

**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

Tag: Dr. Szász Attila Marcell, PhD,  
kutatásvezető

Budapest  
2022

## 1. Bevezetés

A daganatsejtek extrém alkalmazkodó képessége a normál sejtek számára már nem tolerálható környezeti feltételekhez, amely lehetővé teszi, hogy a daganatszövet a változó környezeti feltételek és terápiás kezelések mellett is túléljen, jól ismert. Ennek egyik következménye az adott kezelésekkal szembeni érzékenység megváltozása, elvesztése, a terápiaerezisztencia kialakulása is. A háttérben több, a daganat kialakulása és kezelése közben megjelenő szabályozási, genetikai változás áll, amelyek közé tartoznak a sejtszintű anyagcsere (metabolikus)-változások is.

A daganat progressziós változásairól sok adatot a szöveti összehasonlító vizsgálatokból, 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 a háromdimenziós (3D) struktúra jelentősen megváltoztatja a sejtek proliferációját, túlélését, befolyásolhatja a sejtek anyagcseréjét. A daganatellenes hatóanyagok fejlesztése és tesztelése ennek ellenére még mindig jellemzően hagyományos kétdimenziós (2D) *in vitro* sejttenyészetekben zajlik. Ezekben a sejtek kezelőszerekre adott válasza torzulhatnak (rezisztencia-, szenzitivitáskülönbségek), amely jelentősen módosíthatja a gyógyszerhatóanyag-tesztek eredményeit.

A malignus sejtekben felhalmozódó genetikai, génszabályozási, jelátviteli zavarok, a genetikai instabilitás, különböző környezeti hatások vezetnek a daganatsejtek korlátlan és invazív proliferációjához és

túléléséhez, a szervezet immunvédekező mechanizmusainak elégtelenségéhez, a metasztázisképzéshez. Ezekben a bioenergetikai, metabolikus egyensúly elvesztésének, és a plaszticitásnak szerepe megkérdőjelezhetetlen.

A daganatsejtek bioenergetikai folyamatainak, azok változásainak és ennek akár az egész szervezet alapanyagcseréjét befolyásoló hatásainak vizsgálata a daganatkutatás egyik fontos területe napjainkban. A tumorsejtek túlélésük, proliferációjuk és a folyamatosan változó mikrokörnyezeti alkalmazkodásuk érdekében az egész szövet, a környező sejtek anyagcsere-folyamatait is átprogramozzák. A daganatterápiás fejlesztésekben megnőtt az igény arra, hogy a daganatok komplex metabolikus átrendeződését és folyamatait feltárjuk.

Az alkalmazkodás jellemzőjeként a daganatszövetben sokféle metabolikus fenotípusú tumorsejtet figyelhetünk meg, ez a daganatszövet metabolikus plaszticitásának háttere. A daganatok egyedi jellegzetességei, a szövetet alkotó daganatos és nem daganatos sejtek (pl.: gyulladáshoz vezető elemek, erek, fibroblasztok) aránya, az extracelluláris mátrix alkotók változatossága, az  $O_2$  és a tápanyagok koncentrációjának eltérései már önmagukban szöveti heterogenitást teremtenek. Az elmúlt évek 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, amelyben fontos a daganatsejtek anyagcsere változásainak és metabolikus alkalmazkodásának megismerése.

Az évtizedek óta alkalmazott metabolikus célpontú kemoterápiás készítmények daganatellenes hatásainak és a daganatsejtek jellegzetes metabolikus változásainak

megismerése a tumorigenezisben, tumorprogresszióban, illetve az újabban megismert anyagcsere-folyamatok célzása elősegítheti a további terápiás fejlesztéseket.

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, és ennek megfelelően szabályozza a sejt növekedését, anyagcseréjét (felépítő és lebontó folyamatok, autofágia), valamint túlélését. Az útvonal hibás működése különböző szabályozási zavarokhoz, betegségek kialakulásához vezet. A daganatproliferációval járó folyamatokban emelkedett mTOR-aktivitás figyelhető meg. mTOR-gátló kezeléskor sok más célzott kezeléshez hasonlóan jellemzően inkább citosztatikus, mint citotoxikus hatások jelennek meg, a túlélő sejtekben aktiválódó autofágiás mechanizmusok támogatják a sejtek túlélését, így hozzájárulhatnak a rezisztencia megjelenéséhez is. A rapalógok (rapamycin származékai) mellett, más antimetabolikus kezeléseknek is vannak, lehetnek tumornövekedést gátló hatásai (pl.: metformin daganat incidenciát és egyes tumorok növekedését gátló hatásai).

