

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Organoid technológián és állatmodelleken alapuló vizsgálatok gasztrointesztinális tumorokban

Dr. Wiener Zoltán



**Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai
Intézet**

Budapest, 2023

1. Irodalmi háttér

Bevezetés

A gasztrointesztinális rendszert érintő tumorerő közé tartozó vastag- és végbélrák (CRC) a rákos betegségek általi halálozási listán a második-harmadik helyet foglalja el a nyugati társadalmakban, a hasnyálmirigy duktális adenokarcinoma (PDAC) 5 éves túlélése pedig 8% alatti, mely az elmúlt évtizedekben nem javult jelentősen. Mindkét tumortípus tehát kiemelt népegészségügyi problémának tekinthető, amelyek patomechanizmusa azonban még nem teljesen ismert. A CRC esetében a tumorsejtek mellett fontos szerepet játszanak az egyéb, ún. sztróma sejtek is, mint például limfociták, vagy a sztróma legnagyobb mennyiségben jelen lévő, és a betegek túlélésével negatív korrelációt mutató tumor-asszociált fibroblasztok. Bár az egérmmodellek a korai tumorigenezis bizonyos folyamatait jól reprezentálják, a mutációk felhalmozódásával járó progresszió vizsgálatára más, elsősorban humán szövetekből származó modellek szükségesek.

Az organoid technológia

Az organoidok szövetekből származó, *in vitro* 3D körülmények között, extracelluláris mátrix kivonatokban (pl. Matrigel-ben) fenntartott tenyészetek, melyek „miniszerveket” képeznek. Az organoidok megőrizhetik az *in vivo* szövetek sejtés és genetikai heterogenitását, és ez idáig az emberi rákos megbetegedések egyik legjobb *ex vivo* modelljének bizonyultak.

Az extracelluláris vezikulák (EV) csoportosítása és szerepük

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) membránnal körülvett struktúrák, melyek az intercelluláris kommunikáció új módját képviselik azáltal, hogy biológiailag fontos molekulákat, például miRNS-eket, fehérjéket és lipideket juttatnak a célsejtekhez. Az EV-k biogenezisüket, méretüket, molekuláris rakományukat (cargo), specifikus markereiket és funkcióikat tekintve is rendkívül heterogének. Az EV-k a célsejteken különböző módokon hathatnak: sejtfelszíni receptorokhoz kötődhetnek, az EV membránja összeolvadhat a célsejttel, illetve a célsejt makropinocitózissal vagy endocitózissal felveheti az EV-eket.

Mivel az EV-k jelen vannak a testnedvekben is, így ígéretes biomarkerek lehetnek különböző tumortípusok korai diagnosztizálásában. Ez a feltételezés azon alapul, hogy a tumorsejtek a normál sejtekhez képest magasabb szinten bocsátanak ki EV-eket [1], és hogy a rákos sejtekből származó EV-k tumorspecifikus molekulákat membránnal körülvett, védett környezetben hordozhatnak cargo-ként. Az EV-k emellett szerkeszthetők és specifikus molekulákkal tölthetők fel, melyeket aztán védett módon szállítanak, továbbá az EV-eket hatékonyan veszik fel a célsejtek, így az EV-k a rákterápia szempontjából is ígéretes eszközöknek tekinthetők [2].

A bélhám őssejt niche

A bélhám különböző, jellegzetes funkciókkal jellemezhető sejttípusokat tartalmaz, amelyek 5-6 naponként lecserélődnek (a Paneth sejtek kivételével, melyek hosszabb életidejűek, és a vékonybélben vannak jelen). A sejtek utánpótlását a Lieberkühn-kripták alján található őssejtek biztosítják -ezek egyik legismertebb markere az Lgr5 [3]. Az őssejt tulajdonságok fenntartásáért a környező sejtekkel való kapcsolat, valamint a mikrokörnyezeti tényezők (pl. növekedési faktorok, jelátviteli folyamatokat indukáló molekulák) összessége felelős, mely az őssejt niche-t alkotja. A bélhám őssejt niche központi jelentőségű faktorai a Wnt fehérjék és a Wnt agonista R-Spondin, az epidermális növekedési faktor (EGF), valamint a sejtdifferenciálódást indukáló bone morphogenic protein-ek (Bmp) gátlói, például a noggin [4]. A niche faktorok termelésében a kripták körüli miofibroblasztok, valamint a Paneth-sejtek (csak a vékonybélben) fontosak, mely ez utóbbi sejttípusnak egy új funkcióját jelenti [5].

A niche faktorok és a jelátviteli utak

A Wnt ligandok egy nagyobb család tagjai, melyek átfedő hatással rendelkeznek. A sejtek citoplazmájában egy lebontó multiprotein komplex van jelen, melynek fontos komponensei az adenomatosus polyposis coli (APC), a kazein kináz Ia (CKI α) és a β -katenin. Wnt ligand hiányában ez a komplex a β -katenint foszforilálja, mely a proteaszómában lebontódik. Wnt hatására a lebontó komplex aktivitása gátlás alá kerül, így a felhalmozódó β -katenin a sejtmagba transzlokálódik, ahol kofaktorként elindítja a Wnt célgének átírását. A célgének közé tartoznak a sejtosztódást serkentő fehérjéket kódoló gének (pl. Myc), az őssejt-marker Lgr5, vagy a lebontó komplexben részt vevő Axin2 [6].

A Notch jelátviteli útvonal az őssejt niche-ben a Wnt útvonallal együttesen aktív, és egymás hatását kölcsönösen erősítik [7]. Aktivációjához a sejtfelszíni Notch1-4 receptorokhoz a szomszédos sejt plazmamembránhoz kötött ligandja kapcsolódik. Az epidermális növekedési faktor (EGF) a sejtfelszíni EGF-receptorhoz kötődik. Az EGF által indukált egyik központi jelátviteli a mitogen-activated protein (MAP) kináz útvonal, melyben fontos a KRAS és a BRAF aktiválódása. Az EGF sejtosztódást indukál, mely szintén fontos az őssejtpopuláció méretének szabályozásában [5]. Az EGF családba több más molekula is tartozik (pl. amfiregulin), melyek az EGF receptorcsalád különböző tagjaiból álló hetero- vagy homodimerekhez kapcsolódva indítanak el jelátviteli folyamatokat a sejtekben.

A vastag- és végbélrák kialakulása és típusai

A sporadikus CRC kialakulásának több útvonala is ismert, melyek eltérő adenomatípusokból indulhatnak el. Az esetek többségében a betegség a klasszikus tubulovillosus adenoma-

karcinoma útvonalon alakul ki. Ennek során a bélhám epitél sejtjeinek módosult működése miatt egy Lieberkühn-kriptából kiindulva abnormális, de még benignus sejtszaporulat jelenik meg (polip, tubulovillosus adenoma), mely jellegzetes mutációk felhalmozódása miatt több év alatt rosszindulatú daganattá válhat. A betegek mintegy 80%-a esetében az Apc fehérje inaktivációjához vezető mutációk figyelhetők meg, melynek eredménye, hogy a β -katenin a külső Wnt fehérjék hiányában sem bontódik le, hanem a sejtmagban a Wnt célgének átírását serkenti. A mutációt hordozó sejt tehát külső Wnt fehérjék hiányában is osztódik, elveszik a mikro környezet általi szabályozási lehetőség, mely adenomaképzéshez vezet.

Az adenomák CRC-vé való progressziója során további mutációk felhalmozódása figyelhető meg. Ezek közé tartozik a betegek kb. 50%-ában előforduló, KRAS-t aktiváló onkogén mutáció. A betegek egy másik csoportjában a KRAS mutáció helyett a BRAF aktivációja figyelhető meg [8]. Mind a KRAS, mind a BRAF onkogén mutációja a külső EGF-től független, szabályozatlan sejtosztódást indukálnak. A CRC kialakulásának további központi eseménye a sejtciklus kontrollpontjainak az inaktiválódása, ezáltal genomi instabilitás létrejötte és további mutációk felhalmozódása. A kontrollpontok működésének kiesésében fontos a *TP53* tumor szupresszor gén mutációja, mely a p53 fehérjét kódolja [9].

A CRC progressziója során gyakran figyelhető meg a TGF β által indukált jelátviteli útvonalak inaktiválódása. A TGF β -nak ellentmondásos a szerepe a CRC progressziója során. A tumorigenezis kezdeti stádiumában gátolhatja a tumor növekedését, később azonban a CRC sejtek gyakran rezisztenssé válnak a TGF β apoptotikus hatására, és a TGF β a metasztázis kialakulását is elősegítheti például a fibroblasztok aktiválásán keresztül [10, 11]. CRC-ben a TGF β legfőbb termelői a lokális tumor mikro környezetben felhalmozódó fibroblasztok [11].

Az intra-tumorális sejtes heterogenitás és a tumor őssejtek

A legújabb tanulmányok bizonyították, hogy nem minden primer CRC-ben jelen lévő sejtpopuláció képes tumort képezni. A tumor őssejtek fontos gyógyszercélpontot jelentenek a rákos megbetegedésekben, mivel képesek a daganatokban külön populációként fennmaradni, önmegeújulni és differenciálódni, és összefüggésbe hozhatók a daganat ismételt megjelenésével [12]. Ezért a rákos őssejteket célzó specifikus terápiák kifejlesztése javíthatja a túlélést.

