015) Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat Chem Biol*, 11(1):9-15.
- 126 Schieber M, Chandel NS. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*, 24(10):R453-62.
- 127 Sotgia F, Ozsvari B, Fiorillo M, De Francesco EM, Bonuccelli G, Lisanti MP. (2018) A mitochondrial based oncology platform for targeting cancer stem cells (CSCs): MITO-ONC-RX. *Cell Cycle*, 17(17):2091-2100.
- 128 Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. (2017) Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(1):11-31.
- 129 Wilde L, Roche M, Domingo-Vidal M, Tanson K, Philp N, Curry J, Martinez-Outschoorn U. (2017) Metabolic coupling and the Reverse Warburg Effect in

- cancer: Implications for novel biomarker and anticancer agent development. *Semin Oncol*, 44(3):198-203.
- 130 Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. (2016) Mitochondria and Cancer. *Cell*, 166(3):555-566.
- 131 Lamb R, Ozsvari B, Lisanti CL, Tanowitz HB, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. (2015) Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease. *Oncotarget*, 6(7):4569-4584.
- 132 De Luca A, Fiorillo M, Peiris-Pagès M, Ozsvari B, Smith DL, Sanchez-Alvarez R, Martinez-Outschoorn UE, Cappello AR, Pezzi V, Lisanti MP, Sotgia F. (2015) Mitochondrial biogenesis is required for the anchorage-independent survival and propagation of stem-like cancer cells. *Oncotarget*, 6(17):14777-147795.
- 133 Gray MW. (2012) Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(9):a011403.
- 134 Martin WF, Garg S, Zimorski V. (2015) Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370(1678):20140330.
- 135 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3):209-249.
- 136 Horváth Z, Boér K, Dank M, Kahán Z, Kocsis J, Kövér E, Pajkos G, Pikó B, Rubovszky G, Eckhardt S. (2016) Az emlőrák szisztémás kezelése: szakmai útmutatás [Systemic therapy of breast cancer: practice guideline]. *Magy Onkol.*, 60(3):241-257.
- 137 Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797):747-752.
- 138 Harbeck N, Gnant M. (2017) Breast cancer. *Lancet*, 389(10074):1134-1150.

- 139 Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy K, Tsang J, Cardoso F. (2019) Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 5(1):66.
- 140 Nounou MI, ElAmrawy F, Ahmed N, Abdelraouf K, Goda S, Syed-Sha-Qhattal H. (2015) Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. *Breast Cancer (Auckl)*, 9(Suppl 2):17-34.
- 141 Tavares DF, Chaves Ribeiro V, Andrade MAV, Moreira Cardoso-Júnior L, Rhangel Gomes Teixeira T, Ramos Varrone G, Lopes Britto R. (2021) Immunotherapy using PD-1/PDL-1 inhibitors in metastatic triple-negative breast cancer: A systematic review. *Oncol Rev*, 15(2):497.
- 142 Layman RM, Arun B. (2021) PARP Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer Including Those With BRCA Mutations. *Cancer J*, 27(1):67-75.
- 143 Sonnenblick A, Fumagalli D, Sotiriou C, Piccart M. (2014) Is the differentiation into molecular subtypes of breast cancer important for staging, local and systemic therapy, and follow up? *Cancer Treat Rev*, 40(9):1089-1095.
- 144 Nagini S. (2017) Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. *Anticancer Agents Med Chem*, 17(2):152-163.
- 145 Kay C, Martínez-Pérez C, Meehan J, Gray M, Webber V, Dixon JM, Turnbull AK. (2021) Current trends in the treatment of HR+/HER2+ breast cancer. *Future Oncol*, 17(13):1665-1681.
- 146 Mishra P, Ambs S. (2015) Metabolic Signatures of Human Breast Cancer. *Mol Cell Oncol*, 2(3):e992217.
- 147 Nath S, Devi GR. (2016) Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther*, 163:94-108.
- 148 Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. (2001) Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 294(5547):1708-1712.
- 149 Nickerson CA, Goodwin TJ, Terlonge J, Ott CM, Buchanan KL, Uicker WC, Emami K, LeBlanc CL, Ramamurthy R, Clarke MS, Vanderburg CR, Hammond T, Pierson DL. (2001) Three-dimensional tissue assemblies: novel models for the

- study of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenesis. *Infect Immun*, 69(11):7106-7120.
- 150 Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. (2003) Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng*, 83(2):173-180.
- 151 Delarue M, Montel F, Vignjevic D, Prost J, Joanny JF, Cappello G. (2014) Compressive stress inhibits proliferation in tumor spheroids through a volume limitation. *Biophys J*, 107(8):1821-1828.
- 152 Rodrigues J, Heinrich MA, Teixeira LM, Prakash J. (2021) 3D In Vitro Model (R)evolution: Unveiling Tumor-Stroma Interactions. *Trends Cancer*, 7(3):249-264.
- 153 Asghar W, El Assal R, Shafiee H, Pitteri S, Paulmurugan R, Demirci U. (2015) Engineering cancer microenvironments for in vitro 3-D tumor models. *Mater Today (Kidlington)*, 18(10):539-553.
- 154 Sung KE, Beebe DJ. (2014) Microfluidic 3D models of cancer. *Adv Drug Deliv Rev*, 79-80:68-78.
- 155 Langhans SA. (2018) Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol*, 9:6.
- 156 Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. (2017) Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*, 32(4):266-277.
- 157 Jensen C, Teng Y. (2020) Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci*, 7:33.
- 158 Germain N, Dhayer M, Dekiouk S, Marchetti P. (2022) Current Advances in 3D Bioprinting for Cancer Modeling and Personalized Medicine. *Int J Mol Sci*, 23(7):3432.
- 159 Huang SH, Liu P, Mokasdar A, Hou L. (2013) Additive manufacturing and its societal impact: a literature review. *Int J Adv Manuf Technol*, 67:1191–1203.