A korábban elterjedt „*egy betegség egy hatóanyag elméletet*” felválthatja a gyógyszerhatóanyagok újrahasonosítása, újra pozicionálása, amely daganatos betegségek kezelésében is megjelenhet. Ilyen esetben csökkenthető a farmakológiai tesztekhez szükséges idő és költség is.

Előbbiek költségeit emeli a preklinikai és klinikai vizsgálatok alacsony sikeressége, amelynek hátterében szerep jut annak is, hogy a daganatszövet heterogenitását, a sejtek egyedi metabolikus különbségeit az *in vitro* vizsgálatokban nehéz vagy nem lehet modellezni.

Számos celluláris folyamatban kulcsszerepet töltenek be a mitokondriumok változásai, összefüggésben anyagcsere-folyamatokkal, a jelátviteli változásokkal, indukált sejthalál-mechanizmusokkal. A sejtekben az új mitokondriumok képződése és a károsodott szerkezetű vagy funkciójú, illetve a feleslegessé váltak szelektív autofágiás lebontása között (mitofágia) egyensúly van. A mitofágia támogatni és gátolni is képes a daganatprogressziót. Ezzel összefüggésben a mitokondrium, a mitokondriumok minőségellenőrző folyamatainak gátlása is potenciális daganatterápiás célpont lehet.

A tetraciklin analóg doxiciklin antibiotikum ígéretes mitokondriális biogenezis gátló lehet daganatok kezelésében. Az antibiotikumok tolerálható mellékhatásprofilal rendelkeznek (bár a mikrobiomra gyakorolt hatásai és ennek szerepe a daganatos progresszióban külön vizsgálatokat igényel), repozicionált használatukkal a daganatössejtek is támadhatók lehetnek.

A GLOBOCAN elemzése világviszonylatban az összes diagnosztizált új esetet figyelembe véve az emlődaganatok állnak az első helyen. A magas prevalencia egyik oka a betegség kialakulását támogató kockázati faktorok felhalmozódása (pl.: genetikai, környezeti, életmódi tényezők). Az új esetek számának növekedéséhez hozzájárulhatnak az elterjedő prevenció, szűrő-és regisztrációs programok is. A korai felismerésnek és a terápiák fejlődésének köszönhetően a mortalitási ráta már csökkenést mutat, de még így is jelentős ebben a daganattípusban. Az emlődaganatokat genetikai és molekuláris sajátosságaik alapján több eltérő előfordulási gyakoriságú, klinikai lefolyású, terápiás érzékenységgű, progressziójú szubtípusba sorolhatjuk.

Ezek a szubtípusok metabolikus eltérésekkel is jellemezhetők.

Évtizedeken át a 2D adherens/monolayer tenyészetek uralták a betegségmodellezést, citotoxicitási vizsgálatokat és a gyógyszerfejlesztések első lépéseit. A sejtek természetes, natív környezetének megfelelő, minél pontosabb, de kontroll alatt tartható lemásolása jelenti az első alapvető lépést ahhoz, hogy a kísérleti rendszerekben használt modellek fiziológiás szempontból minél pontosabbak legyenek. Az elmúlt évtizedekben fejlődésnek indult 3D sejtenyésztés esetében, a 3D szferoid-, organoid tenyészetekben az eredmények azonban alig reprodukálhatók, és nem jelenítik meg a gyógyszer penetrancia különbségeket sem. Előbbi modellekben a 3D, de nem szöveti struktúra még mindig távol áll az *in vivo* környezet modellezésétől. Az *in vivo* állatmodellekben tapasztalt megfigyelések értelmezése és interpretálása a humán szervezetre vonatkozóan is kihívásokat jelent. Az új 3D modellrendszerek azonban alkalmasabbak a mechanikai és biokémiai jellegzetesség megjelenítésére, pl.: a sejt-sejt, sejt-extracelluláris mátrix kapcsolatok, a szöveti merevség és egyes faktorok gradiens szerinti eloszlása a daganatszövetben. A legkorszerűbb megoldások, köztük a 3D bionyomtatott modellek és tumormodellek folyamatos technológiai fejlesztései egyre újabb lehetőségeket teremtenek. A 3D élősejtes bionyomtatási technika olyan innovatív megoldás, ahol többféle normál és tumoros sejtípus is megjelenhet, így igen hatékony eszköze lehet a különböző betegségmodellek vagy akár személyre szabott terápiák tesztelésének. Mindehhez azonban a 3D bionyomtatás protokollok standardizálása nélkülözhetetlen.