A szolid tumorok sejtjei mutációs és molekuláris szempontból heterogén populációt alkotnak, mely a tumorigenezis egyik fő hajtóerejének tekinthető. A béladenómák és CRC tumorok rendkívül heterogének, proliferáló és differenciálódó sejteket egyaránt tartalmaznak, és folyamatosan fenntartja őket egy dedikált sejtpopuláció, az úgynevezett tumor őssejtek [12, 13]. Bár a neoplasztikus sejteket fokozott sejtproliferáció és korlátozott sejt differenciálódási

képesség jellemzi, részletes differenciálódási útvonaluk CRC-ben kevésbé ismert. Kimutatták, hogy az *Lgr5* gén expressziója egy őssejt tulajdonságokkal rendelkező sejtpopulációt jelöl intestinális adenomákban és CRC-ben [13, 14]. Érdekes módon további vizsgálatok azt mutatták, hogy az intestinális adenomák kevesebb őssejtet tartalmaznak, mint az *Lgr5*⁺ sejtek száma, ami arra utal, hogy az *Lgr5*⁺ sejteknek csak egy alpopulációja működik őssejtként [15]. Emellett az *Lgr5*⁺ sejtekben kialakuló *Apc* mutáció képes hatékonyan elindítani az adenomák kialakulását [16].

A tumor-asszociált fibroblasztok

A tumor-asszociált fibroblasztok (cancer-associated fibroblasts, CAF) gyakran aktivált állapotban vannak, melyre megváltozott génexpressziós mintázatuk és fokozott proliferáció jellemző. A CAF-ok egy fontos és gyakori sejtípus a tumor stromájában, és mennyiségük összefügg a betegek rosszabb túlélésével [17]. Heterogén sejtcsoportot alkotnak a tumorokban, ahol például az extracelluláris mátrix (ECM) fehérjéit termelik, mint pl. a kollagén-I. A TGF β központi szerepet játszik a fibroblasztok aktiválásában CRC-ben, mely a CAF-ok alakjának a megváltozásához, valamint egy specifikus génexpressziós program indukálásához vezet. A stromális fibroblasztok jelentősen elősegítik a CRC sejtekben az agresszív őssejt fenotípus kialakulását [18].

A tumorszövethez közeli normál vastagbélből izolált peritumorális fibroblasztokat (PTF) gyakran használják a CAF-ok nem aktivált kontrollsejtjeként. A PTF-ek és CAF-ok expressziós profilját összehasonlító egyik publikáció azonban csak minimális különbséget talált a PTF-CAF párok között. Ebben a vizsgálatban az α SMA, amelyet általában az aktivált fibroblasztok markereként tartanak számon, a PTF-ekben is jelen volt [19]. Érdekes módon a CAF-ok jelentősen hozzájárulnak a CRC intra-tumorális sejtes heterogenitásának kialakulásához [18, 20], mely során a tumorsejtek egy csoportja például őssejt aktivitást vesz fel.

A PDAC fő jellemzői

A pancreas duktális adenokarcinóma (PDAC) az egyik legveszélyesebb tumortípus, 5 éves túlélési aránya kevesebb, mint 8%. Bár új, ígéretes célpontokat azonosítottak, a korai diagnosztizálás és a kezelés hatékonysága csak lassan javul, és a PDAC megbízható biomarkereinek azonosítása továbbra is megoldandó feladat. A legtöbb PDAC daganat jellemző mutációkat hordoz a *KRAS*-ban, és/vagy a *TP53* génben, amely központi szerepet játszik a DNS károsodásra adott válaszban. A más génekben előforduló nagyszámú driver mutáció azonban nagy intra- és intertumorális genetikai heterogenitáshoz vezet [21]. Egy nemrégiben létrehozott

organoid könyvtár bizonyította a Wnt jelátvitel fontosságát a sejtes heterogenitás kialakulásában nem csak CRC-ben és a normál bélhamban, hanem PDAC-ben is [22].

2. Célkitűzések

A gasztrointesztinális rendszert érintő két fontos tumortípus, a heterogén CRC és PDAC patomechanizmusának jobb megértése olyan beavatkozási pontok felismeréséhez vezethet, melyek új diagnosztikai, vagy terápiás lehetőségek kifejlesztését segíthetik. Kísérleteink során ezért az alábbi célokat tűztük ki:

- A Prox1 transzkripciós faktor specifikusan az Apc mutáció után, a Wnt útvonal hiperaktiválásának hatására kapcsolódik be, a normál bélhamban csak ritka sejtekben van jelen és nem ismert bélhámhoz kötött funkciója [23], így ez a molekula, vagy valamelyik célgénje érdekes beavatkozási pont lehet. Vizsgálatainkban a Prox1 által indukált CRC progresszió mechanizmusának feltérképezését tűztük ki célul, a CRC őssejtekre fókuszálva. Emellett egy olyan CRC rendszert is meg kívántuk vizsgálni, amelyben a Wnt útvonal nem az Apc mutáció következtében aktiválódik, amely az Apc mutációt nem hordozó bizonyos CRC eseteket modellezheti.
- Célunk volt a TGF- β által a korai intestinális adenomákban kiváltott apoptózis mechanizmusának felderítése, valamint a driver mutációk hatásának vizsgálata a TGF- β -val szembeni rezisztenciára.
- Az EV-k diagnosztikai felhasználásához fontos felderíteni az EV-k kibocsátását és a cargo-jukat befolyásoló tényezőket. Így célul tűztük ki annak meghatározását, hogy az EV-k felszabadulását a CRC és a PDAC progressziójában fontos mely faktorok befolyásolják.
- Kíváncsiak voltunk továbbá arra, hogy CRC-ben az intratumorális sejtes heterogenitás befolyásolja-e az EV kibocsátást és az EV cargo-t. Eltérő EV szekréciónal intenzitással és miRNS cargo-val rendelkező tumorsejt populációkat kívántunk azonosítani.
- Szintén fel kívántuk deríteni az EV-k szerepét a normál intesztinális őssejt niche-ben és a CRC progressziója során.
- Célul tűztük ki az EV-k felvételét befolyásoló sejtes heterogenitás meghatározását CRC-ben, valamint a jelenség funkcionális jelentőségének feltárását. Az eltérő EV felvételi képességgel rendelkező CRC sejtek jelenléte alapvető fontosságú tényező lehet az EV-n alapuló célzó stratégiák kidolgozásakor.

- Az EV kibocsátás és cargo hasnyálmirigyben és PDAC-ben való jellemzésére organoidokból és betegek vérmintáiból származó EV-k miRNS cargo-ját kívántuk összehasonlítani, valamint PDAC-re specifikus EV miRNS-t azonosítani.

3. Módszerek

A kísérletekben *in vivo* egérmodelleket, intesztinális organoidokat, hasnyálmirigy duktális organoidokat, CRC és PDAC beteg eredetű organoidokat, lentivirális transzdukciót, áramlási citometriát és sejtiszortolást, whole-mount immunfestést, RNS izolálást és RT-qPCR-en alapuló génexpresszió analízist, microarray-t, low-density miRNA array-t, Western-blot-ot, konfokális mikroszkópiát használtunk. Az EV-eket több különböző módon izoláltuk, és Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), tunable resistance pulse sensing (TRPS), kapilláris alapú Western blot, illetve ellenanyaggal fedett gyöngyök és áramlási citometria segítségével elemeztük. A statisztikai elemzéshez párosított és párosítatlan t-tesztet, ANOVA-t, Mann-Whitney U-tesztet, Krustal-Wallis tesztet és Dunn post hoc tesztet alkalmaztunk.

4. Eredmények

Az egyes fejezetek utáni római számok a felhasznált saját publikációknak a jelzései, amelyek listája a tézis végén található meg. Az egér géneket és fehérjéket kis betűvel, míg a humán megfelelőiket nagy betűvel jelöltük.

A Prox1 a tumor-össejtpopuláció méretét szabályozza és elősegíti a daganat progresszióját CRC-ben (I, II, III, IV)

Az Lgr5⁺ sejtek képesek adenoma kialakulását elindítani az Apc gén mutációja esetén [16]. Emellett a bélhámsejt-progenitorok össejtszerű fenotípust vehetnek fel gyulladásozó folyamatok során kibocsátott molekulák hatására, és ezáltal gyulladásozó körülmények között CRC kialakulásához is hozzájárulhatnak [24]. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az össejtszerű fenotípus létrejötte kritikus a CRC tumorigenezisben.

Eredményeink szerint a Prox1 a tumorigenezis korai lépései során az adenoma sejtekben indukálódik mind *in vivo*, mind *ex vivo*, beleértve az Lgr5⁺ össejteket is. A Prox1 gén inaktiválása során az össejtek alacsonyabb számát figyeltük meg a Prox1- kriptaszerű struktúrákban, amelyek diszlokált Lgr5⁺ sejteket tartalmaztak. Ez azt jelzi, hogy a sikeres Prox1 deléció gátolja az Lgr5⁺ sejt populáció méretének növekedését adenomákban. Mivel *in vivo* vizsgálatainkban a Prox1 nem expresszáódott az Lgr5⁺ össejtekben az Apc deléciója előtt, hanem csak az Apc kiütése után 5 nappal, így a Prox1 expresszió elvesztése nem a tumorképzés gyakoriságát befolyásolja, hanem az Lgr5⁺ adenoma sejt populáció méretének növekedését

gátolja. Ehhez hasonlóan a Prox1 inaktiválása csökkentette az adenoma őssejtek számát organoidokban is az Apc deléciója után. A PROX1 hiányának következményeit humán CRC sejtvonalban, valamint beteg eredetű organoidokban is megerősítettük.