- 160 Ho CMB, Ng SH, Yoon YJ. (2015) A Review on 3D Printed Bioimplants. *Int J Precis Eng Man*, 16:1035-1046.
- 161 Diment LE, Thompson MS, Bergmann JHM. (2017) Clinical efficacy and effectiveness of 3D printing: a systematic review. *BMJ Open*, 7(12):e016891.
- 162 Boland T, Mironov V, Gutowska A, Roth EA, Markwald RR. (2003) Cell and organ printing 2: fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 272(2):497-502.
- 163 Ramesh S, Zhang Y, Cormier DR, Rivero IV, Harrysson OLA, Rao PK, Tamayol A, Tamayol A. (2020) Extrusion Bioprinting: Recent Progress, Challenges, and Future Opportunities. *Bioprinting*, 21:e00116.
- 164 Yan Q, Dong H, Su J, Han J, Song B, Wei Q, Shi Y. (2018) A review of 3D printing technology for medical applications. *Engineering*, 4(5):729-742.
- 165 Nuseir A, Hatamleh MM, Alnazzawi A, Al-Rabab'ah M, Kamel B, Jaradat E. (2019) Direct 3D Printing of Flexible Nasal Prosthesis: Optimized Digital Workflow from Scan to Fit. *J Prosthodont*, 28(1):10-14.
- 166 Faglin P, Gradwohl M, Depoortere C, Germain N, Drucbert AS, Brun S, Nahon C, Dekiouk S, Rech A, Azaroual N, Maboudou P, Payen J, Danzé PM, Guerreschi P, Marchetti P. (2020) Rationale for the design of 3D-printable bioresorbable tissue-engineering chambers to promote the growth of adipose tissue. *Sci Rep*, 10(1):11779.
- 167 Wang X, Ao Q, Tian X, Fan J, Wei Y, Hou W, Tong H, Bai S. (2016) Correction: 3D Bioprinting Technologies for Hard Tissue and Organ Engineering. *Materials (Basel)*, 9(10):802.
- 168 Groll J, Burdick JA, Cho DW, Derby B, Gelinsky M, Heilshorn SC, Jüngst T, Malda J, Mironov VA, Nakayama K, Ovsianikov A, Sun W, Takeuchi S, Yoo JJ, Woodfield TBF. (2018) A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication*, 11(1):013001.
- 169 Murphy SV, De Coppi P, Atala A. (2020) Opportunities and challenges of translational 3D bioprinting. *Nat Biomed Eng*, 4(4):370-380.

- 170 Panwar A, Tan LP. (2016) Current Status of Bioinks for Micro-Extrusion-Based 3D Bioprinting. *Molecules*, 21(6):685.
- 171 Gopinathan J, Noh I. (2018) Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomater Res*, 22:11.
- 172 Gungor-Ozkerim PS, Inci I, Zhang YS, Khademhosseini A, Dokmeci MR. (2018) Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomater Sci*, 6(5):915-946.
- 173 Das S, Basu B. (2019) An overview of hydrogel-based bioinks for 3D bioprinting of soft tissues. *J Indian Inst Sci*, 99(3):405-428.
- 174 GhavamiNejad A, Ashammakhi N, Wu XY, Khademhosseini A. (2020) Crosslinking Strategies for 3D Bioprinting of Polymeric Hydrogels. *Small*, (35):e2002931.
- 175 Augustine R, Kalva SN, Ahmad R, Zahid AA, Hasan S, Nayeem A, McClements L, Hasan A. (2021) 3D Bioprinted cancer models: Revolutionizing personalized cancer therapy. *Transl Oncol*, 14(4):101015.
- 176 Fouquier J, Guedj M. (2015) Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect*, 3(3):e00149.
- 177 Dankó T, Petővári G, Sztankovics D, Moldvai D, Raffay R, Lőrincz P, Visnovitz T, Zsiros V, Barna G, Márk Á, Krencz I, Sebestyén A. (2021) Rapamycin Plus Doxycycline Combination Affects Growth Arrest and Selective Autophagy-Dependent Cell Death in Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 22(15):8019.
- 178 Adami R, Pagano J, Colombo M, Platonova N, Recchia D, Chiamonte R, Bottinelli R, Canepari M, Bottai D. (2018) Reduction of Movement in Neurological Diseases: Effects on Neural Stem Cells Characteristics. *Front Neurosci*, 12:336.
- 179 Human Protein Atlas; Protein Atlas version 21.0, <https://www.proteinatlas.org/>; 27.05.2022.
- 180 Daly AJ, Baetens JM, De Baets B. (2018) Ecological Diversity: Measuring the Unmeasurable. *Mathematics*, 6(7):119.

- 181 Gerdes MJ, Gökmen-Polar Y, Sui Y, Pang AS, LaPlante N, Harris AL, Tan PH, Ginty F, Badve SS. (2018) Single-cell heterogeneity in ductal carcinoma in situ of breast. *Mod Pathol*, 31(3):406-417.
- 182 Krencz I, Sebestyén A, Papay J, Jeney A, Hujber Z, Burger CD, Keller CA, Khoo A. (2018) In situ analysis of mTORC1/2 and cellular metabolism-related proteins in human Lymphangiomyomatosis. *Hum Pathol*, 79:199-207.
- 183 Nagy N, Hajdu M, Márk Á, Király PA, Tóth M., Dankó T, Csóka M, Sebestyén A. (2016) Growth inhibitory effect of rapamycin in Hodgkin-lymphoma cell lines characterized by constitutive NOTCH1 activation. *Tumor Biol*, 37:13695-13704.
- 184 Kopper L, Steel GG. (1975) The therapeutic response of three human tumor lines maintained in immune-suppressed mice. *Cancer Res*, 35(10):2704-2713.
- 185 Jeney A, Hujber Z, Szoboszlai N, Fullár A, Oláh J, Pap É, Márk Á, Kriston C, Kralovánszky J, Kovalszky I, Vékey K, Sebestyén A. (2016) Characterisation of bioenergetic pathways and related regulators by multiple assays in human tumour cells. *Cancer Cell Int*, 16:4.
- 186 Hujber Z, Petővári G, Szoboszlai N, Dankó T, Nagy N, Kriston C, Krencz I, Paku S, Ozohanics O, Drahos L, Jeney A, Sebestyén A. (2017) Rapamycin (mTORC1 inhibitor) reduces the production of lactate and 2-hydroxyglutarate oncometabolites in IDH1 mutant fibrosarcoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 36(1):74.
- 187 Petővári G, Dankó T, Tőkés AM, Vetlényi E, Krencz I, Raffay R, Hajdu M, Sztankovics D, Németh K, Vellai-Takács K, Jeney A, Kulka J, Sebestyén A. (2020) In Situ Metabolic Characterisation of Breast Cancer and Its Potential Impact on Therapy. *Cancers (Basel)*, 12(9):2492.
- 188 Teng QX, Ashar YV, Gupta P, Gadee E, Fan YF, Reznik SE, Wurlpel JND, Chen ZS. (2019) Revisiting mTOR inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov Today*, 24(10):2086-2095.
- 189 Desbats MA, Giacomini I, Prayer-Galetti T, Montopoli M. (2020) Metabolic Plasticity in Chemotherapy Resistance. *Front Oncol*, 10:281.

