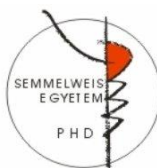


Az extracelluláris vezikulák kibocsátását befolyásoló tényezők vizsgálata normál és tumor szövet eredetű organoid modellekkel

Doktori tézisek

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 elnöke:

Prof. Dr. Igaz Péter, DSc, egyetemi tanár

Komplex vizsga szakmai bizottság tagjai:

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

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

Budapest
2021.

1. Irodalmi háttér

A tumoros betegségek közül a két leggyakoribb ok a tumorok általi halálozási listán a hasnyálmirigy duktális adenokarcinóma (PDAC) és a nem kissejtes tüdőrák (NSCLC). Mindkét betegségnél az 5 éves túlélési valószínűség kevesebb, mint 15%. A PDAC a leggyakoribb hasnyálmirigy tumor. Több környezeti faktor is szerepet játszik a kialakulásában: legnagyobb mértékben a dohányzás, ezt követően pedig a diabetes mellitus és a krónikus hasnyálmirigy gyulladás (CP). Leggyakrabban a *KRAS* és a *TP53* gének mutációit figyelhetjük meg a betegek mintáiban. Az NSCLC heterogén betegségcsoport, a leggyakoribb altípusa a tüdő adenokarcinoma (LUAD). A LUAD epithél eredetű, mirigyes differenciálódású, mucin termelő tumortípus, amely a légutak disztális részén alakul ki. Mint minden tüdőtumor esetében, a dohányzás itt is jelentős mértékben növeli a kialakulás esélyét, azonban a nem dohányzók körében ez a leggyakrabban kialakuló tüdőtumor. A *TP53* génjében található leggyakrabban mutáció ezeknél a tumoroknál. Mindkét tumortípusnál a rossz túlélési adatok egyik fontos oka, hogy a korai diagnózis nem megoldott. Éppen ezért fontos a betegség kialakulásához vezető sejtbioológiai folyamatok, főként a tumor mikrokörnyezetében végbemenő változások hatásának jobb megértése.

Az extracelluláris vezikulák (EV) biológiai membránnal körülvett, a sejtek által kibocsátott partikulumok, melyek a célsejtek működését több módon is képesek befolyásolni pl. miRNS, fehérjék, lipidek transzportja által, így a sejtek közötti kommunikáció új módját testesítik meg. Minthogy a biológiailag fontos molekulák védett módon, a testfolyadékok enzimeitől elzárva és koncentrálnak, így az EV-k detektálása a korai tumordiagnosztika egyik legígéretesebb irányának számít. Az EV-knek igazolt szerepük van a tumorigenezisben több tumortípus esetében is, a tumorok kialakulásának esélyét megnövelő tényezőknek az EV-kre kifejtett hatása azonban még nem ismert.

A tumorok mikrokörnyezetének változásai jelentősen befolyásolják a tumorsejtek életképességét és a tumorok növekedését. A Wnt jelátviteli útvonal kiemelkedő szerepet játszik több tumortípus

kialakulásában, fennmaradásában és metasztázis képzésében. Az ECM változásai és a tumor asszociált fibroblasztok (CAF) jelenléte szintén nagy hatással vannak a tumor sejtekre. Ezen folyamatoknak az EV termelésre gyakorolt hatásának jobb megértése hozzájárulhat az EV alapú diagnosztika kidolgozásához.

2. Célkitűzések

Munkánk során elsődleges célunk volt a mikrokörnyezet hatását vizsgálni az EV szekréció 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 krónikus hasnyálmirigy gyulladás (CP) jelentős kockázati tényező PDAC-re. Munkacsoportunk eredményei alapján a PDAC-hoz hasonlóan a CP-ben is emelkedett EV szint mutatható ki. Eger hasnyálmirigy duktális organoid modell felhasználásával arra voltunk kíváncsiak, hogy van-e hatásuk az EV termelésre olyan mikrokörnyezeti változásoknak (citokinek, az ECM változása), melyek közősek 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 eger modellek esetében azonosítottak egy Wnt termelő mikroniche-t, mely központi jelentőségű a tumorsejtek proliferációs kapacitása szempontjából. Kísérleteink során ennek a niche-nek a jelenlétét igazolni kívántuk humán LUAD modellben is.

