

Az extracelluláris vezikulák kibocsátását befolyásoló tényezők vizsgálata normál és tumor szövet eredetű organoid modellekkel

Doktori értekezés

Sándor Gyöngyvér Orsolya

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Wiener Zoltán, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Tárnok Krisztián, Ph.D., egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Igaz Péter, az MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Vellainé Takács Krisztina, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Mayer Balázs, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest
2021

Tartalomjegyzék

1. Rövidítésjegyzék	4
2. Bevezetés.....	11
2.1. A hasnyálmirigy duktális adenokarcinóma jellemzői.....	11
2.2. A nem kissejtes tüdő adenokarcinóma jellemzői.....	14
2.3. A Wnt jelátviteli útvonal és szerepe a tumorokban.....	16
2.3.1. Wnt jelátviteli útvonal szerepe PDAC esetében	21
2.3.2. Wnt jelátviteli útvonal szerepe NSCLC esetében.....	22
2.4. Notch jelátviteli útvonal és szerepe a tumorokban.....	23
2.5. Fibroblasztok szerepe a tumor mikro környezetben.....	25
2.6. Az extracelluláris mátrix szerepe a tumorigenezisben	27
2.7. A sejtek közötti kommunikáció egyik formája: az extracelluláris vezikulák.....	29
2.8. Az organoidok, mint tumor modellek.....	33
3. Célkitűzések	37
4. Anyagok és módszerek	38
4.1. Kutatásainkhoz szükséges engedélyek	38
4.2. A sejt kultúrák fenntartása	38
4.3. Egér hasnyálmirigy organoidok létrehozása és fenntartása.....	39
4.4. Egér tüdő bronchioláris organoidok létrehozása és fenntartása	40
4.5. Egér tüdő eredetű fibroblaszt kultúrák létrehozása és fenntartása	41
4.6. Humán tüdő eredetű organoid kultúrák létrehozása és fenntartása	41
4.7. Humán tüdő eredetű fibroblaszt kultúrák létrehozása és fenntartása	43
4.8. Kollagén alapú organoid kultúrák	44
4.9. EV izolálás ellenanyaggal fedett gyöngyökkel és detektálás FACS Calibur áramlási citométerrel.....	44
4.10. NTA analízis (Nanoparticle Tracking Analysis).....	46
4.11. EV izolálás funkcionális vizsgálatokhoz.....	46
4.12. Áramlási citométer és sejt szortálás	47
4.13. Immuncitokémia	47
4.14. Transzmissziós elektronmikroszkópia.....	49

4.15. RNS izolálás és mRNS mérés	49
4.16. Szekvenálás	52
4.17. Statisztikai analízis	52
5. Eredmények.....	53
5.1. A kollagén felhalmozódása EV felszabadulást indukál az egér hasnyálmirigy duktális organoidokban.....	53
5.2. A Wnt szekréciót gátló inhibitorok csökkent sejtproliferációhoz és EV szekrécióhoz vezetnek hasnyálmirigy duktális sejtekben.....	55
5.3. A Wnt szekréció gátlása módosítja a proliferáló sejtek arányát és az EV-k kibocsátását egér bronchioláris organoidokban	57
5.4. Az EV szekréció mértéke korrelál a proliferáló sejtek arányával humán bronchioláris organoidokban is	60
5.5. A LUAD organoidok olyan Wnt termelő mikrokörnyezettel rendelkeznek, amely befolyásolja az EV kibocsátás mértékét	62
5.6. A CD133-at expresszáló LUAD sejtpopuláció PORCN+ sejtekben gazdag organoidokat hozott létre, amelyek EV kibocsátása magasabb, mint a CD133-at nem expresszáló sejtekből kialakuló organoidok esetében.....	69
6. Megbeszélés	71
7. Következtetések	76
8. Összefoglalás.....	78
9. Summary	79
10. Irodalomjegyzék.....	80
11. Saját publikációk jegyzéke	95
11.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények	95
11.2. Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények	96
12. Köszönetnyilvánítás	98

1. Rövidítésjegyzék

2D: 2 dimenziós

3D: 3 dimenziós

AcTub: Acetylated Tubulin (acetilált tubulin)

ADAM: A Disintegrin and Metalloprotease (egy dizintegrin és metalloproteáz)

Akt: Akt szerin-treonin protein kináz

ALK: Anaplastic Lymphoma kinase (anaplasztikus limfóma-kináz)

APC: Adenomatous polyposis coli

ARID1A: AT-Rich Interaction Domain 1A (AT-gazdag interakciós 1A domén)

ATCC: American Tissue Culture Collection

AXIN1: Axis inhibition protein 1

AXIN2: Axis inhibition protein 2

BSA: Bovine Serum Albumin (szarvasmarha szérum albumin)

C57Bl/6J: Az egyik legszélesebb körben alkalmazott beltenyésztett, vad típusú egértörzs.

CA 19-9: Cancer Antigen 19-9 (tumor antigén 19-9)

CAF: Cancer Associated Fibroblast (tumor asszociált fibroblaszt)

CD8+ T-sejt: citotoxikus T-sejt

CD9: Cluster of Differentiation 9 (differenciálódási klaszter 9)

CD24: Cluster of Differentiation 24 (differenciálódási klaszter 24)

CD43: Cluster of Differentiation 43 (differenciálódási klaszter 43)

CD44: Cluster of Differentiation 44 (differenciálódási klaszter 44)

CD63: Cluster of Differentiation 63 (differenciálódási klaszter 63)

CD81: Cluster of Differentiation 81 (differenciálódási klaszter 81)

CD133: Cluster of Differentiation 133 (differenciálódási klaszter 133)

CD133^{kis/-}: CD133 fehérjét kis mennyiségben/ nem expresszáló sejt

CD133^{nagy}: CD133 fehérjét nagy mennyiségben expresszáló sejt

CEP55: Centrosomal Protein 55 (centroszómális fehérje 55)

Chga: Chromogranin A (kromogranin A)

CHIR99021: aminopirimidin származék, ami gátolja GSK-3-at

circRNS: Circular RNA (cirkuláris RNS)

CK1: Casein Kinase 1 (kazein kináz 1)

- CKDN2A:** lókus, amely INK4a és ARF tumorszupresszorokat kódolja
- c-myc:** cellular-Myelocytomatosis oncogene (sejtes mielocimatososis onkogén)
- CP:** Chronic Pancreatitis (krónikus hasnyálmirigy gyulladás)
- Cpa1:** Carboxypeptidase A1 (karboxipeptidáz A1)
- CRC:** Colorectalis Carinoma (kolorektális karcinóma)
- CRD:** Cysteine rich domain (ciszteinben gazdag domén)
- CXCL12:** C-X-C motif chemokine ligand 12 (kemokin- (C-X-C motívum) ligand 12)
- CSC:** Cancer Stem Cell (tumor őssejt)
- CSL:** DNS kötő fehérje, amely a Notch jelátvitel célgénejeinek átarását tudja gátolni, vagy aktiválni
- DAPI:** 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-diamidino-2-fenilindol)
- DAPT:** N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (N-[N-(3,5-Difluorofenacetyl)-L-alanyl]-S-fenilglicin t-butyl-észter, γ -szekretáz inhibitor, Notch-inhibitor)
- DBZ:** Dibenzazepine (γ -szekretáz inhibitor, Notch- inhibitor)
- DC:** destruction complex (lebontási komplex)
- DKK:** Dickkopf fehérje
- Dll-1:** Delta-like protein 1 (Delta-szerű fehérje 1, Notch ligand)
- Dll-3:** Delta-like protein 3 (Delta-szerű fehérje 3, Notch ligand)
- Dll-4:** Delta-like protein 4 (Delta-szerű fehérje 4, Notch ligand)
- DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbecco módosított Eagle médiuma)
- DMEM high glucose:** Dulbecco's Modified Eagle Medium – high glucose (Dulbecco módosított Eagle médiuma magas glükóz tartalommal)
- DMEM/F12:** Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (Dulbecco módosított Eagle médiuma/ F12 tápanyag keverékkel)
- DMSO:** Dimethyl Sulfoxide (dimetil-szulfoxid)
- DNS:** Dezoxiribonukleinsav
- DVL:** Dishvelled fehérje
- ECM:** Extracellular matrix (extracelluláris mátrix)
- EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid (etilén-diamin-tetraecetsav)
- EGF:** Epidermal growth factor (epidermális növekedési faktor)
- EGFR:** Epidermal growth factor receptor (epidermális növekedési faktor receptor)

- EMT:** epithelial-mesenchymal transition (epitheliális-mezenchimális tranzíció)
- Epcam:** Epithelial cell adhesion molecule (hámsejt-adhéziós molekula)
- ESCRT:** endosomal sorting complexes required for transport (a szállításhoz szükséges endoszomális válogató komplexek)
- EV:** Extracelluláris vezikula
- FACS:** Flow cytometry (áramlási citometria)
- FAP:** Fibroblast activation protein (fibroblaszt aktivációs fehérje)
- FBS:** Fetal bovine serum (fötális borjúsavó)
- FGF:** Fibroblast growth factor (fibroblaszt növekedési faktor)
- FGFR1:** Fibroblast growth factor receptor 1 (fibroblaszt növekedési faktor receptor 1)
- FGFR2:** Fibroblast growth factor receptor 2 (fibroblaszt növekedési faktor receptor 2)
- FSP1:** Fibroblast specific protein 1 (fibroblaszt specifikus fehérje 1)
- FZD:** Frizzled receptor
- GATA6:** GATA Binding Protein 6 (GATA kötő fehérje 6)
- GNAS:** Guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating (α -stimuláló aktivitású guanin nukleotidokat kötő fehérje)
- granzim B:** citotoxikus T-sejtek és természetes ölüsejtek granulumaiban található szerin-proteáz
- GSK-3:** Glycogen synthase kinase-3 (glikogén-szintáz-kináz-3)
- HEPES:** 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav)
- HER2:** Human epidermal growth factor receptor 2 (humán epidermális növekedési faktor receptor 2)
- HGF:** Hepatocyte growth factor (hepatocita növekedési faktor)
- HIF1 α :** Hypoxia-inducible factor 1- α (hipoxia indukált faktor 1 α)
- HIFs:** Hypoxia-inducible factors (hipoxia indukált faktorok)
- HMGA2:** High mobility group A2 (nagy mobilitású A2 csoport)
- HPRT:** Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz)
- IFN- γ :** Interferon- γ
- IL-1 β :** Interleukin-1 β
- IL-6:** Interleukin-6

IL-8: Interleukin-8

IL-15: Interleukin-15

Ins2: Insulin-2 precursor (Inzulin-2 prekursor)

IWP2: Inhibitor of Wnt production 2 (Wnt termelést gátló 2)

Jagged-1: Notch receptor ligand

Jagged-2: Notch receptor ligand

Ki67: sejtproliferációs marker fehérje

KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (Kirsten patkány szarkóma vírusos onkogén homológ)

KRT5: Citokeratin-5

KRT14: Citokeratin-14

KRT19: Citokeratin-19

LCLC: Large-cell lung carcinoma (nagysejtes tüdő karcinóma)

IEV: Large extracellular yesicle (nagy extracelluláris vezikulák)

LGK974: PORCN inhibitor

Lgr5: Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (leucinban gazdag ismétlődést tartalmazó G-fehérjéhez kapcsolt receptor 5)

Lgr6: Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 6 (leucinban gazdag ismétlődést tartalmazó G-fehérjéhez kapcsolt receptor 6)

lncRNS: Long non-coding RNA (hosszú nem kódoló RNS)

LRP5/6: Lipoprotein receptor-related protein 5 and 6 (lipoprotein receptorhoz kapcsolódó fehérje 5 és 6)

LUAD: Lung Adenocarcinoma (tüdő adenokarcinóma)

LUAD-F: LUAD betegek mintáiból származó fibroblaszt

LUSC: Lung Squamous Cell Carcinoma (tüdő pikkelyes sejtes karcinóma)

MAPK: Mitogen-activated protein kinase (mitogén-aktivált proteinkináz)

MDM2: Murine double-minute 2

MEM: Minimum Essential Medium (minimum esszenciális médium)

MET: hepatocita növekedési factor receptor

MHC: Major Histocompatibility Complex (fő hisztokompatibilitási komplex)

miRNS: micro RNA (mikro RNS)

MLC: Mysin light chain (miozin könnyűlánc)

MMP1: Matrix metalloproteinase-1 (mátrix metalloproteináz-1)
MMP7: Matrix metalloproteinase-7 (mátrix metalloproteináz-7)
mRNS: messenger RNA (hírvivő RNS)
MUC1: Mucin 1
Muc5AC: Mucin 5AC
MVB: Multivesicular body (multivezikuláris test)
NFκB: Nuclear Factor κB (nukleáris faktor κB)
NICD: Notch intracellular domain (Notch intracelluláris domén)
Notch-1: Notch receptor 1
Notch-2: Notch receptor 2
Notch-3: Notch receptor 3
Notch-4: Notch receptor 4
NRG1: Neuregulin 1
NSCLC: Non-small-cell lung carcinoma (nem kissejtes tüdő tumor)
NTA: Nanoparticle Tracking Analysis (nanopartikulum követő analízis)
NTRK1: Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 1 (neurotróf tirozin-kináz receptor 1)
Numb: Notch jelátviteli útvonalat gátló fehérjét kódoló gén
P53: TP53 gén fehérje terméke, tumor protein 53
PAR1: Prader-Willi/Angelman region-1 gene (Prader-Willi/Angelman régió-1 gén)
PBRM1: Polybromo 1
PBS: Phosphate-buffered saline (foszfát puffer)
PDAC: Pancreatic ductal adenocarcinoma (hasnyálmirigy duktális adenokarcinóma)
PDGF: Platelet-derived growth factor (vérlemezke eredetű növekedési faktor)
PDGFR-β: Platelet-derived growth factor receptor β (vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor β)
Pdx1: Pancreatic and duodenal homeobox 1 (hasnyálmirigy és duodenum homeobox 1)
PFA: Paraformaldehyd
PORCN: Porcupine
Ptf1a: Pancreas Associated Transcription Factor 1a (hasnyálmirigy asszociált transzkripció faktor 1a)
Rab: kis GTPáz fehérje
Rab11a: Rab GTPáz 11a

Rab27: Rab GTPáz 27

RET: tirozin-kináz receptort kódoló protoonkogén

RHEB: Ras homolog enriched in brain (agyban lévő Ras homológ)

Rho: Ras homolog (Ras homológ)

RNF43: Ring Finger Protein 43

RNS: Ribonukleinsav

ROCK: Rho-associated protein kinase (Rho-asszociált protein kináz)

ROS1: tirozin-kináz receptort kódoló protoonkogén

RPMI: sejtenyésztéshez használható médium

RREB1: Ras Responsive Element Binding Protein 1 (Ras-érzékeny elemet kötő fehérje-1)

Scgb1a1: Secretoglobin Family 1A Member 1 (szekretoglobin 1A család 1. tagja)

SCLC: Small-cell lung carcinoma (kissejtes tüdő karcinóma)

SE-ÁTET: Semmelweis Egyetem, Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács

sEV: Small extracellular yesicle (kis extracelluláris vezikula)

SFRP: Secreted frizzled-related protein (szekretált frizzled-höz kapcsolódó fehérje)

SMAD4: Mothers against decapentaplegic homolog 4

SNARE: SNAP receptor

Sox9: SRY-Box Transcription Factor 9 (SRY-box transzkripció faktor 9)

STAT: Signal transducers and activators of transcription

STC-1: Stanniocalcin-1

TCF/LEF: Transcription factor/Lymphoid enhancer factor family (transzkripció faktor/limfoid enhanszer faktor család)

TCF4: Transcription Factor 4 (transzkripció faktor 4)

TEM: Transmission electron microscopy (transzmissziós elektronmikroszkópia)

TGF-β: Transforming growth factor β (transzformáló növekedési faktor β)

TGFβR2: Transforming growth factor β receptor 2 (transzformáló növekedési faktor β receptor 2)

TNFRSF19: TNF Receptor Superfamily Member 19 (TNF Receptor szupercsalád 19-es tagja), más néven TROY

TNF-α: Tumor necrosis factor α (tumor nekrozis faktor α)

Treg: regulációs T-sejt

Troy: TNF Receptor Superfamily Member 19 (TNF Receptor szupercsalád 19-es tagja), más néven TNFRSF19

VEGF: Vascular endothelial growth factor (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor)

TP53: tumor protein 53 gén

WIF: WNT inhibitory factor (WNT gátló faktor)

Wls: Wntless/Evi

Wnt: Wingless-Type Mouse Mammary Tumor Virus Integration Site Family (Szárnyatlan típusú egér emlővírus beépülési hely család)

Wnt1: Wnt Family Member 1 (Wnt fehérjecs család 1 tagja)

Wnt2: Wnt Family Member 2 (Wnt fehérjecs család 2 tagja)

Wnt2b: Wnt Family Member 2b (Wnt fehérjecs család 2b tagja)

Wnt3: Wnt Family Member 3 (Wnt fehérjecs család 3 tagja)

Wnt4: Wnt Family Member 4 (Wnt fehérjecs család 4 tagja)

Wnt5a: Wnt Family Member 5a (Wnt fehérjecs család 5a tagja)

Wnt5b: Wnt Family Member 5b (Wnt fehérjecs család 5b tagja)

Wnt7a: Wnt Family Member 7a (Wnt fehérjecs család 7a tagja)

Wnt7b: Wnt Family Member 7b (Wnt fehérjecs család 7b tagja)

Wnt9a: Wnt Family Member 9 (Wnt fehérjecs család 9 tagja)

Wnt10a: Wnt Family Member 10a (Wnt fehérjecs család 10a tagja)

Wnt11: Wnt Family Member 11 (Wnt fehérjecs család 11 tagja)

Wnt16: Wnt Family Member 16 (Wnt fehérjecs család 16 tagja)

Wnt-PCP: WNT-planar cell polarity (WNT planáris sejtpolaritás útvonal)

ZNRF3: Zinc And Ring Finger 3

α -SMA: α -smooth muscle actin (α -simaizom aktin)

β -kat: β -katenin

β TrCP: β -transducin repeat-containing protein (β -transzducin ismétlődő fehérje)

2. Bevezetés

2.1. A hasnyálmirigy duktális adenokarcinóma jellemzői

A hasnyálmirigy anatómiailag és fiziológiailag is két szorosan összekapcsolódó részből áll: endokrin és exokrin. Az endokrin sejtek peptid hormonokat termelnek a glükóz homeosztázis fenntartásáért, míg az exokrin sejtek az emésztőenzimek és nátrium-hidrogén-karbonát előállításáért felelősek, így elsődleges feladatuk a táplálék megfelelő emésztésének és felszívódásának biztosítása. Az endokrin részt más néven Langerhans-szigeteknek hívjuk és ezt a területet gazdagon átszövi a vér- és nyirokerekek hálózata. A hasnyálmirigy 90 %-át viszont az exokrin rész foglalja el, amely acinus, centroacinus és duktális sejteket tartalmaz. Ezek a sejtek egy zárt végű csőrendszert képeznek, amely egy szőlőfürtszerű szerkezetet alkotnak: az acinus és centroacinus sejtek képezik a szőlőszemeket és termelik az emésztőnedvet, és a duktális sejtek alkotják a tubulusokat, amelyek elvezetik azt [1, 2].

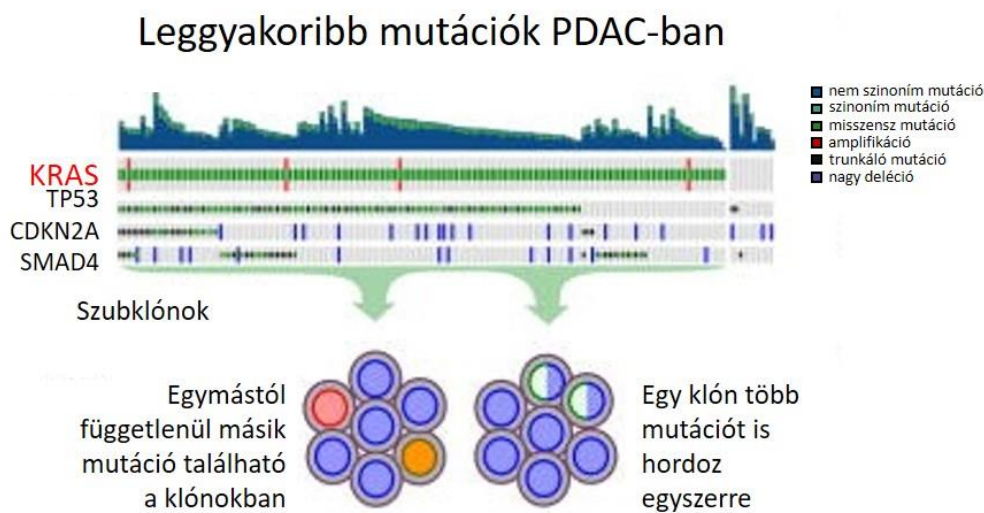
A hasnyálmirigy tumorok az egyik vezető tumor okozta halálok, és a daganatos megbetegedések közül is a hetedik leggyakoribb a világon. A legtöbb primer hasnyálmirigy tumor rosszindulatú. A hasnyálmirigy daganatos betegségei heterogén fenotípust mutatnak, hiszen kialakulhatnak a pancreas endokrin és exokrin részéből is, bár túlnyomó többségében (95%-ban) az exokrin állományból fejlődik ki a daganat. Többféle módon lehet osztályozni őket, például differenciáltság, az emésztőnedv termelés, a sejtek osztódása és a sejtmag morfológiája alapján. A leggyakrabban azonban vagy a makroszkópikus megjelenés alapján (szolid vagy cisztás), vagy az uralkodó sejttípus (duktális, acinus vagy endokrin) alapján szokták csoportosítani őket. A szolid típusok közé tartozik a hasnyálmirigy duktális adenokarcinóma, a neuroendokrin neoplázia, az acinus sejtes karcinómák és a pancreatoblasztómák. A cisztás típusok általában kevésbé agresszívek, ide soroljuk a mucinózus cisztás neopláziát, az intraduktális papillaris mucinózus neopláziát és a szolid-pszepidopapillaris neopláziát. A hasnyálmirigy tumorok közül a leggyakoribb típus azonban a hasnyálmirigy duktális részéből kialakuló adenokarcinóma (PDAC). 85%-ban ezt a típust diagnosztizálják [3-5]. A többi hasnyálmirigy daganat fajta viszont nagyon ritka [6]. Hasonlóan a vastagbél

daganatokhoz, a hasnyálmirigy tumorokra is jellemző, hogy szekvenciálisan alakulnak ki az adenomától a karcinómáig [5].

A PDAC az afroamerikai és az óceániai őslakosok populációjában fordul elő legnagyobb mértékben. Itt minden 10 000 emberből egy esetében alakul ki a betegség. Emellett Európában és Észak-Amerikában is nagy az incidenciája. Ez a tumortípus ugyanis a fejlett országokban, a nagyobb népességű, jobb életszínvonalú városokban élő emberek esetében alakul ki könnyen, ellentétben a fejlődő országokkal, ahol kifejezetten ritka az előfordulása. Több tényező is elősegítheti a PDAC kialakulását, de ez a nagy különbség az országok között arra utal, hogy a környezeti tényezőknek kiemelkedő szerepük van. Az idősebb korosztályt érinti inkább, így az idősödő populáció kedvez a kialakulásának. Leggyakrabban 45 éves kor felett fordul elő. Férfiakban és a nőkben egyaránt megtalálható, bár férfiakban nagyobb eséllyel alakul ki. A többi AB0-ás vércsoporttal összehasonlítva a betegek többsége nem 0-ás vércsoporttal rendelkezik. A bél mikrobiomjának összetételének változása is egy rizikó tényező PDAC esetében: *Neisseria elongate* és a *Streptococcus mitis* fajok számának csökkenése és a *Porphyromonas gingivalis* és a *Granulicatella adiacens* fajok számának növekedése összefüggést mutat a betegség kialakulásával. További tényezők még, amelyek szerepet játszhatnak a PDAC kialakulásában: magas zsírtartalmú ételek fogyasztása, elhízás, metabolikus betegségek (pl. diabetes mellitus), alacsony fizikai aktivitás, alkoholizmus, *Helicobacter pylori* vagy hepatitis-C fertőzés, és a dohányzás. A legnagyobb mértékben meglepő módon a dohányzás növeli meg a betegség kialakulásának esélyét (70%-kal növeli meg az aktívan dohányozók körében, és 20%-kal a már nem dohányzó, de régebben dohányozók körében). Ezen kívül a diabetes mellitus és a krónikus hasnyálmirigy gyulladás (CP) is nagymértékben hozzájárul a tumor képződéséhez [3, 4, 7, 8]. A CP következtében kialakuló gócpont lehet a PDAC kialakulásának kiindulási pontja, ezért gyakran a CP-ből idővel PDAC alakul ki [9, 10]. A CP esetében a hasnyálmirigy szövetében számos proinflammatorikus citokin szintje emelkedik meg, mint az IL-1 β , az IL-6, az IL-8, az IL-15 és a TNF- α [11, 12].

Teljes exon szekvenálási adatokból kiderült, hogy a PDAC-s betegek mintáiban, többek között, a *KRAS*, *TP53*, *CKDN2A*, *SMAD4*, *RNF43*, *ARID1A*, *TGF β 2*, *GNAS*, *RREB1* és *PBRM1* gének szekvenciájában található mutáció. Ezek közül a leggyakrabban a *KRAS* génjében történt mutáció, amely az EGF jelátviteli út vonal egyik fontos fehérjéjét

kódolja[13, 14]. Ez az útvonal számos más tumortípusban is gyakran mutálódik, például kolorektális karcinóma esetében is [15]. A második leggyakoribb gén, amelyben mutációt találtak a *TP53*, amely által kódolt fehérje a DNS károsodásra adott válaszban játszik fontos szerepet, és szintén számos tumortípusnál előfordul. Gyakran ez a két mutáció együtt jelenik meg a PDAC-ban szenvedő betegekben. Számos más protoonkogénben, DNS károsodást javító fehérjék génjeiben, kromatin módosító génekben is találtak mutációkat. Ezek a mutációk közül egyszerre több is jelen lehet egy tumorsejtben, és a szomszédos sejtek mutációs profilja is eltérhet egymástól, mely sejtes és genetikai heterogenitást eredményez (1. ábra) [13].



1. ábra: A leggyakoribb génmutációk PDAC-ben. Leggyakrabban a *KRAS* génjében találtak mutációt PDAC-ban szenvedő betegek mintáiban. A második leggyakoribb mutáció a *TP53* génjében figyelhető meg. PDAC esetében is általános, hogy egy klónsejt több mutációt hordoz, illetve egy mintában lévő klónsejtek más mutációt tartalmaznak, így létrehozva a genetikai heterogenitást. Az ábrát Cancer Genome Atlas Research Network, Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma 2017 alapján a szerző módosította [13].

A PDAC fő tünetei a hátfájás, sárgaság, megmagyarázhatatlan fogyás, bőrviszketés, diabetes mellitus, hipoglikémia, hiperkalcémia, akut hasnyálmirigygyulladás [3]. Ezeket a tüneteket azonban csak a késői stádiumban lehet észlelni, így többségében mire észreveszik a betegséget, a tumor már metasztázisokat képzett más szervekben, mely rossz prognózist eredményez [16]. Így nem meglepő, hogy a betegség 5 éves túlélési valószínűsége kevesebb, mint 8%, ami az elmúlt évtizedben változatlan szinten maradt. Éppen ezért a korai diagnosztizáláshoz kapcsolódó biomarker keresés igen intenzíven kutatott terület. Az egyik megoldása a nem invazív folyadék-biopszia vizsgálat lehet, amely során a vérben, vagy a leheletben próbálnak olyan biomarkereket

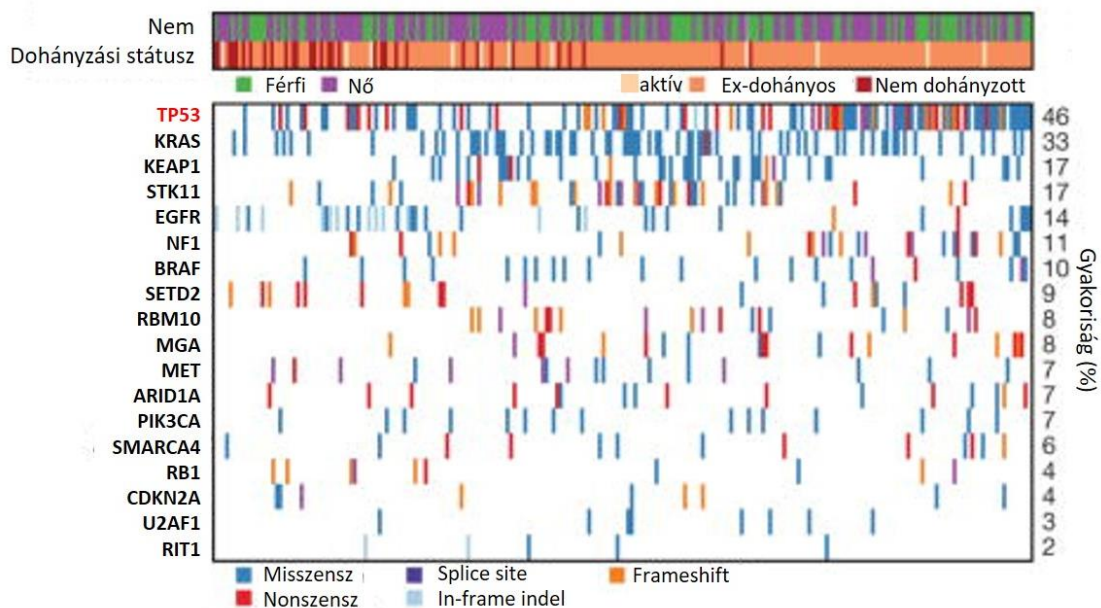
találni, amelyekkel már a korai stádiumban, még a tünetek jelentkezése előtt diagnosztizálni lehetne a betegeket. Ezen vizsgálatok során a vérből metabolikus termékeket, szabadon keringő DNS-t, miRNS-eket, a leheletből illékony szerves vegyületeket próbálnak detektálni, amelyek a PDAC-ra jellemzőek. Eddig azonban csak azt sikerült kimutatni, hogy a PDAC-ban szenvedő betegek leheletében megnő az illékony szerves vegyületek mennyisége, valamint a hasnyálmirigynedvből detektálták a mutáns P53 variánst. A szérumban tumor antigén 19-9 (CA 19-9) az egyetlen olyan marker, amelyet az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyezési Hivatala engedélyezett, azonban ez a marker csak a betegség progressziójának nyomon követésére alkalmas, ugyanis a tünetmentes PDAC-s betegekben nem emelkedik meg a szintje. Ezért további kutatásokra van még ahhoz szükség, hogy biztosan megfelelő biomarkert találjunk [3, 4, 7, 17].

2.2. A nem kissejtes tüdő adenokarcinóma jellemzői

A tüdőtumorerő világszerte a leggyakoribb és leghalálosabb tumoros megbetegedések, amelyek évente 1,6 millió ember halálát okozzák. Az 5 éves túlélési valószínűség ennél a tumornál is elég alacsony, mindössze 15%, ami az utóbbi évtizedekben csak kis mértékben javult [18, 19]. A tüdőtumorerő nagyon heterogén csoportot alkotnak, melyben a sok altípusnak patológiai és klinikai relevanciája van. Mindegyik altípus kialakulásában nagy szerepet játszik a dohányzás, de a nem dohányzó körében az adenokarcinóma a legjellemzőbb. A hisztológiai jellemzők, illetve a prognosztikai és terápiás implikációk alapján két nagy csoportot különböztetnek meg: a kissejtes tüdő karcinómát (SCLC) és a nem kissejtes tüdő karcinómát (NSCLC) [20]. Az SCLC főként a dohányzás következtében, neuroendokrin sejtekből alakul ki és agresszíven viselkedik, és a legtöbb esetben nem műtéti úton kezelik, míg az NSCLC-t korai stádiumban műtét és adjuváns terápia kombinációjával kezelik általában [21-23].

A tüdődagaganatok közül 85%-ban NSCLC-kat azonosítanak, amelyeknek három fő fajtáját különítenek el: a tüdő adenokarcinóma (LUAD), a tüdő pikkelyes sejt karcinóma (LUSC), és a nagysejt karcinóma (LCLC). Ezek közül a leggyakoribb a LUAD (38,5%-a a tüdőtumorerőknek). A LUSC is nagy mértékben megfigyelhető (20%-a a tüdőtumorerőknek), a legkritikusabb pedig a LCLC (2,9 %-a a tüdőtumorerőknek). A LUAD

epithél eredetű, mirigyes differenciálódású, mucin termelő tumortípus. A LUSC szintén epithél eredetű, de a keratinizáció jellemző rá. Az LCLC ezzel szemben differenciálatlan sejteket tartalmaz, így epithél, mirigyes vagy kissejtes eredetre vonatkozóan nem figyelhetünk meg szövettani jellegzetességeket [20, 21]. A LUAD a légutak disztális részén, míg a LUSC a proximális részén alakul ki gyakrabban. Általánosságban elmondható, hogy a tüdő tumoros elváltozásainak fő oka a dohányzás, ami a LUSC és az LCLC esetében nagy asszociációt mutat, mivel ebben az esetben a dohányzás karcinogén hatásai és az emiatt bekövetkező krónikus gyulladás a fő kiváltó ok. A LUAD-nál ezzel szemben kisebb ez a kapcsolat, hiszen a nem dohányzók körében ez a leggyakrabban kialakuló tüdő tumor. Ebben az esetben ugyanis a másodlagos dohányzás, a légszennyezés, munkahelyi rákkeltő anyagok hatása, valamint az örökletes genetikai hajlam is jelentős kiváltó okok lehetnek. A nem dohányzóknál kialakuló tüdő tumorok gyakoribbak Kelet-Ázsiában és a nőkben emelkedő incidenciát mutatnak [18, 19, 24].



2. ábra: A leggyakoribb génmutációk LUAD-ban. A betegség kialakulása függ a kortól és a dohányzási státusztól. A legtöbb LUAD-ban szenvedő beteg mintájában a *TP53* génjében találtak mutációt. A második leggyakoribb mutáció a *KRAS* génjében figyelhető meg. Az ábrát a Cancer Genome Atlas Research Network, Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma 2014 alapján a szerző módosította [25].

A legtöbb daganathoz hasonlóan a tüdő tumorokra is jellemző a sejtes és genetikai heterogenitás, hiszen szubklónok csoportjaiból állnak, amelyek más-más molekuláris jellemzőkkel rendelkeznek, és ez a metasztázisok képzésének kedvez. A LUAD betegek mintáiban leggyakrabban a *TP53*-ban található mutáció, ami a tumor progressziójában

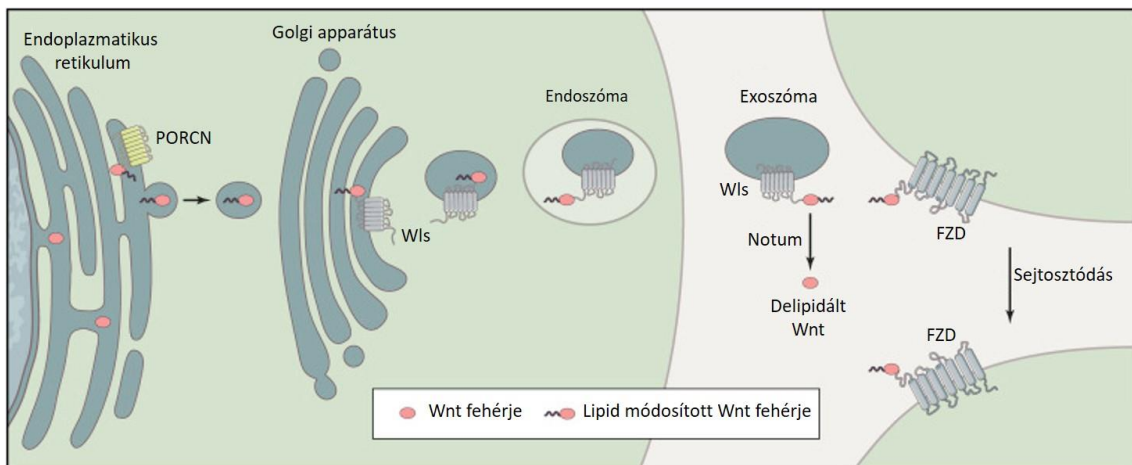
játszik szerepet. A második leggyakoribb pedig a *KRAS* génjében található (2. ábra). Számos további onkogént azonosítottak, amelynek mutációja jelen lehet LUAD-ban, ilyen például a *HER2*, *MET*, *FGFR1*, *FGFR2*, *ALK*, *ROS1*, *NRG1*, *NTRK1* és *RET*. Az, hogy melyik mutáció alakul ki, nagymértékben függ attól, hogy a beteg dohányzott-e valaha. A dohányzók esetében sokkal gyakoribb a citozin → adenin transzverzió és a *KRAS*, illetve a *TP53* mutációja. Ezzel ellentétben a nem dohányzóknál inkább a citozin→timin tranzíció és az *EGFR*, *ROS1* és *ALK* mutációk a gyakoribbak [18, 19, 25].