- 190 McGuirk S, Audet-Delage Y, St-Pierre J. (2020) Metabolic Fitness and Plasticity in Cancer Progression. *Trends Cancer*, 6(1):49-61.
- 191 Gupta PB, Pastushenko I, Skibinski A, Blanpain C, Kuperwasser C. (2019) Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance. *Cell Stem Cell*, 24(1):65-78.
- 192 DeBerardinis RJ, Chandel NS. (2016) Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*, 2(5):e1600200.
- 193 Porporato PE, Filigheddu N, Pedro JMB, Kroemer G, Galluzzi L. (2018) Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell Res*, 28(3):265-280.
- 194 Tarragó-Celada J, Cascante M. (2021) Targeting the Metabolic Adaptation of Metastatic Cancer. *Cancers (Basel)*, 13(7):1641.
- 195 Schiliro C, Firestein BL. (2021) Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation. *Cells*, 10(5):1056.
- 196 Zou Z, Tao T, Li H, Zhu X. (2020) mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell Biosci*, 10:31.
- 197 Magaway C, Kim E, Jacinto E. (2019) Targeting mTOR and Metabolism in Cancer: Lessons and Innovations. *Cells*, 8(12):1584.
- 198 Anttila JV, Shubin M, Cairns J, Borse F, Guo Q, Mononen T, Vázquez-García I, Pulkkinen O, Mustonen V. (2019) Contrasting the impact of cytotoxic and cytostatic drug therapies on tumour progression. *PLoS Comput Biol*, 15(11):e1007493.
- 199 Denton D, Kumar S. (2019) Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ*, 26(4):605-616.
- 200 Doherty J, Baehrecke EH. (2018) Life, death and autophagy. *Nat Cell Biol*, 20(10):1110-1117.
- 201 Kriel J, Loos B. (2019) The good, the bad and the autophagosome: exploring unanswered questions of autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ*, 26(4):640-652.

- 202 Condon KJ, Sabatini DM. (2019) Nutrient regulation of mTORC1 at a glance. *J Cell Sci*, 132(21):jcs222570.
- 203 Koromilas AE. (2019) M(en)TORship lessons on life and death by the integrated stress response. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1863(3):644-649.
- 204 Sticz T, Molnár A, Dankó T, Hujber Z, Petővári G, Nagy N, Végső G, Kopper L, Sebestyén A. (2019) The Effects of Different mTOR Inhibitors in EGFR Inhibitor Resistant Colon Carcinoma Cells. *Pathol Oncol Res*, 25(4):1379-1386.
- 205 Márk Á, Hajdu M, Váradi Z, Sticz TB, Nagy N, Csomor J, Berczi L, Varga V, Csóka M, Kopper L, Sebestyén A. (2013) Characteristic mTOR activity in Hodgkin-lymphomas offers a potential therapeutic target in high risk disease - a combined tissue microarray, in vitro and in vivo study. *BMC Cancer*, 13:250.
- 206 Ózsvári B, Sotgia F, Lisanti MP. (2020) First-in-class candidate therapeutics that target mitochondria and effectively prevent cancer cell metastasis: mitoriboscins and TPP compounds. *Aging (Albany NY)*, 12(11):10162-10179.
- 207 Kim MY, Kruger AJ, Jeong JY, Kim J, Shin PK, Kim SY, Cho JY, Hahm KB, Hong SP. (2019) Combination Therapy with a PI3K/mTOR Dual Inhibitor and Chloroquine Enhances Synergistic Apoptotic Cell Death in Epstein-Barr Virus-Infected Gastric Cancer Cells. *Mol Cells*, 42(6):448-459.
- 208 Lim J, Murthy A. (2020) Targeting Autophagy to Treat Cancer: Challenges and Opportunities. *Front Pharmacol*, 11:590344.
- 209 Lamming DW, Sabatini DM. (2013) A Central role for mTOR in lipid homeostasis. *Cell Metab*, 18(4):465-469.
- 210 Ma L, Zong X. (2020) Metabolic Symbiosis in Chemoresistance: Refocusing the Role of Aerobic Glycolysis. *Front Oncol*, 10:5.
- 211 Kezic A, Popovic L, Lalic K. (2018) mTOR Inhibitor Therapy and Metabolic Consequences: Where Do We Stand? *Oxid Med Cell Longev*, 2018:2640342.

- 212 Zhang X, Li XR, Zhang J. (2013) Current status and future perspectives of PI3K and mTOR inhibitor as anticancer drugs in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 13(2):175-187.
- 213 Patel J, Nguyen SA, Ogretmen B, Gutkind JS, Nathan CA, Day T. (2020) mTOR inhibitor use in head and neck squamous cell carcinoma: A meta-analysis on survival, tumor response, and toxicity. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*, 5(2):243-255.
- 214 Zhu M, Molina JR, Dy GK, Croghan GA, Qi Y, Glockner J, Hanson LJ, Roos MM, Tan AD, Adjei AA. (2020) A phase I study of the VEGFR kinase inhibitor vatalanib in combination with the mTOR inhibitor, everolimus, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*, 38(6):1755-1762.
- 215 Lorenzen S, Knorrenschild JR, Pauligk C, Hegewisch-Becker S, Seraphin J, Thuss-Patience P, Kopp HG, Dechow T, Vogel A, Luley KB, Pink D, Stahl M, Kullmann F, Hebart H, Siveke J, Egger M, Homann N, Probst S, Goetze TO, Al-Batran SE. (2020) Phase III randomized, double-blind study of paclitaxel with and without everolimus in patients with advanced gastric or esophagogastric junction carcinoma who have progressed after therapy with a fluoropyrimidine/platinum-containing regimen (RADPAC). *Int J Cancer*, 147(9):2493-2502.
- 216 Li J, Kim SG, Blenis J. (2014) Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab*, 19(3):373-379.
- 217 Nunes T, Hamdan D, Leboeuf C, El Bouchtaoui M, Gapihan G, Nguyen TT, Meles S, Angeli E, Ratajczak P, Lu H, Di Benedetto M, Bousquet G, Janin A. (2018) Targeting Cancer Stem Cells to Overcome Chemoresistance. *Int J Mol Sci*, 19(12):4036.
- 218 Ilagan E, Manning BD. (2016) Emerging role of mTOR in the response to cancer therapeutics. *Trends Cancer*, 2(5):241-251.
- 219 Guri Y, Hall MN. (2016) mTOR Signaling Confers Resistance to Targeted Cancer Drugs. *Trends Cancer*, 2(11):688-697.