## 2. Célkitűzés

Munkámban rapamycin, doxiciklin és doxorubicin kezelések hatásait (pl.: proliferációgátlással párhuzamosan megjelenő sejthalál-folyamatok) vizsgáltam különböző *in vitro* (hagyományos 2D, 3D szferoid, valamint 3D bionyomtatott szövetszerű struktúrák) és xenograft modellrendszerekben. Előbbiek mellett a metabolikus változásokat, a kezelésekkel szembeni érzékenység különbségeket és a modellek 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 a lehetséges sejthalál-mechanizmusoknak vizsgálata.
3. ZR75.1 humán emlőcarcinoma sejtek hagyományos 2D, 3D sejttenyésztési (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

#### ***Sejttenyésztés és in vitro és in vivo kezelések***

*In vitro* kísérleteinkben különböző szöveti eredetű humán tumorsejtvonalakat használtunk (colon carcinoma, fibrosarcoma, glioma/glioblastoma, tüdő adenocarcinoma, melanoma, prosztatata carcinoma), köztük tíz humán emlőcarcinoma sejtvonalat használtam (luminal A: MCF7 és T47D; luminal B: BT474 és ZR75.1; HER2+: SKBR3 és MDA-MB-453; tripla negatív emlőcarcinoma szubtypus: BT549, HS578T, MDA-MB-231 és MDA-MB-468). Szferoid sejttenyészetet ultra-low attachment típusú plate, illetve függőcsepp technika alkalmazásával alakítottunk ki. Tumorszövetet reprezentáló (tissue mimetic structure – TMS) 3D struktúrák létrehozásához extrúziós, „szálhúzáson” alapuló 3D bionyomtatót használtunk. 0-96 órás rapamycin, doxiciklin, doxorubicin, klorokin, necrostatin-1 és Ac-DEVD-CHO kezeléseket alkalmaztunk. Hosszútávú hatásokat is vizsgáltunk (folyamatos és megvonásos kezelések *in vitro* és *in vivo*). A proliferációs, metabolikus aktivitást befolyásoló hatásokat Alamar blue és szulforodamin B (SRB) tesztek, sejtszám meghatározások segítették *in vitro*.

Xenograft modellek létrehozásához ZR75.1 humán emlőcarcinoma sejtet injektáltunk nőstény SCID egerek emlőtájékára. *In vivo* Rapamune; doxiciklin; Rapamune + doxiciklin kombináció és doxorubicin kezelések hatásait teszteltük.

#### ***Fehérje-expresszió vizsgálata hagyományos Western blot, Wes<sup>TM</sup> Simple módszerrel, immunfestésekkel***

Az alap fehérje-expressziós szintek, illetve a kezelések hatására bekövetkező fehérjeszintű változások kimutatására hagyományos Western blot technikát és/vagy kapilláris-alapú Wes<sup>TM</sup> Simple módszert



használtunk. A következő fehérjék vizsgálatát végeztük el: sejthalál-mechanizmushoz kapcsolatosan – LC3B, a p62 és a RIP1; egyes mTOR/AKT (p-4EBP, p-S6, p-Ser473-AKT és p-mTOR) és metabolikus útvonalban érintett fehérjék (CPT1A, COX4, FASN, LDHB és PKM2). A normalizációhoz anti- $\beta$ -aktin ellenanyagot használtunk. Különböző molekuláris szubtypussal (luminal A, luminal B, HER2+ és tripla negatív) diagnosztizált emlődaganatos betegek szövettani mintáiban, illetve xenograftokból származó tumorszövetmintákon immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatokat is végeztünk. A következő fehérjék expresszióit vizsgáltuk: ACC, ACSS2, ASCT2, ATPb, CPT1A, FASN, GLUT1, GLS, hasított kaszpáz-3, HK2, LC3B, LDHA, PFKP, p-ACC, p-S6, p-mTOR, Rictor és TOM20. A Humán Protein Atlas adatbázisban fellelhető emlődaganatos betegminták szövétmintáinak elemzését is elvégeztük, értékeltük a festések szöveti heterogenitását. A Shannon-féle diverzitási indexet használtuk a tumorszöveti minták intratumorális heterogenitásának értékeléséhez. Egyes vizsgálatainkhoz fluoreszcens immunfestéseket, majd konfokális és fluoreszcens mikroszkópos felvételeket is készítettünk.