Mivel az 5 éves túlélési valószínűség a LUAD esetében is alacsony, és ennek szintén a tünetek késői jelentkezése az egyik fő oka, ezért nem meglepő, hogy ennél a tumortípusnál is intenzíven kutatott terület a diagnosztikai és prognosztikai markerek keresése [26]. Eddig a CEP55 génjét azonosították, mint lehetséges biomarker, amely több szövetben is expresszálódik az osztódó sejtekben. Ennek a fehérjének a magas expresszióját azonban már számos más tumortípusban is azonosították, mint például a prosztata, emlő és vese tumorok esetében, így ez a marker nem elég specifikus [27]. A nem invazív mintavételi mintákból származó biomarker kutatás a LUAD esetében is megoldást jelenthet [28]. Így, ha olyan biomarkereket lehetne azonosítani, amely nem csak a szövetekben, hanem például a vérből is azonosíthatóak lennének, gyorsabban lehetne diagnosztizálni a betegeket, és nagyobb esélyük lenne a gyógyulásra. Már több ígéretes markert is találtak LUAD betegek tumoros szövet mintáiban és a vérplazmájukban egyaránt, mint például circRNS-t és lncRNS-t, amelyek expressziója megváltozik egészséges kontroll szövetekhez és vérplazmához képest [29, 30]. Azonban még nem sikerült igazán megbízható pontos markert találni.

2.3. A Wnt jelátviteli útvonal és szerepe a tumorokban

A Wnt jelátviteli útvonal számos fejlődési és a sejt homeosztázisát fenntartó folyamatban játszik szerepet. Nemcsak alapvető növekedési kontroll útvonalként működik, hanem az őssejtek működésében, és a Wnt útvonal különböző komponenseinek mutációja által számos növekedéssel kapcsolatos betegségben és tumorok kialakulásában is szerepet játszik [31].

Eddig három Wnt jelátviteli útvonalat azonosítottak: a kanonikus β -katenin függő, a nem kanonikus planáris sejt polaritás útvonalat (Wnt-PCP), és a Wnt/ Ca^{2+} útvonalat [32]. Mivel a tumorok esetében főként a kanonikus β -katenin függő Wnt útvonal játszik fontos szerepet [33], ezért dolgozatomban ezt tárgyalom bővebben. Ez az útvonal számos növekedési folyamatban vesz részt, így szinte minden állatfajban evolúciósan nagyon konzervált. A Wnt fehérjék növekedést stimuláló faktorok, így sejtproliferációt indukálnak, és különböző pontokon képesek szabályozni a sejtciklust. Szerepet játszanak az újonnan képződött sejtek megfelelő morfológiájának kialakításában is, amit a mitotikus orsóra, a citoskeletonra és a génexpresszióra gyakorolt hatásukkal érnek el. Emlősökben eddig 19 Wnt fehérjét azonosítottak, amelyek evolúciósan nagyon konzervált, ciszteinben gazdag glikoproteinek. A Wnt-ek fontosságát egérekísérletekben bizonyították: amikor a Wnt1 gént kiütötték, akkor a közepagyban fejlődési rendellenességét észleltek, míg ha például a Wnt4 génjében volt hiba, abban az esetben a vese fejlődésében történt defektus [31].



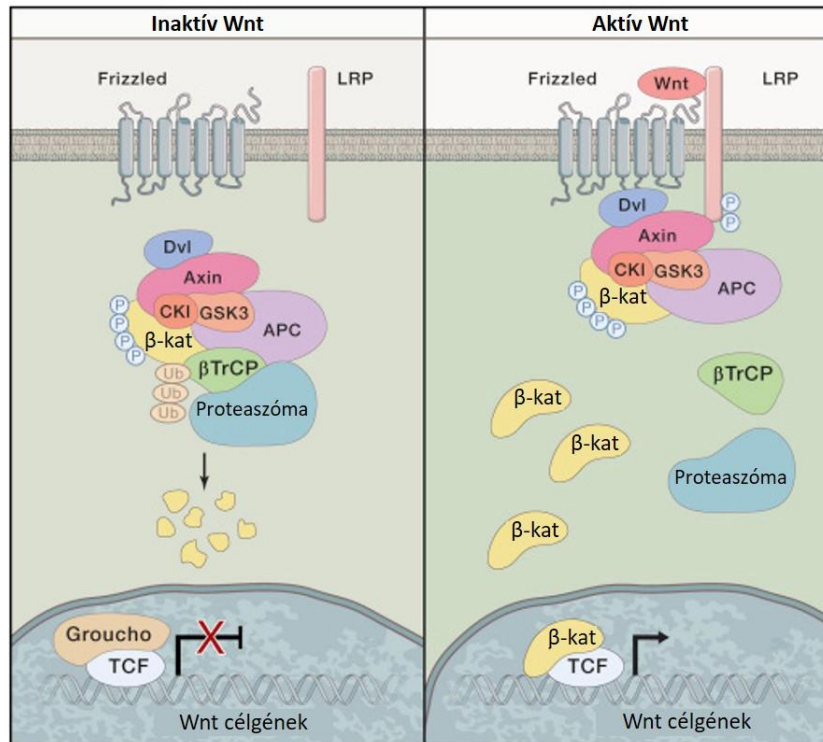
3. ábra: A Wnt fehérje érése és feltételezett kijutása. Az endoplazmatikus retikulumban a PORCN enzim módosítja a Wnt fehérjéket, amelyek így továbbjutnak a Golgi apparátusba. Itt a Wls transzmembrán fehérjéhez kapcsolódnak, amely tovább szállítja őket, endoszómába csomagolva, a plazmamembránhoz. Az exoszómákhoz (ld. később) kívülről kapcsolódnak a Wnt fehérjék, amelyek ezután a FZD receptorokhoz kapcsolódva sejtosztódást indukálnak, vagy a Notum deaciláz enzim levágja a lipid oldalláncot a Wnt fehérjékről és így inaktiválja őket. Az ábrát Roel Nusse és Hans Clevers alapján a szerző módosította [31].

A Wnt fehérjék Frizzled (FZD) sejtmembránreceptorokon és koreceptorain keresztül hatnak autokrin vagy parakrin módon. Egy receptort többféle Wnt fehérje is tud aktiválni és így intracelluláris szignált elindítani, amelynek a végén megemelkedik a nukleáris β -katenin szintje. Ehhez azonban arra van szükségük, hogy ki tudjanak jutni az őket termelő sejtekből, melyben központi szerepe van a Wnt fehérjék palmitoilálásának.

Ezt a módosítást minden Wnt fehérjénél ugyanaz a palmitoil-transzferáz végzi: a Porcupine (PORCN). A lipid módosítás nem csak a membránon való átjutáshoz szükséges, hanem a FZD receptorokhoz való kapcsolódásához, és így a jelátviteli útvonal elindításához is nélkülözhetetlen. A Wnt fehérje palmitoilált formáját a Wntless/Evi (Wls) transzmembrán fehérje tudja megkötni és így segíti a sejtmembránhoz való eljutását. Azt, hogy pontosan hogyan jut el a szekretált Wnt fehérje a célsejthez még nem bizonyított, de valószínűleg nem szabad formájában, hanem részben egy szekréción vezikulába vagy exoszómába csomagolva jut ki a sejtől és szállítódik a receptoráig. Ezeknek a vezikuláknak a membránjában megtalálható a Wls fehérje, és ehhez valószínűleg kívülről kapcsolódva található a Wnt fehérje (3. ábra) [31, 32].

A FZD receptorok az LRP5/6-hoz kapcsolódva heterodimereket alkotnak. A FZD egy 7 transzmembrán fehérje, amelynek az N-terminális részén egy ciszteinben gazdag domén (CRD) található, ami extracellulárisan helyezkedik el. A CRD képes megkötni a Wnt fehérjék C-terminális részét. A Wnt kötés hatására a FZD interakcióba lép koreceptorával, az LRP5/6 fehérjével és a két receptor dimerizálódik, ami konformáció változást eredményez. Ennek hatására az LRP citoplazmatikus része több protein kináz által foszforilálódik, így hozzá tud kapcsolódni az Axin állványfehérjéhez. A FZD citoplazmatikus része pedig Dishvelled (DVL) fehérjét képes megkötni, ami így hozzá tud kapcsolódni az LRP-hez és az Axinhoz, így kapcsolva össze a molekulát. Az Axin az APC-vel, a β -kateninnel, a DVL-lel, a GSK-3-mal és a CK1-el együtt alkotja az ún. „destruction complex”-et (DC, lebontási komplexet). Ha a Wnt receptorokhoz nem kapcsolódik fehérje, tehát az útvonal inaktív, akkor ez a komplex foszforilálja a β -katenint az N-terminális régióánál is, amit így ubiquitinálni tud a β TrCP E3 ubiquitin ligáz, és a β -katenin a proteozóma által lebontódik. Ha viszont az LRP fehérje foszforilálódik, akkor képes gátolni a GSK-3 fehérjét, így a β -katenin foszforilációs mintázata megváltozik, lebontása gátlódik és felhalmozódik a citoplazmában, majd egy még nem teljesen ismert mechanizmus által be tud jutni a sejtbe, ahol ko-faktorként működve a TCF/LEF

transzkripciós faktorokhoz kötődik, leszorítván a represszorokat (pl. Groucho), és így több gén expresszióját is elindítja (4. ábra) [31, 32].



4. ábra: A Wnt jelátviteli útvonal. A jelátviteli útvonal inaktív állapotában a DC (lebontási komplex) a β -kateninnek (β -kat) az N-terminális régióját is foszforilálja, így az ubikvitinációt követően a proteaszóma lebontja. Ha viszont Wnt fehérje kapcsolódik a FZD és LRP receptor komplexhez, inaktíválódik a DC, így a β -katenin foszforilációs mintázata megváltozik, felhalmozódik, bejut a sejtmagba, a TCF transzkripciós faktorokhoz kapcsolódik a Groucho transzkripciós represszor leszorítása után, és a transzkripciós faktorok aktiválásával célgénjeinek átírását indukálja. Az ábrát Roel Nusse és Hans Clevers alapján a szerző módosította [31].

A Wnt jelátviteli útvonalnak számos negatív szabályozó fehérjéje ismert, amelyek megakadályozzák a túlzott aktivitását. Az egyik ilyen fehérje a Notum, ami egy karboxilészteráz, és hidrolízissel el tudja távolítani a Wnt fehérjéről a palmitoleinsav oldalláncot, így inaktíválja a Wnt fehérjét (3. ábra). Az LRP5/6–hez hozzákapcsolódva több szabályozó fehérje gátolja az FZD-vel való dimerizációját. Ilyen mechanizmussal működnek a Dickkopf (DKK) és a Sclerostin/SOST családba tartozó fehérjék [31]. A Wnt útvonal egyik target génjének, az *Axin2*-nek a fehérje terméke segíti a DC aktiválását, így a β -katenin lebontódik. A plazmamembránban található RNF43 és a ZNRF3 E3 ligáz fehérjék pedig ubikvitinálni tudják a Wnt receptorokat, így azok internalizálódnak és a lizoszomális útvonalon keresztül lebontódnak [33]. Az SFRP-k a FZD receptorok CRD doménjához hasonló szerkezetűek. Ezekhez hasonló fehérjék a WIF szekretált fehérjék, amelyek a Derailed/RYK Wnt receptorokkal megegyező szerkezetűek. Mindkét

szolubilis fehérje képes megkötni a Wnt fehérjéket, és ezáltal meggátolni, hogy a sejtfelszíni FZD receptorokhoz tudjanak kapcsolódni és elindítsák a jelátviteli útvonalat [34].

Mivel a Wnt jelátviteli útvonal nagyon sokféle hatást indíthat el a célsejtben, így több jelátviteli útvonallal is kapcsolatban áll. Ilyen például az EGF, a Notch, a Hedgehog jelátviteli útvonal [35]. Ezért nem meglepő, hogy tumorok kialakulásában igen fontos szerepet játszik ez az útvonal. Számos tumor esetében, mint például az emlőrák, a gasztrointesztinális tumorok, a hematológiai, vagy a légzőrendszeri tumorok, megfigyelték, hogy a Wnt jelátviteli útvonal abnormális aktivitása hajlamosító tényezőt jelent. Ez az aktiválás lehet mutációs (β -katenin funkcióvesztéses mutációja vagy a DC egyik tagjának funkcióvesztéses mutációja) és nem mutációs hatás (pl. epigenetikai módosítással gátlódnak az extracelluláris Wnt antagonisták) következménye is [36]. Ennek az aktiválásnak a következtében a tumorsejtek Wnt független módon, folyamatos növekedésre képesek [33].

Tumortípusonként eltér, hogy melyik mutáció/változás fordul elő a Wnt jelátviteli útvonalban, ami a betegség kialakulását okozza. Kolorektális tumorok esetében leggyakrabban az *APC* génjében történik mutáció, hasnyálmirigy tumorok esetében az *RNF43* génje mutálódhat, míg NSCLC-knál főként az *AXINI* promóterének hipermetilációja figyelhető meg. Az, hogy milyen mutáció található a tumorban prognosztikus értékű. Vannak olyan mutációk, melyek a tumorigenezis korai, vagy későbbi lépésében jelennek meg [33]. Erre nagyon jó példa a kolorektális tumorok klasszikus altípusa, ahol az *APC*-ben történik az egyik első mutáció, ami még csak polipképződést indukál, míg ha már a *KRAS* génje mellett a *TP53*-ban és más génekben is mutáció lép fel, akkor már karcinóma alakul ki [33, 34, 37].

A tumorok metasztázis képzésében is szerepet játszik a Wnt jelátviteli útvonal, olyan célgéneken keresztül, mint a *CD44*, az *MMP7*, *VEGF* vagy az *E-kadherin*. Ezek a gének az epitheliális-mezenchimális tranzíció (EMT) folyamatában vesznek részt. Több tumortípusnál is megfigyelték, hogy a tumor őssejtek (CSC) szabályozásában is fontos szerepe van a Wnt jelátvitelnek [35]. A CSC elmélet szerint a tumorokban kis mennyiségben őssejtek találhatóak, és ez a sejtpopuláció központi jelentőségű a tumorok növekedésében és áttétképzésében, valamint gyakran rezisztenciát mutatnak kemoterápiás hatóanyagokkal szemben. Ezzel is magyarázhatóak azok a klinikai

megfigyelések, hogy a tumorok képesek kiújulni az eredetileg sikeresnek tűnő kemoterápiát és / vagy sugárterápiát követően, illetve a daganatok nyugalmi állapota, és a metasztázis képzés. Ebből adódóan több kutatásban is olyan terápiák kidolgozását célozták meg, amelyek nem a tumorok méretének csökkentésével, hanem a CSC-k eltávolításával kezelnék a betegséget [38]. A különböző CSC-k több feltételezett felszíni markere is Wnt célgén, ilyenek például a LGR5, CD44, CD24 és az Epcam. Ezeket a markereket, illetve kombinációikat próbálták használni a CSC-k azonosítására és izolálására korábbi tanulmányokban. Emlőrák esetében sikerült azonosítani az LGR5 expresszáló sejteket, amelyek CSC tulajdonságokkal rendelkeznek és magas bennük a Wnt útvonal aktivitása. Akut limfoid leukémia és prosztatarák esetében pedig a Wnt3 fehérjét azonosították, amely elősegíti a CSC sejtek önmegújító képességét. Kolorektális tumorokban a CD44 marker jelöli a β -katenin aktivitását bizonyos sejtpopulációkban [35]. Ugyanebben a ráktípusban az LGR5+ sejtpopulációról is bizonyították, hogy CSC fenotípussal rendelkeznek [39].

Mivel a Wnt jelátviteli útvonal kiemelkedő szerepet játszik a tumorok kialakulásában, fennmaradásában és metasztázis képzésében, így nem meglepő, hogy számos olyan terápiás szerrel kísérleteznek, melyek különböző módokon gátolják a Wnt útvonalat, pl. a PORCN vagy a β -katenin gátlásával. Eddig azonban ezek a terápiás szerek még nem jutottak túl a klinikai teszteleseken [35, 36].

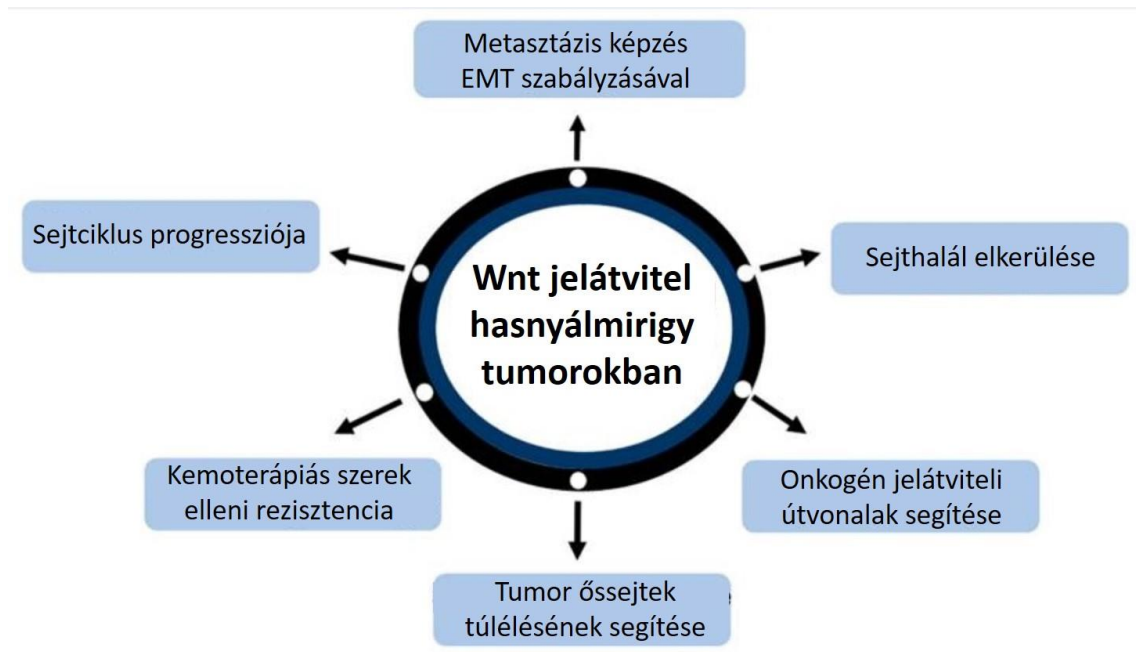
2.3.1. Wnt jelátviteli útvonal szerepe PDAC esetében

PDAC esetében már bizonyították, hogy a két legfontosabb útvonal, ami a betegségben szerepet játszik a mutáns *KRAS* mellett, a Wnt és a P53 jelátviteli útvonal. Fehérje-fehérje interakciós vizsgálatok kimutatták, hogy ez a két útvonal a DKK1 és a HMGA2 fehérjén keresztül tud interakcióba lépni egymással [40]. A Wnt jelátviteli útvonal többféleképpen is részt vesz a hasnyálmirigy karcinogenezisében, de bizonyították, hogy önmagában nem lenne elegendő a betegség kialakításához [41]. Számos Wnt target gént azonosítottak PDAC esetében, amelyek expressziós szintje a betegség során megnő. Ilyenek a sejtciklus szabályozó fehérjék, mint a ciklin D1, ciklin E; az angiogenezisben és az EMT-ben részt vevő fehérjék (c-myc, VEGF, MMP7). Megfigyelték, hogy a Wnt útvonal aktivitása hasnyálmirigy tumoroknál elősegíti az

apoptózis elkerülését és a CSC-k fennmaradását. Továbbá a Wnt2, Wnt5a és a Wnt7a fehérjék emelkedett expresszióját is detektálták [40].

A Wnt jelátviteli útvonalat a nem kanonikus Wnt receptor ligandumok is el tudják indítani, ilyen például a Wnt5a, illetve kölcsönhatást mutattak ki a KRas, MUC1, Rab11a, GATA6 fehérjékkel. Ezek aktivitása szintén jellemző a hasnyálmirigy tumorok progressziójára [40].

A Wnt jelátviteli útvonal szerepét hasnyálmirigy tumorok esetében az 5. ábra foglalja össze.



5. ábra: A Wnt jelátviteli útvonal szerepe hasnyálmirigy tumorokban. A Wnt jelátviteli útvonal az egyik legfontosabb jelátviteli folyamat hasnyálmirigy tumorok esetében. Több ponton is segíti a tumor kialakulását és fennmaradását: sejthalál elkerülésével, onkogén jelátviteli útvonalak elindításával, a tumor őssejtek túlélésének támogatásával, a kemoterápiás szerek elleni rezisztencia kialakulásának elősegítésével, a sejtciklus folyamatának módosításával és a metastázis képzés indukálásával az epitheliális-mezenchimális tranzíció támogatásán keresztül. Az ábrát M. R. Makena és mtsi alapján a szerző módosította [40].

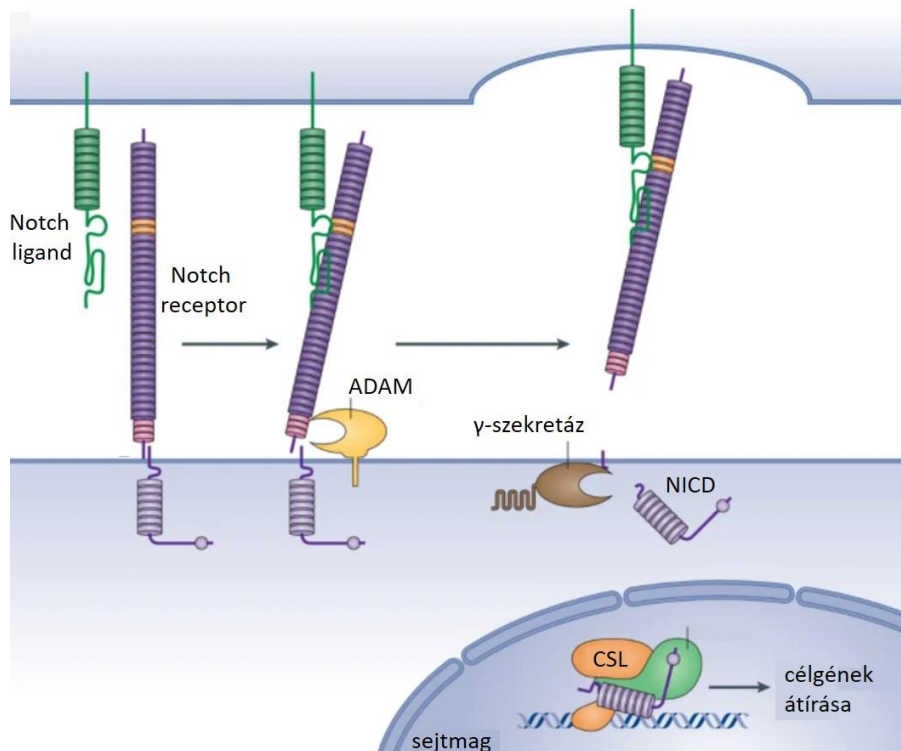
2.3.2. Wnt jelátviteli útvonal szerepe NSCLC esetében

NSCLC esetében nem azonosítottak mutációt a β -katenin vagy az APC fehérjék génjében, viszont bizonyítottan fontos szerepe van a Wnt jelátviteli útvonalnak a tumor kialakulásában, és az útvonal gátlásával meg lehet akadályozni a tumoros sejtek proliferációját. NSCLC-ban szenvedő betegeknél megfigyelhető a *Wnt-1,-2,-3,-5a*, *FZD-8*, a *DVL*, *PORCN* és a *TCF4* génjeinek nagymértékű expressziója, amely rossz prognózissal társul. Meglepő módon azonban az NSCLC-ban gyakran expresszálandó β -

katenin jelenléte ezzel ellentétes módon pont a prognózis javulását jelenti. NSCLC sejtvonalakban és tumor mintákban is megfigyelhető a Wnt inhibitorok negatív szabályozása, pl hipermetilációval [42].

Összeségében elmondható, hogy az NSCLC esetében is kiemelkedően fontos szerepet játszik a Wnt jelátviteli útvonál: befolyásolja a tumorigenezist, a prognózist, a terápiával szembeni rezisztenciát, de a betegség kialakulását leginkább a Wnt inhibitorok funkciójának kiesése befolyásolja. Éppen ezért főként olyan terápiás szerekkel kísérleteznek, amelyek vagy a β -katenin működését gátolják, vagy a Wnt inhibitorok működését segítik elő [42, 43].

2.4. Notch jelátviteli útvonál és szerepe a tumorokban



6. ábra: A Notch jelátviteli útvonál. Az Notch ligand a Notch receptorhoz való kapcsolódásának hatására az ADAM hasítja a receptort. Ezt követően az intracelluláris régióját a receptornak a γ -szekretáz hasítja, így létrehozva NICD-t (Notch intracelluláris domén). Az így felszabadult NICD bejut a sejtmagba és transzkripciós kofaktor aktivitása révén cél gének átírását indítja el a célsejtben. Az ábrát Sarah J. Bray alapján a szerző módosította [47].

A Notch jelátviteli útvonál szintén egy evolúciósan konzervált útvonál, amely fontos szerepet játszik a Metazoák fejlődési és differenciálódási folyamataiban [44, 45].

A Notch jelátvitel három fő részből áll: Notch receptorból, Notch ligandból, és a DNS-ben lévő CSL kötőhelyekből. Emlősökben eddig négyféle transzmembrán Notch receptort találtak (Notch-1, Notch-2, Notch-3 és Notch-4), és ötféle transzmembrán ligandot (Dll-1, Dll-3, Dll-4, Jagged-1, és Jagged-2), amelyek nagyon hasonló szerkezettel rendelkeznek. A Notch jelátviteli útvonal akkor aktiválódik, amikor két szomszédos sejt között a ligand hozzákötődik a Notch receptorhoz, ami meghatározza a sejtek további sorsát [45, 46].

A klasszikus útvonal aktivitásához három proteolitikus hasításra van szükség. Először a Golgi-apparátusban a Notch receptor prekuzort hasítja a Furin proteáz. Az így létrejött Notch receptor egy nagyobb extracelluláris régiót, egy kisebb intracelluláris, és egy transzmembrán régiót tartalmaz. Ha az érett receptorhoz hozzákapcsolódik a Notch ligand, akkor megtörténik a második hasítás ADAM (egy dizintegrin és metalloproteáz) által, aminek következtében az extracelluláris fragment levágódik. A megmaradó transzmembrán és intracelluláris régiót végül a γ -szekretáz hasítja, így létrejön a Notch intracelluláris domén (NICD), ami be tud jutni a sejtmagba és ott transzkripció faktor aktivitása révén hozzá tud kötődni a CSL-kötő szekvenciákhoz, így több gén átíródását indukálja (6. ábra) [46, 47].

Mivel a tumorok progressziójában és metasztázis képzésében fontos szerepe van a tumorsejtek és mikrokoznyezetük közötti interakcióknak, így a Notch jelátviteli útvonalnak is meghatározó szerepe van ebben a kommunikációban. Többféle hatása is lehet ennek az útvonalnak: onkogén és tumorszupresszor folyamatokat is elindíthat. A T-sejtes akut limfoid leukémiában már ismert az onkogén hatása, ahol a Notch-1 receptor aktivitása a tumor kialakulásának az egyik legfontosabb faktora. A Notch jelátvitel a fő szabályozója a tumorok angiogenezisének, és így a metasztázis képzésben is szerepet játszik. Például prosztatara ráknál az egyik Notch ligand, a Jagged-1 nagymértékű expressziójának következtében az angiogenezis fokozódását figyelték meg. Az immunszupresszív környezet és a tumor ellenes immunválasz kialakításában is részt vesz a Notch útvonal a T- és B-sejtek aktivitásának szabályozásán keresztül. Például a citotoxikus T-sejtek anti-tumor hatású granzim B és IFN- γ szekréciójához a Dll-1 ligandumoknak kapcsolódnia kell a Notch-1 vagy Notch-2 receptorhoz. Az immunszupresszív környezetet kialakító tumor-asszociált makrofágok differenciálódásához szintén szükség van a Notch útvonal aktivitására. Vastagbél

tumorokban megfigyelték, hogy a Jagged-2 expressziója szükséges az EMT folyamatához, így a metasztázis képzéshez [48, 49].

NSCLC esetében is kimutatták, hogy fontos szerepe van a Notch jelátviteli útvonalnak. A betegek több, mint 50%-ban nagymértékben expresszálódott a Notch-3 receptor, 10%-ban a Notch-1 funkciónyeréses mutációját találták, 30%-ban pedig a Notch útvonal gátló *Numb* génjében találtak mutációt [50, 51].

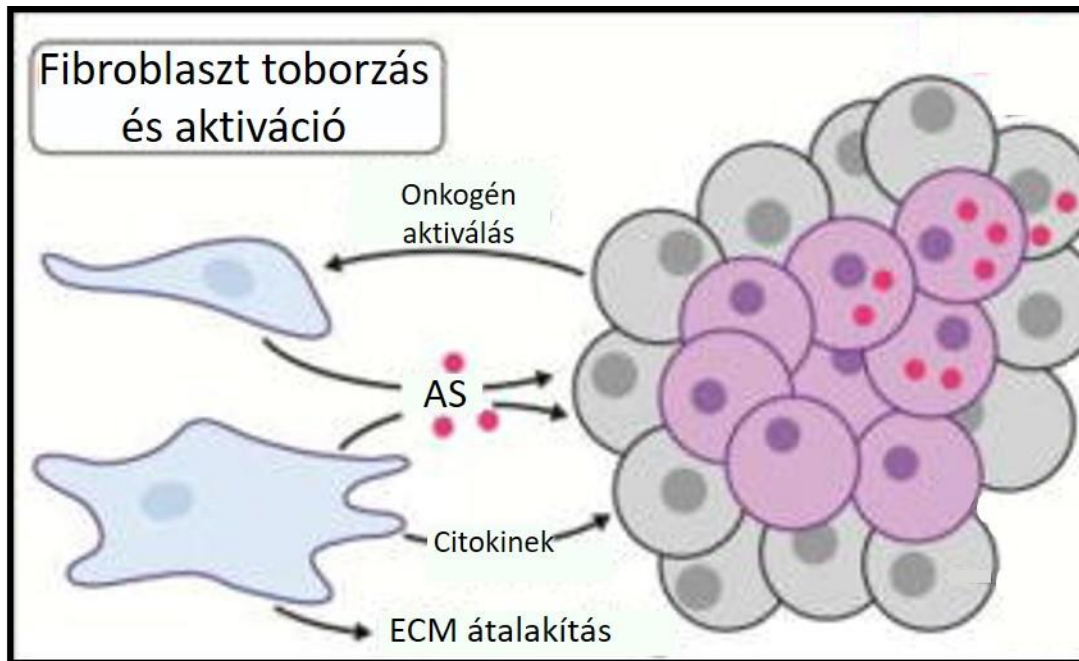
A tumorok ellen már több terápiás szert kifejlesztettek, amelyek a Notch jelátviteli útvonal különböző részeit gátolják. Ilyenek a γ -szekretáz gátlók, receptorhoz vagy a ligandhoz kapcsolódó ellenanyagok, és a transzkripciós aktivitást gátló szerek [48]. Például a petefészek carcinoma sejtvonalak *in vitro* tenyésztésében a DAPT γ -szekretáz gátló hatására a MMP-2 és -9 aktivitása csökkenését figyelték meg [52]. Ezek használata azonban alapos kutatást igényel, ugyanis ezek a vegyületek nemcsak a tumorsejtekre, hanem a mikrokoznyezetben lévő egészséges sejtekre is hatással lehetnek, így súlyos mellékhatást idézhetnek elő [48, 53].

2.5. Fibroblasztok szerepe a tumor mikrokoznyezetben

A tumorokat környező niche-ben lévő egészséges szövetnek az egyik feladata, hogy megakadályozza, hogy a tumorképződés elindulását, így jelentősen befolyásolja a tumorsejtek működését [54]. A tumorsejtek viszont képesek úgy alakítani mikrokoznyezetüket, hogy az a túlélésüket és a növekedésüket segítse. Ilyen változások az extracelluláris mátrix átalakítása, az érrendszeri hálózat képzése, és az immunsejtek és fibroblasztok toborzása [55]. Ez a niche sejtes és sejtmentes részből tevődik össze, melyek aránya és összetétele függ attól, hogy milyen tumorról van szó, hol helyezkedik el a tumor és milyen stádiumban van. A sejtes rész főleg a fibroblasztokból, a mezenchimális őssejtekből, az adipocitákból, a pericitákból, a mezenchimális vonal endotheliális sejteiből, a tumorba beszivárgó limfocitákból és makrofágokból áll. A sejtmentes rész pedig főként az extracelluláris mátrix összetevőit tartalmazza [54].

A fibroblasztok mezenchimális eredetű sejtek, melyek nyugalmi állapotban találhatóak a szövetekben, és valamilyen sérülés hatására aktiválódhatnak, hogy helyrehozzák azt. Így normál körülmények között a fibroblasztok gátolják a tumor kialakulását, azonban vannak tumor asszociált fibroblasztok (CAF), amelyek pont ennek

ellenkezőjét teszik, és így jelentős mértékben hozzájárulnak a tumor kialakulásához és életben maradásához (7. ábra). Indukálni tudják a tumorsejtek proliferációját, fokozzák az extracelluláris mátrix termelését, illetve különböző citokineket termelnek (pl.: VEGF, PDGF), így részt vesznek a tumor iniciációban, növekedésben és a metasztázis képzésében is [54]. A CAF-ok egészséges fibroblasztokból, adipocitákból, pericitákból, endothél sejtekből, és csontvelői őssejtekből differenciálódhatnak [56]. CAF-okra jellemző, ezért széleskörűen használt, bár nem kizárólagosan rájuk specifikus markereik az α -SMA (α -simaizom aktin), FSP1 (fibroblaszt specifikus fehérje 1), a FAP (fibroblaszt aktivációs fehérje), NG2 kondroitin-szulfát proteoglikán, PDGFR- β , és a podoplanin. Több mitogén faktort is termelnek aktiválódásuk után, ilyenek a HGF (hepatocita növekedési faktor), EGF család tagjai, CXCL12 (kemokin ligand 12), FGFs (fibroblaszt növekedési faktorok), és az STC-1 (stanniocalcin-1) [57].



7. ábra: CAF-ok szerepe a tumorokban. A tumorsejtek képesek átalakítani és aktiválni a környezetükben lévő fibroblasztokat. A CAF-ok így segíteni tudják a tumorok növekedését, túlélését és metasztázis képzését úgy, hogy átalakítják az ECM-et, illetve citokineket és aminosavakat termelnek. Az ábrát M. Reina-Campos és mtsi alapján a szerző módosította [54].

Leginkább a CAF-ok metasztázis képzésben játszott szerepük ismert. Az EMT-t folyamatát segítik elő az általuk termelt mátrix metalloproteázok, amelyek az extracelluláris mátrixot képesek bontani, illetve az általuk termelt citokinek, mint például a TNF- α , ami az NF κ B és az Akt jelátviteli útvonalakon keresztül járulnak hozzá a tumorsejtekben az invazív fenotípus kialakításához. Az eredetileg nem invazív

tumorsejteket is képesek átalakítani invazívvá, valószínűleg ezt a PAR1 függő Ca^{2+} jelátviteli út és az MMP1 szabályozásán keresztül érik el [57].

Az egészséges fibroblasztokra és a CAF-okra is jellemző a heterogenitás. Ezeknél a sejteknél gyakran az epitheliális-mezenchimális és a mezenchimális-epitheliális tranzíció is lejátszódik. Bizonyított, hogy a CAF populáció jelenléte klinikailag releváns. Több tumortípus esetében, mint például az NSCLC-nál, a hasnyálmirigy- és az emlődaganatoknál megfigyelték, hogy a sztróma sejtek nagy száma rossz prognózissal párosul. A megnövekedett mátrix metalloproteináz szint, amit a CAF-ok is termelnek, szintén rossz prognózisra utal [55, 58].

Mivel a CAF-ok nagymértékben befolyásolják a tumor progresszióját, terápiás célpontok lehetnek, és számos gyógyszert fejlesztenek a működésük gátlására. Több proteáz gátlóval is kísérleteznek, amelyekkel a CAF-ok működését lehetne ellensúlyozni. Eddig a mátrix metalloproteinázok inhibitoraihoz klinikai vizsgálatok során nagy reményeket fűztek [55].

2.6. Az extracelluláris mátrix szerepe a tumorigenezisben

A tumor mikroniche három részből áll: biológiai, kémiai és biofizikai, illetve biomechanikai környezetből. A biológiai környezet a tumor és a környezetében lévő sejtekből áll. A kémiai környezet az oxigénnek, a tápanyagoknak, a lebomlási termékeknek, a növekedési faktoroknak és a citokineknek a rendellenes eloszlása. A biofizikai és biomechanikai környezet pedig a tumorszövet struktúrája és kapcsolata a környezettel, különösen az extracelluláris mátrixszal (ECM) [59].