- 220 Chen X, Chen S, Yu D. (2020) Metabolic Reprogramming of Chemoresistant Cancer Cells and the Potential Significance of Metabolic Regulation in the Reversal of Cancer Chemoresistance. *Metabolites*, 10(7):289.
- 221 Götting I, Jendrossek V, Matschke J. (2020) A New Twist in Protein Kinase B/Akt Signaling: Role of Altered Cancer Cell Metabolism in Akt-Mediated Therapy Resistance. *Int J Mol Sci*, 21(22):8563.
- 222 García-Castillo V, López-Urrutia E, Villanueva-Sánchez O, Ávila-Rodríguez MÁ, Zentella-Dehesa A, Cortés-González C, López-Camarillo C, Jacobo-Herrera NJ, Pérez-Plasencia C. (2017) Targeting Metabolic Remodeling in Triple Negative Breast Cancer in a Murine Model. *J Cancer*, 8(2):178-189.
- 223 Zhang X, Bai W. (2016) Repression of phosphoglycerate dehydrogenase sensitizes triple-negative breast cancer to doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol*, 78(3):655-659.
- 224 Varghese E, Samuel SM, Líšková A, Samec M, Kubatka P, Büsselberg D. (2020) Targeting Glucose Metabolism to Overcome Resistance to Anticancer Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*, 12(8):2252.
- 225 Fiorillo M, Tóth F, Sotgia F, Lisanti MP. (2019) Doxycycline, Azithromycin and Vitamin C (DAV): A potent combination therapy for targeting mitochondria and eradicating cancer stem cells (CSCs). *Aging (Albany NY)*, 11(8):2202-2216.
- 226 Helmink BA, Khan MAW, Hermann A, Gopalakrishnan V, Wargo JA. (2019) The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nat Med*, 25(3):377-388.
- 227 Liu Y, Levine B. (2015) Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ*, 22(3):367-76.
- 228 Miller DR, Thorburn A. (2021) Autophagy and organelle homeostasis in cancer. *Dev Cell*, 56(7):906-918.
- 229 Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, Mazure NM. (2009) Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol*, 29(10):2570-2581.

- 230 Hui L, Wu H, Wang TW, Yang N, Guo X, Jang XJ. (2019) Hydrogen peroxide-induced mitophagy contributes to laryngeal cancer cells survival via the upregulation of FUNDC1. *Clin Transl Oncol*, 21(5):596-606.
- 231 Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M, Shaw RJ. (2011) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*, 331(6016):456-461.
- 232 Yan C, Luo L, Guo CY, Goto S, Urata Y, Shao JH, Li TS. (2017) Doxorubicin-induced mitophagy contributes to drug resistance in cancer stem cells from HCT8 human colorectal cancer cells. *Cancer Lett*, 388:34-42.
- 233 Gazzano E, Lazzarato L, Rolando B, Kopecka J, Guglielmo S, Costamagna C, Chegaev K, Riganti C. (2018) Mitochondrial Delivery of Phenol Substructure Triggers Mitochondrial Depolarization and Apoptosis of Cancer Cells. *Front Pharmacol*, 9:580.
- 234 Biel TG, Rao VA. (2017) Mitochondrial dysfunction activates lysosomal-dependent mitophagy selectively in cancer cells. *Oncotarget*, 9(1):995-1011.
- 235 Ney PA. (2015) Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochim Biophys Acta*, 1853(10 Pt B):2775-2783.
- 236 Joseph C, Papadaki A, Althobiti M, Alsaleem M, Aleskandarany MA, Rakha EA. (2018) Breast cancer intratumour heterogeneity: current status and clinical implications. *Histopathology*, 73(5):717-731.
- 237 Wong CH, Siah KW, Lo AW. (2019) Estimation of clinical trial success rates and related parameters. *Biostatistics*, 20(2):273-286.
- 238 Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economides C, Rosenthal J. (2014) Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol*, 32(1):40-51.
- 239 Xu C, Li X, Liu P, Li M, Luo F. (2019) Patient-derived xenograft mouse models: A high fidelity tool for individualized medicine. *Oncol Lett*, 17(1):3-10.