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?

3. Módszerek

3.1. A sejt kultúrák fenntartása

Munkánk során A549 és H1975 nem kissejtes tüdő adenokarcinóma, valamint kontrollként immortalizált normál tüdő epithél BEAS-2B sejt vonalakat használtunk. A 3D tenyésztéskor 14 napig növekedési faktor csökkentett, fenolvörös-mentes, 25 μ l-es Matrigel cseppekbe 20 000 sejtet helyeztünk, amelyek szferoidokat képeztek.

3.2. Egér hasnyálmirigy és tüdő bronchioláris organoidok létrehozása és fenntartása

A hasnyálmirigyből származó duktális eredetű organoidok izolálásához C57Bl/6J egerek hasnyálmirigyét használtuk. A szövetmintát feldaraboltuk, és emésztő puffert tettünk rá. Ezt követően mikroszkóp alatt kiválogattuk a duktális eredetű részeket. A tüdő bronchioláris organoidok előállításánál a szövetmintát az emésztés után 70 μ m-es sejt szűrőn átszűrtük. A duktális és bronchioláris mintákat PBS-sel mostuk, majd centrifugálást követően beágyaztuk őket növekedési faktor csökkentett, fenolvörös-mentes Matrigel cseppekbe és kémiaiilag definiált médiumban tenyésztettük. Az organoidokon a tápot 4 naponta cseréltük. 7-8 naponta eltávolítottuk őket a 3D mátrixból, majd mechanikusan kisebb darabokra szedtük az organoidokat és ismét Matrigel-be ágyaztuk be. Egyes kísérletekben az organoidok médiumához Wnt útvonal gátló

IWP2-t, illetve LGK974-et, vagy Notch útvonal gátló DBZ-t, illetve DAPT-ot adtunk. Továbbá bizonyos kísérleteknél az organoidokat IL-1 β -val, IL-6-tal, vagy TNF- α -val kezeltük.

3.3. Egér tüdő eredetű fibroblaszt kultúrák létrehozása és fenntartása

A tüdőből származó fibroblasztok izolálásánál C57Bl/6J egerek teljes tüdejét eltávolítottuk. A szövetmintát feldaraboltuk, és emésztő puffert tettünk rá. Emésztést követően 2x mostuk a sejteket PBS-sel, majd fibroblaszt médiumban tenyésztettük. Egyes kísérletekben az fibroblasztok médiumához Wnt szekréció gátló LGK974-et adtunk.

3.4. Humán bronchioláris és LUAD eredetű organoid és fibroblaszt kultúrák létrehozása és fenntartása

A normál és a tumoros eredetű szövetmintákat feldaraboltuk, és emésztő puffert tettünk rá. Emésztést követően 2x mostuk a mintákat PBS-sel, majd beágyaztuk őket 25 μ l-es növekedési faktor csökkentett, fenolvörös-mentes Matrigel cseppekbe. A tumoros eredetű organoidokat 10 napig nutlin-3 kezeléssel szelektáltuk, mely hatására csak azon sejtek éltek túl, melyek nem tartalmaztak vad típusú P53-at.

A fibroblasztok izolálása során a sejteket fibroblaszt médiumban tenyésztettük. Bizonyos kísérleteknél organoid felülúszóból izolált EV-vel kezeltünk (ld. alább), FBS mentes médiumban hozzáadva a fibroblasztokhoz.

3.5. Kollagén alapú organoid kultúrák

A hasnyálmirigy egér organoidokat eltávolítottuk a Matrigel mátrixból, majd kétszer mostuk PBS-sel. Ezután I-es típusú kollagénbe, vagy I-es típusú kollagén és Matrigel különböző arányú keverékébe (25%, 50% vagy 75% kollagén I tartalmú) ágyaztuk be az organoidokat. Egyes kísérletekben az egér hasnyálmirigy organoidok médiumához IL-1 β , IL-6, vagy TNF- α citokineket adtunk.