Az ECM a szöveteknek nem sejtes része, amelyet a sejtek hoznak létre a szövet strukturális és biokémiai támogatására. Fontos szerepet játszik a sejtek differenciálódásában, osztódásában és a szövetek homeosztázisában [60]. Fő komponensei a víz, fehérjék (kollagén, elasztin, fibronektin, laminin) és poliszacharidok (kondroitin-szulfát, heparin-szulfát, keratin-szulfát és hialuronsav) [61]. Legnagyobb mennyiségben kollagént tartalmaz, de szövetenként eltér, hogy melyik típusa jellemző. A bazális membrán főként IV-es típusú kollagént tartalmaz, azonban az intersticiális mátrixban megtalálható I-es, II-es és III-as típusú kollagén is. Ezek a kollagén típusok polimereket alkotnak, és nem kollagén típusú doméneket is tartalmazhatnak, mint az

endosztatin. Számos betegség kialakulásában szerepet játszik az ECM kollagén tartalma, így terápiás célpont is [60].

Az ECM-nek igen fontos szerepe van a tumor kialakulásának összes stádiumában és mikrokörnyezetének megformálásában. A tumorok a szükségleteiknek megfelelően képesek manipulálni az ECM-et: például a mátrix bontása az inváziót segíti elő [62]. Metasztázis képzés során a tumorsejtek kapcsolatba lépnek az ECM komponenseivel, és az ECM pórus méreteit úgy módosítják, hogy ki tudjanak férni köztük a tumorsejtek. Nemcsak a tumorsejtek, hanem a tumor mikrokörnyezetében lévő sejtek is képesek átalakítani az ECM struktúráját. Erre jó példa a már említett CAF-ok, amelyek MMP-kat termelnek, így segítve az inváziót [59].

Több szolid tumor esetében, mint például a PDAC és a LUAD, nagymértékű fibrózis figyelhető meg, ami részben a kollagén I szintjének növekedése miatt történik. Ez a nagymértékű fibrilláris kollagén lerakódás az ECM-be már gyakran megelőzi a tumor kialakulását [60]. Az emlődaganatoknál már a tumor kialakulása előtt észrevehető, hogy az ECM-ban a kollagén szint megemelkedik a leendő tumor területén, ami a későbbiekben a metastázis képzést is elősegíti. Ezt a kollagén felhalmozódást mammográfia segítségével a tumor megjelenése előtt már detektálni lehet [59]. A kollagén I felhalmozódását a hasnyálmirigy és a prosztaták esetében is megfigyelték. A szöveti sűrűség növekedése különböző külső és belső jelátviteli útvonalakat szabályoz, mint például a Rho-ROCK-MLC útvonal, amely elősegíti az integrinek túlzott expresszióját, a fokális adhéziót, a sejtek kontraktilitását és az EMT markerek termelését, és így a metastázis képzést [60]. A TGF- β útvonal is aktiválódik a módosult ECM hatására a tumorsejtekben, ami az EMT-t indítja el [62]. A kollagén rostok sűrű elhelyezkedésének következtében az MMP kötőhelyek nem lesznek szabadok az MMP számára, így nem tudja lebontani a tumor környezetében, és védettek lesznek a tumorsejtek [60]. Így a különböző terápiás szerek is nehezebben jutnak el a tumorsejtekhez [62].

Azt is megfigyelték, hogy az ECM proteoglikán komponensei is részt vesznek a tumor progresszióban. Ilyen összetevők a perlekán, a szindekán és a gliplikán. A proteoglikánok a tumor progressziójában és neovaszkularizációjában segítenek úgy, hogy több jelátviteli útvonalat is képesek módosítani, illetve növelni tudják az ECM-nak a hidrofíli tulajdonságát. Egy másik fontos, a tumor progressziójában szerepet játszó

poliszacharid komponens a hialuronsav. Emlő, tüdő és petefészek daganatok esetében megfigyelték, hogy fokozott a hialuronsav szekréciója több jelátviteli receptor, mint például az EGFR, TGF- β , és a CD44 fokozott expressziójához vezet. Sőt az Akt- és a MAPK útvonalak is aktiválódnak az előbb említett receptorok által, így metasztázis képzést és kemorezisztenciát is indukálnak [60].

A tumorok belsejében kialakuló hipoxia is nagymértékben befolyásolhatja az ECM szerkezetét. A hipoxia indukálta faktorok (HIFs) olyan gének transzkripcióját indítják el, amelyek az ECM lebontásáért vagy átrendezésért felelősek, így kialakul a metasztatikus fenotípus a tumorsejtekben és elindul az invázió [61].

Az ECM-hez kapcsolódó inhibitorok alkalmazása a metasztázis képzés megállítására terápiás szerként ígéretes lehet, azonban néhány szer a klinikai vizsgálatok során kudarcot vallott, mint például az MMP inhibitorok. Két terápiás szer, a topotecán (topoizomeráz I inhibitor) és a digoxin (szívglikozid), azonban eddigi klinikai vizsgálatok alapján hatásosnak tűnik prosztatarák esetében: csökkenteni tudják a tumorok fibrózisát és gátolni tudják a HIF1 α felhalmozódását [61].

2.7. A sejtek közötti kommunikáció egyik formája: az extracelluláris vezikulák

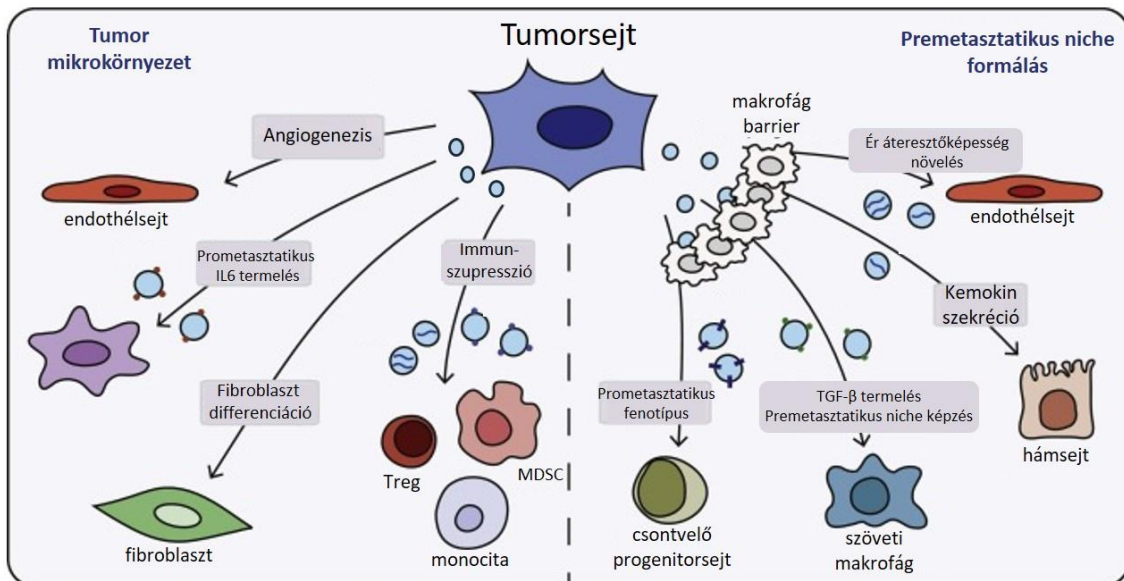
A soksejtű élőlények esetében elengedhetetlen a szervezet megfelelő működéséhez, hogy összehangolják a sejtjeik működését. Ebben játszik nagy szerepet a sejtek közötti kommunikáció, mely többféleképpen is megvalósulhat [63]. A közvetlen egymás mellett lévő sejtek tudnak hatni egymásra a membránjukban lévő molekulák által homofil vagy heterofil módon [64]. Ám nem csak az egymás közelében lévő sejtek jelezhetnek egymásnak, hanem az egymástól nagyon távol lévő sejtek is képesek befolyásolni egymás működését úgy, hogy a testfolyadékokba juttatják a jelvivő molekulákat, mint például a hormonokat [65]. 1960-ban fedezték fel az apoptózis vizsgálata során, hogy az egyik módszer, aminek segítségével a sejt képes információt átadni egy másik sejtnek, az extracelluláris vezikulák (EV) [66]. Ez a kommunikációs forma minden működő sejt, nem csak az eukarióta sejtekre, hanem a prokarióta sejtekre is jellemző [67].

Az EV-k lipid kettősréteggel körülvett partikulumok, amelyek lipideket, transzmembrán fehérjéket, citoszolikus fehérjéket és RNS-eket tartalmaznak [68]. Méretük változó, 30-5000 nm-ig terjedhet, ami a csoportosításuk egyik alapját adja. A legkisebbek az exomerek (30-50nm), utánuk az exoszómák következnek (50-150nm), a legnagyobbak pedig a mikrovezikulák (100-1000nm) és az apoptotikus extracelluláris vezikulák, illetve testek (100-5000 nm). Mivel a különböző méretű EV-k a sejt más-más részeiből alakulhatnak ki, így a membránjukban levő fehérjékben is különböznek. A 100 nm-nél kisebb vezikulák az endoszómális-lizoszómális útvonal különböző komponenseiből ágaznak le. Például az exoszómák esetében ehhez a kompartmenthez tartozó multivezikuláris test nem lizoszómává alakul, hanem a sejtmembránnal összeolvadva kiüríti tartalmát a külvilágba. Így nem meglepő, hogy az exoszómák a multivezikuláris testekben (MVB) található molekulákban gazdagok, és jó markerük a CD63, a CD9 és a CD81 tetraspanin fehérjék [66]. Az EV-ket a gyakorlatban azonban nehéz a sejtbeli eredetük alapján azonosítani, így gyakran méretük alapján csoportosítják őket a kis EV (small EV, sEV) és a nagy EV (large EV, lEV) kategóriákba differenciált centrifugálási és ultracentrifugálási eljárások során kapott üledékek alapján [69].

A mikrovezikulák sejtekről való leválását részben egy flippáz nevű fehérje segíti elő úgy, hogy megváltoztatja két membrán komponens elhelyezkedését a foszfolipid kettősrétegben, mely által módosul a biológiai membrán egyenlőtlen lipid eloszlása: a foszfatidiletanolamin és a foszfatidilszerin megfordul, és ez indítja el a leválásukat a donorsejtről [67]. Az exoszómák belsejébe az ESCRT fehérjék segítségével kerülnek be a cargo molekulák. Az ESCRT fehérjék a MVB biogenezisében vesznek részt, melynek végén a MVB vagy a lizoszómával olvad össze és lebontódnak a belsejében lévő molekulák, vagy a plazmamembránnal összeolvadva kijutnak a vezikulák az extracelluláris térbe [70]. Az exoszómák kibocsátása a Rab GTPáz fehérjék és a SNARE fehérjék segítségével történik meg, amelyek segítik a MVB összeolvadását a plazmamembránnal [71]. Az, hogy az EV-k belsejébe válogatva, vagy véletlenszerűen kerülnek be a biológiailag aktív molekulák, még további kutatásokat igényel [70].

Az EV-k membránjában lévő fehérjék és a belsejükben lévő nagyon változatos tartalom is a kibocsátó sejtre jellemző információt tartalmazhat, és függhet a donor sejt fiziológiai és patológiai állapotától [67]. Ezek a donor sejtre jellemző molekulák membránnal körülvéve szállítódnak, így védve vannak a szövetekben, vagy a vérben lévő

lebontó enzimektől. A célsejtek működését több módon is képesek befolyásolni, hiszen az „üzenetet” közvetíthetik miRNSEk, fehérjék, lipidek transzportja által is [72]. Az EV-k hathatnak úgy, hogy a bennük lévő cargo bejut a célsejt citoplazmájába. Az, hogy milyen mechanizmussal veszik fel a sejtek az EV-ket függ attól, hogy milyen sejtről van szó. Bejuthatnak a sejtekbe endocitózissal, fagocitózissal és pinocitózissal is. Például a neuronok klattrin függő endocitózissal és fagocitózissal, a dendritikus sejtek receptor mediált endocitózissal vagy fagocitózissal, a hámsejtek kaveolin mediált endocitózissal, a tumorsejtek pedig általában koleszterol és lipid-raft függő endocitózissal juttatják be az EV-kből származó információkat. Feltételezik, hogy bizonyos EV-k a citoplazmába bejutva képesek közvetlenül bejutni a sejtmagba és ott kifejteni hatásukat, melynek a közvetlen bizonyítása azonban még nem sikerült. Az EV-k nem csak úgy hathatnak a célsejtre, hogy bejuttatják a bennük lévő molekulákat a citoplazmába, hanem speciális fehérjék segítségével a sejtek felszínén lévő receptorokhoz is tudnak kapcsolódni, így el tudják indítani például az EGF, a Notch, a RHEB, és az IFN- γ /STAT jelátviteli útvonalat [43].



8. ábra: A tumorsejtek által kibocsátott EV-k szerepe a mikrokörnyezet kialakításában és metasztázis képzésében. A tumorsejtek által kibocsátott EV-k képesek átalakítani mikrokörnyezetüket úgy, hogy az elősegítse túlélésüket: angiogenezist indukálnak, immunszuppressziót váltanak ki, aktiválják a fibroblasztokat és premetasztatikus citokinek termelését indukálják. Metasztázis képzésben is fontos szerepeük van: a makrofág barrieren átjutva növelik az erek áteresztőképességét, kemokin szekréciót indukálnak, premetasztatikus citokinek termelését indukálják, és a csontvelő progenitorsejtekben premetasztatikus fenotípust képesek kialakítani. Az ábrát Maarten P Bebelman és mtsi alapján a szerző módosította [70].

A legtöbb sejttípus állandóan képes valamelyik EV típus kibocsátására, melynek intenzitása külső és belső jelektől függ. A tumorok kialakulásában fontos szerepe van a tumorsejtek és mikrokörnyezetük folyamatos kommunikációjának, amiben kiemelkedő szerepe van az EV-knek [73]. Igazolták, hogy a tumorok által kibocsátott EV-knek nagyon fontos szerepük van a progresszióban és metasztázis képzésben is (8. ábra), továbbá azt is megfigyelték, hogy a tumorsejtek több vezikulát bocsátanak ki, mint az egészséges sejtek. A tumorsejtek a mikrokörnyezetük átalakításához használnak EV-eket is, illetve távolabbi szövetek módosításához, így a metasztázis képzéshez. A fibroblasztokban vezikulák segítségével is ki tudják alakítani a CAF fenotípust és MMP termelést, és így az ECM átrendeződését is indukálni tudják. A tumor asszociált makrofágokban az érékezéshez szükséges citokinek termelését indítják el [74]. Megfigyelték, hogy tumorsejtekben a hipoxia olyan EV-k kibocsátását indukálja, melyek az érékezéshez segítik elő [70]. Immunszuppresszív hatást is el tudnak érni a tumorsejtek EV-ken keresztül: Treg sejteket aktiválnak, apoptózist indukálnak CD8⁺ T-sejtekben, neutrofil granulocitákat toboroznak. A tumorsejtek képesek egészséges sejteknek onkogén molekulákat is átadni vezikulába csomagolva, illetve különböző miRNS-ek segítségével elő tudják készíteni a környezetet a metasztázáló tumorsejteknek. Mezenchimális markereket közvetítve az EMT-ben is részt vehetnek az EV-k [74].

Különböző testfolyadékokból tudtak már izolálni EV-kat, mint például a vérből, vizeletből, nyálból, anyatejből, magzatvízből, asciteszből, gerincvelői folyadékból, epéből és ondóból [75]. Ennek köszönhetően ígéretes biomarkerek lehetnek különböző betegségek esetében és segíthetnek a diagnosztikában [76]. Így a folyadék biopsziából izolált tumor specifikus EV-k több tumor esetében is megoldást jelenthetnek a korai diagnosztikához. A tumorra jellemző mRNS-t, miRNS-t és fehérjéket próbálnak detektálni. Azt azonban, hogy melyek azok a vezikulák, amelyek a tumorból származnak nem könnyű megállapítani, így további kutatásokra lesz szükség [77].

Az EV-k nem csak a korai diagnosztikában, de a tumorok terápiájában is segíthetnek, mivel nagy felszín-térfogat arányuknak köszönhetően hatékonyan kölcsönhatnak a célsejttel, felszínük és belsejük is módosítható, nem toxikusak, a szállított molekulák védve vannak az immunrendszerrel, és méretük igen hatékony sejtek általi felvételt tesz lehetővé. Bizonyított, hogy dentritikus sejtekből származó vezikulákkal aktiválni lehet a T-limfocitákat, amelyek így képesek a tumor növekedését

gátolni. A melanoma és az NSCLC esetében már I. fázisú klinikai vizsgálatok folynak olyan EV-kkel, amelyek felszínén az MHC fehérjékhez az adott tumor antigénjei kapcsolódnak, és így elindítják a T-limfocitákban a tumor elleni immunválaszt [74].

Több Rab fehérjénél is bizonyították már, hogy részt vesznek az exoszómák szelektív kibocsátásában egészséges és tumoros sejtekben is. Mivel a tumorok EV-i a metasztázis képzésben is nagy szerepet játszanak, és bizonyos miRNS-eket tartalmazó EV-k kemoterápiás szerek elleni rezisztenciát képesek átadni a célsejteknek, illetve a tumor sejtek is képesek úgy védekezni a kemoterápiás szerek ellen, hogy vezikulába csomagolva kiürítik magukból, újabban azzal is próbálkoznak, hogy a megfelelő Rab fehérjék működését célzottan gátolják a tumoros sejtekben. A melanoma sejtek esetében már megtalálták, hogy a Rab27 gátlása csökkenti egyrészt a primer tumor méretét, valamint a metasztázisok kialakulásának esélyét is [74].

Mivel az EV-eket a megfelelő felszíni molekulákkal célzottan az általunk kívánt sejtek tudjuk „címezni”, így ígéretes terápiás szerek lehetnek úgy, hogy a terápiás RNS-t, fehérjét, vagy más molekulákat, akár kemoterápiás szereket is szállíthatunk velük. Így úgy mondhatjuk „személyre szabható” gyógyszerszállító rendszert lehet létrehozni. Természetesen ennek a módszernek is megvannak a korlátai: nem olyan egyszerű módosítani az EV-eket, megfelelő mennyiségű és tisztaságú EV-re van szükség hozzá, az EV-vel együtt izolált más molekulák hatásáról nincs elég adatunk, továbbá a vérbe bejuttatott vezikulákat a máj és a lép hatékonyan ki tudja szűrni, így nem feltétlenül tud eljutni a célsejtekhez. Szerencsére több esetben már sikerült ezeket a problémákat megoldani és néhány betegségnél, mint például a melanománál, vagy a vastagbélrák esetében már klinikai vizsgálatok folynak az EV alapú terápia használatára [72, 74].

2.8. Az organoidok, mint tumor modellek

A tumorok nagymértékű heterogenitást mutatnak mutációban, epigenetikai változásokban, morfológiában, fenotipikus változásban, génexpresszióban, metabolizmusban, proliferációs és metasztatikus potenciál szempontjából is. Ahhoz, hogy pontosan megértsük, hogyan működnek az egyes tumortípusok és a megfelelő kezelést kidolgozhatjuk, szükségünk van olyan modellekre, amelyek ezt a heterogenitást tükrözik. A 2D-s sejtenyészetek nem megfelelően reprezentálják a sejtes heterogenitást,

ráadásul idővel egyre több mutáció szelektíven halmozódhat fel bennük a tenyésztés következtében. Az állatmodellek pedig nem mindig mutatják a humán tumorokra jellemző genetikai jellemzőket. A betegek műtétei során eltávolított tumoros szövetmintákból immundeficiens állatmodellekbe ültetett xenograftok már jobban reprezentálták a heterogenitást, viszont több probléma is felmerült a használatuk során: munkaigényesek, időigényesek, drágák, és a beültetés hatékonysága tumoronként eltérő. Ezért volt szükség egy jobb modell létrehozására, amelyre a megoldást az organoid kultúra jelentette [78-80].

Az őssejtek, típusuktól függően, létrehozzák az embrió összes sejtípusát (embionális őssejtek) és a szövetek homeosztázisát (szöveti őssejtek) is fenntartják úgy, hogy önmegújulásra és differenciált sejtek létrehozására is képesek. Az őssejtek ezen tulajdonságát használják fel a „mini szervek”, vagyis organoidok *in vitro* létrehozásánál [81]. Az első organoidot 1946-ban hozta létre Emerson Smith és W. J. Cochrane, akik akkor még csak teratomának nevezték [82]. Később Sasai és kollégái készítettek pluripotens őssejtből organoidokat a központi idegrendszer modellezésére, amelynek módosítása révén Lancaster és kollégái készítették el az első „mini agyat” [83]. Eleinte a sejt kultúrák 3D körülmények közötti tenyésztését is organoidoknak hívták, amelyek azonban nem teljesen reprezentálják az *in vivo* körülményeket, hiszen nem található meg bennük az *in vivo* sejtes heterogenitás, így az ilyen kultúrákat szferoidoknak kell ma már nevezni. Az organoidok önmegújító és önszerveződő 3D kultúrák, amelyekben a sejtek típusa, szöveti felépítése, funkciója és genetikai jellemzői megegyeznek az adott szervvel, amelynek szövetmintájából izolálták. Létrehozásukhoz több típusú őssejtet is használhatunk: pluripotens őssejteket, embrionális őssejteket, indukált pluripotens őssejteket és szöveti őssejteket is. Fenntartásukhoz elengedhetetlen, hogy olyan médiumban tenyészük őket, amely minden fontos növekedési faktort és tápanyagot tartalmaz, ami a megfelelő niche kialakításához szükséges. A niche olyan mikro környezet, amely az őssejt fenotípus fennmaradásához szükséges. A különböző tumor eredetű organoidoknak néhány komponensben különbözik a médiumuk [78, 81].

Számos molekuláris technika alkalmazható az organoidokon, mint a CRISPR/Cas9 rendszer, tömegspektrometria, egy sejt szekvenálás (single-cell sequencing), és a cryo-elektron mikroszkópia, így könnyen lehet módosítani és elemezni őket [78]. Ennek köszönhetően vizsgálni lehet az organoidokon a különböző szövetek

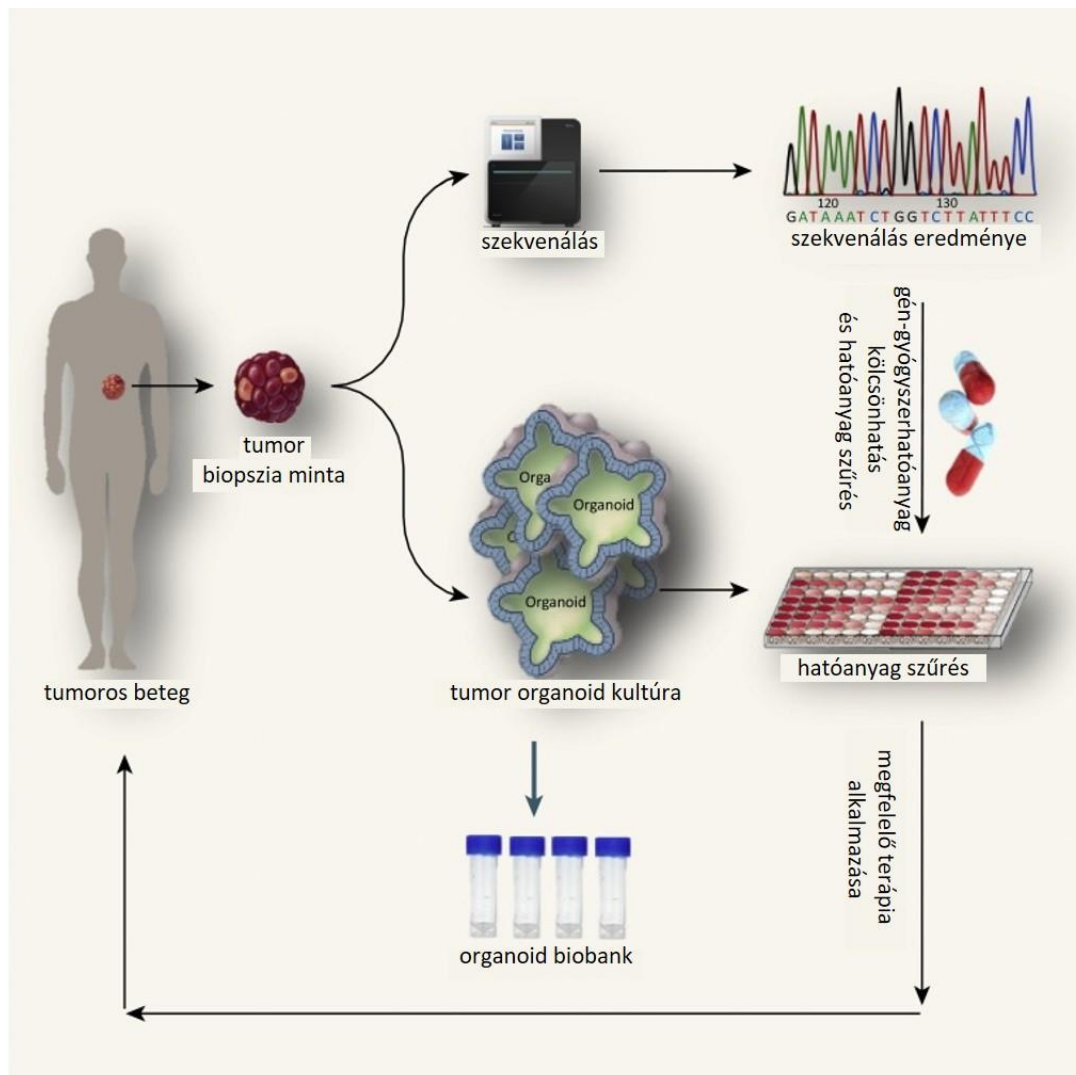
homeosztázisát, az őssejtek működését, bizonyos betegségek patomechanizmusát, mint például tumorok, örökletes betegségeket, de akár különböző mikrobák (pl. Zika-vírus, norovírus, *Helicobacter pylori*) fertőzésének hatását, vagy a mikrobiom változását gyulladással járó bélbetegségben [78]. Számos tumor esetében megfigyelhető, hogy valamilyen fertőzés elősegíti a kialakulásukat, mint például a *Helicobacter pylori* a gyomorrák, a *Salmonella enterica* epehólyag karcinóma, a hepatitis vírusok a hepatocelluláris karcinóma, az Epstein-Barr vírus limfóma, gyomorrák és orrgerati tumorok fejlődését indukálják. Így ezeknek a daganatoknak a kialakulását könnyebben lehet vizsgálni organoid tenyészetek és az adott fertőző ágenseknek a kokultúrájával. A genetikai módosítások alkalmazásával, mint például CRISPR/Cas9 rendszerrel pedig egy konkrét mutáció hatása is könnyen vizsgálható organoidokon. Főleg olyan tumorok esetében, mint például a vastagbél daganatok, amelyekben tudjuk, hogy a tumor progressziója során többféle mutáció is kialakul, és a különböző mutációt hordozó sejteknek más az érzékenysége a terápiás szerekre [79, 83].

Régebben csak 2D-s sejtenyészeten tesztelték a különböző terápiás szereket, hogy milyen hatással vannak az adott tumorra. Ezek a teszteredmények azonban nem mindig tükrözték a valóságot. A betegek mintáiból izolált organoidokon tesztelt és megfelelőnek bizonyult gyógyszerek azonban ténylegesen hatásosak lehetnének a betegekben is, így a személyre szabott orvoslás egyik fontos eszközeivé válhatnak az organoid kultúrák. Már több organoid biobankot is létrehoztak tumoros organoidokból új gyógyszerek azonosítása és tesztelése céljából, illetve egészséges organoidokból, amelyek a toxikológiai tesztelésekre alkalmazhatóak (8. ábra) [79, 83].

A tumor mikrokörnyezetet nehéz modellezni, de az organoidok erre is megoldást jelenthetnek. Ha az organoidokat a tumor mikrokörnyezetére jellemző sejtekkel együtt kokultúrában tartjuk, megvizsgálhatjuk, hogy milyen mechanizmussal hatnak a tumorokra. Például a hasnyálmirigy tumorok esetében az organoidokat sztellát sejtekkel együtt tenyésztve sikerült a különböző CAF típusokat elkülöníteni. Akár a tumorsejtek és az immunsejtek, amelyek szintén a tumor mikrokörnyezetének a részei, kapcsolatát is vizsgálhatjuk organoidok segítségével. Ehhez az adott betegből származó perifériás vérből izolált limfocitákkal készítették kokultúrát NSCLC, CRC és hasnyálmirigy tumorokból származó organoidokkal. Az ilyen vizsgálatokból optimalizálni lehet az effektor T-sejtek választását a beteg tumoros sejtjeivel szemben, vagy nagyszámú aktivált

effektor T-sejtet lehet így előállítani, amelyet utána terápiaként vissza lehet juttatni a betegekbe [83].

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy ma az organoidok nyújtják az egyik legjobb modellrendszert a humán tumorok vizsgálatára. Több módon is hozzájárulhatnak a személyre szabott orvosláshoz tumorok esetében: gén-gyógyszerhatóanyag kölcsönhatás vizsgálatokkal, preklinikai terápiás szerek tesztelésével, így a megfelelő terápia kiválasztásában és a prognózis felállításában is segítséget nyújthatnak (9. ábra) [84].



9. ábra: Az organoid alapú személyre szabott orvoslás sematikus ábrája. Az organoid technológia több módon is hozzájárulhat a személyre szabott orvosláshoz. Szekvenálás segítségével megállapítható, hogy milyen mutáció található az adott tumor mintában és gén-gyógyszerhatóanyag kölcsönhatás vizsgálatok alapján kiválasztható, hogy mely hatóanyag tűnik a leghatásosabbnak. A tumor organoid kultúrákon ezután hatóanyag szűrést (drug screening) lehet végezni a legvalószínűbb gyógyszerekkel és így ki lehet választani az adott betegnek legmegfelelőbb terápiát. Az organoidokból biobankot is létre lehet hozni, amely a későbbi kutatásoknál a kutatók segítségére lehet. Az ábrát Hamidreza Aboulkheyr Es és mtsi alapján a szerző módosította [84].

3. Célkitűzések

Munkánk során elsődleges célunk volt a mikrokörnyezet hatását vizsgálni az EV kibocsátás intenzitására különböző normál és tumoros szövetből származó organoid modelleken, az ECM és a Wnt kibocsátásra, mint két fontos tényezőre fókuszálva.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

1. A CP jelentős kockázati tényező PDAC-re. Munkacsoportunk eredményei alapján a PDAC-hoz hasonlóan a CP-ben is emelkedett EV szint mutatható ki. Egér hasnyálmirigy duktális organoid modell felhasználásával arra voltunk kíváncsiak, hogy van-e hatásuk az EV termelésre olyan mikrokörnyezeti változásoknak (citokinek, az ECM változása), melyek közösek a CP-ben és a PDAC-ben.
2. Korábban azt találtuk, hogy a Wnt aktivitás befolyásolja az EV kibocsátást intestinális adenomában. Arra is kíváncsiak voltunk, hogy ez általános jelenség-e különböző normál és tumoros szövetek esetében.
3. LUAD egér modellek esetében azonosítottak egy Wnt termelő mikroniche-t, mely központi jelentőségű a tumorsejtek proliferációs kapacitása szempontjából. Kísérleteink során ennek a niche-nek a jelenlétét is igazolni kívántuk humán LUAD modellben.
4. Célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a Wnt szekréció tekintetében megfigyelhető sejtes heterogenitás hogyan befolyásolja az osztódó sejtek számát és az EV kibocsátást különböző organoid modellekben, illetve a fibroblasztokból származó EV-k befolyásolják-e a mikroniche-ek kialakulását.
5. LUAD esetében azonosíthatók-e olyan sejtpopulációk, melyek eltérő Wnt termelő mikroniche képzési potenciállal rendelkeznek, így eltérő számú osztódó sejtet tartalmazó organoidokat képeznek?

4. Anyagok és módszerek

4.1. Kutatásainkhoz szükséges engedélyek

A SE-ÁTET, mint állategészségügyi hatóság engedélyezte számunkra az egerek fenntartását és a velük való kísérletek elvégzését.

A humán szövetminták felhasználása az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT-TUKEB) engedélyével (No 52614-4/2013/EKU és 580-5/2021/EÜIG), továbbá a betegek írásbeli hozzájárulásával történt.

4.2A sejtkultúrák fenntartása

Az A549, H1975 és BEAS-2B sejtvonalakat az American Tissue Culture Collection-től vásároltuk. Az A549 (ATCC CRL-185) nem kissejtes tüdő adenokarcinóma sejtvonalat DMEM médiumban tartottuk (DMEM high glucose, Gibco-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 10% FBS (Gibco), 1% glutamin (Merck), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) és 0,5% cyprofloxacin (Merck, 1:200 hígítás) hozzáadásával. A H1975 (ATCC CRL-5908) nem kissejtes tüdő adenokarcinóma sejtvonalat RPMI 1640 médiumban tartottuk (Gibco, Life Technologies) 10% FBS (Gibco), 1% glutamin (Merck), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) és 0,5% cyprofloxacin (Merck, 1:200 hígítás) hozzáadásával. A BEAS-2B normál, immortalizált bronchioláris hám sejtvonalat (ATCC CRL-9609) BEBM Bronchial Epithelial Cell Growth Basal Medium (Lonza, CC-3171) médiumban tartottuk a BEGM (Bronchial Epithelial Cell Growth Medium SingleQuots Supplements and Growth Factors (CC-4175, Lonza)) hozzáadásával. A 3D tenyésztés előtt a sejteket a tenyészedények aljáról Tryple-lel (Gibco) távolítottuk el, utána 3x mostuk őket PBS-sel, majd növekedési faktor csökkentett, fenolvörös-mentes, 25 µl-es Matrigel (Corning) cseppekbe 20 000 sejtet helyeztünk el egy 48 lyukú lemez (Eppendorf) vagy egy 8 lyukú chamber slide (Falcon) egy lyukába, hogy szferoidokat képezzenek. A sejteket 14 napig tenyésztettük így. EV izolálás előtt a sejteket 3x mostuk PBS-sel, majd a következő 48 órában FBS-mentes médiumban voltak tenyésztve. A sejtkultúrákat rendszeresen ellenőriztük Mycoplasma

fertőzésre Hoechst festéssel, így kísérleteink során csak fertőzésmentes kultúrákat használtunk.

4.3. Egér hasnyálmirigy organoidok létrehozása és fenntartása

A normál organoidokat C57Bl/6J (Jackson Laboratory, 000664) egerekből származó hasnyálmirigy szövetből izoláltuk. A szövetdarabok feldolgozását korábbi publikációkban alkalmazott módszerek alapján végeztük [85].

A hasnyálmirigyből származó ductális eredetű organoidok izolálásánál a teljes hasnyálmirigyet eltávolítottuk és 5 ml bazális médiumba (DMEM/F12 médium (Gibco), 1% glutamin (Merck), 1% 10 mM Hepes (Sigma), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco), 2% antibiotikum/antimikotikum mix hozzáadásával) helyeztük. A hasnyálmirigyet 3-4 mm-es darabokra vágtuk és 2x mostuk PBS-sel. Ezután DMEM/F12 médium alapú, 10% kollagenáz XI (C9407, Sigma), 10% diszpáz II (Sigma) és 0,4% DNáz I (Sigma) tartalmú emésztő mixben 1 órán át, 37 °C-on emésztettük a szövetet. Ezt követően mikroszkóp alatt kiválogattuk a ductális eredetű részeket és 2x PBS-es mosást követő centrifugálás után beágyaztuk őket növekedési faktor csökkentett, fenolvörös-mentes Matrigel cseppekbe. A 48 lyukú lemez egy lyukába 25 µl-es cseppet helyeztünk. Az így elindított kultúrákat hasnyálmirigy organoid médiumban tartottuk, mely az alábbiakat tartalmazta: DMEM/F12 médiumban 2% antibiotikum/antimikotikum mix, B27 kiegészítő (Gibco), humán gasztrin (10 nM, Merck), 1.25 mM N-acetil-cisztein (Sigma), HEPES puffer (10 mM, Gibco), egér R-Spondin1 (500 ng/mL, R&D Systems, BioTechne), egér noggin (100 ng/ml, Peperotech), humán FGF-10 (100 ng/mL, Peprotech), humán EGF (50 ng/ml, Peprotech) és nikotinamid (10 mM, Merck). Az organoidok passzálása 6-8 naponta volt szükséges, ekkor erőteljes pipettázással választottuk szét őket, majd új Matrigel mátrix cseppekbe helyeztük őket.

Egyes kísérletekben az organoidok médiumához Wnt szekréciót gátló IWP2-t (5µM, Tocris), illetve LGK974-et (250nM, Tocris) adtunk, amelyeket DMSO-ban oldottunk fel. Kontrollként 1% DMSO-t adtunk a médiumba. Továbbá bizonyos kísérleteknél az organoidok médiumához IL-1β (25 ng/mL, Peprotech), IL-6 (25 ng/mL, Peprotech), és TNF-α (50 ng/mL, Peprotech) citokineket adtunk. Ezen kísérleteknél 3

napi kezelés után újabb kezelést kaptak az organoidok és ezt követően 2 nap után izoláltuk az EV-eket. Az EV izolálás pontos menetéről a későbbiekben lesz szó.