- 240 Reid JA, Palmer XL, Mollica PA, Northam N, Sachs PC, Bruno RD. (2019) A 3D bioprinter platform for mechanistic analysis of tumoroids and chimeric mammary organoids. *Sci Rep*, 9(1):7466.
- 241 Gebeyehu A, Surapaneni SK, Huang J, Mondal A, Wang VZ, Haruna NF, Bagde A, Arthur P, Kutlehria S, Patel N, Rishi AK, Singh M. (2021) Polysaccharide hydrogel based 3D printed tumor models for chemotherapeutic drug screening. *Sci Rep*, 11(1):372.
- 242 Wu D, Berg J, Arlt B, Röhrs V, Al-Zeer MA, Deubzer HE, Kurreck J. (2021) Bioprinted Cancer Model of Neuroblastoma in a Renal Microenvironment as an Efficiently Applicable Drug Testing Platform. *Int J Mol Sci*, 23(1):122.
- 243 Han J, Jeon S, Kim MK, Jeong W, Yoo JJ, Kang HW. (2022) In vitro breast cancer model with patient-specific morphological features for personalized medicine. *Biofabrication*, 14(3).
- 244 Campbell A, Gutierrez DA, Knight C, Vines CM, Heydarian R, Philipovskiy A, Varela-Ramirez A, Boland T. (2021) Novel Combinatorial Strategy Using Thermal Inkjet Bioprinting, Chemotherapy, and Radiation on Human Breast Cancer Cells; an In-Vitro Cell Viability Assessment. *Materials (Basel)*, 14(24):7864.
- 245 Chen Y, Xu L, Li W, Chen W, He Q, Zhang X, Tang J, Wang Y, Liu B, Liu J. (2022) 3D bioprinted tumor model with extracellular matrix enhanced bioinks for nanoparticle evaluation. *Biofabrication*, 14(2).
- 246 Schmid R, Schmidt SK, Hazur J, Detsch R, Maurer E, Boccaccini AR, Hauptstein J, Teßmar J, Blunk T, Schrüfer S, Schubert DW, Horch RE, Bosserhoff AK, Arkudas A, Kengelbach-Weigand A. (2020) Comparison of Hydrogels for the Development of Well-Defined 3D Cancer Models of Breast Cancer and Melanoma. *Cancers (Basel)*, 12(8):2320.
- 247 Flores-Torres S, Peza-Chavez O, Kuasne H, Munguia-Lopez JG, Kort-Mascort J, Ferri L, Jiang T, Rajadurai CV, Park M, Sangwan V, Kinsella JM. (2021) Alginate-gelatin-Matrigel hydrogels enable the development and

- multigenerational passaging of patient-derived 3D bioprinted cancer spheroid models. *Biofabrication*, 13(2).
- 248 Hong S, Song JM. (2022) 3D bioprinted drug-resistant breast cancer spheroids for quantitative in situ evaluation of drug resistance. *Acta Biomater*, 138:228-239.
- 249 Cao X, Ashfaq R, Cheng F, Maharjan S, Li J, Ying G, Hassan S, Xiao H, Yue K, Zhang YS. (2019) A Tumor-on-a-Chip System with Bioprinted Blood and Lymphatic Vessel Pair. *Adv Funct Mater*, 29(31):1807173.
- 250 Jiang T, Munguia-Lopez J, Flores-Torres S, Grant J, Vijayakumar S, De Leon-Rodriguez A, Kinsella JM. (2018) Bioprintable Alginate/Gelatin Hydrogel 3D In Vitro Model Systems Induce Cell Spheroid Formation. *J Vis Exp*, (137):57826.
- 251 Ligon SC, Liska R, Stampfl J, Gurr M, Mülhaupt R. (2017) Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing. *Chem Rev*, 117(15):10212-10290.
- 252 Kingsley DM, Roberge CL, Rudkouskaya A, Faulkner DE, Barroso M, Intes X, Corr DT. (2019) Laser-based 3D bioprinting for spatial and size control of tumor spheroids and embryoid bodies. *Acta Biomater*, 95:357-370.
- 253 Swaminathan S, Hamid Q, Sun W, Clyne AM. (2019) Bioprinting of 3D breast epithelial spheroids for human cancer models. *Biofabrication*, 11(2):025003.
- 254 Langer EM, Allen-Petersen BL, King SM, Kendsersky ND, Turnidge MA, Kuziel GM, Riggers R, Samatham R, Amery TS, Jacques SL, Sheppard BC, Korkola JE, Muschler JL, Thibault G, Chang YH, Gray JW, Presnell SC, Nguyen DG, Sears RC. (2019) Modeling Tumor Phenotypes In Vitro with Three-Dimensional Bioprinting. *Cell Rep*, 26(3):608-623.e6.
- 255 Horder H, Guaza Lasheras M, Grummel N, Nadernezhad A, Herbig J, Ergün S, Teßmar J, Groll J, Fabry B, Bauer-Kreisel P, Blunk T. (2021) Bioprinting and Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cell Spheroids for a 3D Breast Cancer-Adipose Tissue Model. *Cells*, 10(4):803.
- 256 Svanström A, Rosendahl J, Salerno S, Leiva MC, Gregersson P, Berglin M, Bogestål Y, Lausmaa J, Oko A, Chinga-Carrasco G, Petronis S, Standoft S,

- Ståhlberg A, Håkansson J, Landberg G. (2021) Optimized alginate-based 3D printed scaffolds as a model of patient derived breast cancer microenvironments in drug discovery. *Biomed Mater*, 16(4).
- 257 Engel M, Belfiore L, Aghaei B, Sutija M. (2022) Enabling high throughput drug discovery in 3D cell cultures through a novel bioprinting workflow. *SLAS Technol*, 27(1):32-38.
- 258 Paškevičiūtė M, Januškevičienė I, Sakalauskienė K, Raišutis R, Petrikaitė V. (2020) Evaluation of low-intensity pulsed ultrasound on doxorubicin delivery in 2D and 3D cancer cell cultures. *Sci Rep*, 10(1):16161.
- 259 Szakács G, Jakab K, Antal F, Sarkadi B. (1998) Diagnostics of multidrug resistance in cancer. *Pathol Oncol Res*, 4(4):251-257.
- 260 Riedl A, Schleder M, Pudelko K, Stadler M, Walter S, Unterleuthner D, Unger C, Kramer N, Hengstschläger M, Kenner L, Pfeiffer D, Krupitza G, Dolznig H. (2017) Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses. *J Cell Sci*, 130(1):203-218.
- 261 Brodaczewska KK, Bielecka ZF, Maliszewska-Olejniczak K, Szczylik C, Porta C, Bartnik E, Czarnecka AM. (2019) Metastatic renal cell carcinoma cells growing in 3D on poly-D-lysine or laminin present a stem-like phenotype and drug resistance. *Oncol Rep*, 42(5):1878-1892.
- 262 Lucà R, Assenza MR, Maiullari F, Pieroni L, Maiullari S, Federici G, Marini F, Rizzi R, Urbani A, Soddu S, Moretti F. (2021) Inhibition of the mTOR pathway and reprogramming of protein synthesis by MDM4 reduce ovarian cancer metastatic properties. *Cell Death Dis*, 12(6):558.
- 263 Tóké AM, Vári-Kakas S, Kulka J, Törőcsik B. (2022) Tumor Glucose and Fatty Acid Metabolism in the Context of Anthracycline and Taxane-Based (Neo)Adjuvant Chemotherapy in Breast Carcinomas. *Front Oncol*, 12:850401.
- 264 Hofmann S, Cohen-Harazi R, Maizels Y, Koman I. (2022) Patient-derived tumor spheroid cultures as a promising tool to assist personalized therapeutic decisions in breast cancer. *Transl Cancer Res*, 11(1):134-147.