3.6. EV izolálás ellenanyaggal fedett gyöngyökkel

A sejtek és az organoidok az izolálás előtt 2 nappal kaptak friss médiumot-. A felülúszóból differenciál centrifugálással eltávolítottuk először a sejtörmeléket, majd a nagyobb vezikulákat, illetve apoptotikus testeket. Kontrollként üres, EV-mentes médiumot használtunk, amelyen ugyanezeket a centrifugálási lépéseket végeztük el. A centrifugálás után kapott felülúszóhoz anti-CD63 vagy anti-CD81 ellenanyaggal konjugált mágneses gyöngyöt adtunk. A gyöngyöket előzőleg 1%-os BSA-val blokkoltuk. A gyöngyökhöz kötött EV-eket fluoreszcensen jelzett anti-CD63 vagy anti-CD81 ellenanyaggal és áramlási citometriával mutattuk ki. A sejt felülúszó leszívása után a sejteket minden esetben tripánkéék festést követően megszámloltuk és sejtszámra normalizáltuk az áramlási citometriával (FACS) kapott eredményeket.

3.7. NTA analízis (Nanoparticle Tracking Analysis)

A sejtek és organoidok előkészítése hasonló módon történt, mint az áramlási citometriás mérések előtt. A differenciál centrifugálást követően a mintákból hígítást készítettünk, melyben a partikulum méreteloszlást és koncentrációt Zeta View Z-NTA műszer segítségével határoztuk meg.

3.8. EV izolálás funkcionális vizsgálatokhoz

Szérum mentes médiumban tenyésztettük a fibroblasztokat és az organoidokat is 2 napig, majd a felülúszón differenciál centrifugálást és ultracentrifugálást végeztünk. A pelletet mosás után PBS-ben vettük fel, amelyből az EV mennyiséget NTA-val meghatároztuk, majd az EV-eket egér vagy humán tüdő fibroblasztokhoz, illetve humán tüdő organoidokhoz adtuk.

3.9. Áramlási citométer és sejt szortolás

Az organoidokat és a sejt vonalak által képzett szferoidokat eltávolítottuk a Matrigelből, majd TrypLE-lel kezeltük a mintákat. Az

egysejtes szuszpenzióban az elsődleges ellenanyaggal és a másodlagos ellenanyaggal való inkubálást követően áramlási citométerrel (FACS) detektáltuk a pozitív sejteket. Egyes kísérletekben az organoidokból származó sejtpopulációkat fluoreszcencián alapuló sejtiszorítóval (Sony SH800S) médiumot vagy Qiazol lizis puffert tartalmazó csövekbe választottuk szét, hogy organoid kultúrákat indítsunk, vagy RNS-t izoláljunk.

3.10. Immuncitokémia

A sejteket és az organoidokat 4 vagy 8 kamrás tárgylemezeken tenyésztettük. A sejteket fixálást követően blokkoló pufferben permeabilizáltuk, majd a mintákat elsődleges ellenanyagban inkubáltuk 4°C-on éjen át. Másnap a felesleges ellenanyagot kimostuk a mintákból és másodlagos ellenanyagban inkubáltuk szobahőn 2 órát. A mintákat DAPI tartalmú fedőanyaggal való lefedést követően konfokális mikroszkóppal (Zeiss LSM800 és Leica TCS SP8) fotóztuk le, és a Zen 2.6 (blue edition) és ImageJ szoftverekkel értékeltük ki.

3.11. Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

Az ultracentrifugált felülúszóból kapott pelletből 2 µl-t hártával bevont rácsos gridre szárítottuk. Ezt követően glutáraldehiddel ráfixáltuk a mintát a gridre, majd foszfovolfram savval kontrasztosítottunk. Végül dr. Lőrincz Péter (ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológia Tanszék) segítségével TEM képeket készítettünk a gridekről (JEM-1011 transmission electron microscope).

3.12. RNS izolálás és mRNS mérés

A sejttenyészetekből és az organoidokból teljes RNS-t izoláltunk a miRNEasy Micro Kit-tel, majd az RNS koncentrációt NanoDrop készülékkel határoztuk meg. Az mRNS mérésekhez 0,5 µg totál RNS-t írtunk át cDNS-sé. A kvantitatív PCR reakcióhoz a SyberGreen detektálási módszert alkalmaztuk. Az egér hasnyálmirigy

organoid vizsgálatokhoz TaqMan próbákat használtunk. A méréseket Applied Biosystems 7900HT Fast real-time PCR készülékkel végeztük, az eredményeket háztartási génre (*HPRT1*) normalizáltuk, majd bizonyos kísérletekben a heatmap képeken a z-score értékeket ábrázoltuk a Heatmapper program segítségével (www.heatmapper.ca).

