

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Organoid technológián és állatmodelleken alapuló vizsgálatok gasztrointesztinális tumorokban

Dr. Wiener Zoltán



Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet

Budapest, 2023

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	9
2. Irodalmi háttér	10
2.1 Az extracelluláris vezikulák (EV) csoportosítása és szerepük	10
2.2 Az organoid technológia.....	11
2.3 A bélhám őssejt niche.....	12
2.4 Niche faktorok és jelátviteli utak a bélhámiban.....	12
2.5 A vastag- és végbélrák kialakulása és csoportosítása	14
2.6 Az intra-tumorális sejtes heterogenitás és a tumor őssejtek	16
2.7 A tumor-asszociált fibroblasztok.....	17
2.8 A PDAC fő jellemzői	18
3. Célkitűzések	20
4. Anyag és módszerek	21
5. Eredmények és megbeszélésük.....	25
5.1 A Prox1 szabályozza a CRC tumor-őssejtpopuláció méretét és elősegíti a daganat progresszióját CRC-ben.....	25
5.2 A driver mutációk módosítják az intesztinális adenómasejteknek a TGFβ által kiváltott, Bim-mediált apoptózisra való érzékenységet	47
5.3 Az EV-k szekréciója az Apc mutáció által aktivált Wnt útvonal és más CRC progressziós faktorok befolyásoló hatása alatt áll	59
5.4 Az EV kibocsátás korrelációt mutat a Wnt aktivitással egér hasnyálmirigy duktális sejtekben, de nem mutatható ki kapcsolat humán PDAC organoid modellben.....	68
5.5 A CD44 expressziós szintje különböző EV kibocsátási intenzitással rendelkező CRC sejtpopulációkat jelöl.....	72
5.6 Az EV-k EGF aktivitást közvetítenek a bél őssejt niche-ben.....	81
5.7 A fibroblasztokból származó EV-k indukálják a CRC sejtek osztódását amfiregulin szállítása által.....	91
5.8 A sejtfelszíni IFITM1 szint eltérő EV felvétellel jellemezhető CRC sejtpopulációkat jelöl	101
5.9 Átfedő miRNS profil organoid és vérplazma eredetű EV-k között PDAC-ben	115
6. Összefoglalás és kitekintés	124
6.1 A dolgozat legfőbb új eredményeinek összefoglalása.....	124
6.2 Kitekintés.....	126
7. A dolgozathoz felhasznált saját közlemények.....	128
8. Egyéb saját közlemények.....	129
9. Köszönetnyilvánítás.....	132
10. Irodalomjegyzék	133

Rövidítések jegyzéke

AAV: Adeno-asszociált vírus

ANXA1: Annexin A1

APC: adenomatózus polyposis coli (adenomatous polyposis coli) gén/fehérje

ASCL2: Achaete-scute homológ 2 (Achaete-scute homolog 2)

BH3: Bcl-2 homológ domén 3

BME: bazális membrán kivonat

BMP: csont morfogenetikus fehérje (bone morphogenetic protein)

BRAF: V-Raf egér szarkóma vírus onkogén homológ B1 (V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)

BSA: szarvasmarha szérum albumin

CAF: Tumorasszociált fibroblaszt

CHGA: kromogranin A

CKI α : kazein kináz I α

CP: krónikus hasnyálmirigy-gyulladás

CRC: vastag- és végbélrák

CreER: tamoxifen által indukálható Cre rekombináz

CTNNB1: A β -katenint kódoló gén

Csnk1a1: A CKI α -t kódoló gén neve

DAPT: Gamma-szekretáz inhibitor IX (Notch gátló)

DBZ: Dibenzazepin (Notch gátló)

DDR: DNS károsodásra adott válasz (DNA damage response)

DLL: delta-szerű fehérje (delta-like protein)

DMEM: Dulbecco módosított tenyészmédium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

ECM: extracelluláris mátrix

EGF: epidermális növekedési faktor

EGFP: jobban fluoreszkáló zöld fluoreszcens fehérje (enhanced green fluorescent protein)

EMT: epiteliális-mezenchimális tranzíció

EphB: Efrin B típusú receptor (Ephrin type-B receptor)

ERK: Extracelluláris jel által szabályozott kináz (extracellular signal-regulated kinase)

EV: extracelluláris vezikula

EX: exoszóma

FAP: Fibroblaszt aktiváló fehérje (fibroblast activating protein)

FGF: fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor)
FLNA: Filamin A
GSK-3: glikogén szintáz kináz-3
HBEGF: Heparinkötő EGF-szerű növekedési faktor (heparin-binding EGF-like growth factor)
HGF: hepatocita növekedési faktor
HPRT: hipoxantin-guanin foszforiboziltranszferáz
HSA: emberi szérum albumin
IFITM: Interferon által indukált transzmembrán fehérje interferon-induced transmembrane protein
IGF: inzulinszerű növekedési faktor (insulin-like growth factor)
IL: interleukin
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KRAS: Kirsten patkány szarkóma vírus (Kirsten rat sarcoma virus) gén/fehérje
LEF: limfoid enhancer kötő faktor (lymphoid enhancer-binding factor)
LOH: heterozigótáság elvesztése (loss of heterozygosity)
LGR: leucinban gazdag ismétlődést tartalmazó G-fehérje kapcsolt receptor (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor)
LRP: alacsony denzitású lipoprotein receptor (low-density lipoprotein receptor)
MAPK: Mitogén által aktivált protein kináz (mitogen-activated protein kinase)
MEK: Mitogén által aktivált kettős specifitású protein kináz kináz (dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase)
MMR: DNS mismatch javítás (mismatch repair)
MSI: mikroszatellita instabil (vastag- és végbélrák altípus)
MV: mikrovezikula
NICD: Notch intracelluláris domén
NOTCH: Neurogén lókus notch homológ fehérje (neurogenic locus notch homolog protein)
NSAID: Nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszer (nonsteroidal anti-inflammatory drug)
NSG: NOD scid gamma egér
NTA: Nanorészecske követő elemzés (nanoparticle tracking analysis)
PDAC: hasnyálmirigy duktális adenokarcinóma
PORCN: porcupine
PROX1: Prospero homeobox fehérje 1
PSIS: A p53 által elnyomott inváziós géncsoport (the p53-suppressed invasiveness signature)
PTF: tumorkörnyéki fibroblaszt