4.4. Egér tüdő bronchioláris organoidok létrehozása és fenntartása

A normál organoidokat C57Bl/6J (Jackson Laboratory, 000664) egerekből származó tüdő szövetből izoláltuk. A szövetdarabok feldolgozását korábbi publikációkban alkalmazott módszerek alapján végeztük [86].

A tüdő bronchioláris organoidok izolálásánál a teljes tüdőt eltávolítottuk és 5 ml bazális médiumba (DMEM/F12 médium (Gibco), 1% glutamin (Merck), 1% 10 mM HEPES (Sigma), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco), 2% antibiotikum/antimikotikum mix hozzáadásával) helyeztük. A szövetet 3-4 mm-es darabokra vágtuk és 2x mostuk PBS-sel. Ezután DMEM/F12 médium alapú, 15% kollagenáz XI (C9407, Sigma) tartalmú emésztő mixben 1 órán át, 37 °C-on emésztettük a szövetet. 70 µm sejtszűrőn (Fisherbrand) való átszűrés után 2x mostuk a sejteket PBS-sel és centrifugálást követően beágyaztuk őket növekedési faktor csökkentett, fenolvörös-mentes Matrigel cseppekbe. A 48 lyukú lemez egy lyukába 25 µl-es cseppet helyeztünk. Az így elindított kultúrákat tüdő bronchioláris organoid médiumban tartottuk, mely az alábbiakat tartalmazta: DMEM/F12 médiumban 2% antibiotikum/antimikotikum mix, B27 kiegészítő (Gibco), 1,25 mM N-acetil-cisztein (Sigma), HEPES puffer (10mM, Gibco), egér R-Spondin1 (500 ng/mL, R&D Systems, BioTechne), egér noggin (100ng/ml, Peperotech), humán FGF-10 (100 ng/mL, Peperotech), Rock inhibitor (Y-27632, 5µM, MediChemExpress), ALK5 inhibitor (A8301, 500 nM, Sigma), p38 MAPK inhibitor (SB202190, 1 µM, Sigma), humán FGF7 (100 ng/ml, R&D Systems, BioTechne), humán heregulin β-1 (40 ng/ml, Peperotech) és nikotinamid (10 mM, Merck). Ezeknél az organoidoknál szintén 6-8 naponta volt szükséges a passzálás, ekkor erőteljes pipettázással választottuk szét őket, majd új Matrigel mátrix cseppekbe helyeztük.

Egyes kísérletekben az organoidok médiumához Wnt útvonal gátló LGK974-et (250nM, Tocris), vagy Notch útvonal gátló DBZ-t (10µM, Tocris), illetve DAPT-ot (10µM, Tocris) adtunk, amelyeket DMSO-ban oldottunk fel. Kontrollként 1% DMSO-t adtunk a médiumba. Ezen kísérleteknél 3 napi kezelés után újabb kezelést kaptak az

organoidok és ezt követően 2 nap után izoláltuk az EV-ket. Az EV izolálás pontos menetéről a későbbiekben lesz szó.

4.5. Egér tüdő eredetű fibroblaszt kultúrák létrehozása és fenntartása

A normál fibroblasztokat C57Bl/6J (Jackson Laboratory, 000664) egerekből származó tüdő szövetből izoláltuk.

A tüdőből származó fibroblasztok izolálásánál a teljes tüdő szövetet eltávolítottuk és 5 ml bazális médiumba (DMEM/F12 médium (Gibco), 1% glutamin (Merck), 1% 10 mM Hepes (Sigma), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco), 2% antibiotikum/antimikotikum mix hozzáadásával) helyeztük. A tüdőt 3-4 mm-es darabokra vágtuk steril olló és csipesz segítségével és 2x mostuk PBS-sel, majd DMEM/F12 médium alapú, 20% kollagenáz XI (C9407, Sigma), 20% kollagenáz II (Gibco) és 1,5% DNáz I (Sigma) tartalmú emésztő mixben 1 órán át 37 °C-os inkubátorban emésztettük a szövetet. Emésztést követően 2x mostuk a sejteket PBS-sel, majd 6 ml fibroblaszt médiumban 10-es petricsészében tenyésztettük. A fibroblaszt médium a következőket tartalmazta: DMEM High Glucose, GlutaMax (Gibco), 15% FBS (Gibco), 2% antibiotikum/antimikotikum, 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco). Az izolálást követő napon a médiumot teljesen lecseréltük friss médiumra.

Egyes kísérletekben az fibroblasztok médiumához Wnt útvonal gátló LGK974-et (250nM, Tocris) adtunk, amelyet DMSO-ban oldottunk fel. Kontrollként 1% DMSO-t adtunk a médiumhoz. Ezen kísérleteknél 3 napi kezelés után újabb kezelést kaptak FBS mentes médiumban a fibroblasztok és ezt követően 2 nap után izoláltuk az EV-ket. Az EV izolálás pontos menetéről a későbbiekben lesz szó.

4.6. Humán tüdő eredetű organoid kultúrák létrehozása és fenntartása

A humán szövetminták feldolgozását korábbi publikációkban alkalmazott módszer alapján végeztük [86]. A betegek adatai az 1. táblázatban láthatóak.

A normál és a tumoros eredetű szövetmintákat a feldolgozásig PBS-ben tároltuk jégen. Steril olló és csipesz segítségével 3-4 mm-es darabokra vágtuk őket. A feldarabolt szövetet 2x mostuk steril PBS-sel, majd DMEM/F12 médium alapú, 15% kollagenáz XI

(C9407, Sigma) tartalmú emésztő mixben 1 órán át 37 °C-on emésztettük a szöveteket. Emésztést követően 2x mostuk a sejteket PBS-sel, majd beágyasztuk őket 48 lyukú lemezen, 25 µl-es növekedési faktor csökkentett, fenolvörös-mentes Matrigel cseppekbe. Az így elindított kultúrákat tüdő bronchioláris organoid médiumban tarottuk, mely az alábbiakat tartalmazta: DMEM/F12 médiumban 2% antibiotikum/antimikotikum mix, B27 kiegészítő (Gibco), 1.25 mM N-acetil-cisztein (Sigma), HEPES puffer (10 mM, Gibco), humán R-Spondin1 (500 ng/mL, R&D Systems, BioTechne), humán noggin (100 ng/ml, Peperotech), humán FGF-10 (100 ng/mL, Peprotech), Rock inhibitor (Y-27632, 5 µM, MediChemExpress), ALK5 inhibitor (A8301, 500 nM, Sigma), p38 MAPK inhibitor (SB202190, 1 µM, Sigma), humán FGF7 (100 ng/ml, R&D Systems, BioTechne), humán heregulin β-1 (40 ng/ml, Peprotech) és nikotinamid (10 mM, Merck). Ezeknél az organoidoknál 6-8 naponta vált szükségessé a passzálás, ekkor erőteljes pipettázással választottuk szét őket, majd új Matrigel mátrix cseppekbe helyeztük.

A tumoros eredetű organoidokat 10 napig nutlin-3 (10 µM, Sigma) kezeléssel szelektáltuk, ugyanis ezek a minták nem csak tumoros eredetű organoidokat tartalmazhatnak, hanem egészséges normál szövetből kifejlődő organoidokat is [87]. A szelektációs lépés után biztosan csak *TP53* mutáns organoidokat tartalmazott az organoid kultúránk.

Egyes kísérletekben az organoidok médiumához Wnt útvonal gátló LGK974-et (250 nM, Tocris) adtunk, amelyet DMSO-ban oldottunk fel. Kontrollként 1% DMSO-t adtunk a médiumhoz. Ezen kísérleteknél 3 napi kezelés után újabb kezelést kaptak az organoidok és ezt követően 2 nap után izoláltuk az EV-eket. Az EV izolálás pontos menetéről a későbbiekben lesz szó.

1.táblázat: A nem kissejtes tüdő adenokarcinóma betegek klinikai adatai, akik mintáit felhasználtuk kísérleteink során.

Szám	Kor	Nem	Dohányzás	Hisztológia	Osztály	Stádium	pTNM	Előzetes kezelés
1	60	N	nem dohányzó	LUAD	III	IIIB	T3 N2 M0	nem volt
2	68	F	ex-dohányos	LUAD	III	IB	T2a N0 M0	nem volt
3	56	N	dohányzó	LUAD	III	IB	T2a N0 M0	nem volt
4	64	F	ex-dohányos	LUAD	II	IIB	T1b N1 M0	nem volt
5	83	N	nem dohányzó	LUAD	II	IIA	T2b N0 M0	nem volt
6	66	N	ex-dohányos	LUAD	III	IIB	T3 N0 M0	nem volt

4.7. Humán tüdő eredetű fibroblaszt kultúrák létrehozása és fenntartása

A normál és a tumoros eredetű szövetmintákat a feldolgozásig PBS-ben tároltuk jégen, majd steril olló és csipesz segítségével kettéválasztottuk és a feléből organoid kultúrát készítettünk, a másik feléből pedig fibroblaszt kultúrát indítottunk. Ez utóbbihoz 3-4 mm-es darabokra vágtuk a szövetrészt, amelyet 2x mostunk steril PBS-sel, majd DMEM/F12 médium alapú, 20% kollagenáz XI (C9407, Sigma), 20% kollagenáz II (Gibco) és 1,5% DNáze I (Sigma) tartalmú emésztő mixben 1 órán át, 37 °C-os inkubátorban emésztettük a szöveteket. Emésztést követően 2x mostuk a sejteket PBS-sel, majd 6 ml fibroblaszt médiumban 10 cm-es petricsészében tenyésztettük. A fibroblaszt médium a következőket tartalmazta: DMEM High Glucose, GlutaMax (Gibco), 15% FBS (Gibco), 2% antibiotikum/antimikotikum, 1% Penicillin/Strepromycin (Gibco). Az izolálást követő napon a médiumot teljesen lecseréltük friss médiumra.

Bizonyos kísérleteknél organoid felülúszóból izolált EV-vel kezeltünk, FBS mentes médiumban hozzáadva a fibroblasztokhoz. Ezután 4 napig növesztettük a sejteket és fixáltuk. Továbbá EV-eket is izoláltunk fibroblaszt felülúszóból, ehhez FBS mentes médiumban tartottuk a fibroblasztokat és 2 nap után izoláltuk az EV-eket. Az EV izolálás pontos menetéről a későbbiekben lesz szó.

4.8. Kollagén alapú organoid kultúrák

A hasnyálmirigy egér organoidokat erőteljes pipettázással és 300g-vel 5 percig tartó centrifugálással eltávolítottuk a Matrigel mátrixból, majd kétszer mostuk PBS-sel. Ezután I-es típusú kollagénbe (rat tail, Ibidi), vagy I-es típusú kollagén és Matrigel különböző arányú keverékébe (25%, 50% vagy 75% kollagén I tartalmú) ágyztuk be az organoidokat. 100 µl kollagén keverék előállításához 30 µl kollagén I-et, 10 µl MEM-et (Gibco), 60 µl steril desztillált vizet kevertünk össze, majd 1M-os NaOH –dal állítottuk be a pH-t 7,2-re. A tenyészeteket ugyanúgy hasnyálmirigy organoid médiumban tartottuk.

Egyes kísérletekben az egér hasnyálmirigy organoidok médiumához IL-1 β (25 ng/mL), IL-6 (25 ng/mL), és TNF- α (50 ng/mL) citokineket adtunk. Ezen kísérleteknél 3 napi kezelés után újabb kezelést kaptak az organoidok és ezt követően 2 nap után izoláltuk az EV-eket. Az EV izolálás pontos menetéről a következő alfejezetben lesz szó.

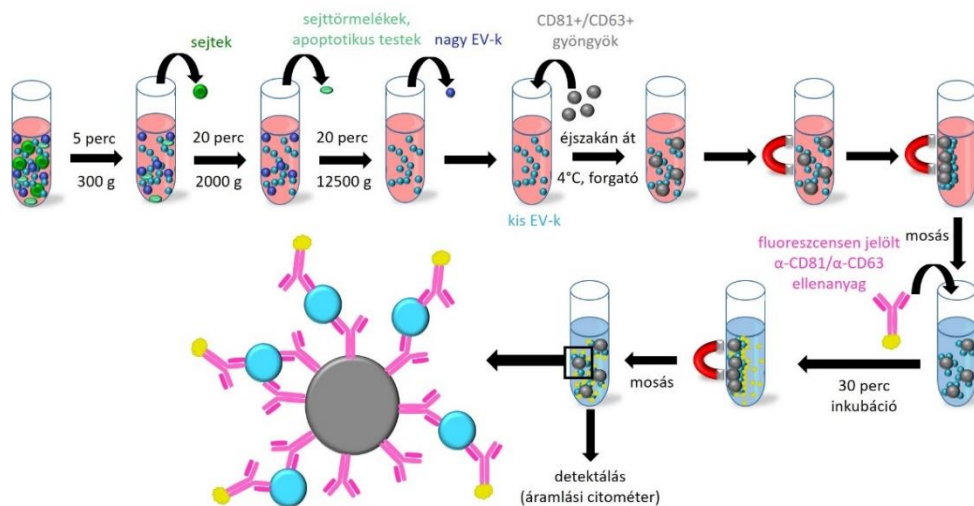
4.9. EV izolálás ellenanyaggal fedett gyöngyökkel és detektálás FACS Calibur áramlási citométerrel

A sejtek és az organoidok az izolálás előtt 2 nappal kaptak friss médiumot (sejtvonalak és fibroblasztok esetén FBS menteset), majd 48 óra elteltével a sejtekről a felülúszót Eppendorf csövekbe helyeztük. A felülúszóból differenciál centrifugálással eltávolítottuk először a sejtörmelékét (300 g, 5 perc), majd a nagyobb vezikulákat, illetve apoptotikus testeket (2000 g, 20 perc, majd 12500 g 20 perc). Kontrollként üres, EV-mentes médiumot használtunk, amelyen ugyanezeket a centrifugálási lépéseket végeztük el.

Ezt követően a médiumokból 250 µl-t helyeztünk gyöngyhöz kötésre alkalmas, kónusz nélküli csövekbe (0,5ml, Cryogenic vials, CryoKing). A mérésekhez használt mágneses gyöngyöket mielőtt a médiumhoz adtuk volna 30 percig blokkoltuk 400 µl 1%-os BSA oldatban (Sigma). A humán mintákhoz 20 µl anti-CD63, vagy 6 µl anti-CD81 ellenanyaggal fedett mágneses gyöngyöt adtunk (InvitrogenTM Exosome-Human CD63/CD81 Isolation/Detection Reagent). Egér minták esetében 1 µl anti-CD81 ellenanyaggal konjugált gyöngyöt (a gyöngy előállításához Dynabeads Antibody Coupling Kit-tel (Invitrogen) 2 mg mágneses gyöngyhöz kötöttünk 10 µl anti-CD81

ellenanyagot (MA180209, Thermo Scientific)) adtuk a felülúszóhoz. A gyöngyöket a blokkolást követően mintánként 10 µl PBS-ben feloldva adtuk a médiumokhoz. Ezután egy éjszakán át forgattuk a médiumokat 4°C-os hűtőben, hogy az EV-k minél hatékonyabban tudjanak hozzákötődni a gyöngyökhöz.

Másnap a gyöngyöket tartalmazó médiumokat áttettük 1,5 ml-s Eppendorf csövekbe, amelyeket mágneses állványra helyeztünk (DynaMag™-Spin, Invitrogen), így a felülúszóból el tudtuk különíteni a mágneses gyöngyöket. Ezután háromszor mostuk a gyöngyöket 500 µl PBS-sel, majd humán minták esetében 2 µl anti-humán CD81-FITC (A15753, Molecular Probes) vagy anti-humán CD63-PE (SAB47000218, Sigma), egér mintáknál 2 µl anti-egér CD81-PE (MA517941, Invitrogen) fluoreszcensen jelölt ellenanyagot adtuk a gyöngyökhöz 50 µl PBS-ben és 30 percig inkubáltuk szobahőn. Az inkubációs idő végén újra mágneses állvány segítségével eltávolítottuk a felesleges ellenanyagot tartalmazó PBS-t, majd egyszer mostuk 500 µl PBS-sel. A mintákat végül 400 µl PBS-ben FACS csövekbe helyeztük. A gyöngyök felületéhez kötött EV-eket FACS Calibur (Beckton Dickinson) áramlási citométerrel detektáltuk, megfelelő lézerbeállítások mellett. Az EV izolálás és detektálás lépései gyöngyök segítségével a 10. ábrán láthatóak. A sejttényészeteket minden esetben a felülúszó eltávolítása után tripánkék festést alkalmazva Bürker-kamrában megszámoltuk, így a mért eredményeket mindig sejtszámra normalizáltuk.



10. ábra: Az ellenanyaggal fedett mágneses gyöngy alapú EV izolálási módszer lépései. A felülúszóból az első centrifugálási lépéssel (500 g) a sejteket, a másodikkal (2000 g) a sejttörmelékét és az apoptotikus sejteket, a harmadikkal (12500g) a nagy EV-eket távolítjuk el. Ezt követően a kis EV-eket anti-CD81 vagy anti-CD63 ellenanyaggal fedett mágneses gyöngyökhöz kötjük és fluoreszcensen jelölt anti-CD81 vagy anti-CD63 ellenanyaggal detektáljuk áramlási citométerrel. A szerző saját ábrája.

4.10. NTA analízis (Nanoparticle Tracking Analysis)

A sejtek és organoidok előkészítése hasonló módon történt, mint a FACS mérések előtt: kezelés nélkül és kezeléssel is 2 nappal az izolálás előtt adtunk friss, savómentes médiumot, majd differenciál centrifugálással (300 g 5 perc, 2000 g 20 perc, 12500 g 20 perc) eltávolítottuk a sejtörmelékét és a nagyobb vezikulákat, illetve apoptotikus testeket. Kontrollként üres médiumot használtunk, amelyen szintén differenciál centrifugálást végeztünk el. Az így kapott mintákból 10x hígítást készítettünk: 100 µl felülúszót adtunk 900 µl 0,1 µm-es szűrőn (Minisart Syringe Filter, Sartorius) átszűrt PBS-hez. ZetaView Z-NTA (Particle Metrix) műszerrel mértük a méreteloszlást és a koncentrációt a mintáinkban. Minden méréshez 11 pozíciót vizsgáltunk 25°C-on, auto expose, gain: 28.8, offset:0, shutter:100, sensitivity:80 kamerabeállításokkal. ZetaView Analyze 8.05.10. szoftverrel elemeztük a videókat, minimum 5, maximum 1000 területen, minimum 20-as fényerőn. Amikor különböző kezelések EV kibocsátásra gyakorolt hatását vizsgáltuk, minden esetben ugyanazon körülmények között (idő, médium mennyisége, sejtszám, sejtenyészítő edény) tenyésztettük a mintákat a különböző vizsgált kezelések esetében. A sejtenyészeteket minden esetben a felülúszó eltávolítása után tripánkéék festést alkalmazva Bürker-kamrában megszámoltuk, így a mért eredményeket mindig sejtszámra normalizáltuk.

Amikor funkcionális vizsgálatokat végeztünk, akkor az ultracentrifugált pelletből 10 µl mintát hígítottunk 990 µl 0,1 µm-es szűrőn átszűrt PBS-sel, a mérési körülmények pedig az előzővel megegyezők voltak.

4.11. EV izolálás funkcionális vizsgálatokhoz

Szérumentes médiumban növesztettük a fibroblasztokat és az organoidokat is 2 napig, majd a felülúszón differenciál centrifugálást végeztünk (300 g 5 perc, 2000 g 20 perc, 12500 g 20 perc), utána pedig ultracentrifugával centrifugáltuk 70 percig, 4°C-on 100 000g-n. Az így kapott pelletet PBS-sel reszuszpendáltuk és újra ultracentrifugáltuk az előzőhöz hasonlóan. A pelletet végül 30 µl PBS-ben vettük fel, amelyből 10 µl mintát NTA méréshez félretettünk. Az NTA mérés alapján a humán tüdő fibroblasztokat 20×10^6

db EV-vel, a humán tüdő organoidokat 25×10^6 db EV-vel, az egér tüdő fibroblasztokat pedig 10×10^6 db EV-vel kezeltük.

4.12. Áramlási citométer és sejt szortolás

Az organoidokat és a sejtvonalak által képzett szferoidokat eltávolítottuk a Matrigelből, majd 650 g-vel 5 percig centrifugáltuk. Ezután kétszer mostuk PBS-sel és erőteljes pipettázással szétszedtük őket. Ahhoz, hogy egysejtes szuszpenziót kapjunk, TrypLE-lel (Gibco) 5-10 percig kezeltük a sejteket, majd 1 ml FACS pufferrel mostuk, amely a következőket tartalmazta: 1mM EDTA, 25mM HEPES és 1% BSA PBS-ben. Az elsődleges ellenanyagokból 1 μ l-t 50 μ l FACS pufferben feloldva adtuk a sejtekhez és 15 percig 4°C-on inkubáltuk. Ezt követően 650 g-vel 5 percig centrifugáltuk, hogy eltávolítsuk a felesleges ellenanyagot, majd 300 μ l FACS pufferrel mostuk. A másodlagos ellenanyagból szintén 1 μ l-t 50 μ l FACS pufferben feloldva adtuk a sejtekhez és 15 percig szobahőn inkubáltuk. Az inkubáció végén 300 μ l FACS puffert adtuk hozzá a sejtekhez és FACS Calibur (Beckton Dickinson) 10 000 eseményt analizáltunk.

Egyes kísérletekben az organoidokból származó sejtpopulációkat szortoltunk fluoreszcens sejt szorterrel (Sony SH800S) médiumot vagy Qiazol lízis puffert (Qiagen) tartalmazó csövekbe, hogy organoid kultúrákat indítsunk, vagy RNS-t izoláljunk. A médiumba szortolt sejteket szortolás után centrifugáltuk 650 g-n 10 percig, majd 10000 sejtet ágyasztunk be egy 25 μ l-es Matrigel cseppbe. A kiindulási sejtszám minden kísérletben azonos volt.

4.13. Immuncitokémia

A sejteket és az organoidokat 4 vagy 8 kamrás Falcon CulturSlide tárgylemezeken (BD Biosciences) tenyésztettük 20-25 μ l-es Matrigel, Matrigel-kollagén keverék, vagy kollagén cseppekben. A tenyészetekhez 250-300 μ l médiumot adtuk.

A médium eltávolítása után a tenyészeteket mostuk 500 μ l PBS-sel, majd 300 μ l 4%-os PFA-val fixáltuk a sejtenyészeteket 20 percig, az organoidokat 40 percig. A fixálószer háromszor 30 percen keresztül, 500 μ l PBS-sel mostuk ki. A fixált

tenyészeteket 300 µl blokkoló pufferrel (0,2% BSA, 5% FBS, 0,3% Triton X-100 PBS-ben) blokkoltuk és permeabilizáltuk 2 órán át szobahőn. Ezt követően 250-300 µl blokkoló pufferben beoldott elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk a mintákat éjszakán át 4°C-on. Az ellenanyagok listája és hígítása a 2. táblázatban található meg. Másnap a maradék ellenanyagokat háromszor, organoidoknál 30 percig, sejttenyészeteknél 15 percig tartó, 300 µl mosó pufferrel (0,3% Triton X-100, 4% NaCl PBS-ben) való mosással távolítottuk el. A másodlagos ellenanyagokkal szintén 250-300 µl blokkoló pufferben, 1:500 hígításban, 2 órán át szobahőn letakarva inkubáltunk. A maradék ellenanyagokat ismét háromszor, organoidok esetében 30 percig, sejttenyészetek esetében 15 percig tartó, 300 µl mosó pufferrel (0,3% Triton X-100, 4% NaCl PBS-ben) való mosással távolítottuk el. Azért, hogy ne maradjon sókristály a mintákon, ezt követően 300 µl desztillált vízzel leöblítettük a mintákat. Végül a mintákat DAPI DNS festéket tartalmazó médiummal (ProLong Diamond antifade mountant containing DAPI, Thermo Fisher) fedtük le és egy éjszakán át hagytuk száradni.

A mintákat konfokális mikroszkóppal (Zeiss LSM800 és Leica TCS SP8) fotóztuk le, és Zen 2.6 (blue edition) és ImageJ software-rel értékeltük ki.

2.táblázat: A kísérleteink során alkalmazott ellenanyagok listája.

Ellenanyag	Gyártó	Katalógus szám	Hígítás
FITC anti-humán CD81	Molecular Probes	A15753	1:25
PE anti-humán CD63	Sigma	SAB4700218	1:25
PE anti-egér CD81	Invitrogen	MA517941	1:25
anti-humán CD133/2	Miltenyi Biotec	130-090-851	1:50
anti-humán CD44	Abcam	ab157107	1:500
anti-aktív kaszpáz-3	R&D Systems	AF835	1:200
anti-egér/humán β-katenin	BD Transduction Lab.	610153	1:250
anti-egér/humán KI67	Abcam	ab16667	1:200
anti-egér/humán KI67	Invitrogen	14-5699-82	1:300
anti-egér/humán α-SMA	Merck	A5228	1:200
anti-AcTUB	Santa Cruz Biotech.	sc-23950	1:100
anti-humán SCGB1A1	Cloud-Clone Corp.	A20181130456	1:100
anti-egér Scgb1a1	Santa Cruz Biotech	sc-365992	1:100
anti-egér/humán MUC5AC	Santa Cruz Biotech.	sc-21701	1:100
anti-egér/humán KRT5	BioLegend	905501	1:200
anti-egér/humán KRT14	BioLegend	905304	1:250

anti-egér/humán PORCN	Abcam	ab105543	1:300
anti-nyúl IgG Alexa 568	Invitrogen	A11011	1:500
anti-nyúl IgG Alexa 488	Invitrogen	A21206	1:500
anti-egér IgG Alexa 488	Invitrogen	A21202	1:500
anti-egér IgG Alexa 568	Invitrogen	A10037	1:500

4.14. Transzmisszós elektronmikroszkópia (TEM)

Az organoid tenyészetek felülúszóját differenciál centrifugálás (300 g 5 perc, 2000 g 20 perc, 12500 g 20 perc) után ultracentrifugáltuk (100 000 g 70 perc), majd PBS-sel a pelletet szuszpendáltuk és újra ultracentrifugáltuk. Az így kapott pelletet 10 µl PBS-ben vettük fel. Az így készült mintából 2 µl-t hártýával bevont rácsos gridre (formvar-carbon coated 300 mesh grid, Electron Microscopy Sciences, USA) szárítottuk 10 percig. Ezt követően 4% glutáraldehiddel ráfixáltuk a mintát a gridre 10 percen keresztül. A felesleges fixálószeret lemostuk háromszor desztillált vízzel, majd 2%-os foszfovolfamsavval kontrasztosítottunk 10 percig. Végül transzmisszós elektronmikroszkóppal képeket készítettünk a gridekről (JEM-1011 transmission electron microscope (JEOL, Japan), Morada digital camera (Olympus, Japan), iTEM software (Olympus, Japan)). A képeket az ELTE, Anatómiai, Sejt-, és Fejlődésbiológiai Tanszékén, Dr. Lőrincz Péter készítette.

4.15. RNS izolálás és mRNS mérés

A sejtenyészetekből és az organoidokból Qiazol lízis pufferrel (Qiagen) készítettünk RNS izolálásra alkalmas mintát. Egyes kísérleteknél az organoidokból származó sejtpopulációkat közvetlenül Qiazol lízis pufferbe (Qiagen) szortoltuk. Ezt követően miRNEasy Micro Kit-tel (Qiagen) a használati útmutatónak megfelelően izoláltunk teljes RNS-t, így a végén 14 µl RNáz és DNáz mentes vízben eluáltuk az RNS-t az oszlopról. Az RNS koncentrációt NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) készülékkel határoztuk meg.

Az mRNS mérésekhez 0,5 µg teljes RNS-t írtunk át cDNS-sé SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline) segítségével, a használati útmutatónak megfelelően, így végül 20 µl cDNS-t kaptunk. A kvantitatív PCR reakcióhoz SensiFAST SYBR Hi-ROX Kit-et

(Bioline) használtunk, SyberGreen detektálási módszerrel. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 2 µl molekulárisan tiszta vízzel hígított cDNS és 3 µl a primerek és a puffer keverékéből, így 5 µl reakcióelegy volt minden lyukban egy 384 lyukú plate-en. A primerek listája a 3. táblázatban található. Az egér hasnyálmirigy organoid vizsgálatokhoz TaqMan próbákat használtunk (4. táblázat). A méréseket Applied Biosystems 7900HT Fast real-time PCR készülékkel végeztük és az eredményeket az alábbi formula segítségével értékeltük ki: relatív expressziós szint = $2^{-\Delta Ct}$, ahol $\Delta Ct = Ct(\text{vizsgált gén}) - Ct(\text{housekeeping gén})$. A Wnt expressziós profil vizsgálatoknál a $Ct > 36$ értékeket hiányzónak vettük. Heatmap képeken a ΔCt értékekből z-score normalizációval nyert adatokat ábrázoltuk a Heatmapper program segítségével (www.heatmapper.ca).

3. táblázat: Kísérleteink során alkalmazott primerek listája és szekvenciái.

Primer név	Forward primer	Reverse primer
hAXIN2	CTGGCTATGTCTTTGCACCA	CTTCACACTGCGATGCATTT
hLGR5	AGTGCTGTGCATTTGGAGTG	AGGGCTTTCAGGTCTTCCTC
hLGR6	TGACAGACAACCAGCTGACC	TGAAGAAGCTGGCACACATC
hTNFRSF19 (TROY)	GATGCACAGTGTGTGACGTG	CATGTCTTGAAAGCCGACAA
hWNT2b	TGGATGCCAAGGAGAAGAGG	CGGAAATCTGAGAGTGCACG
hWNT3	TGGAAGTGCACCACCATAGA	CCCCTTATGATGCGAGTCAC
hWNT4	ACAGTCGTTTGTGGATGTGC	CCAGCACGTCTTTACCTCAC
hWNT5a	TCTGTTTTTGGCAGGGTGAT	GCGGTAGCCATAGTCGATGT
hWNT5b	TTTGGGAGAGTCATGCAGAT	TAGCCGTA CTCCACGTTGTC
hWNT7a	CCGGACTCTCATGAACTTGC	ACGGCCTCGTTGTA CTGTC
hWNT7b	TCAACGAGTGCCAGTACCAG	CAGTTGCTCAGGTTCCCTTG
hWNT9a	AGACGGTCAAGCAAGGATCT	GTGCCGTCTCATACTTGTGC
hWNT10a	ACTCGCAACAAGATCCCCTA	TAAGCGGTGCAGCTTCTTAC
hWNT11	CAGGATCCCAAGCCAATAAA	TATCGGGTCTTGAGGTCAGC
hWNT16	GAAACACCACGGGCAAAGAA	TGTTTTTACAGCACAGGAGC
hHPRT	TGAGGATTTGGAAAGGGTGT	TCCCCTGTTGACTGGTCATT
mAxin2	CTCCCCACCTTGAATGAAGA	ACTGGGTCGCTTCTCTTGAA
mLgr5	CCTGTCCAGGCTTTCAGAAG	CTGTGGAGTCCATCAAAGCA

mLgr6	TGTCTCAGGCCTTCTCCAAG	GCCTCCTCTTCCTCTGGATG
mTnfrsf19 (Troy)	AGTTGCGAAACCGGAGATTG	ACCCAGTCTTCCTTGAACC
mWnt2b	GGATGGGGCCAATTTACAG	TCGGCCACAACACATGATTT
mWnt3	CATCTTTGGGCCTGTCTTGG	GGTGGCCCCTTATGATGTGA
mWnt4	CCGGGCACTCATGAATCTTC	GTGGCACCGTCAAACCTTCTC
mWnt5a	CAACAATGAAGCAGGCCGTA	GCCGCGCTATCATACTTCTC
mWnt5b	GCCGAGCTCTCATGAACCTA	TTCTCCTTCAAACGGTCCCC
mWnt7a	TACACAATAACGAGGCGGGT	CGGCCTCGTTGTATTTGTCC
mWnt7b	TTCTCGTCGCTTTGTGGATG	ACTTAGGTAGCGTGGTCCAG
mWnt9a	ACTTCCACAACAACCTCGTG	GTGTTTTAGGTGCTTGCCCA
mWnt10a	CATCCATGAGTGCCAGCATC	CTTCAGTTTACCCAGAGCGC
mWnt11	CAGGATCCCAAGCCAATAAA	GACAGGTAGCGGGTCTTGAG
mWnt16	CCACTACCACTTCCACCCAG	GGTGTCACAGGAACATTCGG
mHprt1	GCGATGATGAACCAGGTTATGA	GCCTCCCATCTCCTTCATGA

4. táblázat: Kísérleteink során alkalmazott TaqMan próbák listája.

Primer neve	Szekvencia
mKrt19	Mm00492980_m1
mPdx1	Mm00435565_m1
mSox9	Mm00448840_m1
mChga	Mm00514341_m1
mCpa1	Mm00465942_m1
mIns2	Mm00731595_g1
mPtf1	Mm00479622_m1
mHprt1	Mm03024075_m1
mGapdh	Mm99999915_g1

4.16. Szekvenálás

A cDNS mintákból Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher) kittel amplifikáltuk fel a *KRAS* gén egy szakaszát a következő primerekkel (anellációs hőmérséklet: 65 °C): CCCAGGTGCGGGAGAGA és AGGCATCATCAACACCCTGT. A PCR terméket megfuttattuk 2% agaróz gélben, majd Gel Purification Kit-tel (Macherey-Nagel) izoláltuk a gélből a megfelelő szakaszt. A szekvenálást forward and reverse primerekkel is elvégeztük Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer készülékkel (Life Technologies). Az adatokat Chromas 2.6 software (Technelysium Pty Ltd) segítségével elemeztük és az eredményeket a leggyakoribb *KRAS* mutációkra (12-es, 13-as és 61-es kodon) az 5. táblázatban tüntettük fel (ld. Eredmények fejezet). A szekvenálást a Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében dr. Bödör Csaba munkacsoportja végezte.

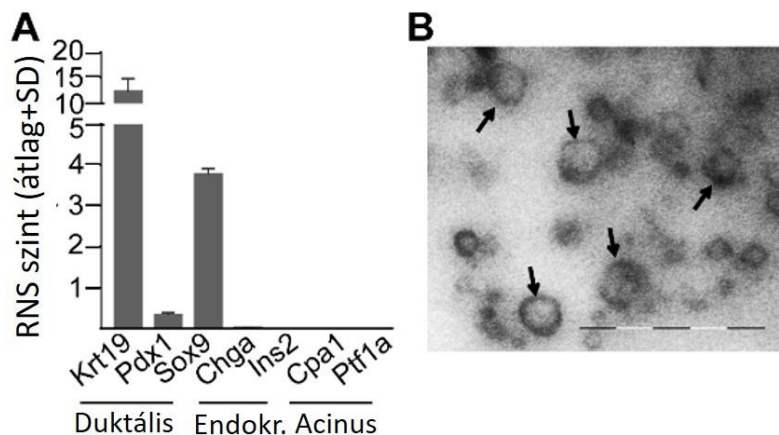
4.17. Statisztikai analízis

A statisztikai analízishez a Microsoft Excel, SPSS 25-ös verzió és GraphPad software-eket alkalmaztuk. Az adatok kiértékelésénél párosított és párosítatlan t-próbát, ANOVA tesztet és Tukey post hoc tesztet, Mann-Whitney U-tesztet, vagy Kruskal-Wallis tesztet Dunn post hoc tesztel használtunk, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ és *** $p < 0.005$ szignifikancia szintekkel. A „fold change” adatok elemzésekor az értékeken log₁₀ transzformációt hajtottunk végre és az így átalakított adatokra alkalmaztuk az egymintás t-tesztet. A boxplotok esetében a medián és a 25-ös, valamint 75-ös percentilisek lettek ábrázolva.