3.13. Szekvenálás

A cDNS mintákból a megfelelő szekvenciákat a Phusion High Fidelity DNA Polymerase-zal amplifikáltuk fel. A PCR terméket 2% agaróz gélből izoláltuk, majd dr. Bödör Csaba (Semmelweis Egyetem, I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet) munkacsoportja segítségével a forward és reverse primerekkel is elvégeztük a szekvenálást Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer készülékkel. Az adatokat a Chromas 2.6 software segítségével elemeztük.

3.14. 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 logaritmikus transzformációt hajtottunk végre és az így átalakított adatokra alkalmaztuk az egymintás t-tesztet.

4. Eredmények

4.1. A kollagén felhalmozódása emelkedett EV szintet eredményez egér hasnyálmirigy duktális organoidokban

Egy nemrégiben végzett átfogó tanulmány kimutatta, hogy a tumorok mikrokörnyezetének módosulása, mint például a PDAC

során az ECM változásai, már jelen vannak a krónikus hasnyálmirigy gyulladásban (CP) is, ami a PDAC kialakulásának egyik legfontosabb rizikófaktora. Korábbi eredményeink alapján továbbá nem csak a PDAC, hanem a CP betegekben is emelkedett EV szint mutatható ki. A pre-tumor stádiumban a mikro környezet változásának modellezésére egér hasnyálmirigy duktális organoidokat izoláltunk. Bizonyítottuk, hogy csak duktális eredetű organoidokat tartalmaz a kultúránk, és hogy az EV-k kimutathatók az organoidok felülűszójában. Így elmondhatjuk, hogy az egér hasnyálmirigy organoidjaink megfelelő modellnek bizonyultak kísérleteinkhez.

Ezt követően olyan mikro környezeti faktorokra fókuszáltunk, amelyek a CP esetében meghatározóak: a kollagén I felhalmozódása, valamint az IL-1 β , az IL-6, és a TNF- α citokinek jelenléte. Amikor tiszta kollagén I-ben tenyésztettük az organoidokat, az rövid időn belül a pusztulásukhoz vezetett, a citokinek hozzáadása az organoidok médiumához azonban nem okozott változást az EV kibocsátásban. Viszont amikor a kollagén és Matrigel mátrix különböző arányú keverékében tenyésztettük őket, akkor megnövekedett az EV szint az organoidok felülűszójában. Megfigyeltük, hogy minél nagyobb százalékban tartalmaz a mátrix kollagén I-et, annál több EV-t tudunk detektálni. Kollagén hatására azonban nem nőtt meg sem az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek, sem a Ki67+ proliferáló sejtek aránya. 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 kibocsátásra.

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.

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

Kutatócsoportunk korábban kapcsolatot talált a Wnt fehérjék szekréciója, a sejtproliferáció és az EV kibocsátás között bélhám sejtekben. Annak vizsgálatára, hogy ez egy általános jelenség és más szövetben is megfigyelhető-e, először egér hasnyálmirigy duktális organoidokon teszteltük hipotézisünket. Az organoid sejtek nagy része pozitív volt a Porcn jelenlétére, mely a Wnt fehérjék szekréciójának központi enzime. Ezen kívül a β -katenint is detektáltuk egyes sejtek sejtmagjában, ami a Wnt jelátviteli útvonal aktivitását mutatja.

A Porcn enzim gátlásával a Wnt fehérjék poszt-transzlációs módosítását gátolni tudjuk, ami így a Wnt fehérjék csökkent szekréciójához és aktivitásához vezet. Kísérleteink során két általánosan használt PORCN inhibitor alkalmaztunk, az IWP2-t és LGK974-et, melyek hatására lecsökkent a Ki67+ proliferáló sejtek száma az organoidokban, azonban az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek száma nem változott. Továbbá a Wnt útvonal célgénjeiről átíródó RNS-ek szintjei is lecsökkentek. Ezzel párhuzamosan csökkent EV kibocsátást detektáltunk.

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

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

Következő modellnek az egér bronchioláris organoidokat választottuk. Ezek az organoidok az összes bronchioláris sejtípust tartalmazzák (csillós hámsejt, bronchioláris exokrin sejt, kehelysejt, bazális sejt), így jól reprezentálják az *in vivo* körülményeket.