Scr: véletlenszerű nukleotidokat tartalmazó kontroll konstrukció

SI: vékonybél

SIR: szeneszencia által kiváltott gyulladásoos válasz (senescence-induced inflammatory response)

SMA: Simaizom aktin (smooth muscle actin)

STAT: Jelátalakító és transzkripció aktivátor (signal transducer and activator of transcription)

Tam, 4-OH-Tam: tamoxifen, 4-hidroxi-tamoxifen (a tamoxifen aktív formája)

TCGA: A rákgenom atlasz (The Cancer Genome Atlas)

TEM: transzmissziós elektronmikroszkóp

TKI: tirozin kináz gátló

TNF: tumor nekrozis faktor

TNFRSF19: tumor nekrozis faktor receptor szupercsalád tag 19 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 19)

TRPS: Tunable Resistive Pulse Sensing (partikulummérési módszer)

UC: ultracentrifuga

VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

villin: az intesztinális hámsejtekben expresszálódoó gén

WT: vad típus

Összefoglalás

A vastag- és végbélrákos (CRC) betegekben kulcsfontosságú az *Apc* mutáció, mely a Wnt útvonal aktiválásához vezet. Emellett a TGF β apoptotikus hatása az egyik fő szelekciós mechanizmus a CRC progressziója során. Munkánk során új, a CRC és a hasnyálmirigy duktális adenokarcinóma (PDAC), mint két fontos gasztrointesztinális tumor kialakulásában és progressziójában, illetve a tumor-sztróma kommunikációban fontos tényezőket vizsgáltunk. Ehhez egérmmodellek mellett a szövetekből származó *in vitro*, legmodernebbnek számító organoidokat használtunk, melyek megtartják a kiindulási szövet sejt heterogenitását.

Igazoltuk, hogy a Prox1 transzkripciós faktor, mely a Wnt útvonal bélhám-specifikus célgénje, szabályozza az adenóma és CRC tumorössejt aktivitást, ugyanakkor nincs hatása a normál bélhámra. Adataink azt igazolták, hogy a tumorigenezis legkorábbi fázisában az *Apc* mutáció után csak átmenetileg fontos a Notch útvonal az adenóma össejtek fennmaradásában. Hipoxiában ugyanakkor a Prox1+ tumorsejtek jobb túléléssel rendelkeznek, mely az autofágiának köszönhető. Bizonyítottuk, hogy az *Apc* inaktiválása növeli az adenómasejtek szenzitivitását a TGF β által kiváltott apoptózissal szemben, a KRas onkogén viszont részleges rezisztenciát biztosít az Erk1/2 útvonalon keresztül. Eredményeink szerint a Bim hatását utánzó molekulák apoptózist indukálnak olyan CRC betegekből származó mintákban is, melyek már rezisztensek a TGF β -val szemben.

Az extracelluláris vezikulák (EV) mind a korai diagnosztikában, mind a terápiás célzásban fontosak lehetnek. Igazoltuk, hogy az EV-k szekrécióját az *Apc* mutáció jelentősen módosítja CRC-ben, az EV kibocsátást hasnyálmirigy duktális sejtekben is növeli a Wnt aktiváció, ugyanakkor PDAC-ben a két jelenség szétkapcsolódik. Mindemellett adataink alapján a sejt heterogenitás fontos szereppel rendelkezik az EV kibocsátás és felvétel mértékében, a magasabb EV szekrécióval jellemezhető CRC sejtek hatása a fibroblasztok aktivációjára pedig az EV dózistól függ. Ugyanakkor azt találtuk, hogy az IFITM1-et alacsony szinten kifejező sejtek több EV-t vesznek fel, melynek funkcionális jelentősége van a CRC sejtek emelkedett mértékű proliferációjában.

A bélhám össejtekben bekövetkező mutációk a CRC tumorigenezis kiindulópontjainak tekinthetők. Bizonyítottuk, hogy a fibroblasztok az EGF családtag amfiregulint tartalmazó EV-eket bocsátanak ki, amelyek közvetlenül befolyásolják az össejtek proliferációját. Az EV-k amfiregulin által a CRC sejtek proliferációját is indukálják a tumorigenezis azon fázisában, amikor az EGF jelátviteli út még normális működésű.

Átfedést mutattunk ki a PDAC organoidokból származó és a vérben keringő EV-k miRNS cargo-ja között. A PDAC vérplazma EV mintáiban a kontrollhoz képest nagyobb mennyiségben jelen lévő miRNS-ek ugyanakkor nem specifikusak a PDAC-ra.

Összefoglalva elmondható, hogy a CRC progressziójában fontos új molekuláris mechanizmusokat azonosítottunk, illetve az EV-k szerepét igazoltuk CRC-ben és PDAC-ben.