- 265 Lenin S, Ponthier E, Scheer KG, Yeo ECF, Tea MN, Ebert LM, Oksdath Mansilla M, Poonnoose S, Baumgartner U, Day BW, Ormsby RJ, Pitson SM, Gomez GA. (2021) A Drug Screening Pipeline Using 2D and 3D Patient-Derived In Vitro Models for Pre-Clinical Analysis of Therapy Response in Glioblastoma. *Int J Mol Sci*, 22(9):4322.
- 266 Shuford S, Wilhelm C, Rayner M, Elrod A, Millard M, Mattingly C, Lotstein A, Smith AM, Guo QJ, O'Donnell L, Elder J, Puls L, Weroha SJ, Hou X, Zanfagnin V, Nick A, Stany MP, Maxwell GL, Conrads T, Sood AK, Orr D, Holmes LM, Gevaert M, Crosswell HE, DesRochers TM. (2019) Prospective Validation of an Ex Vivo, Patient-Derived 3D Spheroid Model for Response Predictions in Newly Diagnosed Ovarian Cancer. *Sci Rep*, 9(1):11153.
- 267 Strelez C, Chilakala S, Ghaffarian K, Lau R, Spiller E, Ung N, Hixon D, Yoon AY, Sun RX, Lenz HJ, Katz JE, Mumenthaler SM. (2021) Human colorectal cancer-on-chip model to study the microenvironmental influence on early metastatic spread. *iScience*, 24(5):102509.
- 268 Neufeld L, Yeini E, Reisman N, Shtilerman Y, Ben-Shushan D, Pozzi S, Madi A, Tiram G, Eldar-Boock A, Ferber S, Grossman R, Ram Z, Satchi-Fainaro R. (2021) Microengineered perfusable 3D-bioprinted glioblastoma model for in vivo mimicry of tumor microenvironment. *Sci Adv*, 7(34):eabi9119.
- 269 Sbirkov Y, Molander D, Milet C, Bodurov I, Atanasov B, Penkov R, Belev N, Forraz N, McGuckin C, Sarafian V. (2021) A Colorectal Cancer 3D Bioprinting Workflow as a Platform for Disease Modeling and Chemotherapeutic Screening. *Front Bioeng Biotechnol*, 9:755563.
- 270 Wang X, Zhang X, Dai X, Wang X, Li X, Diao J, Xu T. (2018) Tumor-like lung cancer model based on 3D bioprinting. *3 Biotech*, 8(12):501.
- 271 Lin Y, Yang Y, Yuan K, Yang S, Zhang S, Li H, Tang T. (2022) Multi-omics analysis based on 3D-bioprinted models innovates therapeutic target discovery of osteosarcoma. *Bioact Mater*, 18:459-470.

- 272 Zhou X, Zhu W, Nowicki M, Miao S, Cui H, Holmes B, Glazer RI, Zhang LG. (2016) 3D Bioprinting a Cell-Laden Bone Matrix for Breast Cancer Metastasis Study. *ACS Appl Mater Interfaces*, 8(44):30017-30026.
- 273 Hughes AM, Kolb AD, Shupp AB, Shine KM, Bussard KM. (2021) Printing the Pathway Forward in Bone Metastatic Cancer Research: Applications of 3D Engineered Models and Bioprinted Scaffolds to Recapitulate the Bone-Tumor Niche. *Cancers (Basel)*, 13(3):507.
- 274 Vinson BT, Phamduy TB, Shipman J, Riggs B, Strong AL, Sklare SC, Murfee WL, Burow ME, Bunnell BA, Huang Y, Chrisey DB. (2017) Laser direct-write based fabrication of a spatially-defined, biomimetic construct as a potential model for breast cancer cell invasion into adipose tissue. *Biofabrication*, 9(2):025013.
- 275 Bersini S, Miermont A, Pavesi A, Kamm RD, Thiery JP, Moretti M, Adriani G. (2018) A combined microfluidic-transcriptomic approach to characterize the extravasation potential of cancer cells. *Oncotarget*, 9(90):36110-36125.
- 276 Moccia C, Haase K. (2021) Engineering Breast Cancer On-chip-Moving Toward Subtype Specific Models. *Front Bioeng Biotechnol*, 9:694218.

10. Saját publikációk jegyzékeA disszertáció alapját képező közlemények:

Dankó T*, Petővári G*, Raffay R, Sztankovics D, Moldvai D, Vetlényi E, Krencz I, Rókus A, Sipos K, Visnovitz T, Pápay J, Sebestyén A. (2022) Characterisation of 3D Bioprinted Human Breast Cancer Model for In Vitro Drug and Metabolic Targeting. *Int J Mol Sci*, 23(13):7444. **IF: 3,104**

*megosztott első szerzőség

Sebestyén A, **Dankó T**, Sztankovics D, Moldvai D, Raffay R, Cervi C, Krencz I, Zsiros V, Jeney A, Petővári G. (2021) The role of metabolic ecosystem in cancer progression - metabolic plasticity and mTOR hyperactivity in tumor tissues. *Cancer Metastasis Rev*, 40(4):989-1033. **IF: 9,237**

Dankó T, Petővári G, Sztankovics D, Moldvai D, Raffay R, Lőrincz P, Visnovitz T, Zsiros V, Barna G, Márk Á, Krencz I, Sebestyén A. (2021) Rapamycin Plus Doxycycline Combination Affects Growth Arrest and Selective Autophagy-Dependent Cell Death in Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 22(15):8019. **IF: 6,208**

Sebestyén, Anna; Petővári, Gábor; **Dankó, Titanilla**; Sztankovics, Dániel; Vetlényi, Enikő; Khor, András; Jeney, András; Krencz, Ildikó; Pápay, Judit. A tumorszövet metabolikus heterogenitása - anyagcsere-változások vizsgálati lehetőségei és jelentősége a daganatbiológiában. *ORVOSKÉPZÉS* 96 : 3 pp. 479-493. , 15 p. (2021)