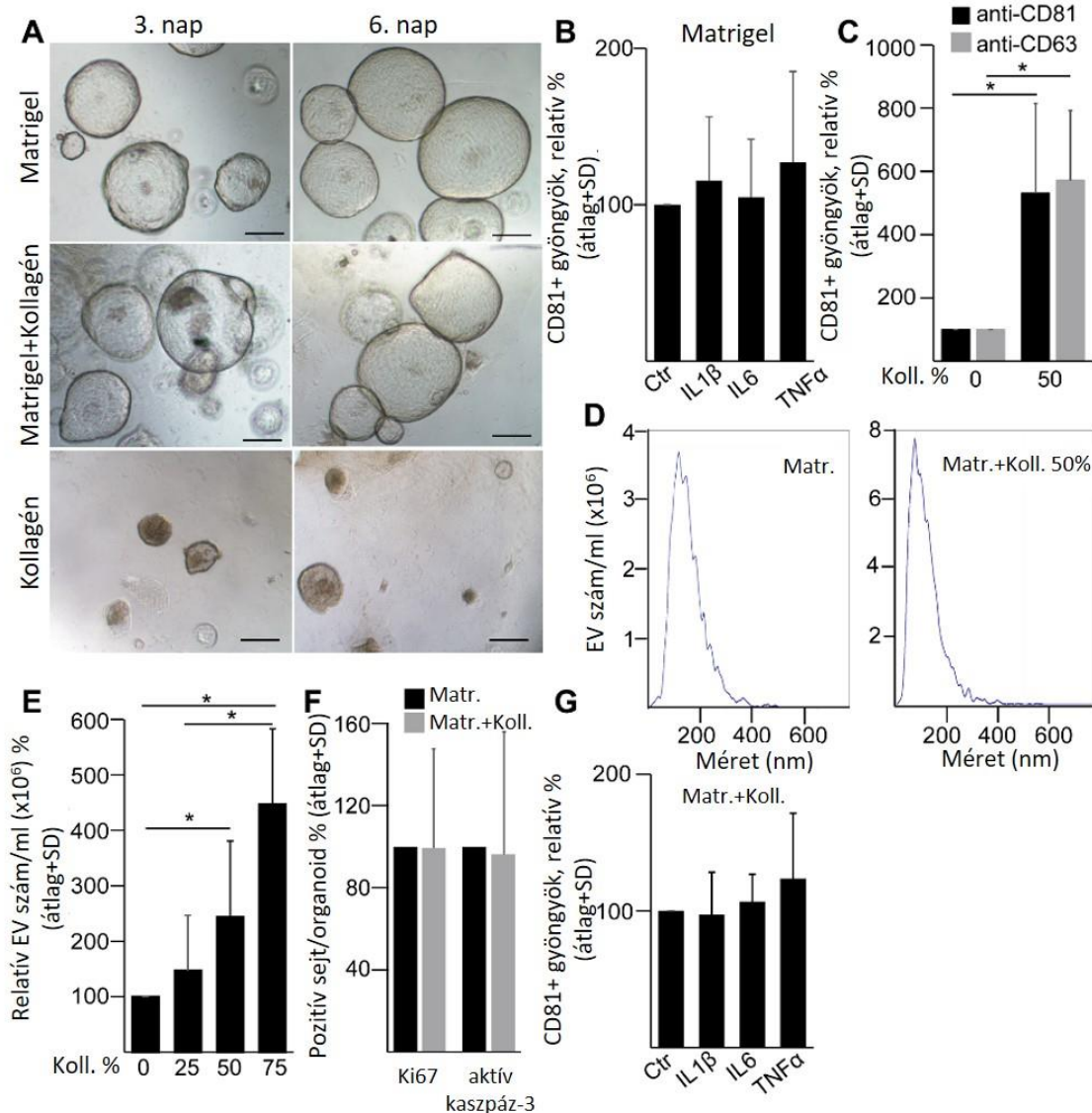
5. Eredmények

5.1. A kollagén felhalmozódása EV szint növekedést indukál az egér hasnyálmirigy duktális organoidok felülúszójában

A PDAC kialakulásában nem csak mutációk vehetnek részt, hanem mikrokörnyezeti faktorok is. Egy nemrégiben végzett átfogó tanulmány kimutatta, hogy a tumorok mikrokörnyezetének módosulása, mint például a PDAC során az ECM változásai, köztük a kollagén felhalmozódása, már jelen vannak a krónikus hasnyálmirigy gyulladásban (CP) is, ami a PDAC kialakulásának egyik legfontosabb rizikófaktora[88]. Korábbi eredményeink alapján továbbá nem csak a PDAC, hanem a CP betegekben is emelkedett EV szint mutatható ki [89]. A pre-tumor stádiumban a mikrokörnyezet változásának modellezésére egér hasnyálmirigy duktális organoidokat izoláltunk, ugyanis humán egészséges hasnyálmirigy szövetmintát nem állt módunkban használni. Annak igazolására, hogy csak duktális eredetű organoidokat tartalmaz a kultúránk, RT-qPCR segítségével megmértük a duktális, az acinus, és az endokrin markerek RNS szintjét. Mindegyik organoidban csak a duktális *Krt19*, *Pdx1*, *Sox9* markerek expresszióját tudtuk detektálni, míg az acinus és endokrin *Cpa1*, *Ptf1a*, *Ins2* és *Chga* markerek nem voltak detektálhatóak (11. ábra A). Ezután TEM-mel bizonyítottuk, hogy EV-k találhatóak az organoidok felülúszójában (11. ábra B). Így elmondhatjuk, hogy az egér hasnyálmirigy organoidjaink megfelelő modellnek bizonyulnak kísérleteinkhez.



11. ábra: Az egér hasnyálmirigy organoidok duktális markereket expresszálnak és EV-eket szekretálnak felülúszójukba. **A)** A duktális, acinus és endokrin markerek relatív RNS szintje (RT-qPCR). **B)** EV-k (nyilakkal jelölve) detektálása egér hasnyálmirigy organoid felülúszójából ultracentrifugálást követően TEM-mel. Mérték: 500 nm



12. ábra: A kollagén I EV felszabadulást indukál egér hasnyálmirigy duktális organoidokban. A) Az organoidok morfológiája Matrigelben, Matrigel és kollagén I 50-50%-os keverékében és tiszta kollagén I-ben 3 és 6 napot követően. Mérték: 100 μ m. **B)** A CD81+ gyöngyök relatív százaléka a jelzett kezelések után (n = 4-5). Az EV-k 2 napos gyűjtése előtt a tenyészetet 3 napig kezeltük a megadott molekulákkal. **C)** CD81+ gyöngyök relatív százaléka tiszta Matrigelben (kollagén 0%), illetve 50% Matrigel és 50% kollagén I keverékében tenyésztett organoidok felülészójában (n = 5). A pozitív gyöngyöket anti-CD81 vagy anti-CD63 ellenanyaggal detektáltuk. **D-E)** NTA reprezentatív képek (D) és relatív partikulum koncentrációk (E), különböző kollagén koncentrációjú organoid tenyészetek felülészóiból mérve (n = 7). Az adatokat sejtszámra normalizáltuk, majd a Matrigel kontrollt mindig 100% -nak tekintettük. **F)** A Ki67+ proliferáló és aktív kaszpáz-3+ apoptotikus organoid sejtek relatív százalékos aránya tiszta Matrigelben, illetve 50% Matrigelben és 50% kollagén I keverékében (n = 3). **G)** Matrigelben és 50% Matrigel és 50% kollagén I keverékében tenyésztett organoidok felülészójából származó CD81+ gyöngyök relatív százalékos aránya (anti-CD81 ellenanyaggal detektálva) (n = 5). Párosított t-tesztet (B, C, F és G), egyutas ANOVA-t és Tukey post hoc tesztet (E) alkalmaztunk, ahol * p < 0,05.

Ezt követően olyan mikrokörnyezeti faktorokra fókuszáltunk, amelyek a CP esetében meghatározóak. Ilyenek a kollagén I felhalmozódása, valamint az IL-1 β , az IL-6, és a TNF- α citokinek jelenléte [90, 91]. Amikor tiszta kollagén I-ben tenyésztettük az

organoidokat, az rövid időn belül a pusztulásukhoz vezetett (12. ábra A), a citokinek hozzáadása az organoidok médiumához azonban nem okozott változást az organoidok felülűszójának EV szintjében (12. ábra B). Viszont amikor a kollagén és Matrigel mátrix különböző arányú keverékében tenyésztettük őket, akkor megnőtt EV szintet detektáltunk. Ehhez CD81 ellenanyaggal fedett mágneses gyöngyöket és fluoreszcensen jelölt anti-CD81, illetve anti-CD63 ellenanyagokat alkalmaztunk és áramlási citométerrel detektáltuk az EV-eket, továbbá NTA mérésével is igazoltuk eredményeinket (12. ábra C-E). Megfigyeltük, hogy minél nagyobb százalékban tartalmaz a mátrix kollagén I-et, annál több EV-t tudunk detektálni (12. ábra E). Kollagén hatására azonban nem nőtt meg sem az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek, sem a Ki67+ proliferáló sejtek aránya (12. ábra F). Amikor kollagén és Matrigel mátrix keverékben növesztettük az organoidokat, az IL-1 β , az IL-6, és a TNF- α citokinek hozzáadása szintén nem volt hatással az EV szintre (12. ábra G).

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy nem csak genetikai mutációk, hanem a mikro környezet kritikus változásai, mint a kollagén I felhalmozódása, emelkedett EV szintet eredményez hasnyálmirigy duktális sejtek felülűszójában.

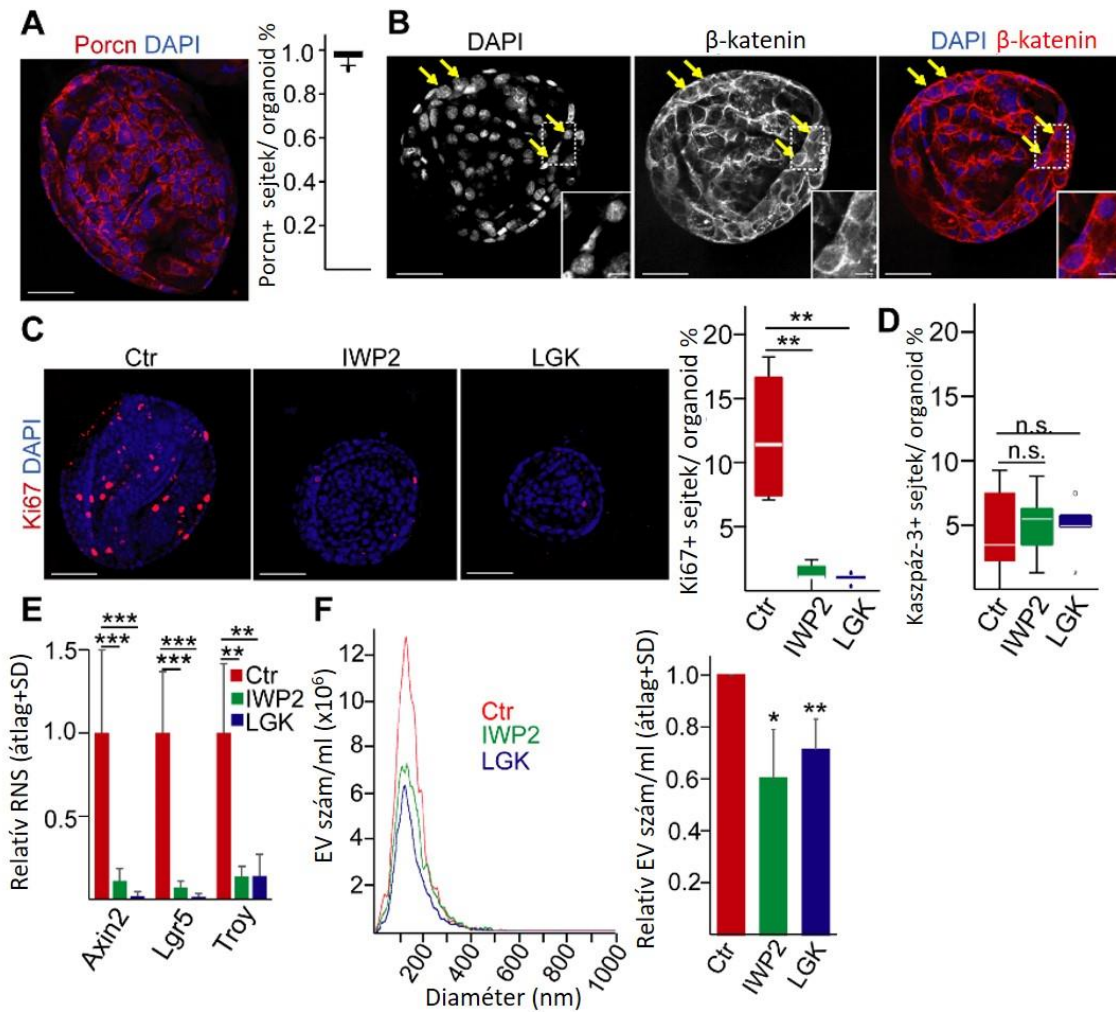
5.2. A Wnt szekréciót gátló inhibitorok csökkent sejtproliferációhoz és EV szekrécióhoz vezetnek hasnyálmirigy duktális sejtekben

Kutatócsoportunk korábban kapcsolatot talált a Wnt fehérjék szekréciója és az EV kibocsátás között bélhám sejtekben [92]. Ennek vizsgálatára, hogy ez egy általános jelenség és más szövetben is megfigyelhető-e, először egér hasnyálmirigy duktális organoidokon teszteltük hipotézisünket. Meglepő módon az organoidok sejtjeinek nagy része pozitív volt a Porcn jelenlétére (13. ábra A). Ezen kívül a β -katenint is detektáltuk egyes sejtek sejtmagjában (13. ábra B), ami a Wnt jelátviteli út vonal aktivitását mutatja.

A Porcn enzim gátlásával a Wnt fehérjék poszt-transzlációs módosítását gátolni tudjuk, ami így a Wnt fehérjék csökkent szekréciójához és aktivitásához vezet [93]. Kísérleteink során két általánosan használt PORCN inhibitor alkalmaztunk, az IWP2-t és LGK974-et [94, 95], melyek hatására lecsökkent a Ki67+ proliferáló sejtek száma egér hasnyálmirigy duktális organoidokban, azonban az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek száma nem változott (13. ábra C-D). Továbbá az *Lgr5*, *Axin2* és *Troy* Wnt út vonal

célgénjeiről átíródó RNS-ek szintjei is lecsökkentek (13. ábra E). Ezzel párhuzamosan csökkent EV kibocsátást detektáltunk a Wnt útvonal gátlásának hatására, amit NTA segítségével detektáltunk (13. ábra F).

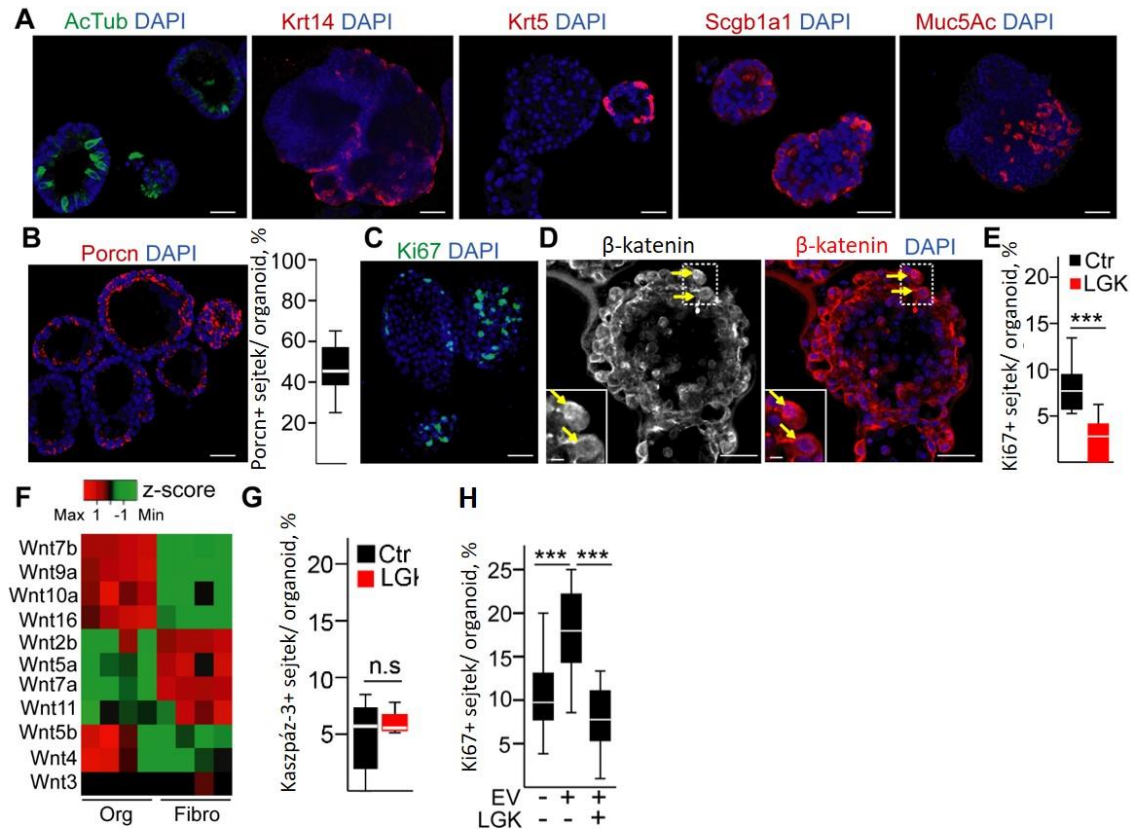
Tehát megállapíthatjuk, hogy a hasnyálmirigy duktális sejtjeiben a Wnt fehérjék szekréciójának gátlása nagy hatással van a proliferáló sejtek számára és az EV kibocsátásra is.



13. ábra: A Wnt szekréció hatással van az EV kibocsátásra egér hasnyálmirigy duktális organoidokban.

A) Immunfestés Porcn fehérjére és a konfokális mikroszkópos képek kvantifikációja. **B**) β -katenin detektálása immunfestéssel. Nyilakkal a β -katenin sejtmagi lokalizációját jelöltük. **C**) A proliferáló sejteket jelölő Ki67 fehérje detektálása immuncitokémiával PORCN gátlókkal való kezelést követően. Balra reprezentatív konfokális mikroszkópos képek, jobbra pedig a kvantifikáció található. **D**) Az apoptotikus aktív kaszpáz-3+ sejtek százalékos aránya PORCN gátlókkal való kezelést követően (konfokális mikroszkópos képek kvantifikációja). **E**) Az *Axin2*, *Lgr5* és *Troy* gének relatív RNS szintje IWP2 és LGK975 kezelést követően (RT-qPCR, n=6). Az adatok a *Hprt1* háztartási génre lettek normalizálva. **F**) Az EV-k detektálása NTA mérésel IWP2 és LGK974 kezelést követően. Balra egy reprezentatív kép, jobbra a kvantifikáció (n=5) található. Az adatok 10^6 sejtre lettek normalizálva. Az A, C, és D képek kvantifikációjához 15-20 képet számoltunk le 3 külön kísérletből. Kruskal-Wallis és Dunn post hoc tesztet (C, D), t-próbát (E) vagy egymintás t-próbát (F) alkalmaztunk, ahol * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$. Mérték: 50 μ m (A, B, C) és 10 μ m (B, nagyított képrész). Az IWP2 kezelés eredményei nem kerültek publikálásra.

5.3. A Wnt szekréció gátlása módosítja a proliferáló sejtek arányát és az EV-k kibocsátását egér bronchioláris organoidokban

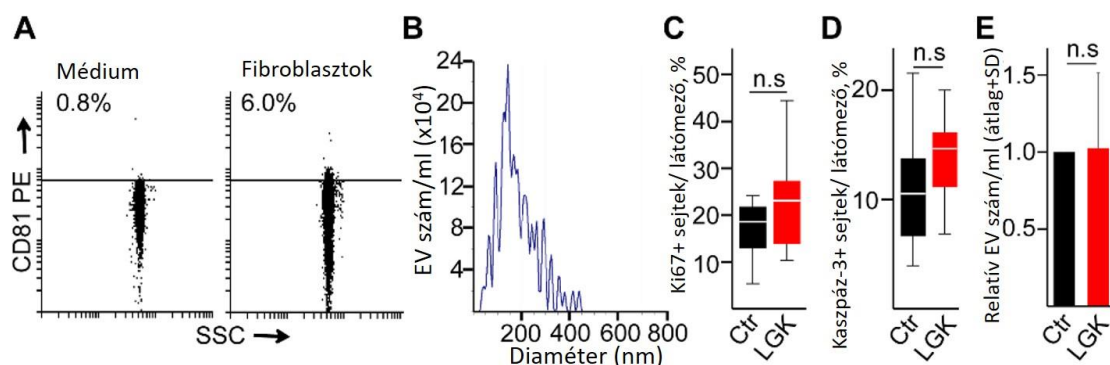


14. ábra: A Wnt szekréció gátlása csökkent proliferációt és EV szekréciót eredményez egér tüdő bronchioláris organoidokban. **A)** Organoidok konfokális mikroszkópos képei AcTub, Krt14, Krt5, Scgb1a1 és Muc5Ac sejtmarkerekre. **B)** Poren immunfestése és a Poren+ sejtek kvantifikációja az organoidokban. **C-D)** A proliferáló Ki67+ sejtek és a nukleáris β -katenin (nyilakkal jelölve) detektálása organoidokban immuncitokémiával. **E)** A Ki67+ sejtek százalékos aránya a kontroll organoidokban (Ctr) és a Poren inhibitor LGK974-gyel (LGK) történő kezelést követően. **F)** A feltüntetett Wnt gének expressziós szintje organoidokban és egér tüdő fibroblasztokban (RT-qPCR, n = 4). Az adatok *Hprt1* háztartási génre lettek normalizálva és a z-score értékeket ábrázoltuk a heatmap-en. A fekete szín az expresszió hiányát mutatja (Ct>36). **G)** Aktív kaszpáz-3 + sejtek százalékos aránya a kontroll organoidokban (Ctr) és az LGK974-gyel (LGK) történő kezelést követően. **H)** A proliferáló sejtek százalékos aránya, miután az organoidokat tüdő fibrolasztból származó EV-vel kezeltük 4 napig. Néhány kísérletben a fibroblasztokat 3 nappal az EV-gyűjtés megkezdése előtt LGK974-gyel (LGK) kezeltük. Az B, E, G, H képek kvantifikációjához 13-15 kép lett leszámolva 3 külön kísérletből. Mann-Whitney U-tesztet (E, G), Kruskal-Wallis és Dunn tesztet (H), alkalmaztunk, ahol *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005. Mérték: 50 μ m (A, B, C, D) and 10 μ m (D, nagyított képrész).

Az Wnt jelátviteli útvonal és az EV kibocsátás kapcsolatának vizsgálatára következő modellnek az egér bronchioláris organoidokat választottuk. Ezek az organoidok az összes bronchioláris sejtípust tartalmazzák. Ilyenek a csillós hámsejtek (acetilált-tubulin (AcTub) pozitívak), a kehelysejtek (mucin5AC (Muc5AC) pozitívak),

bazális sejtek (citokeratin-5 (KRT5) vagy citokeratin-14 (KRT14) pozitívak), és a bronchioláris exokrin sejtek (uteroglobulin (Scgb1a1) pozitívak) (14. ábra A) [96]. Így ez a modellrendszer jól reprezentálja az *in vivo* körülményeket.

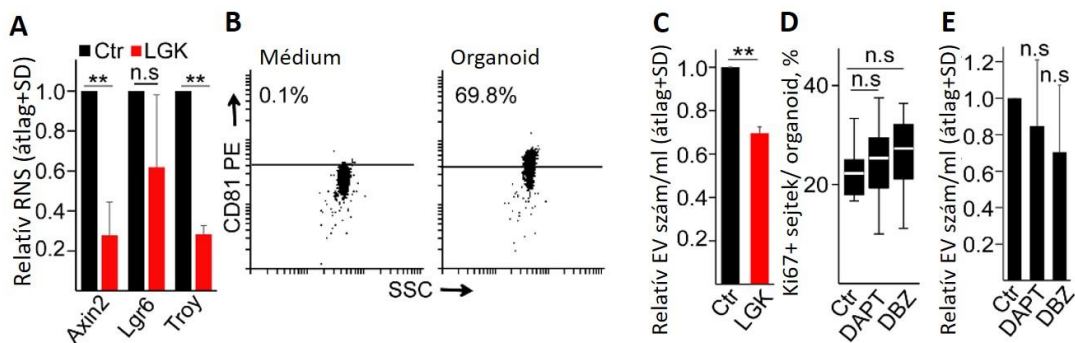
Legelőször ezeknél az organoidoknál is a Wnt fehérjék szekréciójára képes, Porcn⁺ sejteket detektáltuk, amelyek heterogenitást mutattak és jóval kisebb mennyiségben voltak megtalálhatók, mint az egér hasnyálmirigy duktális organoidok esetében (14. ábra B). Továbbá csak a sejtek egy kis részében tudtuk detektálni a Ki67 sejtproliferációs markert (14. ábra C) és sejtmagi lokalizációjú β -katenint (14. ábra D), ami a Wnt jelátviteli útvonal aktivitását jelzi. Az organoidok több Wnt gént is magas szinten expresszáltak, és a Wnt szekréció LGK974-gyel való gátlását követően csökkent Ki67⁺ sejtszámot tapasztaltunk, de az aktív kaszpáz-3⁺ apoptotikus sejtek száma ez esetben sem növekedett meg (14. ábra E-G). Eredményeink arra utalnak, hogy az organoid sejtek szubpopulációi hozzájárulnak a proliferáló sejtek számára a megfelelő mikroniche kialakításához.



15. ábra: A Porcn gátlása nem befolyásolja az egér tüdő eredetű fibroblasztok osztódását, apoptózisát és EV felszabadulását. **A)** Anti-CD81 ellenanyaggal konjugált gyöngyök áramlási citométerrel detektált képe, sejtmentes közegben (Médium) és fibroblasztokról (Fibroblasztok) származó felülúszóban inkubálva. Az EV-eket a gyöngyökön anti-CD81 ellenanyaggal detektáltuk. A számok a pozitív gyöngyök százalékos arányát mutatják. **B)** NTA hisztogram a fibroblasztokról származó felülúszóból, miután a mintát 12500 g-vel centrifugáltuk a nagy EV-k eltávolítására. **C-D)** A Ki67⁺ proliferáló (C) és az aktív kaszpáz-3⁺ apoptotikus (D) kontroll (Ctr) vagy az LGK974-gyel kezelt (5 nap) (LGK) fibroblaszt sejtek százalékos aránya. Az adatokat három kísérlet 15-20 képéből gyűjtöttük össze. **E)** Relatív EV számok kontroll (Ctr) és LGK974-gyel kezelt (LGK) fibroblasztokban (n = 3). Az adatokat 10^6 sejtre normalizáltuk, mielőtt összehasonlítottuk volna a kezeletlen kontrollal. Mann-Whitney U-tesztet (C, D) és egymintás t-tesztet (E) alkalmaztunk. n.s: $p > 0,05$

A fibroblasztok fontos részei a tüdő szövetének, hiszen a tüdő fejlődésében és a sérülések gyógyulásában, így a homeosztázis fenntartásában is részt vesznek [97]. Az egér tüdő eredetű fibroblasztok Wnt expressziós profilja azonban jelentősen eltért az organoidoktól, és csak néhány Wnt fehérje expressziójában egyeztek meg (14. ábra F). Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a fibroblasztok is részt vesznek az organoid sejtek

Wnt-függő heterogenitásának a kialakításában. Már bizonyított, hogy az EV-k képesek aktív Wnt fehérjék közvetítésére [98, 99]. Ezt támasztja alá az az eredményünk, hogy a fibroblasztokból származó EV-k megnövelték az organoidokban az osztódó sejtek számát (14. ábra H). Mivel sok Wnt ligand létezik, amelyek funkciója részben átfed, ezért kísérleteink során a Wnt fehérjék szekrécióját általánosan gátoltuk a fibroblasztokban is LGK974 kezeléssel. A Wnt szekréció gátlást követően izolált fibroblaszt EV-kkel való kezeléssel az EV-k organoidokra való hatását is megakadályoztuk, vagyis nem tapasztaltunk sejtproliferáció növekedést (14. ábra H). Az EV-k jelenlétét a fibroblasztok felülűszójában anti-CD81 ellenanyaggal konjugált mágneses gyöngyökkel és áramlási citométerrel (15. ábra A), illetve NTA mérésrel is igazoltuk (15. ábra B). Az LGK974 kezelés a fibroblasztokban nem volt hatással sem az osztódó Ki67+ (15. ábra C), sem az apoptotikus aktív kaszpáz-3+ sejtek arányára (15. ábra D). Továbbá az EV kibocsátást sem befolyásolta ezekben a sejtekben (15. ábra E). Tehát mind a Porcn+ organoid sejtek, mind a fibroblasztokból származó EV-k fontos szerepet játszanak az organoidok proliferáló mikro környezetének kialakításában.

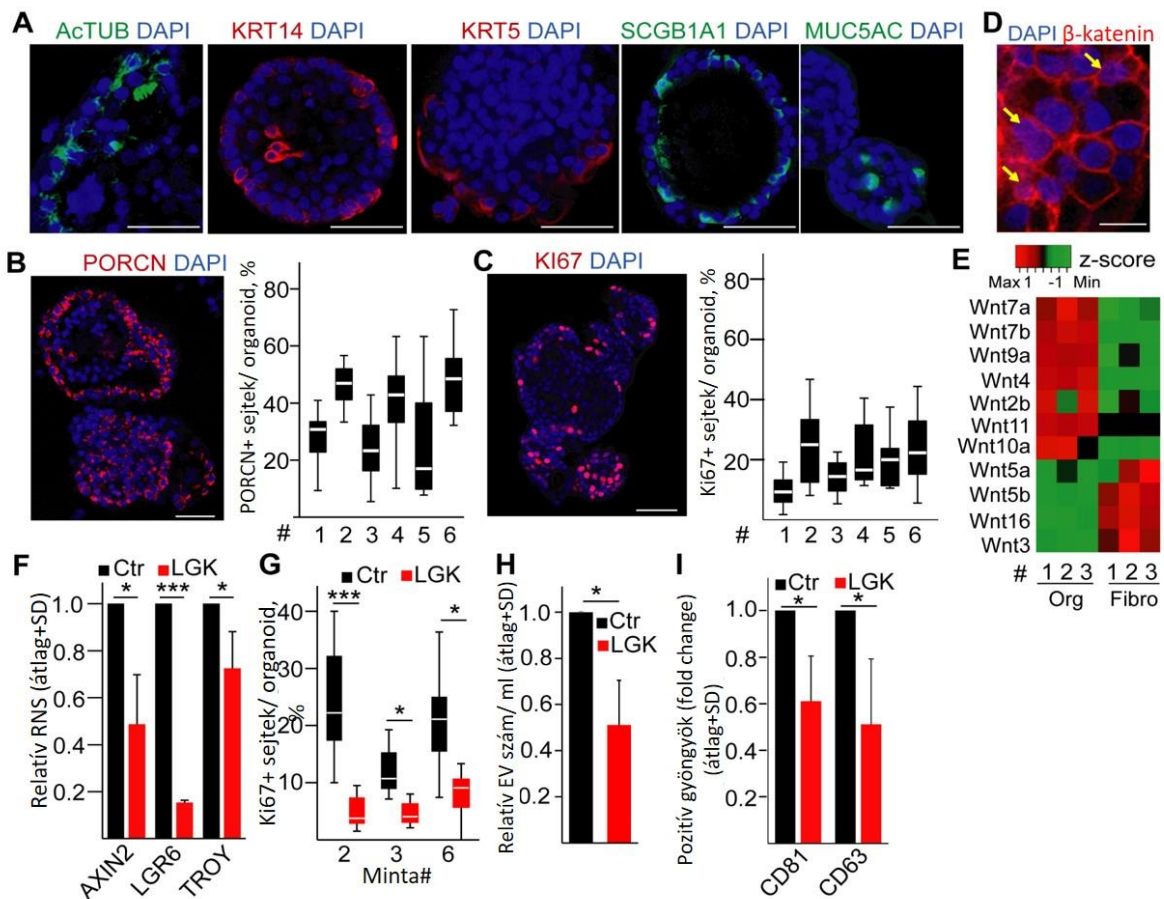


16. ábra: A Wnt szekréció gátlása csökkenti a Wnt célgének RNS szintjét és az EV szekréciót. **A)** Az organoidok RNS expressziójának változása (a kezeletlen kontrollokhoz képest) az *Axin2*, *Lgr6* és *Troy* Wnt célgének esetében kontroll (Ctr) és LGK974-gyel (LGK) történő kezelés után (RT-qPCR, n = 4). **B)** Az anti-CD81 ellenanyaggal konjugált pozitív gyöngyök százaléka szérumentes médiumban (Médium) és organoidok felülűszójában (Organoid) történő inkubálást követően. A pozitív gyöngyöket anti-CD81 ellenanyaggal detektáltuk (reprezentatív áramlási citometriás képek). **C)** Relatív EV szám az organoidok LGK974-gyel való kezelése után (NTA, n = 4). Az adatokat 10^6 sejtre normalizáltuk az összehasonlítás előtt. **D-E)** Az osztódó sejtek százalékos aránya (D, konfokális képek elemzése) és a relatív EV szám változása (E, NTA mérések, n = 3) az organoidoknak a Notch gátló DAPT-vel vagy DBZ-vel való kezelése után. A D) esetében három kísérletből gyűjtöttünk adatokat, és 13-15 képet elemeztünk. Kruskal-Wallis és Dunn tesztet (D) és egymintás t-tesztet (A, C, E) alkalmaztunk a változások log10-es transzformációja után, ahol * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,005. A DAPT és DBZ kezelések eredményei nem kerültek publikálásra.

Az organoidokban az LGK974 kezelés hatására nemcsak a sejtproliferációt, hanem a tudőre jellemző Wnt célgének: az *Axin2*, és a *Troy* RNS-ének az expresszióját is csökkentette (16. ábra A). Az organoidok felülűszójából ez esetben is anti-CD81

ellenanyaggal konjugált mágneses gyöngyökkel és áramlási citométerrel detektáltuk az EV-ket (16. ábra B). LGK974 kezelést követően azonban nem csak a sejtproliferáció csökkenését figyeltük meg, hanem az EV kibocsátás csökkenését is, amit NTA mérésel detektáltunk (16. ábra C). Ezzel ellentétben amikor a Notch aktivitását gátoltuk, ami szintén egy fontos fejlődési és a szöveti homeosztázist fenntartó jelátviteli útvonal [100], nem tapasztaltunk különbséget sem a Ki67+ sejtek arányában, sem az organoidok EV kibocsátásában (16. ábra D-E). Így ezek az eredmények azt mutatják, hogy a Wnt szekréció specifikus gátlása kritikusán módosítja a proliferáló sejtek számát, valamint az EV kibocsátás intenzitását a bronchioláris organoidokban is.

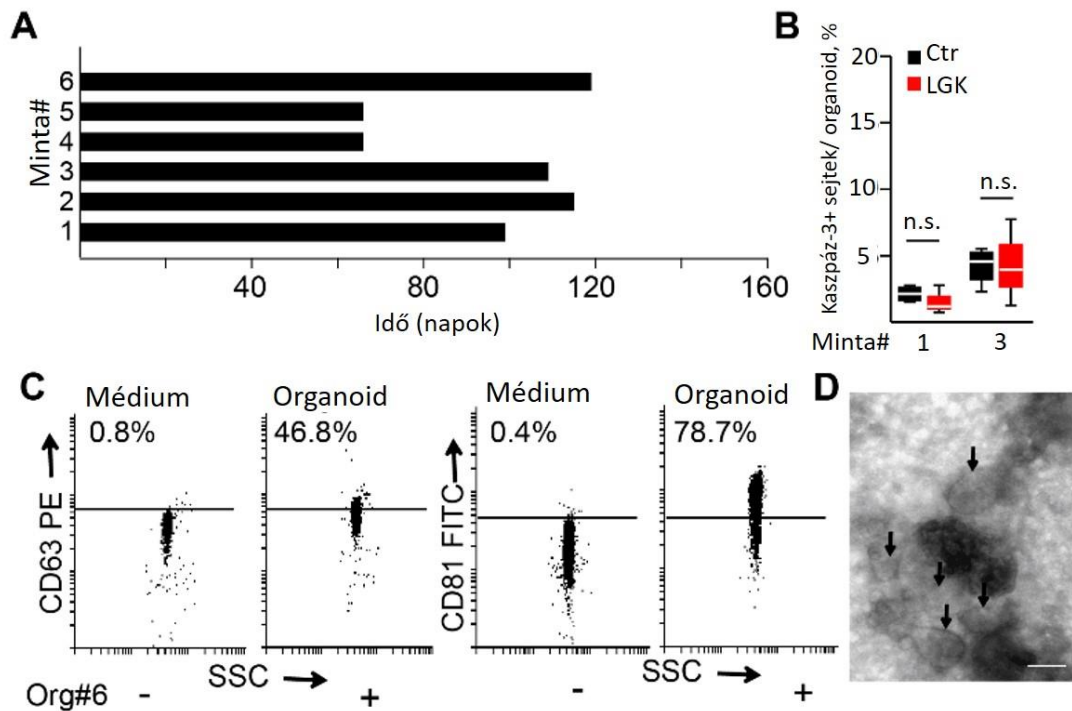
5.4. Az EV szekréció mértéke korrelál a proliferáló sejtek arányával humán bronchioláris organoidokban is



17. ábra: A PORCN gátlása csökkent EV kibocsátást eredményez humán bronchioláris organoidokban. A-D) Humán bronchioláris organoidok immunfestése a jelzett molekulákra (konfokális képek). A B) és C) esetében a képek kvantifikációja látható, több különböző beteg eredetű organoidból. A D) esetében a nyilak a β -katenin sejtmagi lokalizációját jelölik. **E)** A feltüntetett Wnt gének expressziós szintje organoidokban és humán tüdő fibroblasztokban (RT-qPCR, n = 4). Az adatokat a *HPRT1* háztartási génre normalizáltuk és a z-score értékeket ábrázoltuk. **F)** Az *AXIN2*, *LGR5* és *TROY* relatív RNS-szintje az organoidok LGK974-gyel (LGK) történő kezelése után (RT-qPCR, n = 3). Az adatokat a *HPRT1* háztartási génre normalizáltuk, majd összehasonlítottuk a kezeletlen mintákkal (Ctr). **G)** A KI67+ proliferáló sejtek százalékos aránya kontroll (Ctr) és LGK974-gyel (LGK) kezelt organoidokban. **H)** Az EV-szám változása LGK974 kezelés (LGK) hatására (NTA, n = 4). A 10^6 sejtre normalizált adatokat hasonlítottuk össze a kezeletlen kontrollal (Ctr). **I)** A kezeletlen (Ctr) és a kezelt (LGK) organoidok felülúszóiban lévő EV-k anti-CD63 vagy anti-CD81 konjugált gyöngyökkel való detektálása és százalékos arányának változása. Az összes adatot 10^6 sejtre normalizáltuk összehasonlítás előtt (áramlási citometria, n = 5). Egymintás t-tesztet alkalmaztunk a log transzformált fold change értékeken (F, H, I), valamint Mann-Whitney tesztet használtunk (G), ahol * p < 0,05 és *** p < 0,005. Mérték: 50 μ m (A, B, C), 20 μ m (D).