1. Bevezetés

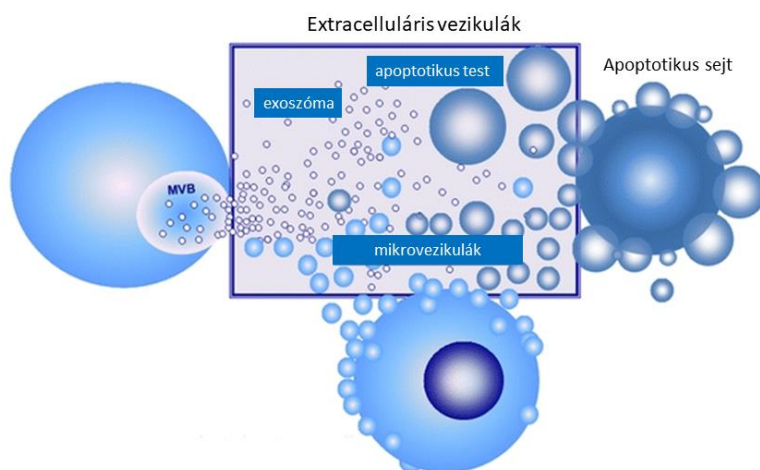
A gasztrointesztinális rendszert érintő tumorok közé tartozó vastag- és végbélrák (CRC) a rákos betegségek általi halálozási listán a második-harmadik helyet foglalja el a nyugati társadalmakban, a hasnyálmirigy duktális adenokarcinoma (PDAC) 5 éves túlélése pedig 8% alatti, mely az elmúlt évtizedekben nem javult jelentősen. Mindkét tumortípus tehát kiemelt népegészségügyi problémának tekinthető, amelyek patomechanizmusa azonban még nem teljesen ismert. A fejlett társadalmakban minden második személyben 70 éves korra vastagbél-tumor alakulhat ki, mely az esetek kb. 10%-ában rosszindulatúvá, CRC-vé alakulhat [1]. A CRC kialakulásában az öröklött genetikai variációk mellett fontosak a környezeti tényezők is, amelyek a bélhám sejteiben mutációkat indukálhatnak. Ezen tényezők közé tartozik az életvitel, vagy a táplálkozás; a megfelelő diéta segíthet a CRC megelőzésében. 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 (CAF). Bár az egérmódellek a korai tumorigenezis bizonyos folyamatait jól reprezentálják, a mutációk felhalmozódásával járó progresszió vizsgálatára más, elsősorban humán szövetekből származó modellek szükségesek. Ezt az űrt tölti ki az organoid technológia, mely elsősorban epiteliális eredetű szövetekből származó *in vitro* „miniszerveknek” tekinthetők, amelyek meghatározott három dimenziós tenyésztési körülmények között megtartják az eredeti szövet sejt heterogenitását, így egy korszerű vizsgálati rendszernek tekinthetők. Munkánk során a CRC korai stádiumának tanulmányozására állatmodelleket és organoidokat, míg a CRC és a PDAC későbbi fázisainak vizsgálatára betegekből származó organoidokat használtunk annak érdekében, hogy új, a CRC és a PDAC kialakulásában és progressójában, illetve a sztróma-tumor kommunikációban fontos tényezőket azonosítsunk és vizsgáljunk.

2. Irodalmi háttér

A dolgozat könnyebb érthetősége érdekében az alábbi általános fejezet mellett az eredmények ismertetésénél is összefoglaljuk az adott vizsgálatokhoz szükséges irodalmi háttérrel. Az általános megállapodás szerint a humán gének/fehérjék neveit nagy betűkkel, az egér megfelelőiket kis betűkkel jelöljük. A nukleinsavakat dőlt, a fehérjéket normál betűtípus mutatja.

2.1 Az extracelluláris vezikulák (EV) csoportosítása és szerepük

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) membránnal körülvett struktúrák, amelyek az intercelluláris kommunikáció új módját képviselik azáltal, hogy biológiailag fontos molekulákat, például miRNS-eket, fehérjéket és lipideket juttatnak el a célsejtekhez. Az EV-k biogenezisüket, méretüket, molekuláris rakományukat (cargo), specifikus markereiket és funkcióikat tekintve is rendkívül heterogének [2-5]. Az exoszómák (EX) endoszomális eredetű EV-k (30-100 nm), amelyek a multivezikuláris testekből (MVB) származnak, és az MVB-k plazmamembránnal való fúziója során szabadulnak fel a sejtekből. A mikrovezikulák (MV-k) közvetlenül a plazmamembránról fűződnek le, a legnagyobb apoptotikus testek (1-5 μm) pedig az apoptotikus sejtekből keletkeznek [6] (1. ábra). Mivel az EV-k izolálása keletkezési mechanizmusuk szerint nehézkes, ezért gyakran differenciált centrifugálással és ultracentrifugálással történő tisztítás során az egyes EV csoportokat méretük szerint választják szét [7]. Ennek megfelelően a nagy EV-k (large EV, lEV), valamint a médium EV-k (mEV) különböző sebességű centrifugálási lépések után az üledékben találhatóak, míg a kis EV (small EV, sEV) frakciót ultracentrifugálás után nyerhetjük.



1. ábra. Az EV-k csoportosítása sejtbeli eredetük szerint (a [8] ábrája módosítva).

Az EV-k a célsejteken különböző módokon hathatnak: sejtfelszíni receptorokhoz kötődhetnek, az EV membránja fuzionálhat 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 [9], és hogy a rákos sejtekből származó EV-k a tumorspecifikus molekulákat membránnal körülvett, védett környezetben hordozzák cargo-ként. Az EV termelés és molekuláris összetétel azonban nagymértékben függ a tenyésztési körülményektől, az izolálási módszerektől és a mindkét paramétert kritikusan befolyásoló külső tényezőktől is [10]. Az EV-k emellett szerkeszthetők és specifikus molekulákkal tölthetők fel, amelyeket aztán védett módon szállítanak, továbbá az EV-eket hatékonyan veszik fel a célsejtek, így az EV-k a tumorok terápiája szempontjából is ígéretes eszközöknek tekinthetők [11].