### ***Sejthalál mechanizmusok vizsgálata***

A nekrosis, illetve apoptózis %-os arányának meghatározásához, áramlási citométert használtunk. A nekrotizáló sejtek detektálását propidium-jodid (PI) festéssel végeztük. Az apoptózis és a sejtciklus meghatározásához a sejteket fixáltuk, majd alkalikus extrakció és RNáz kezelés után végeztünk PI-festést követő értékelést (FACSCalibur és Kaluza szoftver).

Az indukált apoptózis kimutatásához az EnzChek Caspase-3 Assay Kit #1 kaszpáz-3 aktivitás vizsgálatot is

elvégeztük és Ac-DEVD-CHO kaszpáz inhibitor is használtunk.

Az autofágia és a mitokondriumokat érintő változások vizsgálatakor az LC3 és a p62 mennyiségi változásainak követése mellett LC3 és TOM20 fluoreszcens immunfestéseket és MitoTracker Red CMXRos festéket is használtunk, majd konfokális mikroszkópos felvételeket készítettünk. Az autofágia és a sejtek morfológiai vizsgálatát transzmissziós elektronmikroszkóppal is kiegészítettük ZR75.1 xenograft kísérleteinkben.

### ***3D bionyomtatott szövetszerű struktúrák vizsgálata***

Az alginátalapú biotintáink segítségével 3D bionyomtatott ZR75.1 szövetszerű struktúrákat 3, 7, 10 nap vagy egyes esetekben hosszabb idő és kezelések után is vizsgáltuk egyrészt formalin-fixált paraffinba ágyazott szövetek különböző festései, másrészt módosított Alamar Blue és SRB tesztek, illetve konfokális mikroszkóp, valamint az *in vivo* tumorogenitás szempontjából xenotranszplantáció segítségével.

### ***Statisztikai analízis***

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 (GraphPad Prism szoftver).  $p \leq 0,05$  értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## 4. Eredmények

### ***Rapamycin + doxiciklin sejtproliferációt gátló és mitofágiát indukáló hatásai in vitro és in vivo***

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a rapamycin + doxiciklin kombináció a legkülönbözőbb szolid tumor sejtvonalakban tumornövekedés gátló hatású. Jellemeztük a kezelés hatását *in vitro* és *in vivo* sejtvonal modelljeinkben. Eredményeink kiemelik, hogy különböző metabolikus útvonalak együttes gátlása szignifikánsan csökkentheti a tumornövekedést *in vitro* és *in vivo* is. Szignifikáns proliferáció csökkenést mutattunk ki a vizsgált szolid daganateredetű sejtvonalak kétharmadában.

Munkámban elsőként végeztünk részletes elemzést a rapamycin + doxiciklin kombináció antitumorális hatásával kapcsolatban humán emlőcarcinoma modellekben. Az antitumorális hatás csökkenő mTOR-aktivitással és proliferáció gátlással 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 Wes<sup>TM</sup> 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 aktiválódhatnak, elsősorban a kombinációs kezeléseknél, ahol a folyamatos hosszútávú kezelés a sejtkultúra kipusztulásához vezetett.

Az autofágiafüggő sejthalál jellegzetességei közül a rapamycin + doxiciklin kezelés után *in vitro* és *in vivo* is

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 a mitokondriumtömeg deplécióját autofagoszómákban, amely a mitofágia (mitokondriális degradáció) jele. Vizsgálatainkban az alkalmazott antibiotikum kezelés metabolikus katasztrófát eredményezett azokban a sejtekben, amelyek így nem tudtak OXPHOS-ra váltani, a mitokondriumok repopulációjának hiányában (gátolt mitokondrium biogenezis).

A rövidtávú kezeléseink és az *in vivo* alkalmazott kezelőszer megvonásos eredményeink azt mutatták, hogy elsősorban a folyamatos, hosszabb kezeléseknél lehet csak érdemi *in vivo* tumornövekedés gátló, tumorpusztító szerepe antimetabolikus kezelések esetében.