A PROX1 adenoma/CRC őssejtekre gyakorolt hatása mögötti mechanizmus azonosítása érdekében a kalciumfüggő foszfolipidkötő proteinre, az Annexin A1-re (ANXA1) koncentráltunk. Az Anxa1 csak minimális szinten fejeződött ki a normál egér bélhámában. Organoid technológiával bizonyítottuk, hogy a Wnt útvonal Apc deléció utáni aktiválása növelte az Anxa1 expressziót, amelyet a Prox1 indukciója a tumorsejtekben csökkentett. Az ANXA1 fontos szerepére utal továbbá, hogy az ANXA1 csendesítése a PROX1 hatásait utánozta, mely a megnövekedett sejtproliferáció révén az őssejtkészlet bővüléséhez vezetett. A PROX1 célgénjei között szerepelt továbbá a citoskeleton felépítésében fontos aktinkötő fehérjét, a filamin A-t (FLNA) kódoló gén. Érdekes módon jelentős mértékben megnövekedett Flna-expressziót találtunk a Prox1+/Lgr5+ tumorsejtekben. A FLNA az ANXA1-csendesített organoidokban is felszabályozódott. Emellett a PROX1 némítása CRC beteg eredetű organoidokban jelentősen csökkent FLNA szintet eredményezett.

További eredményeink azt mutatták, hogy a Notch útvonal fontos a bél őssejt-aktivitásban az Apc deléciót követő átmeneti fázisban. A magas Wnt aktivitás azonban bekapcsolja a Prox1-et a korai Lgr5+ adenoma sejtekben, melyekben inaktiválódik a Notch útvonal, így a Prox1+/Lgr5+ sejtek Notch-független őssejt fenotípust vesznek fel.

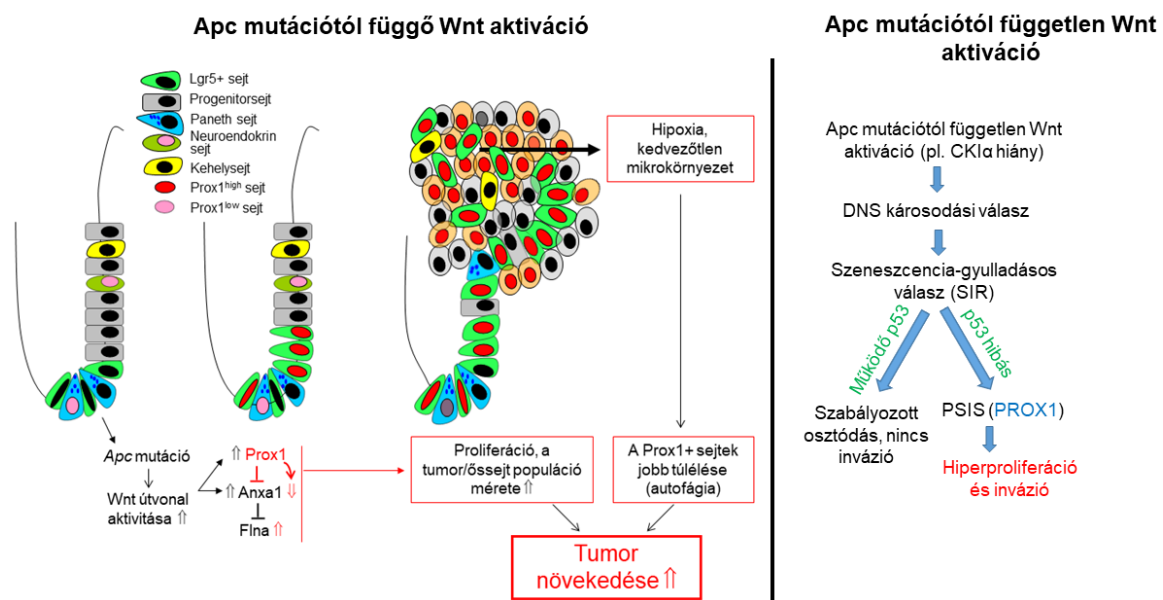
Érdekes módon a szubkután immunhiányos (NSG) egerekbe injektált, Prox1-re deléciót mutató Apc-mutáns organoidok több apoptotikus sejtet tartalmaztak, mint a Prox1-et expresszáló tumoros organoidok, és a Prox1-negatív tumorsejtek csökkent túlélését tapasztaltuk az ischaemiás/hipoxiás tumor belsejében. A PROX1 hiánya megakadályozta az LC3-tartalmú korai autofagoszómák felhalmozódását. Tehát az autofágia, mely fontos mechanizmus a tumorsejtek kedvezőtlen körülmények közötti túlélésében, specifikusan elősegíti a Prox1+ sejtek túlélését.

A fokozott Wnt aktivitás a betegek azon csoportjában is általában megfigyelhető, akiknél nincs APC/ β -katenin mutáció. Ennek modellezésére együttműködő partnerünk bélspecifikusan inaktiválta a β -katenint lebontó fehérjekomplex egy másik tagját, a kazein-kináz I α -t (CKI α), mely szintén a Wnt jelátviteli útvonal kritikus szabályozója. A Csnk1a1 (a CKI α -t kódoló gén) kiütése (egyszeres knock out, SKO) jelentős Wnt aktivációt váltott ki, meglepő módon azonban tumorigenezis indukálása nélkül. Együttműködő partnerünkkel kapott adatok alapján a Csnk1a1 és a p53 bélspecifikus kombinált kiütése (dupla knock out, DKO) egerekben

diszpláziát indukált megnövekedett proliferációs intenzitással, mely invazív karcinómák kialakulásához vezetett az egész bél területén. A Csnk1a1 (CKI α) kiütése egy alacsony fokú, sejtzeneszcenciához köthető gyulladós folyamatot is aktivált a hámban (SIR), mely többek között TNF α termeléssel is párosult, és amely a daganat növekedését gátolta. A SIR azonban p53 hiányában elvesztette növekedésszabályozó képességét, és felgyorsította a tumor növekedését és az invazivitást. A p53 kiütése eredményeink szerint megváltoztatta az SKO organoidok viselkedését a transzformált fenotípus megjelenésével párhuzamosan az immortális jelleg irányába.

A p53 és a CKI α elvesztése egy jellegzetes géncsoportot aktivált (p53 által elnyomott inváziós gének, PSIS), melyek közé tartoznak többek között az interferon által indukált transzmembrán fehérjék (IFITM1, IFITM2, IFITM3), valamint a PROX1. *In vitro* eredményeink alapján a PROX1 csendesítése az invázió jelentős csökkenését eredményezte *in vitro* tesztben.

Összességében egy olyan modellt állíthatunk fel, melyben a Prox1 működésének gátlása emelkedett Anxa1-szinthez és Flna-csökkenéshez vezet, ami korlátozza az adenóma/CRC őssejtpopuláció méretének expanszióját a sejtproliferáció csökkenése révén, és amely a Notch útvonaltól az Apc mutáció létrejötte után függetlenné válik. A tumor transzplantátumok hipoxiás részeiben a PROX1 továbbá elősegíti a tumorsejtek túlélését az autofágia által.



1. ábra. A PROX1 tumorigenezisre kifejtett hatásának összefoglaló ábrája

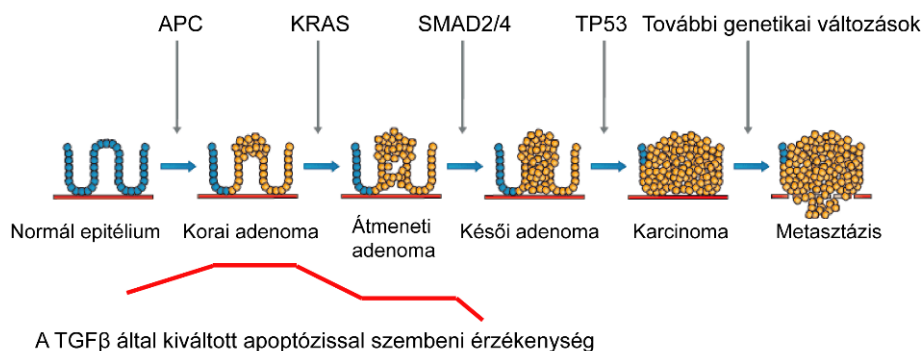
A PROX1 tehát anélkül szabályozza az adenoma/CRC őssejtek számát, hogy befolyásolná a normál bél homeosztázisát, így vonzó terápiás célpontot biztosíthat gyógyszerfejlesztéshez CRC-ben. Apc-mutációtól független Wnt hiperaktivációt mutató modellekben pedig a Prox1

egy inváziós géncsoport tagja. p53 hiányában, a várt növekedési leállással ellentétben, a SIR elősegíti a kóros proliferatív fenotípus kialakulását és serkenti az inváziót mind *in vivo*, mind pedig intesztinális organoid kultúrákban, melyben a Prox1 is résztvevő (1. ábra).