2.2 Az organoid technológia

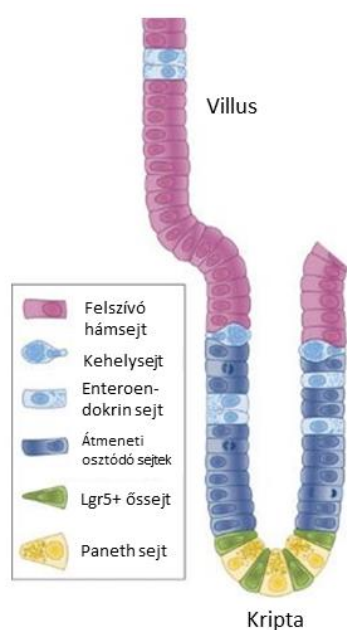
A genetikai szerkesztés metodikai fejlődésével egyre kifinomultabb és bonyolultabb állatmodellek (pl. egértörzsek) előállítása vált lehetővé, amelyek az egyes tumortípusok kialakulásának mechanizmusára is fényt tudtak deríteni. Ugyanakkor az emberi tumor esetében nagyfokú genetikai sokféleség figyelhető meg, melyet a genetikailag szerkesztett egértörzsek csak korlátozottan tudnak modellezni. A vastag- és végbélrák (CRC) jelentős részénél a progresszió kezdeti lépése adenómák kialakulása a vastag, vagy a végbélben [12]. Az intesztinális adenómák modellezésének egyik gyakran használt eszköze az *Apc^{Min/+}* egértörzs, mely azonban elsősorban a vékonybélben fejlesztet nagyszámú adenómát, és CRC-vé való progresszió nem figyelhető meg, valószínűleg az egerek korai halála miatt. Mindez felveti az igényt olyan módszerek kifejlesztésére, melyek segítségével az egyes betegekben jelen lévő tumorok specifikusan, személyre szabottan is modellezhetők lennének.

Az organoidok szövetekből származó, *in vitro* 3D körülmények között, extracelluláris mátrix kivonatokban (pl. a lamininben és kollagén-IV-ben gazdag Matrigel) fenntartott tenyészetek, melyek „miniszerveket” képeznek. Az organoidok megőrzik az *in vivo* szövetek sejtes és genetikai heterogenitását, és ez idáig az emberi rákos megbetegedések egyik legjobb *ex vivo* modelljének bizonyultak [13, 14]. Mára organoidokat sikeresen tenyésztettek számos egér és emberi egészséges és rákos szövetből, így hasnyálmirigyből [15], vékonybélből [16],

vastagbélből [17], májból [18] stb., jól meghatározott, specifikus tenyésztési körülmények között.

2.3 A bélhám őssejt niche

A bélhám különböző, jellegzetes funkciókkal jellemezhető sejtípusokat tartalmaz. A kehelysejtek mucint termelnek nagy mennyiségben, jellemző markerük a MUC2 kifejeződése. A felszívó hámsejtek mellett a bélhám chromogranin A-t (CHG A) expresszáló enteroendokrin sejteket is tartalmaz. A vékonybél Lieberkühn-kriptái alján található a Paneth-sejtek, melyek antibakteriális fehérjék termelése által fontosak a bél mikrobiótájának a megfelelő fenntartásában. A bélhám sejtípusai 5-6 naponként lecserélődnek (a Paneth sejtek kivételével, melyek hosszabb életidejűek). Ezek utánpótlását –egy átmeneti osztódó progenitor, transit amplifying (TA) sejt populáció létrehozásán keresztül- a Lieberkühn-kripták alján található őssejtek biztosítják, melyek egyik legismertebb markere az Lgr5 [19] (2. ábra). Az őssejt tulajdonságok fenntartásáért a környező sejtekkel való kapcsolat, valamint a mikrokörnyezeti tényezők (pl. növekedési faktorok, jelátviteli folyamatokat indukáló molekulák) összessége



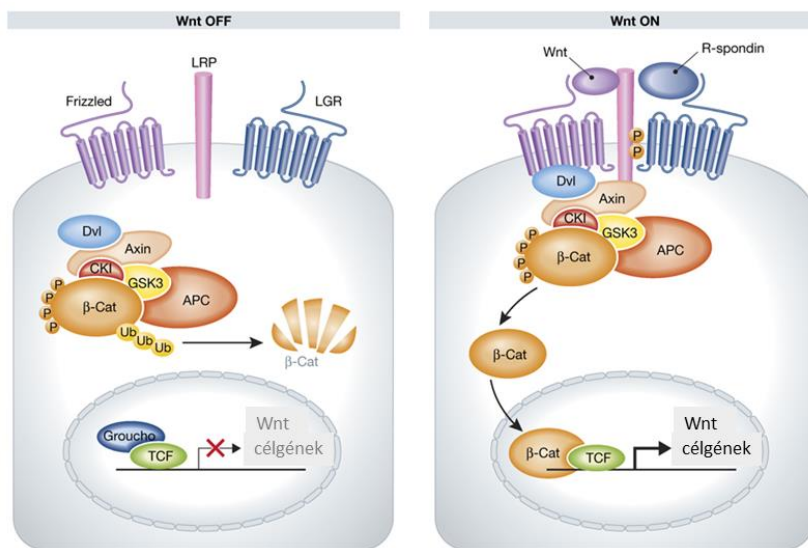
felelős, mely az őssejt niche-t alkotja. A bélhám őssejt niche központi jelentőségű faktorai a Wnt, a Wnt jelátvitel erősségét tovább fokozó R-Spondin, az epidermális növekedési faktor (EGF), valamint a sejt differenciálódást indukáló bone morphogenic protein-ek (Bmp) gátlói, például a noggin [20]. A niche faktorok termelésében a kripták körüli miofibroblasztok, valamint a Paneth-sejtek fontosak, mely ez utóbbi sejtípusnak egy új funkcióját jelenti [16].

2. ábra. A vékonybélhám felépítése ([21] alapján módosítva)

2.4 Niche faktorok és jelátviteli utak a bélhámiban

A Wnt ligandok egy nagyobb család tagjai, melyek átfedő hatással rendelkeznek. A sejtfelszíni Frizzled receptorokhoz kötődnek, a receptorkomplex része még az LRP5/6. A sejtek citoplazmájában egy lebontó (destructing) multiprotein komplex van jelen, melynek fontos komponensei az adenomatosus polyposis coli (APC), a kazein kináz I alfa (CKI α) és a β -katenin. Wnt ligand hiányában ez a komplex a β -katenint foszforilálja, mely ubikvitinálódás

után a proteaszómában lebontódik. A sejtmagban a TCF és a LEF transzkripciós faktorok, melyek a Wnt fehérjék hatásának központi végrehajtói, gátlás alatt állnak, így az ún. Wnt célgének nem fejeződnek ki. Wnt hatására a Frizzled/LRP receptor aktiválódik, mely inaktiválja a lebontó komplex aktivitását. Ennek hatására a β -katenin lebontása elmarad, a β -katenin felhalmozódik a citoplazmában, majd a sejtmagba transzlokálódik, ahol a TCF/LEF transzkripciós faktorokról leszorítja a gátló fehérjét, és a TCF/LEF fehérjékhez kötődve elindítja a Wnt célgének átírását. A célgének közé tartoznak a sejtosztódást serkentő fehérjéket kódoló gének (pl. *MYC*), az őssejt-marker *LGR5*, *LGR6*, a *TROY* (*TNFRSF19*), vagy a lebontó komplexben részt vevő *AXIN2* [21] (3. ábra).



