

A TERÁPIA-INDUKÁLT SZENESZCENCIA KARAKTERIZÁLÁSA EMLŐRÁKBAN: EGY REVERZIBILIS ÉS GYÓGYSZERREZISZTENS ÁLLAPOT

Ph.D. értekezés

Bajtai Eszter

Patológia és Onkológia tagozat
Semmelweis Egyetem



Témavezetők: József Tóvári, Ph.D., D.Sc.
András Füredi, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Rita Padányi, Ph.D.
Tibor Pankotai, Ph.D.

Komplex vizsga bizottság elnöke: Janina Kulka, Ph.D., D.Sc.

Komplex vizsga bizottság tagjai: Zsuzsa Erdei, Ph.D.
Tamás Garay, Ph.D.

Budapest, 2025

1. Bevezetés

A daganatos megbetegedések száma világszerte folyamatosan emelkedik, 2022-ben közel 20 millió új esetet diagnosztizáltak, és több mint 9,7 millió daganattal összefüggő halálesetet jelentettek. Az emlőrák a nők körében a leggyakoribb rosszindulatú daganat: világszerte évente több mint 2,3 millió új esetet regisztrálnak.

A daganatokkal szembeni terápia sikertelenségének egyik fő oka a sejtekben kialakuló gyógyszerrezisztencia. A tumorsejtek többféle mechanizmust is alkalmazhatnak a terápiás hatások elkerülésére: képesek a gyógyszereket eltávolítani a sejtől, lebontani vagy inaktiválni azokat, illetve fokozni a DNS-károsodás javítását. Emellett elkerülhetik az apoptózist, csökkenthetik a célfehérjék expresszióját, vagy módosíthatják a sejtciklus szabályozását.

A sejtek DNS-károsodásra adott válasza a sérülés mértékétől függ: enyhébb esetben javítási folyamatok indulnak be, súlyos károsodás esetén viszont apoptózis vagy nekrosis következhet be. A két állapot között azonban egy harmadik lehetőség is létezik: a sejtes szeneszcencia, amely során bár a sejtek életben maradnak, de tartósan kilépnek a sejtciklusból és nem osztódnak tovább.

A sejtek szeneszcenciába lépése számos stresszhatásra kialakulhat válaszként, többek közt oxidatív stresszre, ionizáló vagy UV-sugárzásra, onkogének aktiválódására, illetve kemoterápiás kezelésekre. Emellett fontos kiváltó tényező a telomerek rövidülése is az osztódások során, amely végül kiváltja a sejtciklus végleges leállítását. Ezt a folyamatot nevezzük replikatív szeneszcenciának, amelyet Hayflick és Moorhead írtak le először emberi fibroblasztokon – innen származik a „Hayflick-limit” fogalma. A különféle kiváltó ingerek közös jellemzője, hogy DNS-károsodásra adott

válaszreakciót aktiválnak, amelyen keresztül olyan sejtciklus-gátló fehérjék expressziója fokozódik, melyek végül irreverzibilis sejtciklus-leálláshoz vezetnek.

A szeneszscens sejtek jellegzetes morfológiai és molekuláris tulajdonságokkal rendelkeznek. Megfigyelhető a megnövekedett citoplazma térfogat és a nagy, ellaposodott sejttest. Molekuláris szinten megemelkedik a sejtciklus-gátló fehérjék (pl.: p21, p16) szintje, csökken a nukleáris lamina egyik fontos alkotóelemének, a Lamin B1-nek az expressziós szintje, valamint megfigyelhető a szeneszscencia-asszociált β -galaktozidáz (SA- β -gal) fokozott aktivitása, amely fontos markere a szeneszscenciának.

Bár a szeneszscens sejtek osztódásra már nem képesek, metabolikusan rendkívül aktívak maradnak, és különféle szabályozó molekulákat termelnek. Ezt nevezzük szeneszscencia-asszociált szekréciós fenotípusnak (senescence-associated secretory phenotype, SASP). A SASP komponensei közé olyan citokinek, kemokinek tartoznak, amelyek révén a szeneszscens sejtek jelentős hatást gyakorolnak környezetükre, befolyásolják az immunválaszt, és hozzájárulhatnak gyulladásos vagy akár tumorprogreszív mikrokörnyezet kialakulásához.