A driver mutációk módosítják az intesztinális adenómasejteknek a TGF- β által kiváltott, Bim-mediált apoptózisra való érzékenységet (V)

A TGF β -nak a CRC-ben betöltött központi szerepét jelzi, hogy a betegek jelentős részében a TGF β által aktivált jelátviteli útvonal valamelyik komponense mutációt szenved [8]. A vezető (driver) mutációk CRC-beli szerepének megértését azonban gátolta a CRC progressziójának tanulmányozására alkalmas *ex vivo* modellrendszerek hiánya, ezért nehéz volt feltérképezni a TGF- β hatását az adenoma fázisban, illetve a mutációk felhalmozódásával párhuzamosan.

Eredményeink szerint a TGF- β elsősorban a BH3-only fehérjék közé tartozó Bim-en keresztül fejti ki apoptotikus hatását a korai béladenomát modellező Apc-mutáns egér organoidokban. Bár a TGF- β kezelés nem eredményezte a különböző BIM izoformák fokozott expresszióját vagy apoptózist késői stádiumú CRC betegekből származó tenyészetekben, a BH3-utánzó vegyületek az organoidok pusztulásához vezettek. További kísérleteink arra is fényt derítettek, hogy a TGF- β az apoptózis erőteljes kiváltója az Lgr5+ őssejtekben is a Bim expresszió indukálásával. Ugyanakkor a KRas onkogén jelenléte részleges védelmet nyújtott az Apc mutáns organoidoknak a TGF- β által kiváltott sejthalállal szemben. Eredményeink azt mutatják, hogy a daganatképzés kezdeti stádiumára jellemző Apc mutáció serkenti a TGF- β által kiváltott sejthalálra való érzékenységet, míg a progresszióban fontos KRas mutáció növeli a sejthalállal szembeni rezisztenciát *in vitro* és *in vivo* egyaránt. A TGF- β által kiváltott apoptózissal szembeni rezisztencia ellenére azonban a KRAS mutáns organoidok még mindig érzékenyek voltak a BH3 mimetikumokra, aminek fontos klinikai jelentősége lehet (2. ábra).



2. ábra. Az driver mutációk módosítják az intesztinális tumorsejtek TGF β -val szembeni érzékenységét

Az EV-k szekrécija az Apc mutáció és más CRC progressziós faktorok befolyásoló hatása alatt áll (VI)

Az EV vizsgálatokhoz olyan modellrendszerre lenne szükség, amely jobban reprezentálja a daganatok *in vivo* helyzetét, mint a hagyományos 2D sejtenyészetek. Ezen túlmenően a sikeres EV alapú diagnosztika nagyban függ a daganatból származó EV-k mennyiségétől a testfolyadékokban. Így következő lépésként a CRC tumorsejtekben az EV termelést befolyásoló tényezőket vizsgáltuk, valamint arra is kíváncsiak voltunk, hogy az EV-k milyen szerepet töltenek be a CRC sejtek és a fibroblasztok, mint az egyik legfontosabb sztromális sejtípus közötti kommunikációban.

Vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy a 3D tenyészetek felülúszóiban –a 2D tenyészetekkel ellentétben– a kisebb méretű EV-k mennyisége volt jelentősebb, míg nagyobb EV-eket csak alacsony számban találtunk. A kollagén I extracelluláris mátrix (ECM) fehérje hatására, mely a CRC progressziója során feldúsul, nagyobb EV mennyiség volt mérhető a CRC organoidok kondicionált médiumában. Adataink tehát arra utalnak, hogy az ECM összetétele kritikus az EV felszabadulás szempontjából a CRC tumorigenezisben. Mindemellett az Apc mutáció megnövelte az EV szekréciónak organoidokban, melyben fontos szerep jut a Wnt útvonal aktiválásának. Mivel az APC mutáció általában korai esemény az intesztinális daganatképződésben, adataink arra utalnak, hogy már az adenóma stádiumban fokozott EV kibocsátás következik be.

Az EV kibocsátás korrelációt mutat a Wnt aktivitással egér hasnyálmirigy duktális sejtekben, de nem mutatható ki kapcsolat humán PDAC organoid modellben (VII, VIII)

Eredményeink szerint tehát a Wnt aktivitás és az EV szekréciónak intenzitása szorosan összefügg bél adenóma sejtekben. Annak vizsgálatára, hogy ez általános jelenség-e más sejtípusokban is, először egér hasnyálmirigy duktális organoidokat használtunk, melyek duktális eredetű és EV szekréciónak is bizonyítottuk. Érdekes módon az organoid sejtek túlnyomó többsége pozitív volt porcypine-ra (Porcn), mely enzim a Wnt fehérjék palmitoilálása által kulcsfontosságú szerepet játszik a szekréciónakban. Porcn inhibitor alkalmazása csökkentette a Ki67+ proliferáló sejtek arányát, az *Lgr5*, *Axin2* és *Troy (Tnfrsf19)* Wnt célgének alacsonyabb RNS szintjét eredményezte, és csökkentette az EV-k számát az organoidok kondicionált médiumában.

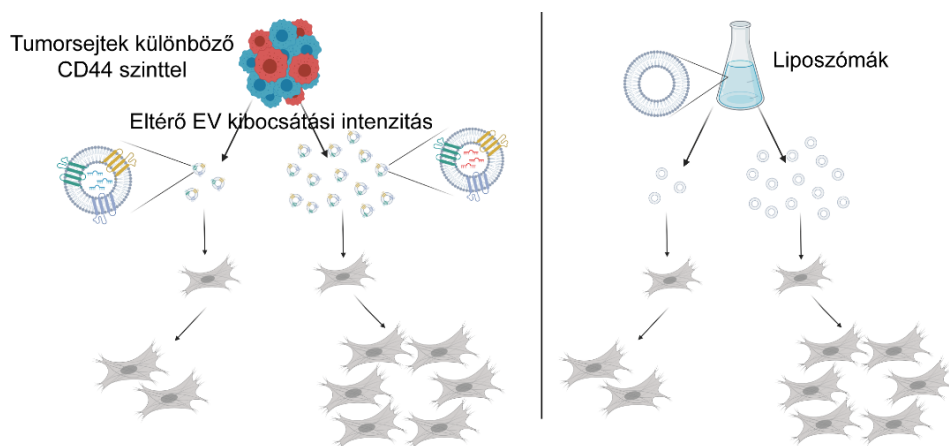
Ezután a duktális eredetű tumortípusra, a PDAC-ra fókuszáltunk. A PDAC progressziója során a tumorsejtek függetlenné válhatnak a külső Wnt fehérjétől [22]. Organoid vonalaink még exogén módon hozzáadott Wnt3a hiányában is növekedtek, és egységesen PORCN expressziót mutattak. Várakozásainknak megfelelően a Wnt szekréciónak gátló alkalmazása a Wnt célgének csökkent expresszióját eredményezte, ugyanakkor nem találtunk változást sem a Ki67+ osztódó

sejtek arányában, sem pedig az EV szekréción. Összefoglalva eredményeink azt mutatják, hogy míg a Wnt fehérjék aktivitásának gátlása döntő hatással van a sejtproliferációra és az EV szekrécióna normál hasnyálmirigy duktális organoidokban, ezt a kapcsolatot nem tudtuk kimutatni PDAC-ban.

A CD44 expressziós szintje különböző EV kibocsátási intenzitással rendelkező CRC sejtpopulációkat jelöl (VI, IX)

A tumorsejtek között molekuláris és fenotípusos heterogenitás figyelhető meg, mely felveti az eltérő EV kibocsátással és cargo-val jellemezhető CRC sejtek jelenlétét. Az eltérő EV szekréciónal jellemezhető CRC sejtpopulációk azonosítása érdekében a CD44-re, a CD133-ra és PTK7-re fókuszáltunk, melyek magas szintje aggresszív viselkedésű CRC sejteket azonosít. Kísérleteink eredményei alapján –a PTK7-tel ellentétben- a CD44 és CD133 nagy osztódási intenzitással rendelkező CRC organoid sejtpopulációkat jelöl. A PTK7^{high} vagy CD133^{high} sejtekből származó organoidok EV szekrécióna nem különbözött a PTK7^{low} vagy CD133^{low} sejtekhez képest, ezzel szemben magasabb EV-szekréciónat találtunk a CD44^{high} organoidok esetében. Az EV cargo miRNS elemzése során a CD44^{high} és a CD44^{low} CRC sejtekből származó EV-k cargo-jában csak kismértékű különbség volt megfigyelhető.

Következő lépésként azt vizsgáltuk, hogy a CD44^{high} és CD44^{low} CRC sejtekből származó eltérő mennyiségű EV-knek, valamint az EV-k eltérő miRNS cargo-jának milyen funkcionális jelentősége lehet fibroblasztokban. Érdekes módon az osztódó fibroblasztok százalékos aránya, valamint a fibroblaszt aktivációs markerek expressziós intenzitása az EV-dózistól függött, de független volt attól, hogy CD44^{high} vagy CD44^{low} organoidokból izoláltuk-e őket. Ezek az eredmények tehát azt mutatják, hogy nem az eltérő miRNS cargo, hanem az EV-k száma a kritikus tényező. Érdekes módon a mesterségesen előállított liposzómák hasonló, dóziszfüggő hatással voltak a fibroblasztokra, ami arra utal, hogy a CD44^{low} és CD44^{high} sejtekből izolált EV-k közös miRNS cargo-ja sem játszik fontos szerepet (3. ábra).