3. ábra. A kanonikus Wnt útvonal működése ([21] alapján módosítva).

A Wnt szabályozás alatt álló LGR5 szintén részt vesz a Wnt jelátviteli útvonalban. Az LGR5 ligandjai az R-Spondin fehérjék, melyek jelenlétében az LGR5 is a Wnt receptorkomplex részévé válik, és meghosszabbítja a Wnt útvonal aktiválódásának az időtartamát [22]. Ez kulcsfontosságú az őssejt niche esetében –a bélhám őssejtjei ugyanis magas, és hosszan tartó Wnt aktivitást igényelnek.

A Notch jelátviteli útvonal az őssejt niche-ben a Wnt útvonallal együttesen aktív, és egymás hatását kölcsönösen erősítik [23]. Aktivációjához a sejtfelszíni Notch1-4 receptorokhoz a szomszédos sejt plazmamembránhoz kötött ligandja (Dll-1, Dll3, Dll4, Jagged-1 vagy Jagged-2) kapcsolódik. Ezt követően megtörténik a Notch hasítása az ADAM (dizintegrin és metalloproteáz) által, mely az extracelluláris rész lehasítódásához vezet. A megmaradó transzmembrán és intracelluláris régiót a γ -szekretáz hasítja, így keletkezik a Notch intracelluláris domén (NICD), ami a sejtmagba bejutva a transzkripcióban fontos szerepet lát el [24, 25].

Az EGF (epidermális növekedési faktor) a sejtfelszíni EGF-receptorhoz kötődik, mely az EGF receptorcsalád különböző tagjaival (ErbB2, ErbB3, ErbB4) heterodimerizálódik. Az EGF által indukált egyik központi útvonal a mitogen-activated protein (MAP) kináz útvonal, melyben fontos a KRAS és a BRAF aktiválódása, valamint az Erk1/2 foszforilációja. Az EGF sejtosztódást indukál, mely szintén fontos az intesztinális őssejt-populáció méretének szabályozásában [16]. Az EGF családba több más molekula is tartozik (pl. amfiregulin), melyek az EGF receptorcsalád különböző tagjaiból álló hetero-vagy homodimerhez kapcsolódva indítanak be jelátviteli folyamatokat a sejtekben.

2.5 A vastag- és végbélrák kialakulása és csoportosítása

A CRC kialakulásának több útvonala is ismert, melyek eltérő adenomatípusokból indulhatnak ki. Az egyes adenóma típusok morfológiai jellemzése fontos lehet a kezelés kiválasztása és a betegség progressziója tekintetében [26].

Az esetek többségében a betegség a klasszikus tubulovillosus adenóma-karcinóma útvonalon alakul ki. Ennek során a bélhám epitelsejtjeinek megváltozott működése miatt egy Lieberkühn-kriptából kiindulva abnormális, de még jóindulatú sejtszaporulat jelenik meg (polip, tubulovillosus adenóma), mely jellegzetes mutációk felhalmozódása miatt több év alatt rosszindulatú daganattá válhat [27]. Ennek a folyamatnak az első lépése általában a Wnt útvonal állandó, külső jelektől független aktiválása. 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 célgénnek átírását serkenti. A betegek egy másik részében a β -katenin olyan aktiváló mutációt hordoz, mely megakadályozza a fehérje lebontását. Mindkét esetben a mutációt hordozó sejt külső Wnt ligandumok hiányában is osztódik, elveszti a mikrokörnyezet általi szabályozási lehetőséget, mely adenómaképzéshez vezet. Barker N és munkatársai elegáns kísérletekkel kimutatták, hogy az Lgr5⁺ intesztinális őssejtekben kialakuló *Apc* mutációk vezetnek hosszú távú adenómaképzéshez, a bélhám differenciált sejtípusaiban bekövetkező genetikai változások kevésbé fontosak a tumorképzés elindításához [28]. Más munkacsoportok később igazolták, hogy a krónikus gyulladási folyamatok a differenciált sejtekben is őssejt tulajdonságokat képesek indukálni, mely lehetővé teszi, hogy az Lgr5⁺ őssejteken kívüli sejtpopuláció mutációi is adenómaképzést indukáljanak [29]. Mindezen adatok azonban az őssejt tulajdonságokkal rendelkező bélhámsejtek fontos szerepét hangsúlyozzák a CRC korai fázisában.

Az *APC*-re nézve heterozigóta formában öröklött mutációt hordozó személyek fokozott hajlamot mutatnak CRC kialakulására, melynek hátterében a normális *APC* allél mutáció általi inaktivációjának (loss of heterozygosity, LOH) nagy valószínűsége áll [1]. Ezek a familiáris adenomatous polyposisban (FAP) szenvedő betegek már fiatal korukban rengeteg adenómát növesztenek a vastag- és végbelükben, melyek eltávolítása nélkül az átlagpopulációhoz képest korán CRC-ben szenvedhetnek. A CRC betegek döntő többsége azonban a sporadikus esetekhez tartozik, amely csak későbbi életkorban, tipikusan 50-60 éves kor után jelenik meg. Az *Apc* gén mutációja egérben is tumorigenezishez vezet, a közismert *Apc*^{Min/+} egerek az *Apc* mutációt heterozigóta formában hordozzák, és az LOH miatt 3-4 hónapos korukra rengeteg adenómát fejlesztenek, az emberrel szemben azonban elsősorban a vékonybélben. Mivel ezek az egerek viszonylag hamar elpusztulnak, a CRC kialakulásának tanulmányozására nem ideálisak [30].