A szeneszscens sejtek szerepe kettős: rövid távon előnyös tulajdonságokat mutathatnak, például elősegíthetik a sebgyógyulást, az embrionális fejlődést és a daganatellenes immunválaszt. Ugyanakkor tartós fennállásuk esetén káros hatásokat fejthetnek ki: krónikus gyulladásos állapotot idézhetnek elő, gátolhatják az immunrendszer daganatellenes működését, elősegíthetik az angiogenezist és hozzájárulhatnak a tumorsejtek invazivitásához és az áttétképzéshez. Emiatt a szeneszscenciára gyakran „kétélű kardként” hivatkoznak, amely egyszerre hordozza a védő és károsító potenciált.

Fontos külön kiemelni a terápia-indukált szeneszscenciát (therapy-induced senescence, TIS), melyet különböző

kemoterápiás kezelések válhatnak ki. A TIS sokáig kedvező terápiás hatásnak számított, mivel a tudomány jelenlegi állása szerint a szeneszencia irreverzibilis sejtciklus leállást jelent, amely megakadályozza a tumorsejtek további osztódását. Azonban az utóbbi években egyre több kutatás támasztja alá, hogy ez az állapot nem minden esetben visszafordíthatatlan. Egyes kutatások szerint bizonyos tumorsejtek idővel képesek kilépni a szeneszencia állapotból és visszanyerhetik proliferációs képességüket, ezzel hozzájárulva a daganat kiújulásához.

Jelen doktori munkámban ezt a jelenséget vizsgáltam részletesen, különös tekintettel a TIS reverzibilitására, a szeneszencia sejtek fenotípusára, transzkriptomikai sajátosságaira, valamint a kiújulásban betöltött szerepükre.

2. Célkitűzések

A doktori munkám során az alábbi célokat tűztem ki:

- ❖ A terápia-indukált szeneszencia (TIS) karakterizálása négy emlőtumor sejtvonalon több szeneszencia-asszociált marker által
- ❖ A TIS reverzibilitásának vizsgálata, valamint a repopuláló (REPOP) sejtek karakterizálása
- ❖ A TIS sejtek gyógyszerérzékenységi és -rezisztencia profiljának megismerése
- ❖ A TIS-re jellemző transzkriptomikai és proteomikai változások vizsgálata
- ❖ A szenolitikus kezelések hatékonyságának, valamint ezek terápiás potenciáljának feltárása

3. Módszerek

3.1. Sejtvonalak

Az MCF7, T47D (ER⁺/PR⁺) és a MDA-MB-231, Hs578T (ER⁻/PR⁻/HER2⁻) humán emlőtumor sejtvonalakat RPMI médiumban tenyésztettük, amelyet 10% FBS-sel, 5 mM L-glutaminnal és 50 U/mL penicillin–sztreptomycin keverékkel egészítettünk ki. A sejtenyésztés 37 °C-on, 5%-os CO₂-szint mellett történt.

3.2. TIS indukció

A TIS indukció 5 napos doxorubicin kezeléssel történt, sejtvonal-specifikus koncentrációk alkalmazásával: MCF7 – 120 nM, T47D – 70 nM, MDA-MB-231 – 150 nM, Hs578T – 200 nM. A szeneszzens fenotípus kialakulása érdekében a sejtek további 7 napon át standard inkubációs körülmények között (37 °C, 5% CO₂) voltak fenntartva.

A re-szeneszzens (re-TIS) állapot létrehozásához ugyanez a protokoll került megvalósításra a REPOP sejteken.

3.3. SA-β-Gal festés

Senescence β-Galactosidase Staining Kit felhasználásával 96-lyukú platen fixáltuk a sejteket, majd X-gal festőoldatban a sejtek inkubálásra kerültek 37 °C-on, CO₂-mentes környezetben, overnight. Másnap a festőoldat eltávolításra került, a mintákat 70%-os glicerinben tároltuk a fénymikroszkópos fotózáshoz.