Petővári G, **Dankó T**, Tőkés AM, Vetlényi E, Krencz I, Raffay R, Hajdu M, Sztankovics D, Németh K, Vellai-Takács K, Jeney A, Kulka J, Sebestyén A. (2020) In Situ Metabolic Characterisation of Breast Cancer and Its Potential Impact on Therapy. *Cancers (Basel)*, 12(9):2492. **IF: 6,639**

Petővári G, Hujber Z, Krencz I, **Dankó T**, Nagy N, Tóth F, Raffay R, Mészáros K, Rajnai H, Vetlényi E, Takács-Vellai K, Jeney A, Sebestyén A. (2018) Targeting cellular metabolism using rapamycin and/or doxycycline enhances anti-tumour effects in human glioma cells. *Cancer Cell Int*, 18:211. **IF: 3,439**

A disszertációtól független saját közlemények:

Sebestyén, Anna; **Dankó, Titanilla**. A sejttenyésztés alapjai, lehetőségei és kihívásai. In: Krenács, Tibor; Bödör, Csaba; Matolcsy, András (szerk.) Patológiai és molekuláris onkodiagnosztikai módszerek : Kézikönyv patológusoknak, kutatóknak, analitikusoknak, asszisztenseknek és a társszakmák képviselőinek. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó (2021) 646 p. pp. 253-263. , 11 p.

Bohusné Barta B, Simon Á, Nagy L, **Dankó T**, Raffay RE, Petővári G, Zsiros V, Sebestyén A, Sipos F, Múzes G. (2022) Survival of HT29 cancer cells is influenced by hepatocyte growth factor receptor inhibition through modulation of self-DNA-triggered TLR9-dependent autophagy response. PLoS One, 17(5):e0268217. **IF: 3,752**

Sipos F, Bohusné Barta B, Simon Á, Nagy L, **Dankó T**, Raffay RE, Petővári G, Zsiros V, Wichmann B, Sebestyén A, Múzes G. (2022) Survival of HT29 Cancer Cells Is Affected by IGF1R Inhibition via Modulation of Self-DNA-Triggered TLR9 Signaling and the Autophagy Response. Pathol Oncol Res, 28:1610322. **IF: 2,874**

Zsigrai S, Kalmár A, Barták BK, Nagy ZB, Szigeti KA, Valcz G, Kothalawala W, **Dankó T**, Sebestyén A, Barna G, Pipek O, Csabai I, Tulassay Z, Igaz P, Takács I, Molnár B. (2022) Folic Acid Treatment Directly Influences the Genetic and Epigenetic Regulation along with the Associated Cellular Maintenance Processes of HT-29 and SW480 Colorectal Cancer Cell Lines. Cancers (Basel), 14(7):1820. **IF: 6,575**

Forika G, Kiss E, Petovari G, **Danko T**, Gellert AB, Krenacs T. (2021) Modulated Electro-Hyperthermia Supports the Effect of Gemcitabine Both in Sensitive and Resistant Pancreas Adenocarcinoma Cell Lines. Pathol Oncol Res, 27:1610048. **IF: 2,874**

Krencz I, Sztankovics D, **Danko T**, Sebestyén A, Khor A. (2021) Progression and metastasis of small cell lung carcinoma: the role of the PI3K/Akt/mTOR pathway and metabolic alterations. Cancer Metastasis Rev, 40(4):1141-1157. **IF: 9,237**

Sebestyén A, Kopper L, **Dankó T**, Tímár J. (2021) Hypoxia Signaling in Cancer: From Basics to Clinical Practice. Pathol Oncol Res, 27:1609802. **IF: 2,530**

Felkai L, Krencz I, Kiss DJ, Nagy N, Petővári G, **Dankó T**, Micsík T, Khor A, Tornóczky T, Sági Z, Sebestyén A, Csóka M. (2020) Characterization of mTOR Activity

and Metabolic Profile in Pediatric Rhabdomyosarcoma. *Cancers (Basel)*, 12(7):1947. **IF: 6,639**

Galamb O, Kalmár A, Sebestyén A, **Dankó T**, Kriston C, Fúri I, Hollósi P, Csabai I, Wichmann B, Krenács T, Barták BK, Nagy ZB, Zsigrai S, Barna G, Tulassay Z, Igaz P, Molnár B. (2020) Promoter Hypomethylation and Increased Expression of the Long Non-coding RNA LINC00152 Support Colorectal Carcinogenesis. *Pathol Oncol Res*, 26(4):2209-2223. **IF: 3,201**

Petővári G, **Dankó T**, Krencz I, Hujber Z, Rajnai H, Vetlényi E, Raffay R, Pápay J, Jeney A, Sebestyén A. (2020) Inhibition of Metabolic Shift can Decrease Therapy Resistance in Human High-Grade Glioma Cells. *Pathol Oncol Res*, 26(1):23-33. **IF: 3,201**

Zsigrai S, Kalmár A, Nagy ZB, Barták BK, Valcz G, Szigeti KA, Galamb O, **Dankó T**, Sebestyén A, Barna G, Szabó V, Pipek O, Medgyes-Horváth A, Csabai I, Tulassay Z, Igaz P, Takács I, Molnár B. (2020) S-Adenosylmethionine Treatment of Colorectal Cancer Cell Lines Alters DNA Methylation, DNA Repair and Tumor Progression-Related Gene Expression. *Cells*, 9(8):1864. **IF: 6,600**

Horváth Z, Reszegi A, Szilák L, **Dankó T**, Kovalszky I, Baghy K. (2019) Tumor-specific inhibitory action of decorin on different hepatoma cell lines. *Cell Signal*, 62:109354. **IF: 3,968**

Sticz T, Molnár A, **Dankó T**, Hujber Z, Petővári G, Nagy N, Végső G, Kopper L, Sebestyén A. (2019) The Effects of Different mTOR Inhibitors in EGFR Inhibitor Resistant Colon Carcinoma Cells. *Pathol Oncol Res*, 25(4):1379-1386. **IF: 2,826**