Az adenómák 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 leggyakoribbak a G12D, G12V) [31]. A betegek egy másik csoportjában a KRAS mutáció helyett a BRAF aktivációja figyelhető meg [31]. Mind a KRAS, mind a BRAF onkogén mutációja a külső EGF-től független, szabályozatlan sejtosztódást indukálnak [32]. A CRC kialakulásának további központi eseménye a sejtciklus kontrollpontjainak az inaktiválódása, ezáltal a genomi instabilitás létrejötte és további mutációk felhalmozódása. A kontrollpontok működésének kiesésében fontos a *TP53* tumor szupresszor gén mutációja (egérben *Trp53*), mely a p53 fehérjét kódolja [33].

Egy másik lehetőség az úgynevezett „fogazott” (serrated) útvonal, ami a CRC esetek 10-20%-ában figyelhető meg, és amely „fogazott” adenomából indul ki. Bár a fogazott útvonal heterogén, az így létrejött tumorer morfológiailag eltérnek a tubulovillosus adenomából kiinduló típustól [26]. A fogazott adenomából kialakulhat mikroszatellita stabil és instabil CRC is. Míg az előbbire a *KRAS*, az utóbbira a *BRAF* mutáció a jellemző. A mikroszatellita instabil (MSI) útvonalra a DNS hibajavító enzimek működésének hiánya jellemző, a mismatch repair gének (MMR) inaktiválódnak (pl. MSH2,6, PMS1,2, MLH1,3), mely a genomi mutációk széleskörű felhalmozódásához vezet. Ebben a CRC típusban a mikroszatelliták területén is fokozott mutációs aktivitás mutatható ki, mely alapján az MSI detektálható, és a jelenség elnevezése is innen származik [34].

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 [35, 36]. A CRC-ben a TGF β legfőbb termelői a lokális tumor mikrokörnyezetben felhalmozódó fibroblasztok [36, 37]. A TGF β tagjai sejt felszíni receptorukhoz kötődnek (TGF β RI és TGF β RII), majd az I-es és II-es típusú receptorok egymáshoz kapcsolódnak, és aktiválódnak. Az aktiváció eredményeként a SMAD fehérjék, mint például a SMAD2/3 foszforilálódása következik be. A SMAD4 ezután a sejtmagba transzlokálódik, ahol a TGF β célgének expresszióját megváltoztatja [38]. A TGF β jelátviteli útja a CRC sejtekben leggyakrabban a TGF β RII, vagy a SMAD4 inaktiválódásával kapcsolódik ki.

Mint ahogy a CRC genetikailag és fenotípusosan is heterogén betegség, ezért a közelmúltban létrehozták a CRC konszenzusos csoportosítását génexpressziós mintázatok elemzésével [39]. Míg az inaktivált MMR-rel és mikroszatellita instabilitással (MSI) jellemezhető CRC betegek a CMS1-be csoportosulnak, a *MYC* és a specifikus WNT célgének fokozott expressziója jellemző a CMS2-re. A CMS3 betegek több mint 70%-ában a *KRAS* onkogén aktivitása a tumoros sejtek metabolikus átprogramozásához vezet. A sztromális infiltrációval és TGF β jelátvitellel járó CMS4 prognózisa a legrosszabb, és hiányoznak a hatékony kezelések erre az altípusra. Erre a csoportra ugyancsak jellemző az epithelialis-mezenchimális tranzíció (EMT), melynek során a tumorsejtek mezenchimális markereket fejeznek ki és inváziós fenotípust vesznek fel. Míg a CMS2 és CMS3 kialakulása tubuláris adenómához kapcsolódik első lépésként, a CMS1 és a CMS4 feltehetően „fogazott” (serrated) elváltozásokból fejlődik ki, és a CMS1-ben gyakran *BRAF* mutáció található. Irodalmi adatok azt is valószínűsítik, hogy a CMS4-hez magas TGF β szintre van szükség [40]. Érdekes módon azonban a CMS2 és a sztromális CMS4 altípus hasonló gyakorisággal tartalmaz *APC*, *KRAS*, *SMAD4*, *TGFBR2* és *TP53* mutációkat [39]. Ezen kívül a fogazott elváltozások nagy százaléka tartalmaz *KRAS*-mutációt [32] és más genetikai eseményeket, például *TP53*-mutációkat. Mindezek az adatok alátámasztják azt az elképzelést, hogy a CRC-ben fontos driver mutációkat hordozó tumorképzés biológiája jelentős heterogenitást mutat, és a CRC fenotípusosan plasztikus.

2.6 Az intra-tumorális sejtes heterogenitás és a tumor őssejtek

A szolid tumorok sejtjei mutációs és molekuláris szempontból heterogén populációt alkotnak, mely a tumorigenezis egyik fő hajtóerejének tekinthető. A béladenómák és CRC tumorképzés

rendkívül heterogének, proliferáló és differenciálódó sejteket egyaránt tartalmaznak, és folyamatosan fenntartja őket egy dedikált sejtpopuláció, az úgynevezett tumor őssejtek [41-43]. A tumor őssejtek fontos gyógyszercélpontot jelentenek a rákos megbetegedésekben, mivel képesek a daganatokban külön populációként fennmaradni, önmegeújulni és differenciálódni, valamint összefüggésbe hozhatók a daganat ismételt megjelenésével [41]. Ezért a rákos őssejteket célzó specifikus terápiák kifejlesztése javíthatja a túlélést.