3.4. Drog kezelés és életképességi vizsgálatok

A sejtek 10.000 sejt/well sűrűségben lettek kirakva 96-lyukú platekre. A TIS állapot indukciója a 3.2. pontban leírt protokoll szerint valósult meg. Az indukciót követően azonos mennyiségű kontroll (CTR) sejt került kirakásra. A TIS és CTR sejtek a következő napon különböző koncentrációjú vegyületekkel lettek kezelve, majd 5 napig standard körülmények között inkubálásra

kerültek. A kezelések a REPOP és re-TIS sejteken azonos kísérleti feltételek mellett valósultak meg. A re-TIS állapot előállításához 10.000 REPOP sejt/well került kirakásra, amelyet 5 napos doxorubicin-kezelés követett. Az életképesség meghatározása a PrestoBlue™ reagenssel történt, a dózis-hatás görbéket és IC50 értékeket GraphPad Prism v8.0.1 program segítségével illesztettük és számoltuk.

3.5. Immunocitokémiai és fluoreszcens festés

Immuncitokémiai vizsgálatoknál elsődleges antitestként γ -H2A.X, Bcl-2 és Bcl-XL-t használtunk, a sejtmagfestés DAPI-val történt. Fluoreszcens festéshez Nucleolus Bright Red, SPiDER- β Gal Cellular Senescence Detection Kit, MitoBright Red és LysoTracker Red festékeket alkalmaztunk. A képalkotás Zeiss LSM-710 konfokális mikroszkóppal, 40 $\times$ nagyítással zajlott.

3.6. Kristályibolya festés

A sejtek 100.000 sejt/well sűrűségben lettek kirakva 6-well plate-re. Öt napos doxorubicin kezelést követően Navitoclax kezelést alkalmaztunk IC₃₀ koncentrációban heti háromszor két hétig. Jéghideg metanolos fixálást követően 1 ml kristályibolya oldattal festettük a sejteket.

3.7. Western blot

A következő antitesteket használtuk: CDKN1A (p21), LMNB1, Bcl-2, Bcl-XL. Ezt követően HRP-konjugált másodlagos antitestekkel kemilumineszcens előhívó rendszerrel detektáltuk a blotmembránon a jelet.

3.8. *In vivo* kísérletek

Az állatkísérletek az Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológiai Osztályán folytak a Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (MÁB) jóváhagyásával (engedélyszámok: PEI/001/1738-3/2015 és PE/EA/1461-7/2020). A

Brcal^{-/-};p53^{-/-} FVB egerekből származó emlődaganat-fragmentumokat vad típusú nőtény FVB egerek emlőszírszövetébe helyeztük. Amikor a tumor elérte a ~200 mm³-es méretet, DOXIL-lal kezeltük az állatokat (6 mg/kg, intravénásan). Két nappal később navitoklax kezelést alkalmaztunk, 10 napon keresztül, napi 50 mg/kg dózisban.

3.9. Transzkriptom analízis

Transzkriptom analízishez MCF7, T47D, MDA-MB-231 és Hs578T sejtvonalakon bulk RNS-szekvenálást, míg az MCF7 és T47D sejtvonalakon single-cell RNS szekvenálást végeztünk. Mindkettő esetben CTR, TIS és REPOP mintákat vizsgáltunk.

3.10. Citokin expressziós assay

MCF7 és T47D sejtvonalakon CTR és TIS állapotokban RNS expresszió alapján citokin expressziós mérést végeztünk IL6, IL10, IL13 citokinekre. Az expressziót négy referencia génre normalizáltuk.

3.11. Sejtfelszíni és szekretált protomikai vizsgálatok

Sejtfelszíni és szekretált fehérjékre célzott proteomikai vizsgálatot végeztünk MCF7 sejtvonalon CTR, TIS és REPOP állapotban. Ehhez egy olyan biotin-alapú jelölési módszert alkalmaztunk, ami kifejezetten a membránköthető és szekretált fehérjék dúsítására alkalmas. A méréseket tömegspektrometriai módszerrel végeztük.