3. ábra. A CD44^{high} és CD44^{low} sejtek által kibocsátott EV-k dóziszfüggő és miRNA cargo független hatása

Az EV-k és a liposzómák hasonló és dóziszfüggő hatása a fibroblasztok proliferációjára és aktivációjára

Az EV-k EGF aktivitást közvetítenek a bélhámósejt niche-ben (X)

Az LGR5+ sejtekben fellépő APC mutáció a tumorigenezis első lépésének tekinthető a CRC betegek jelentős részénél, mely hosszútávú adenomaképzéshez vezet [16]. Az Lgr5+ őssejtek egy speciális mikrokörnyezetben, az őssejt niche-ben (ISCN) helyezkednek el [4]. Következő lépésként tehát arra koncentráltunk, hogy bizonyítsuk a fibroblasztokból származó EV-k szerepét az ISCN kialakításában és fenntartásában, valamint meghatározzuk a fibroblaszt EV-k cargojában az aktív molekulákat, amelyek a CRC-ben is fontos szerepet játszhatnak. Eredményeink szerint a fibroblaszt eredetű EV-k nem hordoznak olyan molekulákat, melyek serkentő, vagy gátló hatást fejthetnek ki az ISCN kialakításában abban az esetben, ha az összes lényeges niche faktort kívülről hozzáadjuk a médiumhoz.

Annak tesztelésére, hogy a fontos ISC niche faktorok fibroblaszt eredetű EV-khez kötődve hatnak-e, a niche faktorokat egyesével elvontuk a médiumból. A fibroblaszt eredetű EV-k jelentős menekítő hatást mutattak az organoidok túlélésére, amikor a Wnt3a hiányzott a tenyésztő médiumból. Az EV-k szintén jelentős menekítő hatást mutattak, ha az EGF-et elvontuk. Érdekes módon a fibroblaszt eredetű EV-k akkor is megakadályozták az organoidok pusztulását, amikor az EGF humán colon organoid tenyészetekből hiányzott.

Ezután egy olyan egérmodellből készítettünk intestinális organoidokat, melyek az EGFP zöld fluoreszcens fehérjét az ISC-kben fejezik ki [3]. Érdekes módon az EGFP+ sejtek teljesen eltűntek EGF hiányában, azonban továbbra is tudtunk zöld sejteket detektálni az organoidokban fibroblaszt eredetű EV-k jelenlétében. Kísérleteink tehát bizonyítékkal szolgálnak arra nézve, hogy az EGF aktivitás jelentős részben az EV-ken keresztül továbbítódik az ISCN-ben.

Vizsgálatainkban az EGF család tagjai közül az amfiregulin jelenlétét bizonyítottuk a fibroblaszt eredetű EV-ken. Amikor az amfiregulint neutralizáló ellenanyaggal blokkoltuk az EV-kben, jelentős csökkenést figyeltünk meg a túlélő organoidok arányában, ami a csökkent őssejtaktivitást mutatta. Ugyanakkor a fibroblaszt eredetű EV-k nélkülözhetők voltak EGF-független adenomasejtek számára. Adataink összességében azt mutatják, hogy a fibroblaszt eredetű EV-k EGF családtagokat (pl. amfiregulin) hordoznak, amelyek az ISC-k niche faktoraként működnek mind egér, mind humán modellben. Az EV-k ezáltal hozzájárulnak az ISC fenotípus fenntartásához a normál bélhámiban.

A fibroblasztokból származó EV-k a CRC sejtek osztódását indukálják amfiregulin szállítása által (VI, XI)

A CRC progressziójának egyik fontos lépése a KRAS mutáció megjelenése, mely a CRC sejteket függetlenné teszi az EGF család tagjaitól. Így következő kísérleteinkben arra

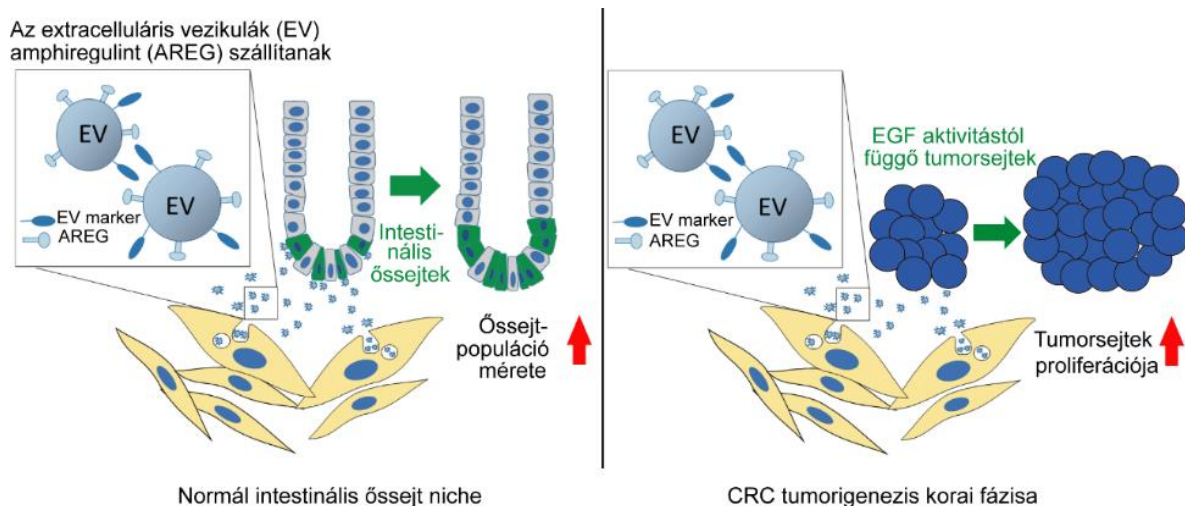
fókuszáltunk, hogy a fibroblaszt eredetű EV-k általunk felfedezett amfiregulin (AREG) transzportja fontos mechanizmus lehet-e a CRC korai fázisában is.

A tumorokban lévő fibroblasztok jellegzetes génexpressziós profillal jellemezhetők, és ezek a tumor-asszociált fibroblasztok (CAF) aktivált állapotban vannak. A TGF β kritikus szerepet játszik a vastagbél fibroblasztok aktiválásában, például indukálja az áttétképzés kezdeti lépéseit [11]. A TGF β által indukált normál colon fibroblaszt (NCF) aktivációnak nem volt hatása az EV szekrécióra. Az NCF-ek aktiválása során az EV-k cargo változásának meghatározásához a miRNS-ekre koncentráltunk, melynek során azt találtuk, hogy négy miRNS csak a TGF β -val kezelt sejtekből származó EV-mintákban volt jelen.

Az EV-k fontosak lehetnek a vad típusú KRAS-t és BRAF-ot tartalmazó, egyben EGF-függő humán CRC organoidok számára. Először NCF-eredetű EV-eket adtunk a betegekből származó, EGF-függő organoid vonalainkhoz külső rekombináns EGF/AREG nélkül. AREG hiányában jelentős csökkenést figyeltünk meg a proliferáló organoid sejtek százalékában, amelyre az NCF-eredetű EV-k menekítési hatást gyakoroltak. Továbbá az EGF-receptor blokkolása gátolta az EV-k hatását, mely bizonyította az EV-hez kötött AREG kritikus szerepét a CRC sejtek proliferációjában. Ugyanakkor nem figyeltünk meg különbséget az osztódó sejtek arányában, amikor a CRC organoidokat kontroll, vagy TGF β -aktivált NCF-ből izolált EV-vel kezeltük. Ez arra utal, hogy az AREG mind a kontroll, mind pedig az aktivált NCF-eredetű EV-ken jelen volt, valamint a TGF β által indukált kis mértékű változás az EV-k miRNS cargo-jában nem volt hatással a CRC sejtek proliferációjára.

További kísérleteinkben normoxia vagy hipoxia alatt növesztett humán vastagbél fibroblasztokból EV-t izoláltunk, majd EGF-függő CRC organoid sejteket kezeltünk mindkét körülmény között EGF jelenlétében. Érdekes módon csak akkor figyeltünk meg az EV kezelés hatására emelkedést az organoidképzési hatékonyságban, amikor a fibroblasztokat hipoxiában tenyésztettük, és ezt a jelenséget EV-mentes felülúszóval nem tudtuk kimutatni. Bár hipoxia esetében a fibroblaszt EV-knek EGF-független hatásuk is volt kísérleteinkben, normoxiás fibroblasztokból származó EV-k esetében ezt nem figyeltük meg EGF-függő organoidoknál.

Az NCF-ekhez hasonlóan a kontroll és a TGF β -kezelt CRC eredetű fibroblaszt EV-ken is kimutattuk az AREG-et. A fibroblaszt-eredetű EV-k által szállított AREG tehát nem csak az ISC-k niche faktoraként fontos a normál bélhámában, hanem a CRC tumorigenezisének korai szakaszában is, amikor az EGF jelátviteli út vonal még nem mutált (4. ábra).