Bár a neoplasztikus sejteket fokozott sejtproliferáció és korlátozott sejt differenciálódási képesség jellemzi, részletes differenciálódási útvonaluk CRC-ben nem teljesen ismert. Kimutatták, hogy az *Lgr5* gén expressziója egy őssejt-tulajdonságokkal rendelkező sejtpopulációt jelöl meg intesztinális adenómákban és CRC-ben [42-44]. Emelett az intesztinális őssejtekre jellemző génexpressziós profil, beleértve az *LGR5* expressziót is, azonosítja a CRC őssejteket, és előre jelzi a betegség ismételt megjelenését humán CRC-betegeknél is [45]. Érdekes módon további vizsgálatok azt mutatták, hogy az intesztinális adenómák kevesebb őssejtet tartalmaznak, mint az *Lgr5*+ sejtek száma, ami arra utal, hogy az *Lgr5*+ sejteknek csak egy alpopulációja működik őssejtként [46]. Emellett az *Lgr5*+ sejtekben kialakuló *Apc* mutáció képes hatékonyan elindítani az adenómák kialakulását [28].

A CRC-k olyan sejtcsoportokat is tartalmaznak, amelyek immunhiányos gazdaszervezetbe ültetve hatékonyan képeznek tumort. Ezek a sejtek, amelyeket tumorindító sejteknek neveznek, a felszíni markerek, például a CD133 [47, 48] vagy a CD44 [49] expressziójával azonosíthatók. A CD133+ vagy CD44+ sejtpopulációk az aggresszív CRC sejtek egy bizonyos alcsoportját képviselik. Ezen túlmenően néhány bizonyíték összefüggésre utal a daganatot indító sejtek és a tumor őssejtek között. A CD133 és a CD44 különösen a normál kripták proliferatív részében expresszálódik [50, 51]. Ezen kívül az izolált CD133+ sejtek *in vitro* differenciálatlan populációként szaporíthatók, amely xenotranszplantáció után differenciált sejteket tartalmazó tumorokat generál [52]. E megfigyelések ellenére a tumor őssejtek és a CD133+/CD44+ tumorsejtek közötti kapcsolat továbbra is kérdéses.

2.7 A tumor-asszociált fibroblasztok

Egyes CRC betegekben a fibroblasztok felhalmozódása figyelhető meg a tumorban. 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 sejt típus a tumor stromában, erős negatív korrelációt mutat a CRC kiújulásáig eltelt idővel, és mennyisége összefügg a betegek rosszabb túlélésével [37].

Ezen kívül a sztromális génexpressziós mintázat rossz túlélést jósol a betegeknél [36]. A CAF-okat elsősorban az α -simaizom aktin (α SMA) vagy a fibroblaszt aktiváló fehérje (FAP) alapján azonosítják, és heterogén sejtcsoportot alkotnak a daganatos szövetben, ahol például az extracelluláris mátrix (ECM) fehérjéit termelik, mint pl. a kollagén-I. A CAF-ok TGF β 1-et és TGF β 3-at is szekretálnak, így a fibroblasztok mennyisége és a sztróma egyéb sejteiben a TGF β jelátviteli út aktiváltsága között korreláció figyelhető meg [36, 37]. 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, mint például a HBEGF, az IL6 és az IL11 expressziójának emelkedése. Az IL11 elősegíti a CRC sejtek invázióját és metasztázis kialakulását a STAT jelátviteli útvonalon keresztül [36]. A sztromális fibroblasztok jelentősen elősegítik a CRC sejtekben az agresszív őssejt fenotípus kialakulását például hepatocita növekedési faktor (HGF) termelése által, mely a Wnt útvonal aktivitását fokozza a tumorsejtekben [53].

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 [54]. Érdekes módon a CAF-ok jelentősen hozzájárulnak a CRC intra-tumorális sejtes heterogenitásának kialakulásához [53, 55], mely során a tumorsejtek egy csoportja például őssejt aktivitást vesz fel.

2.8 A PDAC fő jellemzői

A pancreas duktális adenokarcinóma (PDAC) az egyik legveszélyesebb tumortípus, 5 éves túlélési aránya kevesebb, mint 8%, mely –az intenzív kutatások ellenére- nem javult lényegesen az elmúlt két évtizedben. Magyarországon a rákos halálozáshoz vezető tumortípusok között az ötödik helyen áll. Kialakulásában a jelentős rizikófaktorok közé tartozik a dohányzás, az elhízás, a *Helicobacter pylori* fertőzés, valamint a krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban (CP) szenvedő betegek is jelentősen emelkedett PDAC rizikóval számolhatnak. Bár új, ígéretes célpontokat fedeztek fel [56], a korai diagnosztizálás és a kezelés hatékonysága csak lassan javul, és a PDAC megbízható biomarkereinek azonosítása továbbra is megoldandó feladat. A PDAC daganatok több, mint 80%-a jellemző mutációkat hordoz a *KRAS*-ban, amely kulcsfontosságú fehérjét kódol az EGF jelátviteli útvonalában, és/vagy a *TP53* génben, amely központi szerepet játszik a DNS károsodásra adott válaszbán. A más génekben előforduló nagyszámú driver mutáció azonban nagy intra- és intertumorális genetikai heterogenitáshoz

vezet [57]. Az eltérő sejtfelszíni CD44, CD133 vagy CD9 expressziós szintekkel rendelkező PDAC sejtpopulációk jellemzőit már leírták [58-60]. A CD9^{high} sejtekből származó daganatok például vegyes szövettani képet mutattak, amely egyaránt tartalmazott dukális (CK19+) és agresszív, orsó alakú (CK19-), mezenchimális (szarkomatoid) tumorsejteket. Ezzel szemben a CD9^{low} sejtek kizárólag CK19+ kuboidális hámsejteket alkottak [58]. Egy nemrég publikált tanulmány pedig a BMP gátló gremlin-1 központi szerepére hívja fel a figyelmet a PDAC sejtes heterogenitásának fennmaradásában. A BMP aktivitás állandó gátlása elengedhetetlen az epiteliális PDAC sejtek fennmaradásához, és a gremlin-1 inaktiválása eger PDAC modellben az epiteliális sejtek közvetlen átalakulását eredményezte mezenchimális PDAC sejtekké [61].