4. Eredmények

4.1. A terápia-indukált szeneszencia (TIS) indukciója és jellemzése

A doxorubicin kezelés mind a négy vizsgált emlőtumor sejtvonalban sikeresen indukált TIS-t. A sejtekben a szeneszencia morfológiai és molekuláris markerei – így a megnövekedett citoplazma térfogat, nagy, ellaposodott sejtest, a SA- β -galaktozidáz aktivitás, a p21 szint emelkedése és a Lamin B1 expresszió csökkenése – megerősítették a TIS állapotot.

4.2. A TIS reverzibilitásának vizsgálata

A doxorubicin kezelést követően minden vizsgált sejtvonalban jelentős sejtszámcsökkenés volt megfigyelhető, amely hosszú ideig fennmaradt, utalva arra, hogy a túlélő sejtek nem képesek osztódásra. Azonban idővel minden sejtvonal esetében megfigyelhető volt a TIS reverzibilitása: a sejtek visszanyerték proliferációs képességüket, és jellemzően a 30-35. napon repopuláló (REPOP) populációkat hoztak létre. A REPOP állapotban eltűntek a szeneszencia jellegzetes markerei: az SA- β -galaktozidáz aktivitás csökkent, a p21, a Lamin B1 expressziós szintje és a sejtmorfológia is visszatért a kontroll (CTR) sejtekével azonos állapotba.

4.3. A TIS sejtek gyógyszerrezisztenciájának vizsgálata

Annak vizsgálatára, hogy a TIS állapot hogyan befolyásolja a sejtek gyógyszerérzékenységét, kiterjedt citotoxicitási tesztek végeztünk. A TIS sejtek markáns rezisztenciát mutattak a doxorubicinnel szemben, míg a REPOP sejtek érzékenysége helyreállt a CTR sejtekével azonos mértékűre. Újabb kezeléssel

(re-TIS modell) a szenescencia és a gyógyszerrezisztencia ismételten kiváltható volt.

Emellett a TIS sejtek rezisztensek voltak több emlőrákban gyakran alkalmazott kemoterápiás szerrel szemben is (gemcitabin, paclitaxel, docetaxel).

Egy 63 FDA (Amerikai Gyógyszerügynökség) által engedélyezett szert tartalmazó gyógyszerpanel vizsgálata során a tesztelt szerek közül 17 esetében sem a CTR, sem a TIS sejtek nem mutattak érzékenységet, míg a fennmaradó 46 vegyületből 23-mal szemben a TIS sejtek legalább három sejtvonal esetében rezisztenciát mutattak. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TIS állapot önmagában egy gyógyszerrezisztens fenotípus.

4.4. Szenolitikus kezelések vizsgálata

A szenescens sejtek szelektív eliminálására szolgáló szenolitikus szerek közül a navitoclax hatását vizsgáltuk részletesen. Rövid távú *in vitro* vizsgálatokban a navitoclax szignifikáns szenolitikus hatást mutatott, azonban hosszabb távú kezelésekkel ez a hatás nem volt következetesen megfigyelhető. Az *in vivo* vizsgálatok során a pegilált liposzómális doxorubicinnel (DOXIL) kezelt Brca1^{-/-};p53^{-/-} egérmodellben a navitoclax-szal végzett kiegészítő kezelés nem eredményezett javulást sem a túlélésben, sem a relapszus kialakulásának idejében a kizárólagos DOXIL-terápiához képest.