Legelőször a Porcn+ sejteket detektáltuk, amelyek heterogenitást mutattak és jóval kisebb mennyiségben voltak megtalálhatók, mint az egér hasnyálmirigy duktális organoidok esetében. Továbbá csak a sejtek egy kisebb részében tudtuk detektálni a Ki67-et és sejtmagi lokalizációjú β -katenint, 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. Eredményeink arra utalnak, hogy az organoid sejtek szubpopulációi hozzájárulnak a proliferáló sejtek számára a megfelelő mikroniche kialakításához.

Mind az organoidokban, mind pedig a fibroblasztokban jellegzetes Wnt gének expresszióját tudtuk kimutatni. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a fibroblasztok is részt vesznek az organoid sejtek Wnt-függő heterogenitásának a kialakításában. A fibroblasztokból származó EV-k megnövelték az organoidokban az osztódó sejtek számát. A Wnt fehérjék szekrécióját általánosan gátoltuk a fibroblasztokban is LGK974 kezeléssel. Az ezt követően izolált fibroblaszt EV-kkel való kezeléssel az EV-k organoidokra való hatását is megakadályoztuk, vagyis nem tapasztaltunk sejtproliferáció növekedést. Az LGK974 kezelés a fibroblasztokban nem volt hatással sem az osztódó Ki67+, sem az apoptotikus aktív kaszpáz-3+ sejtek arányára. Továbbá az EV kibocsátást sem befolyásolta ezekben a sejtekben. Tehát mind a Porcn+ organoid sejtek, mind a fibroblasztokból származó EV-k fontos szerepet játszanak az organoidok proliferáló mikro környezetének kialakításában.

Az organoidokban az LGK974 kezelés nem csak a sejtproliferációt, hanem a tüdőre jellemző Wnt célgénnek RNS-ének az expresszióját is csökkentette, továbbá redukált EV kibocsátáshoz vezetett. Ezzel ellentétben, amikor a Notch aktivitását gátoltuk, nem tapasztaltunk különbséget sem a Ki67+ sejtek arányában, sem az organoidok EV kibocsátásában. Így ezek az eredmények azt mutatják, hogy a Wnt szekréció specifikus gátlása kritikusan módosítja a proliferáló sejtek számát, valamint az EV kibocsátás intenzitását a bronchioláris organoidokban is.

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

Annak tesztelésére, hogy a proliferáló sejtek százaléka korrelációban áll-e a humán szövetekben is az EV kibocsátás

mennyiségével, humán tüdőszövet mintákból bronchioláris organoidokat izoláltunk. Ezek az organoidok az összes bronchioláris sejtípust tartalmazták. Az egér bronchioláris organoidokhoz hasonlóan heterogenitást találtunk a PORCN-t expresszáló sejtek tekintetében, továbbá itt is az organoid sejtek egy alpopulációjában volt megtalálható a KI67 sejtosztódási marker. Bizonyos sejtekben pedig sejtmagi lokalizációjú β -katenint is detektáltunk, 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, ezzel megmutatva, hogy a bronchioláris organoidok képesek WNT ligandumokat előállítani önmaguk számára. A WNT fehérjék szekréciójának gátlása csökkentette a WNT célgének RNS szintjét, valamint a KI67+ osztódó sejtek számát az organoidokban, de az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek aránya ez esetben sem emelkedett. Az egér organoidokhoz hasonlóan az aktív WNT termelő sejtpopuláció méretének módosítása az EV szekréció változását eredményezte. Így elmondhatjuk, hogy a WNT termelő sejtek szubpopulációjának nagysága a normál humán bronchioláris organoidokban a proliferáló sejtek számával, valamint megnövekedett EV felszabadulással függ össze.

4.5. A humán LUAD organoidok olyan Wnt termelő mikrokörnyezettel rendelkeznek, amely befolyásolja a sejtproliferációt és az EV kibocsátás mértékét

Habár egér modellen már bizonyították, hogy a LUAD progressziójához nélkülözhetetlen, hogy kialakuljon a Wnt szekréció szempontjából az intratumorális heterogenitás, az ilyen mikrokörnyezet jelenlétét humán rendszerben még nem igazolták.