Hujber Z, Horváth G, Petővári G, Krencz I, **Dankó T**, Mészáros K, Rajnai H, Szoboszlai N, Leenders WPJ, Jeney A, Tretter L, Sebestyén A. (2018) GABA, glutamine, glutamate oxidation and succinic semialdehyde dehydrogenase expression in human gliomas. *J Exp Clin Cancer Res*, 37(1):271. **IF: 5,646**

Hujber Z, Petővári G, Szoboszlai N, **Dankó T**, Nagy N, Kriston C, Krencz I, Paku S, Ozohanics O, Drahos L, Jeney A, Sebestyén A. (2017) Rapamycin (mTORC1 inhibitor) reduces the production of lactate and 2-hydroxyglutarate oncometabolites in IDH1 mutant fibrosarcoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 36(1):74. **IF: 6,217**

Fehér D, Szabó G, **Dankó T**, Juhos K, Szentes P, Csukás D, Sándor J, Ender F, Fónagy L, Molnár K, Jedlovszky-Hajdú A, Zrínyi M, Wéber G. (2016) Abdominal hernia repair with poly(succinimide) and with its cysteamine crosslinked nanofiber hernia meshes. A preliminary experimental study. *Int J Biotechnol Mol Biol Res*, 6(2):1-6. **IF: -**

Nagy N, Hajdu M, Márk Á, Király PA, Tóth M, **Dankó T**, Csóka M, Sebestyén A. (2016) Growth inhibitory effect of rapamycin in Hodgkin-lymphoma cell lines characterized by constitutive NOTCH1 activation. *Tumour Biol*, 37(10):13695-13704. **IF: 3,650**

Nemes K, Csóka M, Nagy N, Márk Á, Váradi Z, **Dankó T**, Kovács G, Kopper L, Sebestyén A. (2015) Expression of certain leukemia/lymphoma related microRNAs and its correlation with prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pathol Oncol Res*, 21(3):597-604. **IF: 1,940**

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani mindazoknak, akik PhD-munkám során támogattak, segítséget nyújtottak.

Köszönöm dr. Matolcsy András intézetvezető professzor úrnak, hogy a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben végezhettem kutatómunkámat.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, dr. Sebestyén Annának, hogy az általa vezetett munkacsoportban végezhettem TDK- és a PhD-munkámat, illetve, hogy nagy türelemmel támogatja és irányítja szakmai fejlődésemet. Köszönöm, a bizalmat, a hosszú évek során nyújtott szakmai és emberi támogatást, bátorítást, hogy bármikor fordulhattam hozzá az esetlegesen felmerülő problémákkal.

Szeretném megköszönni a Tumorbiológiai labor volt és jelenlegi PhD-hallgatóinak és munkatársainak a baráti laborléggé várt és a motiváló környezetet. Köszönöm Kovácsné dr. Márk Ágnesnek és dr. Nagy Noéminek, hogy még TDK-sként számos módszert elsajátíthattam tőlük. Továbbá szeretném megköszönni dr. Hajdu Melindának, dr. Hujber Zoltánnak, dr. Krencz Ildikónak, dr. Moldvai Dorottyának, dr. Petővári Gábornak, Raffay Reginának, Sztankovics Dánielnek és dr. Vetlényi Enikőnek a támogatást, türelmüket és szakmai tanácsaikat, a kísérletek kivitelezésében és kiértékelésében való segítségüket.

Köszönöm a Tumorbiológiai labor volt és jelenlegi TDK-sainak, Gelencsér Rebekának, Kathy Jeonnak és Kóczán Patrícianak, a kísérletekben való lelkes közreműködésüket.

Köszönöm a Szövettenyésztő laborban dolgozó PhD-hallgatóknak, Czeti Ágnesnek, dr. Fórika Gertrúrnak, dr. Jakab Annának, Keresztes Dávidnak, Kiss Évának, Mátyási Barbarának, Pásztor-Csizmarik Anitának és dr. Váncza Lórándnak, hogy megvitattuk a sejtek olykor „ügyes-bajos dolgait”.

Köszönöm dr. Zsiros Viktóriának az elektronmikroszkópos (Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet) és dr. Visnovitz Tamásnak a konfokális mikroszkópos (Semmelweis Egyetem Genetika, Sejt- és Immunológia Intézet) felvételek elkészítésében való segítségüket.

Az áramlás citometriai mérésekben való segítségükért szeretnék köszönetet mondani dr. Barna Gábornak, Kovácsné dr. Márk Ágnesnek és dr. Szalóki Gábornak.

Köszönet illeti a Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet a Biopszia laborok munkatársait a metszetkészítésben nyújtott technikai segítségükért, külön köszönöm Kurucz Csillának és Tamási Annának a segítséget.

Az *in vivo* kísérletekben való segítséget szeretném megköszönni a Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Állatházában dolgozó munkatársaknak, Sztodola Andrásnak és Kövi Emesének.

Külön köszönettel tartozom Csorba Gézánnak, Maricának, hogy tőle tanulhattam a szövettenyésztési technikákat, akinek elhivatottsága és szaktudása mindig példaként fog állni előttem.

Köszönöm továbbá a Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet valamennyi munkatársainak, hogy kérdéseimmel fordulhattam hozzájuk és segítettek munkámat.

Köszönöm dr. Barna Gábornak, hogy elvállalta dolgozatom házi bírálatát, meglátásaival, hasznos tanácsaival segítette munkámat. Köszönöm a dolgozatom hivatalos bírálójának, dr. Balázs Margitnak és dr. Hegyesi Hargitának is, hogy időt fordítottak a disszertációm áttanulmányozására.

Szeretném megköszönni Laczik Ceciliának a PhD-tanulmányaimmal kapcsolatos ügyintézésben való segítségét.

Köszönettel tartozom az Emberi Erőforrások Minisztériumának, valamint a Stephen W. Kuffler Kutatási Alapítványnak, hogy pályázataik révén tudományos munkámat és a külföldi tanulmányutamat támogatták.

Hálával tartozom szüleimnek, Dankó Józsefnek és Dankó Józsefnének, hogy szeretettel, türelemmel támogattak és végigkísérték eddigi munkámat. Szeretném kiemelni húgom, Dankó Éva, töretlen biztatását, odaadó támogatását, aki mindig a legnagyobb támaszom. Köszönöm, hogy mellettem álltatok minden döntésemben, hogy hittetek, hisztek bennem, nélkülötök most nem tarthatnék itt.