Annak tesztelésére, hogy a proliferáló sejtek százaléka korrelációban áll-e a humán szövetekben is az EV kibocsátás mennyiségével, humán tüdőszövet mintákból bronchioláris organoidokat izoláltunk. Ezeket az organoidokat több mint 2 hónapig sikerült fenntartani tenyészetben (18. ábra A) és KRT5+, KRT14+, MUC5A+, SCGB1A1+ és AcTUB+ sejteket is tartalmaztak (17. ábra A), igazolva a fő bronchioláris sejtípusok jelenlétét [86, 101]. Az egér bronchioláris organoidokhoz hasonlóan heterogenitást találtunk a PORCN-t expresszáló sejtek tekintetében (17. ábra B), továbbá itt is az organoid sejtek egy alpopulációjában volt megtalálható a Ki67 sejtosztódási marker (17. ábra C). Bizonyos sejtekben pedig sejtmagi lokalizációjú β -katenint is detektáltunk (17. ábra D), ami a Wnt jelátviteli útvonal aktivitását jelzi. Az organoid sejtek és a normál tüdőszövetből izolált fibroblasztok WNT expressziós profiljának összehasonlításakor azt találtuk, hogy bizonyos WNT gének működése jellemző a hámsejtekre (17. ábra E), ezzel megmutatva, hogy a bronchioláris organoidok képesek WNT ligandumokat előállítani önmaguk számára. A WNT fehérjék szekréciójának gátlása csökkentette a WNT célgénnek, az *AXIN2*, az *LGR6* és a *TROY* RNS szintjét (17. ábra F), valamint a KI67+ osztódó sejtek számát az organoidokban (17. ábra G), de az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek aránya ez esetben sem nőtt (18. ábra B). Az egér organoidokhoz hasonlóan az aktív WNT termelő sejtpopuláció méretének módosítása az EV szekréció változását eredményezte (17. ábra G). A humán bronchioláris organoidok felülúszójában az EV-k jelenlétét anti-CD81 és anti-CD63 ellenanyaggal konjugált mágneses gyöngyökkel és áramlási citométerrel (18. ábra C), illetve TEM-mel is igazoltuk (18. ábra D). Így elmondhatjuk, hogy a WNT termelő sejtek

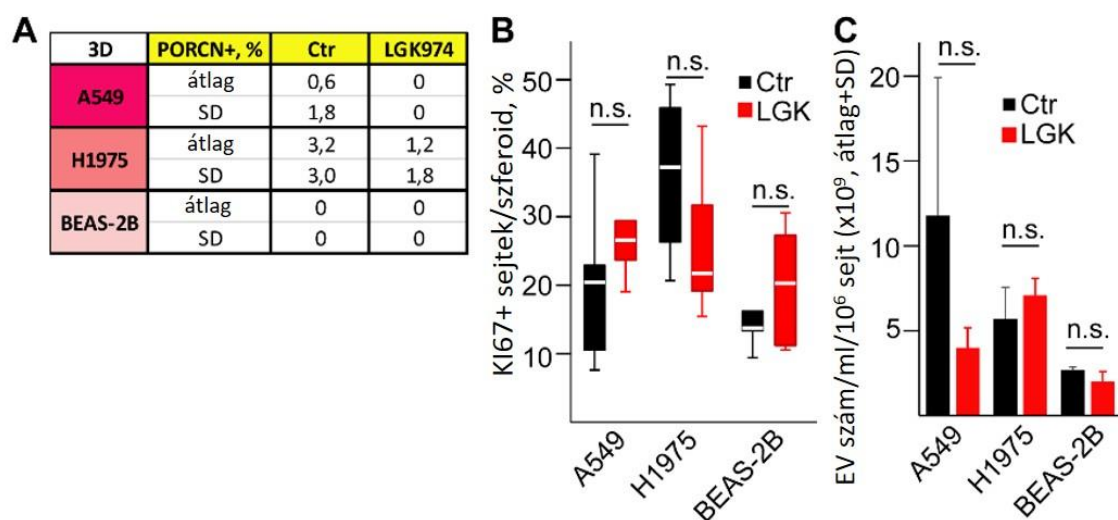
szubpopulációjának nagysága a normál humán bronchioláris organoidokban a proliferáló sejtek számával, valamint megnövekedett EV felszabadulással függ össze.



18. ábra: A humán bronchioláris organoidok EV-eket szekretálnak. **A)** A különböző személyekből izolált normál organoid vonalak tenyésztési ideje. **B)** Az aktív kaspáz-3 pozitív apoptotikus sejtek százalékos aránya kontroll (Ctr) és LGK974-gyel (LGK) kezelt organoidokban (konfokális mikroszkópos képek kvantifikációja, 13-15 képet használtunk 3 külön kísérletből). **C)** Az anti-CD81 és anti-CD63 ellenanyaggal konjugált pozitív gyöngyök százaléka szérumentes médiumban (Médium) és organoidok felülszójában (Organoid) történő inkubálást követően. A pozitív gyöngyöket anti-CD81 és anti-CD63 ellenanyaggal detektáltuk (reprezentatív áramlási citometriás képek). **D)** TEM kép organoid kultúra felülszójáról ultracentrifugálást követően. A nyilak az EV-eket jelölik. Mann-Whitney U-tesztet használtunk a B ábránál, ahol $p > 0,05$ nem vettük szignifikánsnak (n.s.). Mérték: 100 nm (D).

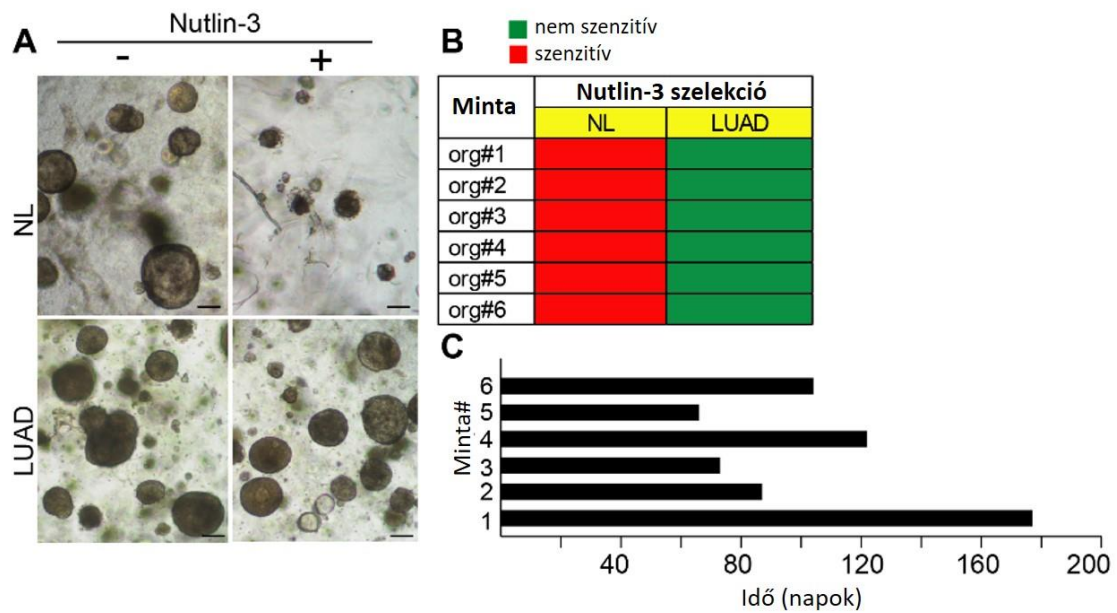
5.5. A LUAD organoidok olyan Wnt termelő mikrokörnyezettel rendelkeznek, amely befolyásolja a sejtproliferáció és az EV kibocsátás mértékét

Habár egér modellen már bizonyították, hogy a LUAD progressziójához nélkülözhetetlen, hogy kialakuljon a Wnt jelátvitel szempontjából az intratumorális heterogenitás, azaz Wnt-et termelő és a Wnt-re reagáló sejtek létrejöjjenek [102], az ilyen mikrokörnyezet jelenlétét humán rendszerben még nem igazolták.



19. ábra: A humán NSCLC és kontroll tüdő sejtvonalakból származó szferoidok nem mutatnak heterogenitást a PORCN expresszió szempontjából. A) A kontroll és az LGK974-gyel kezelt (5 napig) NSCLC sejtvonalakból (A549, H1975) és kontroll immortalizált bronchioláris sejtvonalból (BEAS-2B) képződött szferoidok PORCN immunfestésének kvantifikációja. **B)** A kontroll és az LGK974-gyel (LGK) kezelt NSCLC és bronchioláris sejtvonalakban a KI67+ proliferáló sejtek százalékos aránya. **C)** NTA mérések a kontroll (Ctr) és az LGK974-gyel (LGK) kezelt NSCLC és bronchioláris sejtvonalakról származó felülúszókból 12500 g centrifugálást követően. Három kísérletből húsz képet értékeltünk az A és B esetében. Mann-Whitney U-tesztet (B) és t-tesztet (C) alkalmaztunk, ahol $p > 0,05$ nem szignifikánsnak vettünk (n.s.).

Ahhoz, hogy LUAD-ban tanulmányozzuk a WNT termelő mikrokörnyezet szerepét az EV szekrécióban, először kereskedelemben kapható sejtvonalakat használtunk, melyeket gyakran használnak a daganatok sejtbiológiai folyamatainak modellezésére. Annak tesztelésére, hogy mutatnak-e heterogenitást a WNT termelés szempontjából, primer, nem kissejtes tüdő adenokarcinóma eredetű sejtvonalakat (A549 és H1975) és immortalis kontroll tüdő hámsejteket (BEAS-2B) tenyésztettünk 3D körülmények között. Érdekes módon egyik esetben sem volt jelen nagy mennyiségű PORCN+ sejt a szferoidokban (19. ábra A), és az LGK974 kezelés nem változtatta meg a KI67+ sejtek és az EV szekréció százalékos arányát egyik 3D-s tenyészetben sem (19. ábra B-C).



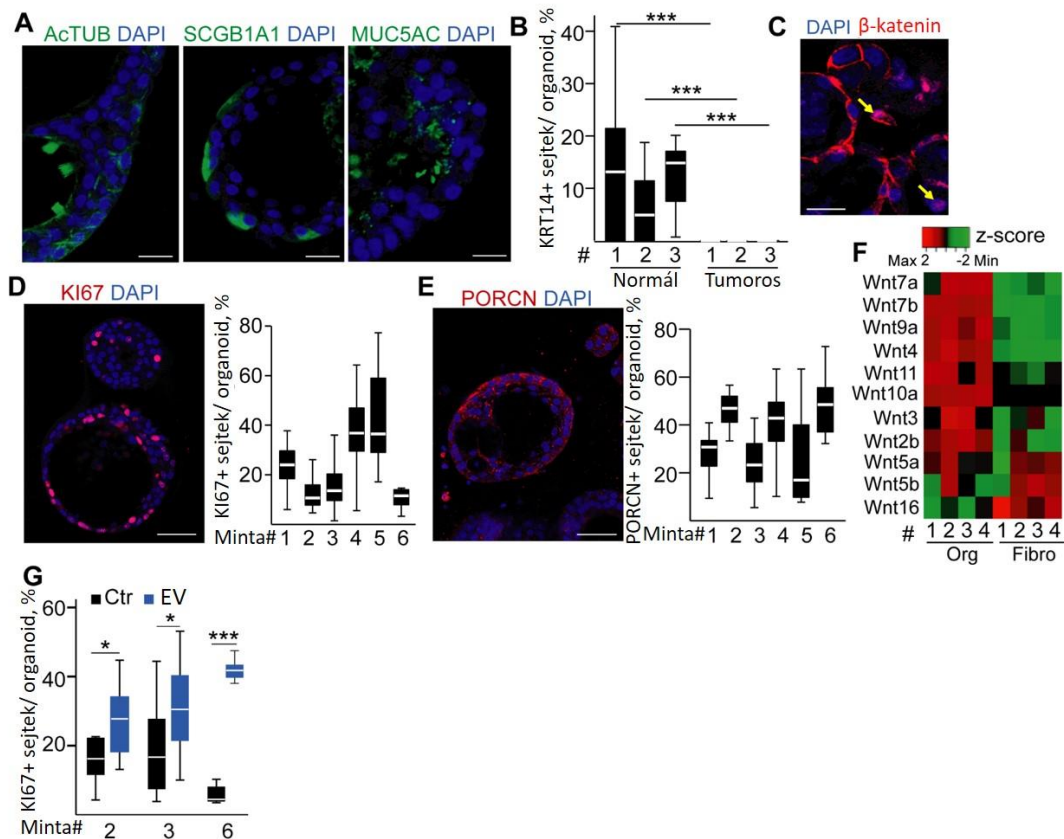
20. ábra: A normál tüdő bronchioláris (NL) organoidokkal szemben a LUAD organoidok rezisztensek a nutlin-3 kezelésre. A) Az NL és LUAD organoidok kezeletlen és nutlin-3 kezelt (10 μ M, 10 nap) fénymikroszkópos képei. Mérték: 50 μ m. B) A jelzett betegekből izolált NL és LUAD organoidok túlélési mintázata nutlin-3 kezelést és fénymikroszkópos értékelést követően. C) A betegekből származó LUAD organoidok tenyésztési ideje nutlin-3-mal történő szelekció után (10 μ M 10 napig).

Mivel a sejtvonalakból származó sferoidokból hiányzott a PORCN expresszió, ezután a már korábban publikált módszer szerint izoláltuk a LUAD beteg eredetű tumoros organoidokat [86]. A tumorból származó mintákból azonban nemcsak tumor eredetű organoidok képződnek, hanem normál organoidok is, amelyek gyakran túlnövik a tumoros organoidokat [87]. A *TP53* a leggyakrabban mutált gén a LUAD-ban [25], így nutlin-3 kezelést alkalmaztunk az organoidok szelektálására. A nutlin-3 gátolja az MDM2 fehérjét, így a P53 stabilizálódik és aktív lesz [103]. Ennek következtében a vad típusú P53-mal rendelkező sejtekben a sejtciklus megáll, majd a sejtek apoptózissal elpusztulnak [86, 87]. Míg a normál tüdő organoid tenyészetek egyike sem élte túl a nutlin-3 kezelést, a LUAD minták jelentős része tartalmazott túlélő organoidokat ezen szelekciós lépést követően, melyek >2 hónapig tenyészthetőek voltak (20. ábra A-C). Bár néhány LUAD mintát elvesztettünk ezzel a szelekcióval, azonban így biztosítani tudtuk, hogy a túlélő organoidok mind tumor eredetűek legyenek (20. ábra B csak azon mintákat mutatja, melyek esetében a tumoros részből az organoidok egy része túlélte a nutlin-3 szelekciót, így ezeket használtuk fel a kísérleteinkben) [87]. A szelekciót túlélő organoid vonalak további jellemzése érdekében a *KRAS* gént a mutációs forrópontokra nézve (12, 13, 61-es kodon) megszekvenáltuk (5. táblázat).

5.táblázat: A kísérleteink során használt LUAD organoidok *KRAS* gén mutációs forrópontokra nézve (12, 13, 61-es kodon) megszekvenált adatai.

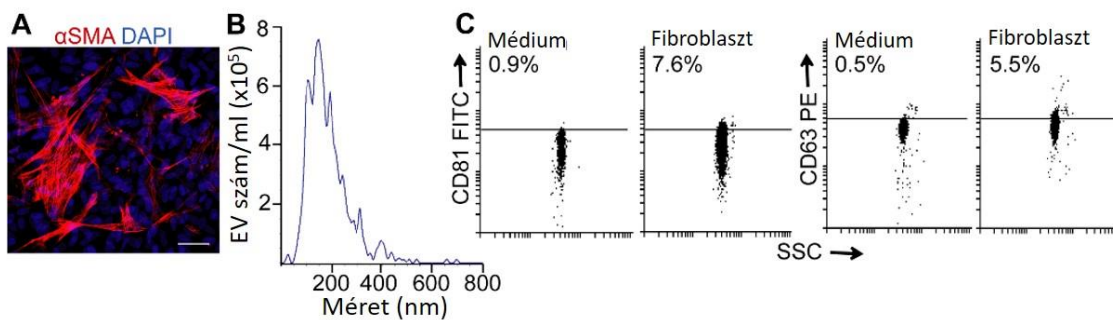
Organoid szám	<i>KRAS</i> mutáció (12,13,61 kodon)
1	nincs
2	nincs
3	het c.183 A>T, Q61H
4	nincs
5	nincs
6	nincs

Ezekben az organoidokban detektálni tudtunk különböző differenciálódási markerekkel rendelkező sejteket, mint például AcTUB+, MUC5A+ vagy SCGB1A1+ sejtek (21. ábra A). Azonban a LUAD organoidok csak elhanyagolható számú KRT14+ sejtet tartalmaztak a normál tüdő organoidokhoz képest (21. ábra B), ami irodalmi adatok alapján szintén a tumoros eredetüket bizonyítja [87]. Továbbá a LUAD organoidok egyes sejtjeiben nukleáris lokalizációjú β -katenint detektáltunk (21. ábra C), illetve sejtjes heterogenitást mutattak a PORCN és a KI67 esetében (21. ábra D-E), tehát a WNT termelő mikrokörnyezet megtalálható nem csak egér, hanem humán LUAD-ban is.



21. ábra: Humán LUAD organoidokban is megtalálható a Wnt termelő mikroniche. **A)** SCGB1A1, MUC5AC és AcTUB sejtmarkerek kimutatása LUAD organoidokban (immuncitokémia és konfokális mikroszkóp) **B)** A KRT14+ sejtek százalékos aránya három humán bronchioláris (Normál) és LUAD (Tumoros) mintapárban (immuncitokémia és konfokális mikroszkóp, 10 kép/minta). **C)** Konfokális mikroszkópos kép β -katenin immunfestéssel. A nyílak a sejtmagi lokalizációt jelölik. **D-E)** Reprezentatív képek és a KI67 (D) és PORCN (E) immunfestések kvantifikációja különböző beteg eredetű LUAD organoidokból. **F)** Kiválasztott Wnt-gének expressziós profilja LUAD-organoidokban és fibroblasztokban (RT-qPCR, illesztett mintákat használtunk, 1., 2., 3., 4. mintákból). A *HPRT1* háztartási génre normalizáltuk az eredményeket, utána a z-score értékeket ábrázoltuk. **G)** A KI67+ proliferáló LUAD organoid sejtek aránya LUAD fibroblaszt eredetű EV-k nélkül (Ctr) és jelenlétében (EV) konfokális mikroszkópos képek alapján. Az organoidokat 4 napig kezeltük az EV-kkel. A D) és E) esetében két kísérletből 14-16 képet gyűjtöttünk minden egyes organoid vonalra. Mann-Whitney U-tesztet (B, G) alkalmaztunk, ahol * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$. Mérték: 20 μm (A, C), 50 μm (D, E).

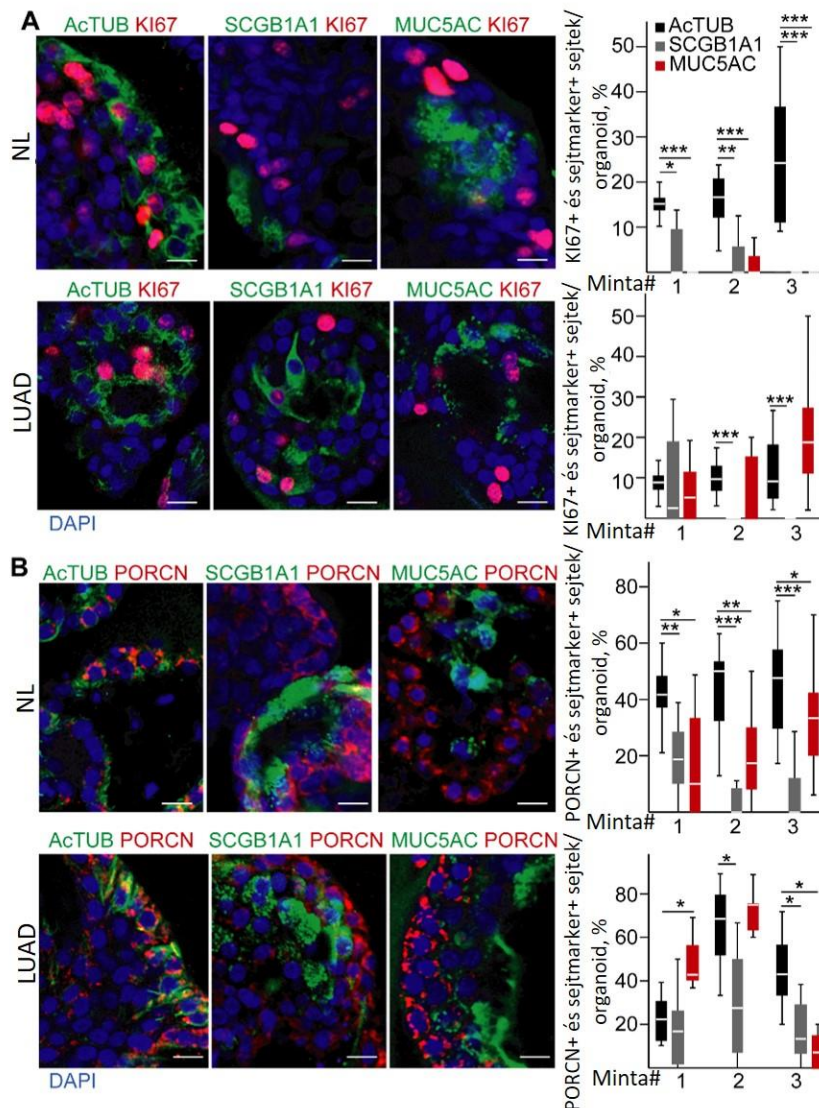
Annak vizsgálatára, hogy a proliferáló LUAD sejtek mennyiségét milyen hatások befolyásolják, LUAD betegek mintáiból fibroblaszt tenyészeteket (LUAD-F) is létrehoztunk, amelyekben a sejtek jelentős része pozitív volt a széles körben elfogadott α -SMA fibroblaszt markerre (22. ábra A) [104]. Megjegyzendő, hogy az LUAD sejteknek és a fibroblasztoknak ez esetben is jellegzetes és csak részben átfedő WNT expressziós mintázata volt (21. ábra F). A LUAD-F-ok felülúszójából a szekretált EV-eket anti-CD81 és anti-CD63 antitestekkel konjugált gyöngyökkel és áramlási citometriával, valamint NTA-val is tudtuk detektálni (22. ábra B-C), és hasonlóan az egér bronchioláris organoidokhoz, ezek az EV-k is növelték a proliferáló sejtek számát a LUAD organoidokban (21. ábra G).



22. ábra: A LUAD fibroblasztok EV-eket szekretálnak. **A)** LUAD fibroblasztok α -SMA immunfestése. **B)** A LUAD fibroblaszt tenyészet felülúszójából származó EV-k detektálása NTA-val. A felülúszót 12500 g centrifugálást követően mértük. **C)** Az anti-CD81 és anti-CD63 ellenanyaggal konjugált gyöngyök százalékos aránya médiumban (Médiium) vagy LUAD fibroblaszt tenyészetek felülúszójában (Fibroblaszt) történő inkubálás után, áramlási citométerrel detektálva. A számok a pozitív gyöngyök százalékos arányát mutatják. Mérték: 50 μm (A).

A WNT termelő sejtpopuláció további jellemzésére megvizsgáltuk, hogy a proliferáló és PORCN+ sejtek mely sejtpopulációkra jellemzőek. Míg a humán normál bronchioláris organoidokban magasabb százalékban találtunk KI67+ és PORCN+ sejteket az AcTUB+ sejtpopulációban, addig a LUAD organoidokban nem csak az

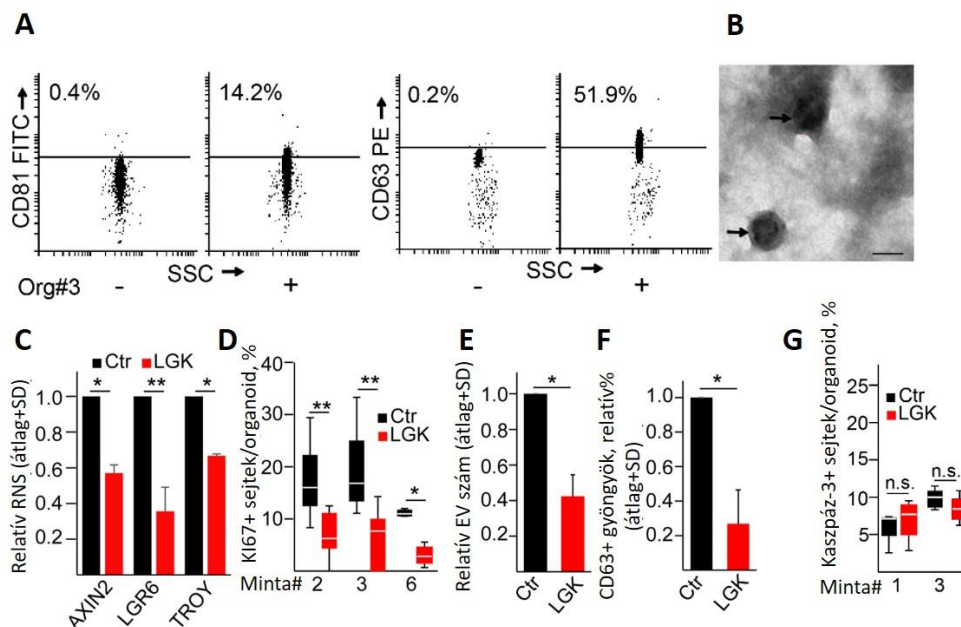
AcTUB+, hanem a MUC5AC+ sejtpopulációban is nagyobb arányban detektáltunk mind osztódó, mind pedig PORCN+ sejteket (23. ábra A-B). Érdekes módon a LUAD organoidok esetében az SGCB1A1+ sejtpopulációban is nagy arányban található PORCN+ sejt (23. ábra B). Így ezek az adatok azt mutatják, hogy a PORCN+ és az osztódó sejtek nem kapcsolhatók egy-egy sejtmarkerhez LUAD organoidokban, és eloszlásuk eltér a normál organoidokhoz képest, ami a tumorsejtek esetében a terminális differenciálódás hiányával magyarázható.



23. ábra: Az osztódó KI67+ és a WNT termelő PORCN+ sejtek eloszlása a különböző markereket expresszáló sejtpopulációkban normál humán bronchioláris (NL) és LUAD organoidokban (n=10-12 kép 2 külön kísérletből). A sejt-specifikus markerekkel együtt immunjelöltünk KI67 (A) és PORCN (B) fehérjékre. Három külön beteg mintából származó organoid vonal párosított NL és LUAD organoidjait használtuk fel a festésekhez. Kruskal-Wallis és Dunn tesztekkel használtunk, ahol * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,005$. Mérték: 50 μ m.

Ezután a LUAD organoidokban kialakuló mikrokozonyetnek az EV szekréción intenzitására gyakorolt hatását vizsgáltuk. Antitesttel konjugált gyöngyökkel és TEM-mel igazoltuk az EV-k jelenlétét az organoidok felülúszójában (24. ábra A-B). Hasonlóan a normál humán bronchioláris organoidokhoz, az aktív WNT fehérjék szekréciónak gátlásakor az *AXIN2*, *LGR6* és *TROY* gének RNS szintjének csökkenését (24. ábra C), illetve a proliferáló sejtek arányának (24. ábra D) és EV termelésének (24. ábra E-F) a csökkenését figyeltük meg, míg az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek aránya ez esetben sem emelkedett (24. ábra G)

Eredményeink alapján tehát elmondhatjuk, hogy az intratumorális WNT termelő sejtek és a fibroblasztokból származó EV-k által létrehozott sejtes heterogenitás kritikusan meghatározza az EV-szekréción intenzitását LUAD-organoidokban.



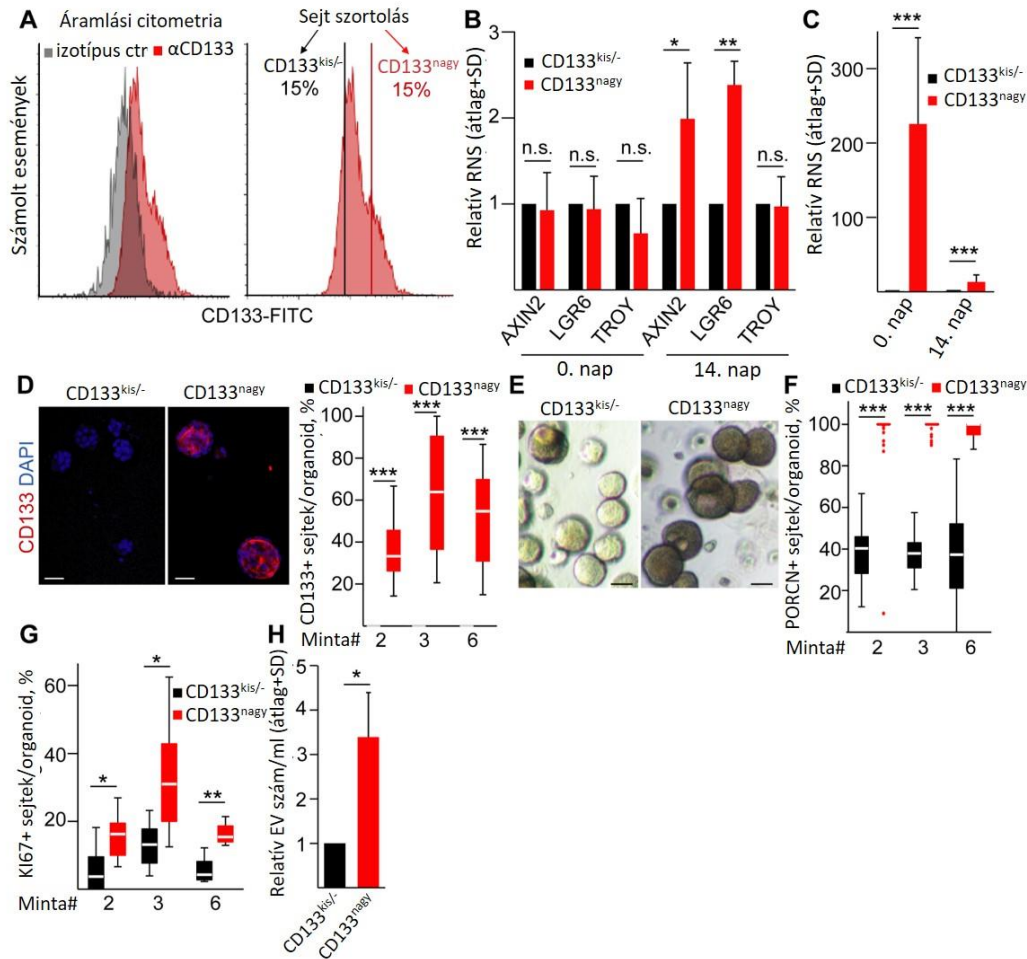
24. ábra: A proliferatív mikrokozonyet modosítása a LUAD organoidokban csökkent EV felszabaduláshoz vezet. **A)** Az anti-CD81 vagy anti-CD63 ellenanyaggal konjugált gyöngyöket médiumban (-) vagy organoid felülúszóban (+) (3. minta) inkubálás után áramlási citométerrel detektáltuk. A számok a pozitív gyöngyök százalékos arányát mutatják. **B)** A LUAD organoid felülúszóból ultracentrifugált pellet transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) képe. Az EV-eket nyilakkal jelöltük. **C)** A jelzett gének relatív RNS szintje LGK974 (LGK) kezelés után, a kezeletlen kontrollokhoz (Ctr) hasonlítva (RT-qPCR, n = 3). **D)** A KI67+ sejtek százalékos aránya kontroll (Ctr) és LGK974-gyel kezelt (LGK) három külön LUAD organoid vonalban (konfokális mikroszkópos képek kvantifikációja, 14-16 képet gyűjtöttünk 2 külön kísérletről). **E)** Relatív EV-szám LGK974 (LGK) kezelés után, NTA-val mérve (n = 4). **F)** Az anti-CD63 ellenanyaggal konjugált gyöngyök százalékos változásai, kontroll (Ctr) vagy LGK974-gyel (LGK) kezelt LUAD organoidok felülúszójában. Az adatokat 10^6 sejtre normalizáltuk (áramlási citometria, n = 4). **G)** Az aktív kaszpáz-3+ sejtek százalékos aránya kontroll (Ctr) és LGK974-gyel kezelt (LGK) két külön LUAD organoid vonalban (konfokális mikroszkópos képek kvantifikációja, 8-10 képet gyűjtöttünk 2 külön kísérletről). Egymintás t-tesztet (C, E, F) és Mann-Whitney U-tesztet (D, G) alkalmaztunk, ahol * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$ szignifikánsnak és $p > 0,05$ nem szignifikánsnak vettünk. Mérték: 100 nm.

5.6. A CD133-at expresszáló LUAD sejtpopuláció PORCN+ sejtekben gazdag organoidokat hozott létre, amelyek EV kibocsátása magasabb, mint a CD133-at nem expresszáló sejtekből kialakuló organoidok esetében

Korábbi tanulmányok szerint a CD133 fehérje egy agresszív sejtpopulációt jelöl a tüdő tumorokban [105]. Annak vizsgálatára, hogy ez a sejtpopuláció más tulajdonságokkal rendelkezik-e a WNT termelő mikroniche létrehozására, mint más LUAD sejtek, mely magyarázat lehet az agresszív viselkedésükre, LUAD organoid sejteket fluoreszcensen szortoltunk a CD133-mat nagy mennyiségben (CD133^{nagy}) és CD133-at kis mennyiségben, vagy egyáltalán nem (CD133^{kis/-}) expresszáló csoportokra (25. ábra A). Nem találtunk különbséget az *AXIN2*, *LGR6* és *TROY* WNT célgének expressziójában a frissen szortolt sejtek között (25. ábra B). Azonban a CD133^{nagy} sejtek nagyobb organoidokat képeztek (25. ábra E), és ezeknek az organoidoknak magasabb volt a CD133 RNS szintje (25. ábra C), illetve több CD133+ sejtet tartalmaztak 2 héttel a szortolást követően is, összehasonlítva a CD133^{kis/-} sejtekből származó organoidokkal (25. ábra D). Így az organoidok megtartják a különbséget a CD133 expressziós mintázatban. A CD133^{nagy} sejtekből képződött organoidokban a WNT aktivitás megemelkedett, amit az *AXIN2* és az *LGR6* magasabb RNS szintje jelzett (25. ábra B). Meglepő módon, ellentétben a CD133^{nagy} organoidokkal, ahol az összes sejt pozitív volt a PORCN fehérjére, a CD133^{kis/-} organoidok esetében a sejteknek csak egy al csoportja expresszálta ezt az enzimet (25. ábra F), ami arra utal, hogy nem minden sejt képes aktív WNT ligandok termelésére. A WNT termelő sejtpopuláció méretében lévő különbséggel párhuzamosan a KI67+ proliferáló sejtek alacsonyabb számát detektáltuk a CD133^{kis/-} sejtekből származó organoidokban (25. ábra G). Érdekes módon az NTA-mérések magasabb EV koncentrációt mutattak a CD133^{nagy} sejtekből származó LUAD organoidok felülúszóiban (25. ábra H), amely organoidok több osztódó sejtet tartalmaztak (25. ábra G).