Ahhoz, hogy LUAD-ban tanulmányozzuk a WNT termelő mikrokörnyezet szerepét az EV szekrécióban, először kereskedelembe kapható sejtvonalakat használtunk. Annak tesztelésére, hogy mutatnak-e heterogenitást a WNT termelés szempontjából, primer NSCLC eredetű sejtvonalakat és immortális

kontroll tüdő hámsejteket tenyésztettünk 3D körülmények között. Érdekes módon egyik esetben sem volt jelen nagy mennyiségű PORCN+ sejt a szferoidokban, és az LGK974 kezelés nem változtatta meg a KI67+ sejtek és az EV szekréció százalékos arányát egyik 3D-s tenyészetben sem.

Ezt követően a már korábban publikált módszer szerint izoláltunk LUAD beteg eredetű tumoros organoidokat. A tumorból származó mintákból azonban nem csak tumor eredetű organoidok képződnek, hanem normál organoidok is, amelyek gyakran túlnövik a tumoros organoidokat. A *TP53* a leggyakrabban mutált gén a LUAD-ban, így nutlin-3 kezelést alkalmaztunk a *TP53* mutáns organoidok szelektálására. Míg a normál tüdő organoid tenyészetek egyike sem élte túl a nutlin-3 kezelést, a LUAD minták jelentős része tartalmazott organoidokat ezen szelektációs lépést követően. A szelektációt túlélő organoid vonalak további jellemzése érdekében a *KRAS* gént a mutációs forrópontokra nézve (12, 13, 61-es kodon) megszekvenáltuk.

Ezekben az organoidokban detektálni tudtunk különböző differenciálódási markerekkel rendelkező sejteket, de csak elhanyagolható számú KRT14+ bazális sejtet tartalmaztak a normál tüdő organoidokhoz képest, ami irodalmi adatok alapján szintén a tumoros eredetüket bizonyítja. Továbbá a LUAD organoidok egyes sejtjeiben nukleáris lokalizációjú β -katenint detektáltunk, illetve sejtes heterogenitást mutattak a PORCN és a KI67 esetében, tehát a WNT termelő mikrokönyezet megtalálható nem csak eger, hanem humán LUAD-ban is.

Annak vizsgálatára, hogy a proliferáló LUAD sejtek mennyiségét milyen hatások befolyásolják, LUAD betegek mintáiból fibroblaszt tenyészeteket (LUAD-F) is létrehoztunk. A LUAD sejteknek és a fibroblasztoknak ez esetben is jellegzetes, és csak részben átfedő WNT expressziós mintázata volt. Hasonlóan az eger bronchioláris organoidokhoz, a LUAD-F-ek által szekretált EV-k is növelték a proliferáló sejtek számát a LUAD organoidokban.

A WNT termelő sejtpopuláció további jellemzésére megvizsgáltuk, hogy a proliferáló és PORCN+ sejtek mely markerekkel jellemezhető sejtpopulációkra jellemzőek.

Kísérleteinkben megállapítottuk, 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.

Hasonlóan a normál humán bronchioláris organoidokhoz, az aktív WNT fehérjék szekréciójának gátlásakor a WNT célgének RNS szintjének csökkenését, illetve a proliferáló sejtek arányának és az EV termelés csökkenését figyeltük meg, míg az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek aránya ez esetben sem emelkedett.

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

4.6. A CD133-at expresszáló LUAD sejtpopuláció PORCN+ sejtekben gazdag organoidokat hoz 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. Annak vizsgálatára, hogy ez a sejtpopuláció más tulajdonságokkal rendelkezik-e a WNT termelő mikroniche létrehozására, mint más LUAD sejtek, LUAD organoid sejteket fluoreszcensen szortoltunk a CD133-mat nagy mennyiségben (CD133^{nagy}) és CD133-at kis mennyiségben, vagy egyáltalán nem (CD133^{kis/-}) expresszáló csoportokra. Nem találtunk különbséget a WNT célgének expressziójában a frissen szortolt sejtek között. Azonban a CD133^{nagy} sejtek nagyobb organoidokat képeztek, és ezeknek az organoidoknak magasabb volt a *CD133* RNS szintje, illetve több CD133+ sejtet tartalmaztak 2 héttel a szortolást követően is. Így az organoidok megtartják a különbséget a CD133 expressziós mintázatban. A CD133^{nagy} sejtekből képződött organoidokban a WNT aktivitás megemelkedett. 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 alcsoportja expresszáta ezt az enzimet, ami arra utal, hogy nem minden sejt képes aktív WNT ligandok termelésére. Ennek megfelelően a KI67+ proliferáló sejtek alacsonyabb számát detektáltuk a CD133^{kis/-} sejtekből származó organoidokban. Érdekes módon magasabb EV koncentrációt detektáltunk a CD133^{nagy} sejtekből származó LUAD organoidok felülúszóiban, amely organoidok több osztódó sejtet tartalmaztak.