4. ábra. A fibroblaszt EV-k által szállított AREG központi szerepe a normál ISC niche-ben, valamint a CRC tumorigenezis korai fázisában

Az IFITM1 expresszió intenzitása eltérő EV felvétellel jellemezhető CRC sejtpopulációkat jelöl (XII)

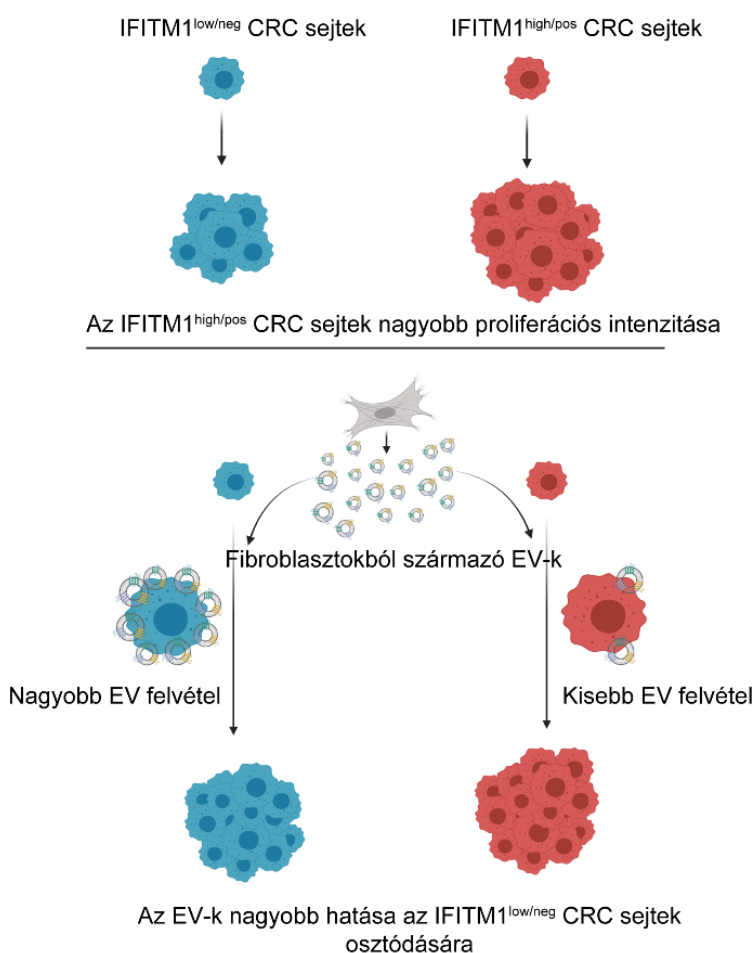
Bár az EV-k a tumorterápia szempontjából is ígéretes eszközöknek tekinthetők [2], még nem ismertek azok a molekulák, amelyek fontosak az EV felvételben. Továbbá még az sem tisztázott, hogy az EV-k bizonyos CRC alpopulációkat másoknál hatékonyabban megcélozhatnak-e.

Az interferon által indukált transzmembrán (IFITM) család tagjai a membránnal burkolt vírusok sejtbe való bejutását szabályozzák, így jelentősen hozzájárulnak a sejtek membránnal körülvett vírusokkal szembeni rezisztenciájához [25]. Az IFITM fehérjék közül az IFITM1 a plazmamembránban működik [26, 27]. Minthogy az EV-k is membránnal burkoltak, így az IFITM1-ről feltételezhető, hogy gátolja az EV felvételt is.

Minthogy az IFITM1 a PSIS tagja, amely az invazív tulajdonság kiváltásáért felelős (ld. fentebb), így szerepet játszhat a CRC sejtek rosszindulatú viselkedésében és a CRC sejtek EV felvételében. Érdekes módon sejtes heterogenitást mutattunk ki az IFITM1 expressziójára nézve ugyanabból a betegből származó organoidok között, így az IFITM1^{high} és IFITM1^{low} CRC organoid sejteket sejtszortterrel választottuk szét. Az IFITM1^{high} sejtekből származó organoidok több proliferáló sejtet tartalmaztak. Az Apc-mutáns organoidok, amelyek az Ifitm1-et magasabb szinten fejezték ki, kevesebb fibroblasztból származó EV-t akkumuláltak, mint a vad típusú bélorganoidok. Továbbá az IFITM1^{high} CRC sejtek kevesebbet vettek fel a humán vastagbél fibroblaszt eredetű EV-kből az IFITM1^{low} CRC sejtekhez képest. Ezután a CRC organoid sejteket fibroblaszt eredetű jelölt EV-kkel kezeltük, majd a magas, illetve alacsony

EV-felvételi képességű sejtpopulációkat szortoltuk. Az IFITM1 szignifikánsan magasabb RNS szintjét mértük az alacsony EV-felvételű sejtekben, mely megerősíti, hogy az IFITM1^{high} sejtek kevesebb EV-t vesznek fel. Az adatok együttesen tehát azt bizonyítják, hogy (i) eltérő EV felvételi képességgel rendelkező sejtpopulációk mutathatók ki CRC-ben, és (ii) az IFITM1^{high} jelöli az alacsonyabb EV felvételű sejteket.

A CRC sejt alpopulációk közötti eltérő EV felvétel funkcionális jelentőségének tesztelésére fibroblaszt eredetű EV-eket adtunk a CRC sejtekhez, majd az IFITM1 expressziót és a KI67 osztódási markert mértük az organoidokban. Az IFITM1^{-low} sejtpopuláción belül a proliferáló sejtek aránya lényegesen jobban növekedett EV-k jelenlétében, mint az IFITM1^{+high} sejtpopulációban. A proliferáló sejtek százalékos arányában mutatkozó kezdeti különbség továbbá eltűnt a két CRC sejt alpopuláció között az EV-ekkel végzett kezelés hatására. Érdekes módon a CRISPR-Cas9 által előállított IFITM1^{KO} organoidokban az EV+ sejtek aránya lényegesen magasabb volt az IFITM1^{WT} sejtekhez képest, és a fibroblaszt eredetű EV-k nagyobb hatást gyakoroltak az IFITM1^{KO} organoidok proliferációjára, ami az IFITM1



hiányos sejtek fokozott EV felvételének funkcionális hatását jelzi. Az IFITM1 tehát nem csak egy olyan marker, mely egy csökkent EV felvétellel jellemezhető CRC sejtpopulációt jelöl, hanem ez a molekula funkcionálisan is részt vesz az EV felvétel gátlásában (5. ábra).

5. ábra. Az IFITM1^{low} és IFITM1^{high} CRC sejtek eltérő EV felvétele jelentősen befolyásolja a proliferációt

Átfedő miRNS profil organoid és vérplazma eredetű EV-k között PDAC-ben (VIII)

Mivel a daganatból származó EV-k védetten és koncentráltan szállítják daganatspecifikus cargo-jukat a testnedvekben, így ígéretes lehetőséget rejtenek a daganatok korai felismerésében. Az EV-k biomarkerként való lehetséges felhasználását és *in vivo* szerepük megértését PDAC-ben és más hasnyálmirigy betegségekben nagymértékben akadályozza a megfelelő modellek hiánya. Ezért az EV kibocsátásban bekövetkező változások és a PDAC-ra specifikus EV miRNS-ek kimutatása érdekében egy kombinált megközelítést alkalmaztunk vérplazma minták, betegekből származó organoidok és antitest alapú EV izolációs protokoll segítségével.

Amikor az EV miRNS-eket jelenlétük vagy hiányuk alapján elemeztük öt PDAC betegből származó organoid vonalban, nyolc miRNS átfedett az összes minta között. Ezután páronként összehasonlítottuk a PDAC organoidokból származó EV-k miRNS profilját az adott beteg vérplazmájából izolált EV-k cargo-jával. Az organoid EV-kben jelen lévő miRNS-ek döntő többsége megtalálható volt a megfelelő PDAC vér EV-kben is. A párosított PDAC organoidból és vérből származó EV-k közös miRNS listájából az átfedő halmaz nyolc miRNS-t eredményezett, amelyeket „PDAC organoid közös halmaznak” (POCS) neveztünk el. Így eredményeink azt mutatják, hogy a PDAC organoid EV miRNS-ek túlnyomó többsége jelen van a vérmintákban is, valamint kiemelik a betegek közötti jelentős eltéréseket. Fontos megemlíteni, hogy a POCS miRNS készlet teljes átfedésben volt a mind az öt organoid vonalból származó közös EV miRNS készlettel.

Mivel a normál humán hasnyálmirigyszövethez korlátozott a hozzáférés, a POCS PDAC specifikus részhalmazának meghatározása nehéz. Ezek a miRNS-ek azonban jelen voltak a PDAC vérplazma EV-kben is. Így a PDAC-t összehasonlítottuk egy másik, nem tumoros pancreas betegségben (krónikus pancreatitis, CP) szenvedő betegekből származó és normál vérplazma EV-kkel. Meglepő módon az összes POCS miRNS nem csak a PDAC plazma EV mintákban volt jelen, hanem a CP-kben és a kontrollokban is. Kimutattunk két miRNS-t, amelyek szignifikánsan feldúsultak a PDAC plazma EV preparátumokban (miR-195 és miR-21) a kontroll mintákhoz képest, azonban egyik sem különbözött a PDAC és CP vér EV-k összehasonlításakor.

A PDAC sejtvonalak nagyobb mennyiségű EV-t produkáltak mind a klasszikus 2D, mind pedig 3D Matrigel tenyészetekben, mint a kontroll immortalizált duktális sejtvonal. Emellett nem csak a PDAC, hanem a CP betegek vérplazmamintái is magasabb EV szintet mutattak a kontrollokhoz képest. Mindez felveti annak a lehetőségét, hogy nem csak a mutációk, hanem

más tényezők is fokozott EV felszabadulást eredményezhetnek a hasnyálmirigy duktális sejtekből. A hipotézis tesztelésére egér hasnyálmirigy duktális organoid modellt használtunk, amely egy genetikailag homogén modellrendszert képvisel. Egy átfogó tanulmány kimutatta, hogy számos mikrokörnyezeti tényező, beleértve a PDAC extracelluláris mátrixának (ECM) változását, mint például a kollagén felhalmozódását, már jelen van CP-ben is. A kollagén-I hozzáadása Matrigel-hez megnövelte az EV szintet a duktális organoidok kondicionált médiumában.