Összességében elmondható, hogy ellentétben a CD133^{nagy} sejtekből származó organoidokkal, ahol a sejtek többsége WNT termelő és fogadó is egyben, ennek köszönhetően pedig nagymértékű sejtproliferáció figyelhető meg bennük, a CD133^{kis/-}

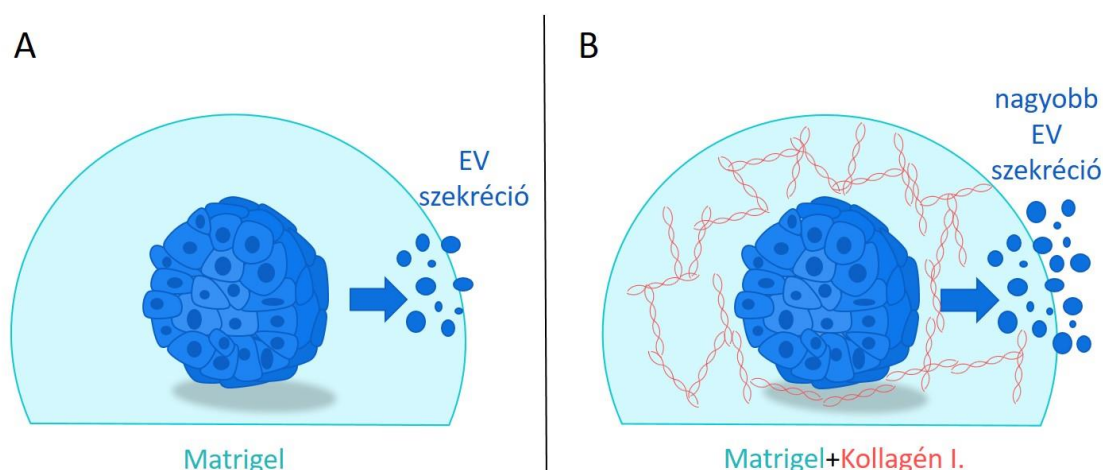
sejtekből származó organoidok heterogenitást mutattak a WNT szekréciójára nézve. Ez alacsonyabb proliferációs rátát és EV szekréciót eredményezett a $CD133^{nagy}$ sejtekből származó organoidokhoz képest.



25. ábra: A $CD133^{nagy}$ LUAD sejtek magas proliferációs rátájú és nagy mennyiségű EV-t szekretáló organoidokat képeznek. **A)** $CD133$ expresszió LUAD organoid sejtekben és a $CD133^{nagy}$ és $CD133^{kis/-}$ sejtek szortolásának stratégiája (áramlási citométer). **B)** Relatív RNS-ek az *AXIN2*, *LGR6* és *TROY* esetében frissen szortolt sejtekből (0. nap) vagy organoidokból, amelyeket $CD133^{nagy}$ vagy $CD133^{kis/-}$ sejtekből indítottunk (14. nap) (RT-qPCR, n = 4). Az adatokat a *HPRT1* háztartási génre normalizáltuk, majd a $CD133^{nagy}$ populáció RNS szintjét összehasonlítottuk az $CD133^{kis/-}$ adataival. **C)** A szortolt sejtekből (0. nap) és e sejtek által elindított organoidokból (14. nap) származó *CD133* relatív RNS-szintje. A $CD133^{kis/-}$ populáció normalizált RNS-szintjét 1-nek vettük (RT-qPCR, n = 4). **D)** A $CD133$ immunfestése és a konfokális mikroszkópos képek kvantifikációja szortolt sejtekből származó organoidokban ($CD133^{kis/-}$ vagy $CD133^{nagy}$) a 14. napon (n = 3). **E)** A jelzett szortolt LUAD sejtpopulációk által képzett organoidok fénymikroszkópos képei. **F-G)** A PORCN + (F) és KI67 + (G) sejtek százalékos aránya a szortolt $CD133^{kis/-}$ és $CD133^{nagy}$ sejtekből képződött organoidokban. **H)** Relatív EV mennyiség a $CD133^{kis/-}$ vagy $CD133^{nagy}$ sejtekből képződött organoidok felülűszójában a 14. napon (NTA, n = 4). Az adatokat 10^6 sejtre normalizáltuk az összehasonlítás előtt. A D, F és G esetében 3 külön LUAD organoid sejtvonalból 10-15 konfokális mikroszkópos képet elemeztünk. Egymintás t-tesztet (B, C, H) és Mann-Whitney U-tesztet (D, F, G) alkalmaztunk, ahol * p < 0,05, ** p < 0,01 és *** p < 0,005. Mérték: 50 μ m (D, E).

6. Megbeszélés

Korábban munkacsoportunk bizonyította, hogy a CRC egyik kulcsfontosságú genetikai változása, az *Apc* gén mutációja megemeli a sejtek EV kibocsátását. A dolgozat eredményei alapján elmondhatjuk, hogy nem csak a jellemző mutációk, hanem a mikrokozonyatnek már a tumorigenezist megelőző fontos változásai is nagy hatással vannak a sejtek EV szekrécijára több organoid modellben is.



26. ábra: Az egér hasnyálmirigy duktális organoidok felülúszójában emelkedett EV szint detektálható kollagén I jelenlétében. **A)** Az egér hasnyálmirigy duktális organoidok Matrigel ECM-ben növesztve EV-eket szekretálnak. **B)** Matrigel és kollagén I keverékében tenyésztett egér hasnyálmirigy duktális organoidok felülúszójában nagyobb EV szintet lehet megfigyelni. A szerző saját ábrája.

A hasnyálmirigy duktális sejtek esetében azt tapasztaltuk, hogy a kollagén I felhalmozódása az ECM-ben emelkedett EV szintet eredményez (26. ábra A-B). Korábban már megfigyelték a kollagén I nagymértékű jelenlétét a CP és PDAC korai stádiumában is [60, 106], illetve hogy a CP jelentősen megnöveli a PDAC kialakulásának esélyét [9, 10]. Egy friss elemzés szerint nagymértékű változás figyelhető meg az ECM-ben CP esetében: felhalmozódnak a kollagén fehérjék (több, mint 90%-a lesz az ECM-nek). Ráadásul a kollagének közül főként a fibrilláris kollagének, mint a kollagén I, találhatóak meg nagy mértékben. Továbbá azt is megfigyelték, hogy azok az ECM fehérjék, amelyek nagyobb mennyiségben figyelhetők meg a PDAC mintákban a kontrollhoz képest, szintén felülreprezentáltak CP esetében [88]. Eredményeinkhez hasonlóan egy nemrégiben készült kutatásban azt tapasztalták, hogy a CD43+ sejtek nagyobb mennyiségben szekretáltak EV-eket, amikor kollagén I jelenlétében tenyésztették őket [107]. Ugyanakkor mivel a kollagén hatására a mátrixban több, és kisebb pórus jön

létre, illetve megnő a diffúzió mértéke is [108], így a magasabb EV szintet a sejtek nagyobb EV kibocsátása mellett az is magyarázhatja, hogy az EV-k könnyebben kijutnak a mátrixból. Mindez azonban nem változtat azon a tényen, hogy a célsejtekhez eljutó EV-k mennyiségét döntően befolyásolja az ECM összetétele. Mindemellett egészséges hasnyálmirigy duktális sejtekben a Wnt jelátviteli útvonal aktivitása és a proliferáló sejtek aránya is befolyásolja az EV szekréció mértékét. Ez utóbbi jelenséget nem csak hasnyálmirigy duktális organoidokban, hanem különböző szöveti eredetű organoidokban: egér és humán tüdő bronchioláris, illetve humán LUAD organoidokban is megfigyeltük. Fontos megemlíteni, hogy a használt organoidok nem csak az adott szövet valamennyi sejtípusát, hanem osztódó sejteket is tartalmaznak, mely központi jelentőségű kísérleteink végrehajtásában.

Továbbá a Wnt fehérjék szekréciójának gátlása PORCN inhibitorokkal a proliferáló sejtek számának csökkenésével és az EV szekréció kisebb intenzitásával is együtt járt hasnyálmirigy duktális organoidokban, tüdő bronchioláris és LUAD organoidokban egyaránt. Ezen kívül bizonyítottuk, hogy a Wnt termelő mikrokörnyezet jelenléte nemcsak a LUAD egér modelljében található meg [102], hanem a humán LUAD tumorokra is jellemző, amit eddig még nem mutattak ki. A fibroblaszt eredetű EV-k sejtproliferációt indukáltak normál bronchioláris és LUAD organoidokban egyaránt WNT aktivitás közvetítésével, mutatva a fibroblasztok által szekretált EV-k jelentőségét a sejtes heterogenitás létrehozásában. Ezenkívül a CD133^{nagy} sejtek egy olyan LUAD sejtpopulációt jelölnek, amely több PORCN⁺ és proliferáló sejtet tartalmazó organoidot képes létrehozni a CD133^{kis/-} sejtekhez képest.

A legtöbb tanulmányban az EV kibocsátást csak egy modellen, illetve főként klasszikus 2D sejtenyészeteken vizsgálták, amely nem alkalmas a sejtes heterogenitás modellezésére. Ilyen modellrendszeren végzett kísérletekből olyan fontos következtetésekre jutottak, mint hogy a sejt szintű anyagcserét befolyásoló gyógyszerek hatással vannak a tumorsejtek EV szekréciójára [109], a „bystander” T-sejtek indukálják a dentritikus sejtek EV termelését [110], illetve a hipoxia fontos szerepet játszik az EV szekréció fokozásában mind a tumor, mind a normál sejtekben [111-113]. Az organoidokat azonban megfelelően tartják a humán hám eredetű szövetek heterogenitásának modellezésére [114]. Az organoidok ezen sajátossága alapján sikeresen alkalmazták már például betegségek mechanizmusának, a tumorigenezis során

kialakuló mutációk szerepének, vagy a tumorok progressziójának és fejlődési folyamatainak feltárására. Számos tumor modellezésére alkalmaznak már organoidokat, mint például gasztrointesztinális daganatok, emlődaganat, urigenitális tumorok, és tüdő tumorok esetében. Az organoidok megtartják annak a szövetnek a genetikai változásait, amelyből izolálják, így alkalmasak egy betegség genetikai hátterének vizsgálatára. Az endometriózis esetében meglepő módon számos onkogén útvonal aktivitását sikerült organoidok segítségével meghatározni, az irritábilis bélszindrómás betegek mintáiból izolált bélorganoidokon pedig a DNS metilációs mintázat változását detektálták. A tumor sejtek és a mikrokoznyezetében lévő sejtek kapcsolatának vizsgálatára is alkalmasak az organoidok. PDAC organoidok és CAF kokultúrák segítségével sikerült megállapítani, hogy a CAF sejtek két fő alpopulációra oszthatóak: miofibroblasztokra, amelyek a neoplasztikus sejtek közelében helyezkednek el és α -SMA-t, valamint ECM komponenseket expresszálnak, és proinflammatorikus CAF-okra, amelyek távolabb helyezkednek el a tumorsejtektől és IL-6 és más gyulladásoos citokinek expressziója jellemző rájuk.[115, 116].

A legtöbb organoid fenntartásához szükség van endogén módon termelt vagy exogén módon a médiumhoz hozzáadott Wnt fehérjékre [117]. Továbbá organoid kultúráknak köszönhetően sikerült azonosítani a Wnt jelátviteli útvonal meghatározó szerepét a diffúz gyomortumorok különböző szövettani altípusainak kialakulása esetében [118]. Így a Wnt útvonal központi fontosságú nemcsak a sejtípusok differenciálódásában és a morfogenezisben, hanem abban is, hogy tumoros megbetegedésekben kialakítsa a proliferáló mikrokoznyezetet, ami sejtés heterogenitást eredményez. A PORCN enzim nélkülözhetetlen a Wnt fehérjék palmitoilálásához és azok a sejtek, amelyekből hiányzik a PORCN, nem képesek Wnt fehérjék szekréciójára [119], továbbá a PORCN inhibitorok széles körben alkalmazottak Wnt fehérjék sejtéből kijutásának gátlására [120, 121]. Ezzel megegyezően azt tapasztaltuk, hogy a PORCN inhibitorok csökkentették a Wnt célgénék expresszióját és a sejtproliférációt, valószínűleg autokrin és/vagy parakrin módon, különböző organoid modellekben. Fontos megjegyezni, hogy a Porcn bizonyítottan jelzi a Wnt termelő tumorsejteket a LUAD egérmodelljében, amely által egy speciális mikrokoznyezet jön létre a Wnt-re reagáló tumorsejtek számára. Továbbá ennek a sejtpopulációnak a mérete jelentős mértékben befolyásolta a kísérleti állatok túlélését

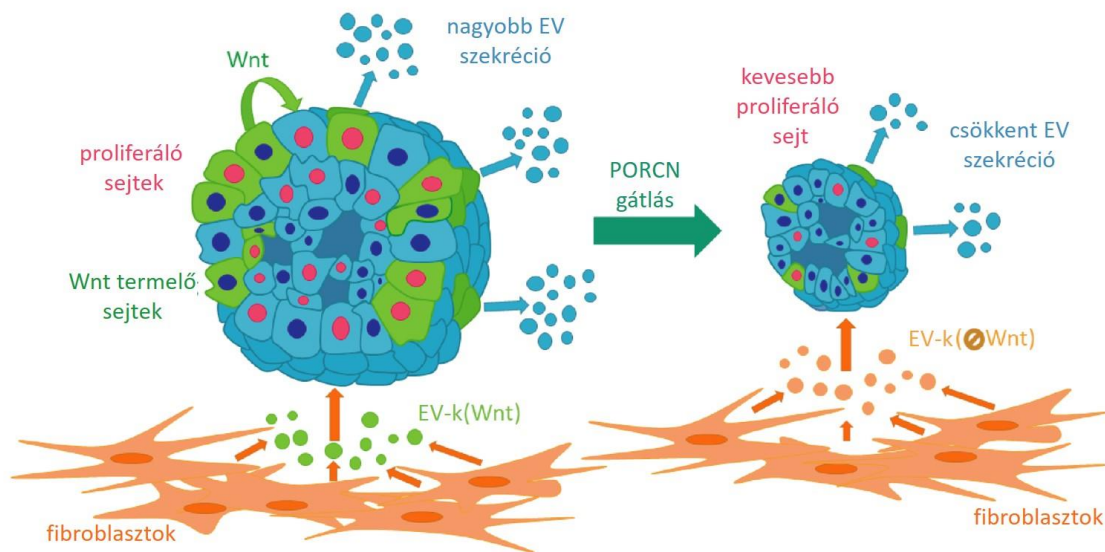
[102]. Eredményeinkkel igazoltuk, hogy ez a mikrokönyezet jelen van humán LUAD esetében is, és hogy az organoidok alkalmasak ennek a mikroniche-nek a modellezésére.

Az EV-ken keresztüli sejt-sejt kommunikáció manapság intenzíven kutatott terület. A tumorsejtek által kibocsátott EV-k sokféle módon fejthetik ki hatásukat, például részt vehetnek a koagulációban, fokozhatják az erek áteresztő képességét, a sztromális sejtekben elindíthatják a metasztázis képzéshez szükséges környezet kialakítását [74, 122]. Sokszor az EV-k ellentétes hatást is kifejthetnek, mint például a tüdő tumorok esetében, ahol megfigyelték, hogy a tumorsejtekből származó EV-k az egészséges fibroblasztokban az integrinek segítségével CAF fenotípust alakítanak ki, illetve NSCLC esetében a podocalyxin tartalmú EV-k fokozzák a sejtmigrációt [123], míg a mir192 tartalmú EV-k megakadályozzák az angiogenezist LUAD esetében [124]. Kutatócsoportunk korábbi vastagbél-tumorokon végzett kutatási eredményéhez hasonlóan [92, 125] azt tapasztaltuk, hogy az egészséges és a tumor asszociált fibroblasztokból származó EV-k sejtosztódást indukáltak normál bronchioláris és LUAD organoidokban is, ezzel bizonyítva a fibroblasztok által szekretált EV-k jelentőségét, amely nem csak a CRC esetében figyelhető meg.

KRas és *Tp53* mutáns egér LUAD modellben a Wnt fehérjék szekréciójának a gátlása jelentősen csökkentette a tumor növekedését és megnövelte a túlélési időt [102]. Ehhez hasonlóan mi is azt tapasztaltuk, hogy a LUAD betegekből származó *TP53* mutációra szelektált organoidokban jelen van egy WNT fehérjét termelő sejtpopuláció, és ezeknek a sejteknek az aktivitása fontos a tumorsejtek proliferációjához.

A tüdő tumorok egyik fő jellemzője a sejtes heterogenitás. Irodalmi adatok alapján több molekula, mint például a CD133 [126, 127] és a CD44 [128], agresszívan osztódó sejtpopulációt jelölnek és így tumor össejt markerek is lehetnek. Ugyan már bizonyították, hogy a Poren⁺ sejteknek fontos szerepe van a LUAD progressziójában egér modellben [102], de eddig nem próbálták meg izolálni a Wnt termelő sejtpopulációt. Eredményeink arra utalnak, hogy a CD133^{nagy} sejtekből képződő LUAD organoidok több PORN⁺ sejtet tartalmaznak, mint a CD133^{kis/-} sejtekből képződött organoidok, ami magyarázhatja a CD133^{nagy} sejtpopuláció agresszív viselkedését. Továbbá a CD133^{nagy} sejtekből származó organoidokban a megnövekedett WNT szekréció magyarázhatja a megnövekedett sejtproliferációt.

Összességében elmondhatjuk, hogy ugyan még mindig hiányzik a hasnyálmirigy-ductális sejtekben az EV szekréciót kiváltó mikrokörnyezeti tényezők nagyléptékű szűrése, eredményeink szerint azonban az ECM kritikus hatást gyakorol az EV kibocsátásra, függetlenül a tumor-specifikus driver-mutációktól. Továbbá megfigyeltük, hogy az organoidokon belüli Wnt fehérje szekréció meghatározó jelentőségű a proliferáló mikrokörnyezet kialakításában normál hasnyálmirigy ductális, tüdő bronchioláris és LUAD organoidok esetében. Ezt a niche-t nem csak az organoid sejtek alpopulációi alakítják ki Wnt szekréció által, hanem a fibroblasztok által kibocsátott EV-k is jelentős szerepet játszanak (27. ábra). Bizonyítottuk, hogy a megnövekedett EV-felszabadulás és a Wnt aktiváció által kiváltott sejtproliferáció korrelációban állnak mind a normál, mind a tumoros organoidokban, ami arra utal, hogy ez a mechanizmus nem korlátozódik csak egy szövettípusra. Mivel az EV alapú diagnosztika függ mind az EV-k mennyiségétől, mind pedig attól, hogy mely sejtekből származnak, így eredményeink nagy jelentőségűek lehetnek az EV-kkal végzett klinikai tesztek kidolgozása szempontjából.



27. ábra: A Wnt termelő mikrokörnyezet befolyásolja a proliferációt és az EV szekréciót. A Wnt fehérjék szekréciója központi jelentőségű a proliferáló mikrokörnyezet kialakításában normál hasnyálmirigy ductális, tüdő bronchioláris és LUAD organoidok esetében. Ezt a mikrokörnyezetet a fibroblasztok által kibocsátott EV-k is befolyásolják. A nagyobb Wnt aktivitás következtében több proliferáló sejt és nagyobb EV szekréció figyelhető meg. PORCN gátlás hatására pedig lecsökken a proliferáló sejtek aránya és az EV kibocsátás is. A szerző saját ábrája.

7. Következtetések

Munkacsoportunk adatai alapján bizonyos driver mutációk központi fontosságúak az EV kibocsátás szabályozásában. Jelen vizsgálatunkban a mikrokörnyezet szerepét tanulmányoztuk különböző egészséges és tumoros eredetű organoid modellekben.

Korábbi eredményeink alapján nem csak a PDAC, hanem a PDAC-re hajlamosító CP-ben szenvedő betegek esetében is emelkedett EV szint mutatható ki. A tumoros sejteknél általánosan megfigyelt nagyobb EV szekréció tehát már a pre-tumor stádiumban is megfigyelhető lehet, melyre az extracelluláris mátrix jelentős átrendeződése, például a kollagén I felhalmozódása is jellemző. A hasnyálmirigy duktális organoidokban a kollagén I jelenléte az extracelluláris mátrixban nagyobb EV szintet eredményezett, míg a gyulladásos citokineknek nem volt hatásuk. Mindez arra utal, hogy a CP-ben megfigyelhető emelkedett EV szintet az ECM módosulása kritikusan befolyásolja.

Egy másik fontos mikrokörnyezeti faktor a Wnt kibocsátásra képes sejtek jelenléte. Kutatócsoportunk már egy másik modellrendszeren, az intestinális adenoma organoidokon bizonyította, hogy kapcsolat van az aktív Wnt útvonallal rendelkező sejtpopuláció és az EV kibocsátás között. Eredményeink alapján elmondható, hogy ez a kapcsolat nem csak erre a szövettípusra, hanem a hasnyálmirigy duktális organoidokra, normál tüdő bronchioláris organoidokra és LUAD organoidokra is igaz, így általánosnak tekinthető. A hasnyálmirigy duktális organoidok esetében a legtöbb sejt pozitivitást mutatott a Wnt szekrécióban fontos Porcn enzimre és ennek különböző inhibitorokkal való gátlásának következtében a proliferáló sejtek és az EV szekréció is lecsökkent. Ezzel szemben a normál tüdő bronchioláris és a LUAD organoidok esetében heterogenitást figyeltünk meg a PORCN enzim jelenlétére nézve. Ezekben az organoidokban is megfigyeltük, hogy Wnt szekréció gátlóval való kezelés hatására lecsökkent a proliferáló sejtek aránya és az EV szekréció. Bár a LUAD egér modelljében már leírták a Wnt termelő és Wnt-re válaszoló tumorsejtek alpopulációját, jelen vizsgálatunk megerősítik ennek a mikroniche-nek a létezését és fontosságát humán rendszerben is. Továbbá LUAD organoidokban sikerült azonosítanunk, hogy a CD133 pozitív, irodalmi adatok alapján agresszív viselkedésű sejtek alpopulációja olyan organoidokat hoz létre, melyek homogének PORCN expresszióra nézve, és ez fokozott sejtosztódáshoz és EV szekrécióhoz vezet. Végül bizonyítottuk, hogy a Wnt termelő és arra válaszoló

mikrokörnyezet kialakításában nem csak az organoid sejtek, hanem a környező fibroblasztok által szekretált EV-k is jelentősen hozzájárulnak Wnt aktivitás által.

Összességében elmondhatjuk, hogy eredményeink hozzájárulhatnak az EV alapú korai diagnosztika kidolgozásához PDAC és LUAD esetében is, ami így lényegesen megkönnyíthetné ezeknek a tumoroknak a tünetek előtti észrevételét.

8. Összefoglalás

Az EV-k az intercelluláris sejt-kommunikáció egyik fontos módját jelenítik meg. Az általuk membránnal védett módon szállított molekulák a kibocsátó sejtre jellemzőek lehetnek, így a folyadék biopsziából izolált EV-k több betegség, például a pancreas ductális (PDAC) és a tüdő adenokarcinoma (LUAD) korai diagnosztikájához megoldást jelenthetnek. A diagnosztikai felhasználáshoz azonban szükség lenne azon biológiai folyamatok megértésére, melyek az EV-k kibocsátását szabályozzák.

Az organoidok olyan szöveti eredetű „miniszervek”, melyek megfelelő, standard tenyésztési körülmények között *in vitro* is megtartják az epitheliális eredetű szövet sejt heterogenitását, így jelenleg a legjobb humán modellnek tekinthetők. PhD dolgozatomban különböző organoid modell rendszereken vizsgáltam, hogy a mikro-környezet olyan változásai, melyek a LUAD és a PDAC kimenetelével is összefüggést mutatnak, milyen módon befolyásolják az EV kibocsátást. Egér hasnyálmirigy ductális organoidokon bizonyítottuk, hogy a kollagén I felhalmozódása az ECM-ben, ami a PDAC egyik hajlamosító tényezőjeként számon tartott krónikus pancreatitis (CP) és a PDAC esetében is megfigyelhető jelenség, nagyobb EV szintet eredményez. Továbbá kapcsolatot találtunk a Wnt termelő sejtek populációjának a mérete és a proliferáló sejtek száma, illetve az EV kibocsátás között egér és humán bronchioláris (NL) és LUAD organoidokban. NL és LUAD organoidokban a proliferáló sejtpopuláció méretének szabályozásában nem csak a WNT termelő epitheliális mikroniche jelenléte, hanem a fibroblasztok által szekretált EV-k is szerepet játszanak, melyet meg tudunk akadályozni WNT szekréciót gátló molekulákkal. Végezetül azt találtuk, hogy a korábbi irodalmi adatok alapján agresszív tulajdonságokkal rendelkező CD133+ sejtek által kialakított organoidokban nagyobb a WNT szekretáló sejtpopuláció mérete, az osztódó sejtek száma, valamint az EV kibocsátás mértéke.

Összességében elmondhatjuk, hogy a mikro-környezet változásai is befolyásolják az EV kibocsátást, nem csak a tumorok driver mutációi. Bizonyítottuk, hogy a Wnt aktivitás, a proliferáló sejtpopuláció mérete és az EV kibocsátás intenzitása közötti összefüggés általános jelenség, mely több szövettípusra és tumorra is jellemző. Mindez fontos elméleti háttérrel biztosíthat az EV alapú korai diagnosztika kidolgozásához olyan magas mortalitású betegségek esetében, mint a LUAD.

9. Summary

EVs are an important form of intercellular communication. Since EVs carry their cargoes in a protected form that can be characteristic for the releasing cell, EVs isolated from liquid biopsy are considered as a potential tool for early disease diagnosis eg. for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and lung adenocarcinoma (LUAD) as well. However, factors modifying EV release remain largely unknown.

The organoids are „mini organs” that maintain the cellular heterogeneity characteristic for the *in vivo* epithelial tissues, thus, they are currently considered as the best human model. By using different model systems in my PhD dissertation, I examined the effects of the changes in the microenvironment which occur during the early tumor progression in PDAC and LUAD, for EV secretion. We proved that the accumulation of collagen I, a characteristic change in the ECM in both PDAC and chronic pancreatitis (CP) that is a major risk factor for PDAC, critically modifies the EV levels in murine pancreatic ductal organoids supernatants. Furthermore, we found that high cell proliferation rate, induced by Wnt pathway activation, is coupled to a higher EV release. We also demonstrated this phenomenon on murine bronchiolar, human bronchiolar and LUAD organoids. The microniche for proliferating cells was shaped not only by WNT producing cells in NL and LUAD organoids, but also by fibroblast-derived EVs. This effect could be blocked by using Wnt secretion inhibitors. Finally we found that CD133+ cells that are known to have with malignant behavior based on previous literature data, produced organoids with a high percentage of WNT producing and proliferating cells and an elevated EV secretion.

Collectively, we show here that not only driver mutations in tumor cells but also changes in the microenvironment critically affect EV release. We prove that the relationship between Wnt activity, proliferating cell population size and EV release intensity is a common phenomenon that is characteristic of several tissue types and tumors. Thus, our results may provide an important theoretical background for the future development of EV-based early diagnosis in high-mortality diseases such as LUAD.

10. Irodalomjegyzék

1. Pandiri, A.R., *Overview of exocrine pancreatic pathobiology*. Toxicol Pathol, 2014. **42**(1): p. 207-216.
2. Leung, P.S., *Overview of the pancreas*. Adv Exp Med Biol, 2010. **690**: p. 3-12.
3. Luchini, C., P. Capelli, and A. Scarpa, *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants*. Surg Pathol Clin, 2016. **9**(4): p. 547-560.
4. Lin, K., A.N. Lin, S. Lin, T. Lin, Y.X. Liu, and M. Reddy, *A Silent Asymptomatic Solid Pancreas Tumor in a Nonsmoking Athletic Female: Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. Case Rep Gastroenterol, 2017. **11**(3): p. 616-624.
5. Gupta, R., I. Amanam, and V. Chung, *Current and future therapies for advanced pancreatic cancer*. J Surg Oncol, 2017. **116**(1): p. 25-34.
6. de Braud, F., S. Cascinu, and G. Gatta, *Cancer of pancreas*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **50**(2): p. 147-155.
7. McGuigan, A., P. Kelly, R.C. Turkington, C. Jones, H.G. Coleman, and R.S. McCain, *Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes*. World J Gastroenterol, 2018. **24**(43): p. 4846-4861.
8. Zheng, L., J. Xue, E.M. Jaffee, and A. Habtezion, *Role of immune cells and immune-based therapies in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma*. Gastroenterology, 2013. **144**(6): p. 1230-1240.
9. Elsherif, S.B., M. Virarkar, S. Javadi, J.J. Ibarra-Rovira, E.P. Tamm, and P.R. Bhosale, *Pancreatitis and PDAC: association and differentiation*. Abdom Radiol (NY), 2020. **45**(5): p. 1324-1337.
10. Mayerle, J., H. Kalthoff, R. Reszka, B. Kamlage, E. Peter, B. Schniewind, S. Gonzalez Maldonado, C. Pilarsky, C.D. Heidecke, P. Schatz, M. Distler, J.A. Scheiber, U.M. Mahajan, F.U. Weiss, R. Grutzmann, and M.M. Lerch, *Metabolic biomarker signature to differentiate pancreatic ductal adenocarcinoma from chronic pancreatitis*. Gut, 2018. **67**(1): p. 128-137.
11. Manohar, M., H.K. Kandikattu, A.K. Verma, and A. Mishra, *IL-15 regulates fibrosis and inflammation in a mouse model of chronic pancreatitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2018. **315**(6): p. G954-G965.

12. Binker, M.G., A.A. Binker-Cosen, D. Richards, H.Y. Gaisano, R.H. de Cosen, and L.I. Cosen-Binker, *Chronic stress sensitizes rats to pancreatitis induced by cerulein: role of TNF-alpha*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(44): p. 5565-5581.
13. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address, a.a.d.h.e. and N. Cancer Genome Atlas Research, *Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. Cancer Cell, 2017. **32**(2): p. 185-203 e13.
14. Omori, Y., Y. Ono, M. Tanino, H. Karasaki, H. Yamaguchi, T. Furukawa, K. Enomoto, J. Ueda, A. Sumi, J. Katayama, M. Muraki, K. Taniue, K. Takahashi, Y. Ambo, T. Shinohara, H. Nishihara, J. Sasajima, H. Maguchi, Y. Mizukami, T. Okumura, and S. Tanaka, *Pathways of Progression From Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm to Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Based on Molecular Features*. Gastroenterology, 2019. **156**(3): p. 647-661 e2.
15. Feng, Y., X. Dai, X. Li, H. Wang, J. Liu, J. Zhang, Y. Du, and L. Xia, *EGF signalling pathway regulates colon cancer stem cell proliferation and apoptosis*. Cell Prolif, 2012. **45**(5): p. 413-419.
16. Hruban, R.H., M.M. Gaida, E. Thompson, S.M. Hong, M. Noe, L.A. Brosens, M. Jongepier, G.J.A. Offerhaus, and L.D. Wood, *Why is pancreatic cancer so deadly? The pathologist's view*. J Pathol, 2019. **248**(2): p. 131-141.
17. Carmicheal, J., A. Patel, V. Dalal, P. Atri, A.S. Dhaliwal, U.A. Wittel, M.P. Malafa, G. Talmon, B.J. Swanson, S. Singh, M. Jain, S. Kaur, and S.K. Batra, *Elevating pancreatic cystic lesion stratification: Current and future pancreatic cancer biomarker(s)*. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2020. **1873**(1): p. 188318.
18. Herbst, R.S., D. Morgensztern, and C. Boshoff, *The biology and management of non-small cell lung cancer*. Nature, 2018. **553**(7689): p. 446-454.
19. Chen, Z., C.M. Fillmore, P.S. Hammerman, C.F. Kim, and K.K. Wong, *Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(8): p. 535-546.
20. Rodriguez-Canales, J., E. Parra-Cuentas, and Wistuba, II, *Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer*. Cancer Treat Res, 2016. **170**: p. 25-46.
21. Zheng, M., *Classification and Pathology of Lung Cancer*. Surg Oncol Clin N Am, 2016. **25**(3): p. 447-468.

22. Saab, S., H. Zalzale, Z. Rahal, Y. Khalifeh, A. Sinjab, and H. Kadara, *Insights Into Lung Cancer Immune-Based Biology, Prevention, and Treatment*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 159.
23. Waqar, S.N. and D. Morgensztern, *Treatment advances in small cell lung cancer (SCLC)*. Pharmacol Ther, 2017. **180**: p. 16-23.
24. Osmani, L., F. Askin, E. Gabrielson, and Q.K. Li, *Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy*. Semin Cancer Biol, 2018. **52**(Pt 1): p. 103-109.
25. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma*. Nature, 2014. **511**(7511): p. 543-550.
26. Camidge, D.R., R.C. Doebele, and K.M. Kerr, *Comparing and contrasting predictive biomarkers for immunotherapy and targeted therapy of NSCLC*. Nat Rev Clin Oncol, 2019. **16**(6): p. 341-355.
27. Fu, L., H. Wang, D. Wei, B. Wang, C. Zhang, T. Zhu, Z. Ma, Z. Li, Y. Wu, and G. Yu, *The value of CEP55 gene as a diagnostic biomarker and independent prognostic factor in LUAD and LUSC*. PLoS One, 2020. **15**(5): p. e0233283.
28. Pennell, N.A., M.E. Arcila, D.R. Gandara, and H. West, *Biomarker Testing for Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Real-World Issues and Tough Choices*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2019. **39**: p. 531-542.
29. Liu, X.X., Y.E. Yang, X. Liu, M.Y. Zhang, R. Li, Y.H. Yin, and Y.Q. Qu, *A two-circular RNA signature as a noninvasive diagnostic biomarker for lung adenocarcinoma*. J Transl Med, 2019. **17**(1): p. 50.
30. Dong, H.X., R. Wang, X.Y. Jin, J. Zeng, and J. Pan, *LncRNA DGCR5 promotes lung adenocarcinoma (LUAD) progression via inhibiting hsa-mir-22-3p*. J Cell Physiol, 2018. **233**(5): p. 4126-4136.
31. Nusse, R. and H. Clevers, *Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities*. Cell, 2017. **169**(6): p. 985-999.
32. Taciak, B., I. Pruszynska, L. Kiraga, M. Bialasek, and M. Krol, *Wnt signaling pathway in development and cancer*. J Physiol Pharmacol, 2018. **69**(2).

33. Bugter, J.M., N. Fenderico, and M.M. Maurice, *Mutations and mechanisms of WNT pathway tumour suppressors in cancer*. Nat Rev Cancer, 2021. **21**(1): p. 5-21.
34. Clevers, H., *Wnt/beta-catenin signaling in development and disease*. Cell, 2006. **127**(3): p. 469-480.
35. Yang, K., X. Wang, H. Zhang, Z. Wang, G. Nan, Y. Li, F. Zhang, M.K. Mohammed, R.C. Haydon, H.H. Luu, Y. Bi, and T.C. He, *The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies*. Lab Invest, 2016. **96**(2): p. 116-136.
36. Harb, J., P.J. Lin, and J. Hao, *Recent Development of Wnt Signaling Pathway Inhibitors for Cancer Therapeutics*. Curr Oncol Rep, 2019. **21**(2): p. 12.
37. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-767.
38. Battle, E. and H. Clevers, *Cancer stem cells revisited*. Nat Med, 2017. **23**(10): p. 1124-1134.
39. Wu, W., J. Cao, Z. Ji, J. Wang, T. Jiang, and H. Ding, *Co-expression of Lgr5 and CXCR4 characterizes cancer stem-like cells of colorectal cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(49): p. 81144-81155.
40. Ram Makena, M., H. Gatla, D. Verlekar, S. Sukhavasi, K.P. M, and C.P. K, *Wnt/beta-Catenin Signaling: The Culprit in Pancreatic Carcinogenesis and Therapeutic Resistance*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(17).
41. Morris, J.P.t., S.C. Wang, and M. Hebrok, *KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(10): p. 683-695.
42. Stewart, D.J., *Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 2014. **106**(1): p. djt356.
43. Cai, J., L. Fang, Y. Huang, R. Li, X. Xu, Z. Hu, L. Zhang, Y. Yang, X. Zhu, H. Zhang, J. Wu, Y. Huang, J. Li, M. Zeng, E. Song, Y. He, L. Zhang, and M. Li, *Simultaneous overactivation of Wnt/beta-catenin and TGFbeta signalling by miR-128-3p confers chemoresistance-associated metastasis in NSCLC*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15870.

44. Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand, and R.J. Lake, *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development*. Science, 1999. **284**(5415): p. 770-776.
45. Andersson, E.R., R. Sandberg, and U. Lendahl, *Notch signaling: simplicity in design, versatility in function*. Development, 2011. **138**(17): p. 3593-3612.
46. Li, L., P. Tang, S. Li, X. Qin, H. Yang, C. Wu, and Y. Liu, *Notch signaling pathway networks in cancer metastasis: a new target for cancer therapy*. Med Oncol, 2017. **34**(10): p. 180.
47. Bray, S.J., *Notch signalling in context*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. **17**(11): p. 722-735.
48. Meurette, O. and P. Mehlen, *Notch Signaling in the Tumor Microenvironment*. Cancer Cell, 2018. **34**(4): p. 536-548.
49. Brahmi, M., O. Bally, L. Eberst, and P. Cassier, *[Therapeutic targeting of Notch signaling in cancer]*. Bull Cancer, 2017. **104**(10): p. 883-891.
50. Xu, Q., D. Lin, X. Li, R. Xiao, Z. Liu, W. Xiong, L. Cai, and F. He, *Association between single nucleotide polymorphisms of NOTCH signaling pathway-related genes and the prognosis of NSCLC*. Cancer Manag Res, 2019. **11**: p. 6895-6905.
51. Zou, B., X.L. Zhou, S.Q. Lai, and J.C. Liu, *Notch signaling and non-small cell lung cancer*. Oncol Lett, 2018. **15**(3): p. 3415-3421.
52. Akbarzadeh, M., M. Majidinia, S. Fekri Aval, S. Mahbub, and N. Zarghami, *Molecular Targeting of Notch Signaling Pathway by DAPT in Human Ovarian Cancer: Possible Anti Metastatic Effects*. Asian Pac J Cancer Prev, 2018. **19**(12): p. 3473-3477.
53. Takebe, N., D. Nguyen, and S.X. Yang, *Targeting notch signaling pathway in cancer: clinical development advances and challenges*. Pharmacol Ther, 2014. **141**(2): p. 140-149.
54. Reina-Campos, M., J. Moscat, and M. Diaz-Meco, *Metabolism shapes the tumor microenvironment*. Curr Opin Cell Biol, 2017. **48**: p. 47-53.
55. Junttila, M.R. and F.J. de Sauvage, *Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response*. Nature, 2013. **501**(7467): p. 346-354.
56. Sahai, E., I. Astsaturov, E. Cukierman, D.G. DeNardo, M. Egeblad, R.M. Evans, D. Fearon, F.R. Greten, S.R. Hingorani, T. Hunter, R.O. Hynes, R.K. Jain, T.

- Janowitz, C. Jorgensen, A.C. Kimmelman, M.G. Kolonin, R.G. Maki, R.S. Powers, E. Pure, D.C. Ramirez, R. Scherz-Shouval, M.H. Sherman, S. Stewart, T.D. Tlsty, D.A. Tuveson, F.M. Watt, V. Weaver, A.T. Weeraratna, and Z. Werb, *A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts*. Nat Rev Cancer, 2020. **20**(3): p. 174-186.
57. Calon, A., D.V. Tauriello, and E. Batlle, *TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis*. Semin Cancer Biol, 2014. **25**: p. 15-22.
58. Hanley, C.J., M. Mellone, K. Ford, S.M. Thirdborough, T. Mellows, S.J. Frampton, D.M. Smith, E. Harden, C. Szyndralewicz, M. Bullock, F. Noble, K.A. Moutasim, E.V. King, P. Vijayanand, A.H. Mirnezami, T.J. Underwood, C.H. Ottensmeier, and G.J. Thomas, *Targeting the Myofibroblastic Cancer-Associated Fibroblast Phenotype Through Inhibition of NOX4*. J Natl Cancer Inst, 2018. **110**(1).
59. He, X., B. Lee, and Y. Jiang, *Cell-ECM Interactions in Tumor Invasion*. Adv Exp Med Biol, 2016. **936**: p. 73-91.
60. Mohan, V., A. Das, and I. Sagi, *Emerging roles of ECM remodeling processes in cancer*. Semin Cancer Biol, 2020. **62**: p. 192-200.
61. Belli, C., D. Trapani, G. Viale, P. D'Amico, B.A. Duso, P. Della Vigna, F. Orsi, and G. Curigliano, *Targeting the microenvironment in solid tumors*. Cancer Treat Rev, 2018. **65**: p. 22-32.
62. Najafi, M., B. Farhood, and K. Mortezaee, *Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers*. J Cell Biochem, 2019. **120**(3): p. 2782-2790.
63. Bloemendal, S. and U. Kuck, *Cell-to-cell communication in plants, animals, and fungi: a comparative review*. Naturwissenschaften, 2013. **100**(1): p. 3-19.
64. Singer, S.J., *Intercellular communication and cell-cell adhesion*. Science, 1992. **255**(5052): p. 1671-1677.
65. Latorre, R., C. Sternini, R. De Giorgio, and B. Greenwood-Van Meerveld, *Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication*. Neurogastroenterol Motil, 2016. **28**(5): p. 620-630.
66. Mathieu, M., L. Martin-Jaular, G. Lavieu, and C. Thery, *Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication*. Nat Cell Biol, 2019. **21**(1): p. 9-17.

67. van Niel, G., G. D'Angelo, and G. Raposo, *Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018. **19**(4): p. 213-228.
68. Tkach, M. and C. Thery, *Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go*. *Cell*, 2016. **164**(6): p. 1226-1232.
69. Thery, C., K.W. Witwer, E. Aikawa, M.J. Alcaraz, J.D. Anderson, R. Andriantsitohaina, A. Antoniou, T. Arab, F. Archer, G.K. Atkin-Smith, D.C. Ayre, J.M. Bach, D. Bachurski, H. Baharvand, L. Balaj, S. Baldacchino, N.N. Bauer, A.A. Baxter, M. Bebawy, C. Beckham, A. Bedina Zavec, A. Benmoussa, A.C. Berardi, P. Bergese, E. Bielska, C. Blenkiron, S. Bobis-Wozowicz, E. Boilard, W. Boireau, A. Bongiovanni, F.E. Borrás, S. Bosch, C.M. Boulanger, X. Breakefield, A.M. Breglio, M.A. Brennan, D.R. Brigstock, A. Brisson, M.L. Broekman, J.F. Bromberg, P. Bryl-Gorecka, S. Buch, A.H. Buck, D. Burger, S. Busatto, D. Buschmann, B. Bussolati, E.I. Buzas, J.B. Byrd, G. Camussi, D.R. Carter, S. Caruso, L.W. Chamley, Y.T. Chang, C. Chen, S. Chen, L. Cheng, A.R. Chin, A. Clayton, S.P. Clerici, A. Cocks, E. Cocucci, R.J. Coffey, A. Cordeiro-da-Silva, Y. Couch, F.A. Coumans, B. Coyle, R. Crescitelli, M.F. Criado, C. D'Souza-Schorey, S. Das, A. Datta Chaudhuri, P. de Candia, E.F. De Santana, O. De Wever, H.A. Del Portillo, T. Demaret, S. Deville, A. Devitt, B. Dhondt, D. Di Vizio, L.C. Dieterich, V. Dolo, A.P. Dominguez Rubio, M. Dominici, M.R. Dourado, T.A. Driedonks, F.V. Duarte, H.M. Duncan, R.M. Eichenberger, K. Ekstrom, S. El Andaloussi, C. Elie-Caille, U. Erdbrugger, J.M. Falcon-Perez, F. Fatima, J.E. Fish, M. Flores-Bellver, A. Forsonits, A. Frelet-Barrand, F. Fricke, G. Fuhrmann, S. Gabrielsson, A. Gamez-Valero, C. Gardiner, K. Gartner, R. Gaudin, Y.S. Gho, B. Giebel, C. Gilbert, M. Gimona, I. Giusti, D.C. Goberdhan, A. Gorgens, S.M. Gorski, D.W. Greening, J.C. Gross, A. Gualerzi, G.N. Gupta, D. Gustafson, A. Handberg, R.A. Haraszti, P. Harrison, H. Hegyesi, A. Hendrix, A.F. Hill, F.H. Hochberg, K.F. Hoffmann, B. Holder, H. Holthofer, B. Hosseinkhani, G. Hu, Y. Huang, V. Huber, S. Hunt, A.G. Ibrahim, T. Ikezu, J.M. Inal, M. Isin, A. Ivanova, H.K. Jackson, S. Jacobsen, S.M. Jay, M. Jayachandran, G. Jenster, L. Jiang, S.M. Johnson, J.C. Jones, A. Jong, T. Jovanovic-Talisman, S. Jung, R. Kalluri, S.I. Kano, S. Kaur, Y. Kawamura, E.T. Keller, D. Khamari, E. Khomyakova, A. Khvorova, P. Kierulf, K.P. Kim, T. Kislinger, M. Klingeborn,

D.J. Klinke, 2nd, M. Kornek, M.M. Kosanovic, A.F. Kovacs, E.M. Kramer-Albers, S. Krasemann, M. Krause, I.V. Kurochkin, G.D. Kusuma, S. Kuypers, S. Laitinen, S.M. Langevin, L.R. Languino, J. Lannigan, C. Lasser, L.C. Laurent, G. Lavieu, E. Lazaro-Ibanez, S. Le Lay, M.S. Lee, Y.X.F. Lee, D.S. Lemos, M. Lenassi, A. Leszczynska, I.T. Li, K. Liao, S.F. Libregts, E. Ligeti, R. Lim, S.K. Lim, A. Line, K. Linnemannstons, A. Llorente, C.A. Lombard, M.J. Lorenowicz, A.M. Lorincz, J. Lotvall, J. Lovett, M.C. Lowry, X. Loyer, Q. Lu, B. Lukomska, T.R. Lunavat, S.L. Maas, H. Malhi, A. Marcilla, J. Mariani, J. Mariscal, E.S. Martens-Uzunova, L. Martin-Jaular, M.C. Martinez, V.R. Martins, M. Mathieu, S. Mathivanan, M. Maugeri, L.K. McGinnis, M.J. McVey, D.G. Meckes, Jr., K.L. Meehan, I. Mertens, V.R. Minciocchi, A. Moller, M. Moller Jorgensen, A. Morales-Kastresana, J. Morhayim, F. Mullier, M. Muraca, L. Musante, V. Mussack, D.C. Muth, K.H. Myburgh, T. Najrana, M. Nawaz, I. Nazarenko, P. Nejsum, C. Neri, T. Neri, R. Nieuwland, L. Nimrichter, J.P. Nolan, E.N. Nolte-'t Hoen, N. Noren Hooten, L. O'Driscoll, T. O'Grady, A. O'Loghlen, T. Ochiya, M. Olivier, A. Ortiz, L.A. Ortiz, X. Osteikoetxea, O. Ostergaard, M. Ostrowski, J. Park, D.M. Pegtel, H. Peinado, F. Perut, M.W. Pfaffl, D.G. Phinney, B.C. Pieters, R.C. Pink, D.S. Pisetsky, E. Pogge von Strandmann, I. Polakovicova, I.K. Poon, B.H. Powell, I. Prada, L. Pulliam, P. Quesenberry, A. Radeghieri, R.L. Raffai, S. Raimondo, J. Rak, M.I. Ramirez, G. Raposo, M.S. Rayyan, N. Regev-Rudzki, F.L. Ricklefs, P.D. Robbins, D.D. Roberts, S.C. Rodrigues, E. Rohde, S. Rome, K.M. Rouschop, A. Ruggetti, A.E. Russell, P. Saa, S. Sahoo, E. Salas-Huenuleo, C. Sanchez, J.A. Saugstad, M.J. Saul, R.M. Schiffelers, R. Schneider, T.H. Schoyen, A. Scott, E. Shahaj, S. Sharma, O. Shatnyeva, F. Shekari, G.V. Shelke, A.K. Shetty, K. Shiba, P.R. Siljander, A.M. Silva, A. Skowronek, O.L. Snyder, 2nd, R.P. Soares, B.W. Sodar, C. Soekmadji, J. Sotillo, P.D. Stahl, W. Stoorvogel, S.L. Stott, E.F. Strasser, S. Swift, H. Tahara, M. Tewari, K. Timms, S. Tiwari, R. Tixeira, M. Tkach, W.S. Toh, R. Tomasini, A.C. Torrecilhas, J.P. Tosar, V. Toxavidis, L. Urbanelli, P. Vader, B.W. van Balkom, S.G. van der Grein, J. Van Deun, M.J. van Herwijnen, K. Van Keuren-Jensen, G. van Niel, M.E. van Royen, A.J. van Wijnen, M.H. Vasconcelos, I.J. Vechetti, Jr., T.D. Veit, L.J. Vella, E. Velot, F.J. Verweij, B. Vestad, J.L. Vinas, T. Visnovitz, K.V. Vukman, J.

- Wahlgren, D.C. Watson, M.H. Wauben, A. Weaver, J.P. Webber, V. Weber, A.M. Wehman, D.J. Weiss, J.A. Welsh, S. Wendt, A.M. Wheelock, Z. Wiener, L. Witte, J. Wolfram, A. Xagorari, P. Xander, J. Xu, X. Yan, M. Yanez-Mo, H. Yin, Y. Yuana, V. Zappulli, J. Zarubova, V. Zekas, J.Y. Zhang, Z. Zhao, L. Zheng, A.R. Zheutlin, A.M. Zickler, P. Zimmermann, A.M. Zivkovic, D. Zocco and E.K. Zuba-Surma, *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines*. *J Extracell Vesicles*, 2018. **7**(1): p. 1535750.
70. Bebelman, M.P., M.J. Smit, D.M. Pegtel, and S.R. Baglio, *Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer*. *Pharmacol Ther*, 2018. **188**: p. 1-11.
71. Abels, E.R. and X.O. Breakefield, *Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake*. *Cell Mol Neurobiol*, 2016. **36**(3): p. 301-312.
72. Buzas, E.I., B. Gyorgy, G. Nagy, A. Falus, and S. Gay, *Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases*. *Nat Rev Rheumatol*, 2014. **10**(6): p. 356-364.
73. Zomer, A., C. Maynard, F.J. Verweij, A. Kamermans, R. Schafer, E. Beerling, R.M. Schiffelers, E. de Wit, J. Berenguer, S.I.J. Ellenbroek, T. Wurdinger, D.M. Pegtel, and J. van Rheenen, *In Vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior*. *Cell*, 2015. **161**(5): p. 1046-1057.
74. Becker, A., B.K. Thakur, J.M. Weiss, H.S. Kim, H. Peinado, and D. Lyden, *Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis*. *Cancer Cell*, 2016. **30**(6): p. 836-848.
75. Colombo, M., G. Raposo, and C. Thery, *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014. **30**: p. 255-289.
76. Dreyer, F. and A. Baur, *Biogenesis and Functions of Exosomes and Extracellular Vesicles*. *Methods Mol Biol*, 2016. **1448**: p. 201-216.
77. Urabe, F., N. Kosaka, K. Ito, T. Kimura, S. Egawa, and T. Ochiya, *Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020. **318**(1): p. C29-C39.

78. Dutta, D., I. Heo, and H. Clevers, *Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems*. Trends Mol Med, 2017. **23**(5): p. 393-410.
79. Xu, H., X. Lyu, M. Yi, W. Zhao, Y. Song, and K. Wu, *Organoid technology and applications in cancer research*. J Hematol Oncol, 2018. **11**(1): p. 116.
80. Bleijs, M., M. van de Wetering, H. Clevers, and J. Drost, *Xenograft and organoid model systems in cancer research*. EMBO J, 2019. **38**(15): p. e101654.
81. Artegiani, B. and H. Clevers, *Use and application of 3D-organoid technology*. Hum Mol Genet, 2018. **27**(R2): p. R99-R107.
82. Smith, E. and W.J. Cochran, *CYSTIC ORGANOID TERATOMA: (Report of a Case)*. Can Med Assoc J, 1946. **55**(2): p. 151-152.
83. Tuveson, D. and H. Clevers, *Cancer modeling meets human organoid technology*. Science, 2019. **364**(6444): p. 952-955.
84. Aboulkheyr Es, H., L. Montazeri, A.R. Aref, M. Vosough, and H. Baharvand, *Personalized Cancer Medicine: An Organoid Approach*. Trends Biotechnol, 2018. **36**(4): p. 358-371.
85. Huch, M., P. Bonfanti, S.F. Boj, T. Sato, C.J. Loomans, M. van de Wetering, M. Sojoodi, V.S. Li, J. Schuijers, A. Gracanin, F. Ringnalda, H. Begthel, K. Hamer, J. Mulder, J.H. van Es, E. de Koning, R.G. Vries, H. Heimberg, and H. Clevers, *Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis*. EMBO J, 2013. **32**(20): p. 2708-2721.
86. Sachs, N., A. Papaspyropoulos, D.D. Zomer-van Ommen, I. Heo, L. Bottinger, D. Klay, F. Weeber, G. Huelsz-Prince, N. Iakobachvili, G.D. Amatngalim, J. de Lig, A. van Hoeck, N. Proost, M.C. Viveen, A. Lyubimova, L. Teeven, S. Derakhshan, J. Korving, H. Begthel, J.F. Dekkers, K. Kumawat, E. Ramos, M.F. van Oosterhout, G.J. Offerhaus, D.J. Wiener, E.P. Olimpio, K.K. Dijkstra, E.F. Smit, M. van der Linden, S. Jaksani, M. van de Ven, J. Jonkers, A.C. Rios, E.E. Voest, C.H. van Moorsel, C.K. van der Ent, E. Cuppen, A. van Oudenaarden, F.E. Coenjaerts, L. Meyaard, L.J. Bont, P.J. Peters, S.J. Tans, J.S. van Zon, S.F. Boj, R.G. Vries, J.M. Beekman, and H. Clevers, *Long-term expanding human airway organoids for disease modeling*. EMBO J, 2019. **38**(4).
87. Dijkstra, K.K., K. Monkhorst, L.J. Schipper, K.J. Hartemink, E.F. Smit, S. Kaing, R. de Groot, M.C. Wolkers, H. Clevers, E. Cuppen, and E.E. Voest, *Challenges*

- in Establishing Pure Lung Cancer Organoids Limit Their Utility for Personalized Medicine*. Cell Rep, 2020. **31**(5): p. 107588.
88. Tian, C., K.R. Clauser, D. Ohlund, S. Rickelt, Y. Huang, M. Gupta, D.R. Mani, S.A. Carr, D.A. Tuveson, and R.O. Hynes, *Proteomic analyses of ECM during pancreatic ductal adenocarcinoma progression reveal different contributions by tumor and stromal cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(39): p. 19609-19618.
 89. Zeold, A., G.O. Sandor, A. Kiss, A.A. Soos, T. Tolgyes, A. Bursics, A. Szucs, L. Harsanyi, A. Kittel, A. Gezsi, E.I. Buzas, and Z. Wiener, *Shared extracellular vesicle miRNA profiles of matched ductal pancreatic adenocarcinoma organoids and blood plasma samples show the power of organoid technology*. Cell Mol Life Sci, 2021. **78**(6): p. 3005-3020.
 90. Lesina, M., S.M. Wormann, P. Neuhofer, L. Song, and H. Algul, *Interleukin-6 in inflammatory and malignant diseases of the pancreas*. Semin Immunol, 2014. **26**(1): p. 80-87.
 91. Mews, P., P. Phillips, R. Fahmy, M. Korsten, R. Pirola, J. Wilson, and M. Apte, *Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis*. Gut, 2002. **50**(4): p. 535-541.
 92. Szvicsek, Z., A. Oszvald, L. Szabo, G.O. Sandor, A. Kelemen, A.A. Soos, K. Paloczi, L. Harsanyi, T. Tolgyes, K. Dede, A. Bursics, E.I. Buzas, A. Zeold, and Z. Wiener, *Extracellular vesicle release from intestinal organoids is modulated by Apc mutation and other colorectal cancer progression factors*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(12): p. 2463-2476.
 93. Wang, X., J. Moon, M.E. Dodge, X. Pan, L. Zhang, J.M. Hanson, R. Tuladhar, Z. Ma, H. Shi, N.S. Williams, J.F. Amatruda, T.J. Carroll, L. Lum, and C. Chen, *The development of highly potent inhibitors for porcupine*. J Med Chem, 2013. **56**(6): p. 2700-2704.
 94. Huang, Y., L. Yuan, T. Li, X. Liu, Y. Yu, H. Ouyang, and B. Wang, *IWP2 impairs the development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos via Wnt signaling pathway inactivation*. Biomed Rep, 2017. **7**(1): p. 36-40.
 95. Liu, J., S. Pan, M.H. Hsieh, N. Ng, F. Sun, T. Wang, S. Kasibhatla, A.G. Schuller, A.G. Li, D. Cheng, J. Li, C. Tompkins, A. Pferdekamper, A. Steffy, J. Cheng, C.

- Kowal, V. Phung, G. Guo, Y. Wang, M.P. Graham, S. Flynn, J.C. Brenner, C. Li, M.C. Villarroel, P.G. Schultz, X. Wu, P. McNamara, W.R. Sellers, L. Petruzzelli, A.L. Boral, H.M. Seidel, M.E. McLaughlin, J. Che, T.E. Carey, G. Vanasse, and J.L. Harris, *Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(50): p. 20224-20229.
96. Barkauskas, C.E., M.I. Chung, B. Fioret, X. Gao, H. Katsura, and B.L. Hogan, *Lung organoids: current uses and future promise*. Development, 2017. **144**(6): p. 986-997.
97. Scheraga, R.G., C. Thompson, M.E. Tulapurkar, A.C. Nagarsekar, M. Cowan, R. Potla, J. Sun, R. Cai, C. Logun, J. Shelhamer, N.W. Todd, I.S. Singh, I.G. Luzina, S.P. Atamas, and J.D. Hasday, *Activation of heat shock response augments fibroblast growth factor-1 expression in wounded lung epithelium*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016. **311**(5): p. L941-L955.
98. Gross, J.C., V. Chaudhary, K. Bartscherer, and M. Boutros, *Active Wnt proteins are secreted on exosomes*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(10): p. 1036-1045.
99. Saha, S., E. Aranda, Y. Hayakawa, P. Bhanja, S. Atay, N.P. Brodin, J. Li, S. Asfaha, L. Liu, Y. Tailor, J. Zhang, A.K. Godwin, W.A. Tome, T.C. Wang, C. Guha, and J.W. Pollard, *Macrophage-derived extracellular vesicle-packaged WNTs rescue intestinal stem cells and enhance survival after radiation injury*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13096.
100. Kopan, R. and M.X. Ilagan, *The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism*. Cell, 2009. **137**(2): p. 216-233.
101. Zhou, J., C. Li, N. Sachs, M.C. Chiu, B.H. Wong, H. Chu, V.K. Poon, D. Wang, X. Zhao, L. Wen, W. Song, S. Yuan, K.K. Wong, J.F. Chan, K.K. To, H. Chen, H. Clevers, and K.Y. Yuen, *Differentiated human airway organoids to assess infectivity of emerging influenza virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(26): p. 6822-6827.
102. Tammela, T., F.J. Sanchez-Rivera, N.M. Cetinbas, K. Wu, N.S. Joshi, K. Helenius, Y. Park, R. Azimi, N.R. Kerper, R.A. Wesselhoeft, X. Gu, L. Schmidt, M. Cornwall-Brady, O.H. Yilmaz, W. Xue, P. Katajisto, A. Bhutkar, and T. Jacks, *A Wnt-producing niche drives proliferative potential and progression in lung adenocarcinoma*. Nature, 2017. **545**(7654): p. 355-359.

103. He, T., J. Guo, H. Song, H. Zhu, X. Di, H. Min, Y. Wang, G. Chen, W. Dai, J. Ma, X. Sun, and J. Ma, *Nutlin-3, an Antagonist of MDM2, Enhances the Radiosensitivity of Esophageal Squamous Cancer with Wild-Type p53*. *Pathol Oncol Res*, 2018. **24**(1): p. 75-81.
104. Kuzet, S.E. and C. Gaggioli, *Fibroblast activation in cancer: when seed fertilizes soil*. *Cell Tissue Res*, 2016. **365**(3): p. 607-619.
105. Lundin, A. and B. Driscoll, *Lung cancer stem cells: progress and prospects*. *Cancer Lett*, 2013. **338**(1): p. 89-93.
106. Pandol, S., M. Edderkaoui, I. Gukovsky, A. Lugea, and A. Gukovskaya, *Desmoplasia of pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2009. **7**(11 Suppl): p. S44-47.
107. McNeill, B., A. Ostojic, K.J. Rayner, M. Ruel, and E.J. Suuronen, *Collagen biomaterial stimulates the production of extracellular vesicles containing microRNA-21 and enhances the proangiogenic function of CD34(+) cells*. *FASEB J*, 2019. **33**(3): p. 4166-4177.
108. Anguiano, M., C. Castilla, M. Maska, C. Ederra, R. Pelaez, X. Morales, G. Munoz-Arrieta, M. Mujika, M. Kozubek, A. Munoz-Barrutia, A. Rouzaut, S. Arana, J.M. Garcia-Aznar, and C. Ortiz-de-Solorzano, *Characterization of three-dimensional cancer cell migration in mixed collagen-Matrigel scaffolds using microfluidics and image analysis*. *PLoS One*, 2017. **12**(2): p. e0171417.
109. Wen, Y., Y. Chen, G. Wang, K. Abhange, F. Xue, Z. Quinn, W. Mao, and Y. Wan, *Factors influencing the measurement of the secretion rate of extracellular vesicles*. *Analyst*, 2020. **145**(17): p. 5870-5877.
110. Lindenbergh, M.F.S., D.G.J. Koerhuis, E.G.F. Borg, E.M. van 't Veld, T.A.P. Driedonks, R. Wubbolts, W. Stoorvogel, and M. Boes, *Bystander T-Cells Support Clonal T-Cell Activation by Controlling the Release of Dendritic Cell-Derived Immune-Stimulatory Extracellular Vesicles*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 448.
111. King, H.W., M.Z. Michael, and J.M. Gleadle, *Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells*. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p. 421.
112. Kucharzewska, P., H.C. Christianson, J.E. Welch, K.J. Svensson, E. Fredlund, M. Ringner, M. Morgelin, E. Bourseau-Guilmain, J. Bengzon, and M. Belting, *Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-*

- dependent activation of vascular cells during tumor development. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(18): p. 7312-7317.
113. Zhang, W., X. Zhou, Q. Yao, Y. Liu, H. Zhang, and Z. Dong, *HIF-1-mediated production of exosomes during hypoxia is protective in renal tubular cells. Am J Physiol Renal Physiol*, 2017. **313**(4): p. F906-F913.
 114. Sasaki, N. and H. Clevers, *Studying cellular heterogeneity and drug sensitivity in colorectal cancer using organoid technology. Curr Opin Genet Dev*, 2018. **52**: p. 117-122.
 115. Fiorini, E., L. Veghini, and V. Corbo, *Modeling Cell Communication in Cancer With Organoids: Making the Complex Simple. Front Cell Dev Biol*, 2020. **8**: p. 166.
 116. Fujii, M. and T. Sato, *Somatic cell-derived organoids as prototypes of human epithelial tissues and diseases. Nat Mater*, 2021. **20**(2): p. 156-169.
 117. Schutgens, F. and H. Clevers, *Human Organoids: Tools for Understanding Biology and Treating Diseases. Annu Rev Pathol*, 2020. **15**: p. 211-234.
 118. Togasaki, K., S. Sugimoto, Y. Ohta, K. Nanki, M. Matano, S. Takahashi, M. Fujii, T. Kanai, and T. Sato, *Wnt Signaling Shapes the Histologic Variation in Diffuse Gastric Cancer. Gastroenterology*, 2021. **160**(3): p. 823-830.
 119. Barrott, J.J., G.M. Cash, A.P. Smith, J.R. Barrow, and L.C. Murtaugh, *Deletion of mouse *Porcn* blocks Wnt ligand secretion and reveals an ectodermal etiology of human focal dermal hypoplasia/Goltz syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(31): p. 12752-12757.
 120. Koo, B.K., J.H. van Es, M. van den Born, and H. Clevers, *Porcupine inhibitor suppresses paracrine Wnt-driven growth of *Rnf43;Znrf3*-mutant neoplasia. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(24): p. 7548-7550.
 121. van de Wetering, M., H.E. Francies, J.M. Francis, G. Bounova, F. Iorio, A. Pronk, W. van Houdt, J. van Gorp, A. Taylor-Weiner, L. Kester, A. McLaren-Douglas, J. Blokker, S. Jaksani, S. Bartfeld, R. Volckman, P. van Sluis, V.S. Li, S. Seepo, C. Sekhar Pedamallu, K. Cibulskis, S.L. Carter, A. McKenna, M.S. Lawrence, L. Lichtenstein, C. Stewart, J. Koster, R. Versteeg, A. van Oudenaarden, J. Saez-Rodriguez, R.G. Vries, G. Getz, L. Wessels, M.R. Stratton, U. McDermott, M.

- Meyerson, M.J. Garnett, and H. Clevers, *Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients*. *Cell*, 2015. **161**(4): p. 933-945.
122. Maia, J., S. Caja, M.C. Strano Moraes, N. Couto, and B. Costa-Silva, *Exosome-Based Cell-Cell Communication in the Tumor Microenvironment*. *Front Cell Dev Biol*, 2018. **6**: p. 18.
123. Novo, D., N. Heath, L. Mitchell, G. Caligiuri, A. MacFarlane, D. Reijmer, L. Charlton, J. Knight, M. Calka, E. McGhee, E. Dornier, D. Sumpton, S. Mason, A. Echard, K. Klinkert, J. Secklehner, F. Kruiswijk, K. Vousden, I.R. Macpherson, K. Blyth, P. Bailey, H. Yin, L.M. Carlin, J. Morton, S. Zanivan, and J.C. Norman, *Mutant p53s generate pro-invasive niches by influencing exosome podocalyxin levels*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 5069.
124. Valencia, K., D. Luis-Ravelo, N. Bovy, I. Anton, S. Martinez-Canarias, C. Zanduetta, C. Ormazabal, I. Struman, S. Tabruyn, V. Rebmann, J. De Las Rivas, E. Guruceaga, E. Bandres, and F. Lecanda, *miRNA cargo within exosome-like vesicle transfer influences metastatic bone colonization*. *Mol Oncol*, 2014. **8**(3): p. 689-703.
125. Oszvald, A., Z. Szvicsek, G.O. Sandor, A. Kelemen, A.A. Soos, K. Paloczi, A. Bursics, K. Dede, T. Tolgyes, E.I. Buzas, A. Zeold, and Z. Wiener, *Extracellular vesicles transmit epithelial growth factor activity in the intestinal stem cell niche*. *Stem Cells*, 2020. **38**(2): p. 291-300.
126. Chen, Y.C., H.S. Hsu, Y.W. Chen, T.H. Tsai, C.K. How, C.Y. Wang, S.C. Hung, Y.L. Chang, M.L. Tsai, Y.Y. Lee, H.H. Ku, and S.H. Chiou, *Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells*. *PLoS One*, 2008. **3**(7): p. e2637.
127. Jia, Z., Y. Zhang, A. Yan, M. Wang, Q. Han, K. Wang, J. Wang, C. Qiao, Z. Pan, C. Chen, D. Hu, and X. Ding, *1,25-dihydroxyvitamin D3 signaling-induced decreases in IRX4 inhibits NANOG-mediated cancer stem-like properties and gefitinib resistance in NSCLC cells*. *Cell Death Dis*, 2020. **11**(8): p. 670.
128. Leung, E.L., R.R. Fiscus, J.W. Tung, V.P. Tin, L.C. Cheng, A.D. Sihoe, L.M. Fink, Y. Ma, and M.P. Wong, *Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties*. *PLoS One*, 2010. **5**(11): p. e14062.

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

1. Gyöngyvér Orsolya Sándor, András Áron Soós, Péter Lőrincz, Livia Rojkó, Tünde Harkó, Levente Bogyó, Tamás Tölgyes, Attila Bursics, Edit I Buzás, Judit Moldvay, Zoltán Wiener

Wnt activity and cell proliferation are coupled to extracellular vesicle release in multiple organoid models

FRONTIERS IN CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY (2021), doi: 10.3389/fcell.2021.670825

IF: 5.186

2. Anikó Zeöld¹, Gyöngyvér Orsolya Sándor¹, Anna Kiss, András Áron Soós, Tamás Tölgyes, Attila Bursics, Ákos Szűcs, László Harsányi, Ágnes Kittel, András Gézsi, Edit I Buzás, Zoltán Wiener

Shared extracellular vesicle miRNA profiles of matched ductal pancreatic adenocarcinoma organoids and blood plasma samples show the power of organoid technology

CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES (2020), doi: 10.1007/s00018-020-03703-8.

IF: 6.496

¹Megosztott első szerzők

Értekezéshez felhasznált közlemények kumulatív impakt faktora: 11,682

Ebből első szerzős impakt faktor: 11,682

11.2. Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

1. Ádám Oszvald, Zsuzsanna Szvicsek, **Gyöngyvér Orsolya Sándor**, Andrea Kelemen, András Áron Soós, Krisztina Pálóczi, Attila Bursics, Kristóf Dede, Tamás Tölgyes, Edit I Buzás, Anikó Zeöld, Zoltán Wiener

Extracellular vesicles transmit epithelial growth factor activity in the intestinal stem cell niche

STEM CELLS 38: 2pp. 291-300. (2020)

IF:6,022

2. Zsuzsanna Szvicsek, Ádám Oszvald, Lili Szabó, **Gyöngyvér Orsolya Sándor**, Andrea Kelemen, András Áron Soós, Krisztina Pálóczi, László Harsányi, Tamás Tölgyes, Kristóf Dede, Attila Bursics, Edit I Buzás, Anikó Zeöld, Zoltán Wiener

Extracellular vesicle release from intestinal organoids is modulated by Apc mutation and other colorectal cancer progression factors

CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 76(12): 2463–2476. (2019)

IF:6,496

3. Péter Nagy, **Gyöngyvér O Sándor**, Gábor Juhász

Autophagy maintains stem cells and intestinal homeostasis in Drosophila

SCIENTIFIC REPORTS, volume 8, Article number: 4644 (2018)

IF:4,011

4. Péter Nagy, Zsuzsanna Szatmári, **Gyöngyvér O Sándor**, Mónika Lippai, Krisztina Hegedűs, Gábor Juhász

Drosophila Atg16 promotes enteroendocrine cell differentiation via regulation of intestinal Slit/Robo signaling

DEVELOPMENT, 144: 3990-4001 (2017)

IF:5,413

5. Péter Nagy, Laura Kovács, **Gyöngyvér O Sándor**, Gábor Juhász

Stem-cell-specific endocytic degradation defects lead to intestinal dysplasia in *Drosophila*

DISEASE MODELS & MECHANISMS. 9: 501-512 (2016)

IF:4,691

Összes közlemény kumulatív impakt faktora: 38,315

Ebből elsőszerezős impakt faktor: 11,682

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Buzás Editnek, a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt-, és Immunbiológiai Intézetének igazgatójának, hogy lehetőséget adott, hogy ebben az intézetben végezhessem el kutatásaimat a PhD tanulmányaim során, és hogy ajánlásokkal mindig támogatta pályázataimat.

Köszönöm Dr. Wiener Zoltánnak, hogy elvállalta témavezetésemet, és hogy munkám során folyamatosan segített, és sok jó ötlettel és észrevétellel támogatott. Neki köszönhetően több hazai és külföldi konferencián is lehetőségem volt bemutatni a témámat. A négy év alatt rengeteg tudást és tapasztalatot szereztem általa, amik későbbi pályafutásom során a hasznomra válnak majd.

Hálás vagyok a Molekuláris Onkobiológiai Kutatócsoport jelenlegi és volt tagjaink: Dr. Zeöld Anikónak, Soós András Áronnak, Dr. Szvicsek Zsuzsannának, Dr. Oszvald-Haibach Ádámnak és Kelemen Andreának, hogy ha valamilyen problémám adódott, mindig fordulhattam hozzájuk, továbbá hogy ennek a munkahelyen kívül is összetartó és egymást támogató csapatnak a tagja lehettem. Külön szeretném megköszönni Soós András Áronnak a közös munkát és a sok segítséget, illetve Dr. Szvicsek Zsuzsannának, hogy még azután is folyamatosan segített, miután már nem a kutatócsoportunkban dolgozott. Szeretném megköszönni Dr. Pós Zoltánnak, hogy ha valamilyen kérésem vagy kérdésem volt, mindig bátran fordulhattam hozzá segítségért, és mindig biztosította számomra az egereket a kísérleteimhez. Továbbá rengeteg köszönettel tartozom Dr. Molnár-Érsek Barbarának, Dr. Lupsa Nikolettnek, Dr. Takács Angélának, és Koncz Annának a laborban együtt eltöltött vidám percekért, és hogy mindig számíthattam rájuk, akár lelki támogatásra, akár más segítségre volt szükségem.

Köszönöm Dr. Lőrincz Péternek az elektronmikroszkópos képeket, amelyek elkészítését a pandémia ellenére is szívesen vállalta. Köszönöm Dr. Bödör Csabának és Gróf Stefániának a szekvenálásban nyújtott nagy segítségüket. Továbbá szeretném megköszönni Dr. Moldvay Juditnak, Dr. Harkó Tündének, Dr. Rojkó Líviának, és Dr. Bogyó Leventének, hogy az Országos Korányi Pulmonológiai Intézetből biztosították kísérleteimhez a humán normál tüdő és LUAD szövetmintákat.

Hálával tartozom Dr. Nagy Péternek és Dr. Faddy (Szatmári) Zsuzsannának, hogy annak ellenére, hogy már nem egy kutatóhelyen dolgozunk, mégis aggódó figyelemmel kísérték végig PhD pályafutásomat és mindig segítő tanácsokkal láttak el.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm édesanyámnak Szabó Ágnes Ilonának és testvéremnek Dr. Sándor Eszter Anitának, hogy PhD tanulmányaim során végig mellettem álltak és tartották bennem a lelket, és szereteteli és nyugodt családi háttérrel biztosítottak számomra. Nélkülük nem lettem volna képes befejezni a PhD képzést.