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.

5. Következtetések

- A tumoros sejteknél megfigyelt nagyobb EV szekréció eredményeink alapján csak részben mutációk következménye. A hasnyálmirigy duktális organoidokban a kollagén I jelenléte, mely mind a PDAC-ben, mind pedig a PDAC egyik fő rizikófaktorának számító CP-ben is feldúsul, emelkedett EV szintet eredményezett.
- Kutatócsoportunk már egy másik organoid modellrendszeren, a CRC organoidokon bizonyította, hogy kapcsolat van a Wnt fehérjékre válaszoló sejtpopuláció mérete, a proliferáció és az EV kibocsátás között. Eredményeink alapján elmondható, hogy ez a jelenség nem csak erre a szövettípusra, hanem a hasnyálmirigy duktális organoidokra, normál tüdő bronchioláris organoidokra és LUAD organoidokra is igaz, így egy széleskörű mechanizmusról van szó.
- A hasnyálmirigy duktális organoidok esetében a legtöbb sejt pozitív volt a Porcn enzimre, mely a Wnt fehérjék

palmitoilálásáért és szekréciójáért felelős, így a Wnt termelő sejteket jelöli. A Porcn különböző inhibitorokkal való gátlásának következtében mind a proliferáló sejtek aránya, mind pedig az EV szekréció lecsökkent.

- A normál tüdő bronchioláris és a LUAD organoidok esetében a sejteknek csak egy alpopulációja tartalmazott PORCN enzimet. Bár a Wnt termelő mikroniche és annak kapcsolata a rossz túléléssel már ismert eger LUAD modellekben, kísérleteinkben bizonyítottuk a jelenlétét humán LUAD organoidok esetében is.
- Mind a normál bronchioláris, mind pedig a LUAD organoidokban is megfigyeltük, hogy PORCN gátló hatására lecsökkent a proliferáló sejtek aránya és az EV szekréció.
- Kísérleteinkben a LUAD organoidokból származó CD133+ sejtek olyan organoidokat hoztak létre, melyekben jelentősen feldúsultak a PORCN+ és az osztódó sejtek, valamint emelkedett EV kibocsátás volt megfigyelhető a CD133 negatív sejtek által képzett organoidokhoz képest. Mindez magyarázatot adhat arra, hogy irodalmi adatok alapján a CD133+ LUAD sejtpopuláció agresszív tulajdonságokkal rendelkezik.
- Bizonyítottuk, hogy a Wnt termelő és arra reagáló mikro környezet kialakításában nem csak az organoid sejtek, hanem a környező fibroblasztok által szekretált, Wnt fehérje tartalmú EV-k is jelentősen hozzájárulnak.

A dolgozat eredményei alapján elmondhatjuk, hogy i) a mikro környezetnek már a PDAC tumorigenezist megelőző fontos változásai is nagy hatással vannak a hasnyálmirigy duktális sejtek EV szekréciójára, valamint ii) korreláció figyelhető meg a Wnt termelő mikroniche mérete, az osztódó sejtek aránya és az EV kibocsátás intenzitása között több egészséges, valamint tumoros organoid esetében.

Minthogy az EV alapú, korai diagnosztikához szükséges az EV kibocsátást befolyásoló tényezők, valamint az EV-k sejt típus eredetének a feltérképezése, így eredményeink hozzájárulhatnak ezen

módszerek kidolgozásához PDAC és LUAD esetében, ami lényegesen megkönnyíthetné ezeknek a tumoroknak a tünetek előtti észrevételét.

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezéshez felhasznált 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

Az értekezéshez fel nem használt 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 elsőszerzős impakt faktor: 11.682