4.5. Transzkriptomikai változások vizsgálata: bulk RNS-szekvenálás elemzés

A négy emlőtumor sejtvonalon végzett bulk RNS-szekvenálással összesen 929 differenciálisan expresszált gént azonosítottunk a TIS és a CTR sejtek között, amelyek közül 96,5% emelkedett expressziót mutatott a TIS állapotban. A TIS → REPOP átmenet során a génexpressziós mintázat megfordult: a differenciáltan expresszált gének túlnyomó többsége (97,8%) csökkent

expressziót mutatott, arra utalva, hogy az emelkedett TIS-asszociált expressziós szintek visszaálltak a CTR sejtekre jellemző kiindulási szintre.

A GSEA analízis alapján a TIS állapotban a proliferációhoz, DNS-javításhoz és sejtciklushoz kapcsolódó génutak szupresszáltak voltak, miközben számos immunválaszhoz köthető útvonal aktiválódott. Ezek az változások a REPOP sejtekben jellemzően visszarendeződnek.

4.6. Egysejt szintű transzkriptomikai profil vizsgálata: single-cell RNS-szekvenálás elemzés

MCF7 és T47D sejtvonalakon végzett single-cell RNS-szekvenálás vizsgálat alapján a TIS állapot jól elkülönült transzkriptomikai mintázatot mutatott.

A TIS állapotot jellegzetes szenescencia-markerek (CDKN1A (p21) overexpresszió, LMNB1 downreguláció) expressziója támasztotta alá, míg a proliferációhoz köthető gének (pl. TOP2A, MKI67) csökkent expressziót mutattak. Találtunk egy „escaper” alpopulációt, amelyben egyszerre volt kimutatható a sejtciklust gátló fehérjék és a proliferációt elősegítő gének túlzott expressziója. Feltételezéseink szerint ezek a sejtek nyerhetik vissza később a proliferációs képességüket és képezhetik a REPOP populáció alapját.

4.7. A TIS immunmoduláló hatásának vizsgálata

Transzkriptomikai vizsgálataink során pathway analízissel kimutattuk számos immunválaszhoz köthető génútvonal aktivációját TIS állapotban, amelyek később a REPOP sejtekben visszarendeződtek. Ez a szabályozás arra utal, hogy a TIS sejtek aktívan képesek módosítani környezetük immunológiai állapotát.

Ennek közvetlen vizsgálatához citokin expressziós analízist végeztünk MCF7 és T47D sejtvonalakon. Az eredmények

alapján a TIS sejtekben jelentősen megnőtt az IL6, IL10 és IL13 citokinek expressziója. Ezek a citokinek ismerten részt vesznek az immunválasz gyengítésében, az immunsejtek gátlásában és a tumortámogató mikrokörnyezet kialakításában. Ezen megfigyelések alapján feltételezhető, hogy a TIS sejtek aktív immunmoduláló és potenciálisan immunszuppresszív hatást fejtenek ki, amellyel képesek lehetnek hosszabb ideig elkerülni az immunrendszer felismerését és eltávolítását, ezzel is hozzájárulva a daganat hosszú távú perzisztenciájához és a kiújulás lehetőségéhez.

4.8. Sejtfelszíni és szekretált proteomikai vizsgálatok

A sejtfelszíni és szekretált fehérjék célzott vizsgálatával 95 olyan fehérjét azonosítottunk, amelyek kizárólag a TIS állapotban mutattak fokozott expressziót. Ezek között több ismert szeneszcencia markert is azonosítottunk, ugyanakkor számos olyan új fehérjét is találtunk, amelyeket korábban nem hoztak összefüggésbe a szeneszcenciával, és amelyek a jövőben potenciális biomarkerként vagy terápiás célpontként szolgálhatnak.

4.9. A TIS sejtek gyógyszerrezisztencia mechanizmusának vizsgálata

Kiterjedt génexpressziós elemzéseink valamint proteomikai adataink alapján is megvizsgáltuk, hogy a TIS sejtekben megfigyelt széleskörű rezisztencia megmagyarázható-e ismert rezisztencia mechanizmusokkal, illetve a vizsgált gyógyszerek célpontjainak expressziós változásával. Eredményeink alapján csak néhány esetben mutatkozott összefüggés, a legtöbb hatóanyag esetében az expressziós mintázat önmagában nem magyarázta a TIS sejtekben tapasztalt rezisztencia- vagy érzékenységi profilt, ami nem-kanonikus vagy kontextusfüggő szabályozó folyamatok szerepére utal.