A vérminták és a PDAC organoidok komplex megközelítése során tehát azonosítottuk a PDAC organoidokra jellemző EV miRNS-ek halmazát, amelyeket a PDAC betegek plazmájából származó EV-kben is kimutattunk. Azonban az EV miR-ek, amelyek különbséget mutattak a PDAC és a kontroll vérminták között, nem különböztek a PDAC és a CP között. Bizonyítékot szolgáltatunk továbbá arra vonatkozóan, hogy nem csak a mutációk, hanem az ECM-ben bekövetkezett változások is kritikusan módosíthatják az EV felszabadulását a hasnyálmirigy duktális sejtekből.

5. A dolgozat legfőbb új eredményeinek összefoglalása

A dolgozatban egérmodellek és az organoid technológia felhasználásával két, a gasztrointesztinális rendszert érintő fontos tumortípus, a CRC és a PDAC kialakulásában, valamint progressziójában fontos tényezők vizsgálatát tűztük ki célul. Az organoid technológiát az elsők között alkalmaztuk mind a nemzetközi tudományos életben, mind pedig Magyarországon.

- Mivel a Prox1 a normál bélhamban csak néhány sejtben expresszálódik, és kiütése nem okoz fenotípusos következményt, a CRC kialakulása során azonban a Wnt útvonal egyik szövetspecifikus célgénje, így a Prox1, vagy valamely általa szabályozott géntermék gátlása fontos lehet a CRC betegek esetében. Eredményeink szerint a Prox1+ sejtek egy alpopulációja –a normál bélhámval ellentétben- őssejtaktivitást mutat intestinális adenomákban/CRC-ben. Továbbá a Prox1 deléciója csökkentette az Lgr5+ adenoma és a CRC őssejtpopulációk méretét, valamint az őssejtaktivitást. Kimutattuk, hogy az Apc mutáció következtében kialakuló magas Wnt aktivitás a Prox1 expresszióját indukálja, és a Prox1+/Lgr5+ sejtek függetlenné válnak a Notch útvonal aktivitásától. Bizonyítottuk, hogy tumor xenograftokban a Prox1+ sejtek jobb túléléssel rendelkeztek hipoxiás, kedvezőtlen körülmények között, mely az intenzívebb autofágiának volt köszönhető. Emellett a Prox1, valamint az Ifitm1 a p53 tumorszuppresszor által

elnyomott, invázióért felelős géncsalád (PSIS) tagjai egy olyan CRC modellben, melyben a Wnt útvonal nem az Apc mutáció által indukálódik. Kimutattuk, hogy a p53 hiánya az epitésejtekben megjelenő alacsony szintű gyulladáshoz fenotípust átalakítja tumorgátlóból a tumor növekedését serkentő folyamattá.

- A TGF β apoptotikus hatása az egyik fő szelektív mechanizmus a CRC progressziója során. Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a TGF β a Bim pro-apoptotikus fehérjén keresztül fejt ki apoptotikus hatását, melyben az összejt aktivitással rendelkező Lgr5+ adenoma sejtek is érintettek. Érdekes módon a CRC tumorigenezise során megjelenő mutációk jellegzetes változást okoznak a TGF β -val szembeni szenzitivitásban: míg az Apc inaktiválása növeli az adenomasejtek szenzitivitását, a KRas onkogén részleges rezisztenciát biztosít a TGF β által kiváltott apoptózissal szemben. Bizonyítottuk, hogy a BH3 mimetikumok, melyek a BIM hatását utánozzák, sejthalált indukálnak olyan késői CRC betegekből származó organoidokban is, melyek már rezisztenciát mutatnak a TGF β apoptotikus hatásával szemben.
- Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy az intesztinális organoidokból az EV-k szekrécióját az Apc mutáció és a Wnt magas aktivitása, illetve az ECM összetételének változása jelentősen módosítják. A Wnt aktivitás hasnyálmirigy duktális organoidokban is indukálja az EV kibocsátást, ugyanakkor a külső Wnt forrástól független késői PDAC mintákban ez a kapcsolat nem volt bizonyítható.
- A CRC intratumorális sejtes heterogenitása egyre növekvő figyelmet kap a terápiákkal szembeni rezisztenciában. Kimutattuk, hogy a sejtes heterogenitás fontos szereppel rendelkezik az EV kibocsátás mértékében, és a CD44^{high} sejtek több EV-t szekretálnak, mint a CD44^{low} CRC sejtek. Bizonyítottuk továbbá, hogy a CD44^{high} és CD44^{low} CRC sejtek által kibocsátott EV-k hatása a fibroblasztok aktivációjára és proliferációjára elsősorban a dózistól, és nem a miRNS cargo-tól függ.
- A bélhám Lgr5+ összejtjeiben bekövetkező mutációk a CRC tumorigenezis kiindulópontjainak tekinthetők. Az összejtek egy speciális mikro környezetben, az összejt niche-ben találhatóak. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a fibroblasztok, melyek az intesztinális kripták körüli egyik legfontosabb sejt típus, az EGF családba tartozó amfifregulint tartalmazó EV-eket bocsátanak ki, melyeknek közvetlen hatásuk van az Lgr5+ összejtek proliferációjára.

- Igazoltuk, hogy a fibroblasztokból származó EV-k amfiregulin transzportjuk által a CRC sejtek proliferációját is indukálják a CRC tumorigenezis azon fázisában, amikor az EGF jelátviteli út még normális működésű (KRAS^{WT} és BRAF^{WT} tumorok).
- Az intratumorális sejtes heterogenitásnak központi szerepe lehet az EV felvételben is. Bizonyítottuk, hogy a sejtfelszíni IFITM1 expresszió meghatározza az EV felvétel mértékét CRC-ben, melynek funkcionális jelentősége is van: az IFITM1^{low} sejtek nem csak több EV-t vesznek fel, hanem az EV-knek nagyobb a hatása az IFITM1^{low} sejtek proliferációjára. Igazoltuk továbbá, hogy az IFITM1 fontos szereplő az EV felvétel gátlásában. A sztromasejtek tehát eltérő módon befolyásolják az egyes CRC sejt alpopulációk proliferációját az EV-ken keresztül. Minthogy bizonyos CRC sejt alpopulációk eltérő EV felvételi képességgel rendelkeznek, ezt figyelembe kell venni az EV alapú célzó eszközök tervezésekor.
- Kimutattuk az átfedést a PDAC organoidokból származó és a vérben keringő EV-k miRNS cargo-ja között. A miR-21 és a miR-195 nagyobb mennyiségben van jelen a PDAC vérplazma EV mintáiban a kontrollokhoz képest, bár ezek a miRNS-ek nem specifikusak a PDAC-ra. Ezen túlmenően adataink azt mutatták, hogy az I-es típusú kollagén felhalmozódása az ECM-ben lényegesen magasabb EV szintet eredményezett a hasnyálmirigy duktális organoid tenyészetekben, ami lehetséges magyarázatot ad a krónikus pancreatitis és PDAC vérminták emelkedett EV szintjére. Ezzel bizonyítékot szolgáltatunk arra vonatkozóan, hogy nem csak a mutációk, hanem az ECM-ben bekövetkezett változások is kritikusan módosíthatják az EV felszabadulását a hasnyálmirigy duktális sejtekből.

6. A dolgozathoz felhasznált saját közlemények

I. **Wiener Z**, Högström J, Hyvönen V, Band AM, Kallio P, Holopainen T, Dufva O, Haglund C, Kruuna O, Oliver G, Ben-Neriah Y, Alitalo K. Prox1 promotes expansion of the colorectal cancer stem cell population to fuel tumor growth and ischemia resistance. *Cell Rep.* 2014;8(6):1943-1956. IF: 8,358, független idézők: 43

II. Högström J, Heino S, Kallio P, Lähde M, Leppänen VM, Balboa D, **Wiener Z***, Alitalo K*. Transcription Factor PROX1 Suppresses Notch Pathway Activation via the Nucleosome Remodeling and Deacetylase Complex in Colorectal Cancer Stem-like Cells. *Cancer Res.* 2018;78(20):5820-5832. *megosztott utolsó szerzőség. IF: 8,378, független idézők: 14

III. Pribluda A, Elyada E, **Wiener Z**, Hamza H, Goldstein RE, Biton M, Burstain I, Morgenstern Y, Brachya G, Billauer H, Biton S, Snir-Alkalay I, Vucic D, Schlereth K, Mernberger M, Stiewe T, Oren M, Alitalo K, Pikarsky E, Ben-Neriah Y. A senescence-

inflammatory switch from cancer-inhibitory to cancer-promoting mechanism. *Cancer Cell*. 2013;24(2):242-56. IF: 23,893, független idézők: 143