Eredményeink alapján a rapamycin + doxiciklin kezelés autofágiát és autofágiafüggő mitokondrium szekvesztrációt indukál, így végső autolizoszomális mitokondrium degradációt, vagyis a mitofágiát okoz.

### ***Hagyományos in vitro 2D és 3D tenyészetek, 3D bionyomtatott szövetszerű struktúrák és in vivo xenograft modellek összehasonlító vizsgálata***

Munkám másik részében egy humán emlőcarcinoma sejtvonal, a ZR75.1 jellegzetességeit, proliferációját és szenzitivitását, korábban leírt rapamycin szenzitiváló hatásait vizsgáltuk *in vitro* hagyományos 2D, többféle 3D sejtenyészetekben, 3D bionyomtatással létrehozott szövetszerű struktúrákban, illetve *in vivo* körülmények

között (xenograft kísérletek). 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* egér modellekben 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 3D bionyomtatott modelleket SCID egerekbe implantáltuk, majd folyamatosan regisztráltuk a tumor *in vivo* növekedését. A kísérleti modellünk alkalmasnak bizonyult gyógyszerhatóanyag-tesztekhez, molekuláris és patomorfológiai célú vizsgálatokhoz.

Kísérleti körülményeink mellett a ZR75.1 sejtvonal 3D bionyomtatott modellrendszerünkben igazolni tudtuk, a sejt-sejt kapcsolatok kialakulását, az erre a daganattípusra jellemző lumenformálást is.

A vizsgálatunk újszerűsége, hogy ugyanazon sejtvonal felhasználásával, a ZR75.1 modellekben hasonlítottuk össze a 2D tenyészetek, a 3D szferoidok, 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 bionyomatott 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 kezelésekből kimutatott rezisztenciát 3D bionyomatott TMS-ekben is tapasztaltuk, de a 2D és 3D szferoid tenyészetek jóval érzékenyebbeknek bizonyultak kísérleteinkben a monoterápiás kezelésekkal szemben.

Kvantitatív összehasonlító fehérje-expressziós vizsgálatunk során a 2D és a 3D szferoid tenyészetek nagyobb mértékű metabolikus hasonlóságát igazolták a Wes<sup>TM</sup> Simple eredmények és ez jelentősen eltért a xenograft modellekben tapasztaltakhoz képest. A xenograft és 3D bionyomatott TMS-ek szöveti metabolikus enzim expressziós mintázatának összehasonlításával, a vizsgált metabolikus fehérjék többségében a xenograftokhoz, illetve a humán tumorokhoz hasonló *in situ* „szöveti” metabolikus heterogenitást is sikerült igazolnunk.

## 5. 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 hatásosak humán emlőcarcinoma *in vitro* és *in vivo* modellekben.

III. A rapamycin + doxiciklin kezelés nekrozis, apoptózis és nekroptózis független autofágia függő sejthalálformát, mitofágiát indukált a ZR75.1 humán emlőcarcinoma sejtekben.

IV. A 3D bionyomatással szövetszerű *in vitro* modellt alakítottunk ki ZR75.1 sejtekkel, amely alkalmas daganatmodell kísérletekre.

V. A ZR75.1 humán emlőcarcinoma sejtvonalmodellek (hagyományos 2D, kétféle 3D szferoid modellek, 3D bionyomatott tenyészetek és *in vivo* xenograftok), jellegzetességeit összehasonlítva a 3D bionyomatott *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.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények:

1) **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

2) 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**

3) **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**

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

5) 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**

6) 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:

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

2) 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**

3) 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**

4) 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**

5) 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**

6) 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**

7) 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**

8) 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**

9) Galamb O, Kalmár A, Sebestyén A, **Dankó T**, Kriston C, Fúri I, Hollósi P, Csabai I, Wichmann B, Krenacs 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**

10) Petővári G, **Dankó T**, Krencz I, Hujber Z, Rajnai H, Vetlányi 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**

11) 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**

12) 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**

13) Sticz T, Molnár A, **Dankó T**, Hujber Z, Petóvári 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**

14) Hujber Z, Horváth G, Petóvári 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**

15) Hujber Z, Petóvári 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**

16) 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: -**

17) 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**

18) 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**

## **7. Köszönetnyilvánítás**

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