5. Következtetések

- ❖ A doxorubicin kezelés négy emlőrtumor sejtvonalban sikeresen indukálta a terápia-indukált szeneszencia (TIS) állapotot
- ❖ A TIS reverzibilis: mind a négy vizsgált sejtvonalban a szeneszencia sejtek idővel visszanyerték proliferációs képességüket, és REPOP sejteket hoztak létre
- ❖ A szenolitikus szerek korlátozott hatékonyságot mutattak, a navitoclax *in vivo* nem befolyásolta a relapszus idejét vagy a túlélést
- ❖ A TIS sejtek széles körű drogrezisztenciát mutattak
- ❖ A TIS sejtek génexpressziós szinten is teljesen elkülönült állapotot alkotnak, feltártunk egy „escaper” alpopulációt
- ❖ A TIS sejtek immunszabályozó funkcióval rendelkeznek
- ❖ A proteomikai vizsgálatokkal 95 TIS-specifikus felszíni és szekretált fehérjét azonosítottunk, köztük ismert és potenciálisan új szeneszencia markereket

6. A jelölt publikációs jegyzéke

A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk:

Bajtai E, Kiss C, Bakos É, Langó T, Lovrics A, Schád É, Tisza V, Hegedűs K, Fürjes P, Szabó Z, Tusnády GE, Szakács G, Tantos Á, Spisák S, Tóvári J, Füredi A. Therapy-induced senescence is a transient drug resistance mechanism in breast cancer. *Mol Cancer*. 2025 May 1;24(1):128. doi: 10.1186/s12943-025-02310-0. PMID: 40312750; PMCID: PMC12044945. **IF: 33.9**

Szebényi K, Füredi A, **Bajtai E**, Sama SN, Csiszar A, Gombos B, Szabó P, Grusch M, Szakács G. Effective targeting of breast cancer by the inhibition of P-glycoprotein mediated removal of toxic lipid peroxidation byproducts from drug tolerant persister cells. *Drug Resist Updat*. 2023 Nov;71:101007. doi: 10.1016/j.drug.2023.101007. Epub 2023 Sep 17. PMID: 37741091. **IF: 21.7**

A disszertáció témájához nem kapcsolódó publikációk:

Füredi A, Tóth S, Hegedűs K, Szabó PT, Gaál A, Barta G, Naszályi LN, Kiss K, Bölcskei K, Szeltner Z, **Bajtai E**, Gombos B, Kiss D, Cserepes MT, Kiss A, Pokreisz P, Kenner L, Högler S, Magyar C, Cowles JD, Csiszar A, Tóvári J, Szűts D, Helyes Z, Varga Z, Mező G, Szakács G. Safe delivery of a highly toxic anthracycline derivative through liposomal nanoformulation achieves complete cancer regression. *Mol Cancer*. 2025. Accepted for publication. Ref: Submission ID 11580c0e-613a-4161-963b-348f39e47065. **IF: 33.9**

Vizvari Z, Gyorfı N, Maczko G, Varga R, Jakabfi-Csepregi R, Sari Z, Furedi A, **Bajtai E**, Vajda F, Tadic V, Odry P, Karadi Z, Toth A. Reproducibility analysis of bioimpedance-based self-developed live cell assays. Sci Rep. 2024 Jul 16;14(1):16380. doi: 10.1038/s41598-024-67061-2. PMID: 39013939; PMCID: PMC11252348. **IF:3.9**

Vajda F, **Bajtai E**, Gombos B, Karai E, Hámori L, Szakács G, Füredi A. Új stratégiák fejlesztése a gyógyszerrezisztens daganatok kezeléséhez [Development of novel treatment strategies for drug resistant cancer]. Magy Onkol. 2021 Jun 3;65(2):176-187. Hungarian. Epub 2021 May 9. PMID: 34081765.

ΣIF: 93.4