IV. Elyada E, Pribluda A, Goldstein RE, Morgenstern Y, Brachya G, Cojocaru G, Snir-Alkalay I, Burstain I, Haffner-Krausz R, Jung S, **Wiener Z**, Alitalo K, Oren M, Pikarsky E, Ben-Neriah Y. CK1 α ablation highlights a critical role for p53 in invasiveness control. *Nature*. 2011;470(7334):409-13. IF: 36,280, független idézők: 132

V. **Wiener Z**, Band AM, Kallio P, Höglström J, Hyvönen V, Kaijalainen S, Ritvos O, Haglund C, Kruuna O, Robine S, Louvard D, Ben-Neriah Y, Alitalo K. Oncogenic mutations in intestinal adenomas regulate Bim-mediated apoptosis induced by TGF β . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(21):E2229-36. IF: 9,674, független idézők: 42

VI. Szvicsek Z, Oszvald Á, Szabó L, Sándor GO, Kelemen A, Soós AÁ, Pálóczi K, Harsányi L, Tölgyes T, Dede K, Bursics A, Buzás EI, Zeöld A, **Wiener Z**. Extracellular vesicle release from intestinal organoids is modulated by Apc mutation and other colorectal cancer progression factors. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(12):2463-2476. IF: 6,496, független idézők: 36

VII. Sándor GO, Soós AÁ, Lőrincz P, Rojkó L, Harkó T, Bogyó L, Tölgyes T, Bursics A, Buzás EI, Moldvay J, **Wiener Z**. Wnt Activity and Cell Proliferation Are Coupled to Extracellular Vesicle Release in Multiple Organoid Models. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:670825. eCollection 2021. IF: 5,69, független idézők: 7

VIII. Zeöld A, Sándor GO, Kiss A, Soós AÁ, Tölgyes T, Bursics A, Szűcs Á, Harsányi L, Kittel Á, Gézsi A, Buzás EI, **Wiener Z**. 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):3105-3120. IF: 9,78, független idézők: 11

IX. Kelemen A, Carmi I, Seress I, Lőrincz P, Tölgyes T, Dede K, Bursics A, Buzás EI, **Wiener Z**. CD44 Expression Intensity Marks Colorectal Cancer Cell Subpopulations with Different Extracellular Vesicle Release Capacity. *Int J Mol Sci*. 2022;23(4):2180. IF: 6,208, független idézők: 1

X. Oszvald Á, Szvicsek Z, Sándor GO, Kelemen A, Soós AÁ, Pálóczi K, Bursics A, Dede K, Tölgyes T, Buzás EI, Zeöld A, **Wiener Z**. Extracellular vesicles transmit epithelial growth factor activity in the intestinal stem cell niche. *Stem Cells*. 2020;38(2):291-310. IF: 6,022, független idézők: 26

XI. Oszvald Á, Szvicsek Z, Pápai M, Kelemen A, Varga Z, Tölgyes T, Dede K, Bursics A, Buzás EI, **Wiener Z**. Fibroblast-Derived Extracellular Vesicles Induce Colorectal Cancer Progression by Transmitting Amphiregulin. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:558. eCollection 2020. IF: 5,201, független idézők: 12

XII. Kelemen A, Carmi I, Oszvald Á, Lőrincz P, Petővári G, Tölgyes T, Dede K, Bursics A, Buzás EI, **Wiener Z**. IFITM1 expression determines extracellular vesicle uptake in colorectal cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78(21-22):7009-7024. IF: 9,261, független idézők: 3

7. Irodalomjegyzék

1. Bebelman MP, Smit MJ, Pegtel DM et al. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol Ther.* 2018;188:1-11.
2. Esmaeili A, Hosseini S, Baghaban Eslaminejad M. Engineered-extracellular vesicles as an optimistic tool for microRNA delivery for osteoarthritis treatment. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78:79-91.
3. Barker N, van Es JH, Kuipers J et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature.* 2007;449:1003-1007.
4. Sato T, Vries RG, Snippert HJ et al. Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009;459:262-265.
5. Sato T, van Es JH, Snippert HJ et al. Paneth cells constitute the niche for *Lgr5* stem cells in intestinal crypts. *Nature.* 2011;469:415-418.
6. Schuijers J, Clevers H. Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, *Lgr5* and R-spondins. *EMBO J.* 2012;31:2685-2696.
7. Rodilla V, Villanueva A, Obrador-Hevia A et al. *Jagged1* is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:6315-6320.
8. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487:330-337.
9. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a001008.
10. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell.* 2008;134:215-230.
11. Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell.* 2012;22:571-584.
12. Sampieri K, Fodde R. Cancer stem cells and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2012;22:187-193.
13. Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE et al. Lineage tracing reveals *Lgr5*+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science.* 2012;337:730-735.
14. Cortina C, Turon G, Stork D et al. A genome editing approach to study cancer stem cells in human tumors. *EMBO Mol Med.* 2017;9:869-879.
15. Kozar S, Morrissey E, Nicholson AM et al. Continuous clonal labeling reveals small numbers of functional stem cells in intestinal crypts and adenomas. *Cell Stem Cell.* 2013;13:626-633.
16. Barker N, Ridgway RA, van Es JH et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature.* 2009;457:608-611.
17. Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llargo A et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2015.
18. Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol.* 2010;12:468-476.

19. Berdiel-Acer M, Sanz-Pamplona R, Calon A et al. Differences between CAFs and their paired NCF from adjacent colonic mucosa reveal functional heterogeneity of CAFs, providing prognostic information. *Mol Oncol.* 2014;8:1290-1305.
20. Essex A, Pineda J, Acharya G et al. Replication Study: Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Elife.* 2019;8.
21. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address aadhe, Cancer Genome Atlas Research N. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 2017;32:185-203 e113.
22. Seino T, Kawasaki S, Shimokawa M et al. Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. *Cell Stem Cell.* 2018;22:454-467 e456.
23. Petrova TV, Nykanen A, Norrmen C et al. Transcription factor PROX1 induces colon cancer progression by promoting the transition from benign to highly dysplastic phenotype. *Cancer Cell.* 2008;13:407-419.
24. Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell.* 2013;152:25-38.
25. Smith S, Weston S, Kellam P et al. IFITM proteins-cellular inhibitors of viral entry. *Curr Opin Virol.* 2014;4:71-77.
26. Smith SE, Busse DC, Binter S et al. Interferon-Induced Transmembrane Protein 1 Restricts Replication of Viruses That Enter Cells via the Plasma Membrane. *J Virol.* 2019;93.
27. Weston S, Czieso S, White IJ et al. A membrane topology model for human interferon inducible transmembrane protein 1. *PLoS One.* 2014;9:e104341.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Tóth Sárának, akinek vezetésével a PhD fokozatomat megszereztem, és akitől mindig rengeteg szakmai és emberi támogatást kaptam. Nagy hálával tartozom eddigi mentoraimnak a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetben, akik már kezdő kutatóként is irányítottak, tanácsokkal láttak el: Prof. Falus Andrásnak, Prof. Buzás Editnek. Mindketten igazgatóként kötetlen, nagyon inspiratív és motiváló légkört teremtettek abban az intézetben, ahol jelenleg is dolgozom. Hálás vagyok nekik, hogy segítettek akkor is, amikor külföldön töltöttem a posztdoktori időszakomat, és visszavártak az intézetbe. Köszönöm Prof. Thomas Brunner-nek, akinek laboratóriumában Bern-ben, Svájcban néhány hónapot eltölthettem tanulmányúton a PhD képzésem alatt. Szakmai életem egy meghatározó periódusa köthető a Helsinki-ben eltöltött posztdoktori évekhez, ahol Prof. Kari Alitalo munkacsoportjában rengeteg lehetőséget kaptam új módszerek kipróbálására, együttműködések kialakítására más élvonalbeli kutatókkal. Köszönet neki ezért az izgalmas periódusért, az élvonalbeli első- és

társszerzős munkákért. Hálás vagyok Jenny Högström és Ville Hyvonen PhD hallgatóknak, akikkel együtt dolgozhattam Helsinki-ben.

Az elért eredményekben természetesen fontos szerepet játszott a csapatmunka. Köszönöm a Molekuláris Onkobiológia Kutatócsoport valamennyi korábbi és jelenlegi tagjának, hogy velem dolgoztak/dolgoznak: Dr. Szvicsek Zsuzsannának, dr. Oszvald Ádámnak, dr. Sándor Gyöngyvér Orsolyának, dr. Kelemen Andreának, dr. Zeöld Anikónak, Idan Carmi-nak, Soós András Áronnak, és valamennyi TDK hallgatónak. Hálás vagyok nekik, hogy nagyon emberi, inspiráló légkört alakítottak ki –a sikereket együtt értük el.

Köszönöm továbbá a klinikusoknak, Dr. Szűcs Ákosnak, Dr. Benke Mártonnak, Dr. Bursics Attilának, Dr. Dede Kristófnak és Dr. Tölgyes Tamásnak, akik rengeteg betegellátási feladatuk mellett nyitottak voltak a tudományos együttműködésre.

Hálás vagyok a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet valamennyi volt és jelenlegi munkatársának, akik segítették szakmai fejlődésemet.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak, hogy vannak, elviselnek, támogatnak, megértenek, szeretnek. Feleségemnek, aki a mindennapokban megteremtette a körülményeket az alkotó munkához, és mindig mellettem áll. Négy gyermekemnek, akik hatalmas örömforrást jelentenek. Szüleimnek, akik a kezdetektől támogattak, ma is támogatnak, bíztak és bíznak bennem.