A PDAC egy további fontos jellemzője a fibroblasztok felhalmozódása a sztrómában. Ezek a CAF-ok nagy heterogenitást mutatnak, és ellentmondásos adatokat publikáltak arról, hogy gátolják vagy indukálják a tumorigenezist. A nemrég megjelent tanulmányok két különböző CAF populációt azonosítottak PDAC-ban: míg a miofibrotikus myCAF-ok elsősorban ECM komponenseket termelnek, az IL1 α által indukált iCAF-ok gyulladásszerű tulajdonsággal rendelkeznek, és citokineket szecernálnak nagy mennyiségben [62, 63].

A közelmúltban egy PDAC betegekből származó organoid könyvtáron végzett hatóanyagszűrés nem talált olyan vegyületeket, amelyek minden organoid vonalon hatékonyak lettek volna, ami arra utal, hogy nincs általános kezelési lehetőség, és minden betegnek egyedi gyógyszerkombinációra lehet szüksége [64]. Egy másik PDAC organoid könyvtár bizonyította, hogy míg egyes PDAC organoidok teljesen külső (például sztrómális fibroblaszt eredetű) Wnt fehérjéktől függenek, mások Wnt-t termelnek maguknak (Wnt+ organoidok). Bár a Wnt útvonal mutációi ritkák PDAC-ben, ez egyértelműen jelzi a Wnt jelátvitel fontos szerepét a tumorsejtekben. Ugyanezen könyvtár útmutatást adott arra is, hogy a PDAC organoidokat milyen stratégiát követve lehet szelektálni a kiindulási szövetben jelen lévő normális hasnyálmirigy sejtek által képzett organoidoktól [65]. Így ezek az eredmények rávilágítanak a Wnt útvonal központi szerepére a sejtes heterogenitás kialakulásában nem csak CRC-ben és a normál bélhamban, hanem a PDAC-ben is.

3. Célkitűzések

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 transzkripció faktor specifikusan a Wnt útvonal hiperaktiválásának hatására kapcsolódik be, a normál bélhámokban csak ritka sejtekben van jelen és nem ismert bélhámhoz kötött funkciója. A Prox1-nek *Apc* mutációval rendelkező egerekben való kiütése gátolta az adenóma növekedését és a diszplázia kialakulását [66], így ez a molekula, vagy valamelyik célgénje érdekes beavatkozási pont lehet. Vizsgálatainkban a PROX1 által indukált CRC progresszió mechanizmusának feltérképezését tűztük ki célul *Apc* mutáción alapuló modellekben, 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 az intesztinális korai adenómákban 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 a CRC-ben az intratumorális sejtes heterogenitás befolyásolja-e az EV kibocsátást és az EV cargo-t. Eltérő EV szekréciós 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.

4. Anyag és módszerek

A felhasznált módszerek részletesebb ismertetése a közleményekben található, terjedelmi okokból az alábbiakban egy rövid összefoglalás olvasható azon felhasznált legfontosabb módszerekről, melyek fontosak a dolgozat további megértéséhez.

Intesztinális és pancreas duktális organoidok előállítása

Az illetékes hatóság (Állatkísérletek Nemzeti Hatósága, Dél-Finnországi Regionális Iroda) engedélyével használtuk az alábbi egértörzseket: $Apc^{flox/flox}$; $villin-CreER$ (VApc), $Apc^{flox/flox}$; $Prox1^{flox/flox}$ [67]; $villin-CreER$ (VApcP), $CK1\alpha^{flox/flox}$; $p53^{flox/flox}$; $villin-CreER$ (VCKI) [68], $Prox1^{flox/flox}$; $villinCreER$, $Apc^{flox/flox}$; $Lgr5-EGFP-IRES-CreER$ (LApc) [19] és $Apc^{flox/flox}$; $Prox1^{flox/flox}$; $Lgr5-EGFP-IRES-CreER$ (LApcP). A Pest Megyei Kormányhivatal (Magyarország), mint állategészségügyi hatóság jóváhagyta a C57Bl/6J (Jackson Laboratory, 000664) és az *UBI-GFP* (Jackson Laboratory, 004353) egerekkel végzett kísérleteket. Normál intesztinális kriptákat korábban publikált módszerek szerint izoláltunk [17, 20]. Körülbelül 500 kriptát ágyasztunk be növekedési faktor csökkentett, fenolvörös mentes Matrigelbe (Corning), majd 100 ng/ml noggin (Peprotech), 50 ng/ml EGF-et (Peprotech) és 500 ng/ml egér R-Spondin1-et (BioTechne) tartalmazó médiumban tenyésztettük. Egyes kísérletekben az *Apc* mutációt hordozó organoidokat R-Spondin1 hiányában szelektáltuk 5-6 napig. A hasnyálmirigy ductus-okat C57Bl/6J egerekből (Jackson Laboratory, 000664) izoláltuk mikroszkóp alatt, és Matrigel-be ágyasztuk. Ezután gasztrin (10 nM), 1,25 mM N-acetil-cisztein, egér R-Spondin1 (500 ng/ml, Bio-Techne), noggin (100 ng/ml, Peprotech), nikotinamid (10 mM, Sigma), FGF-10 (100 ng/ml, Peprotech) és EGF (50 ng/ml, Peprotech) jelenlétében tenyésztettük.

In vivo kísérletek

A VApc, LApc és LApcP egereket intraperitoneálisan két egymást követő napon tamoxifennel (2 mg/200 μ l napraforgóolaj, Sigma) injektáltuk 7-8 hetes korukban. A sejtorskövetési kísérletekhez (lineage tracing) a $Prox1-CreER$ [69]; $Rosa26-tdTomato^{flox/Stop/flox}$ (Jackson Laboratories, 007914); $Apc^{Min/+}$ és a $Prox1-CreER$; $Rosa26-tdTomato^{flox/Stop/flox}$ egereket egyetlen tamoxifen injekcióval kezeltük, majd a beleket különböző időpontokban elemeztük.

Humán organoid kultúrák

A kísérletek az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos Kutatásaitikai Bizottsága jóváhagyásával (TUKEB 51323-4/2015/EKU) és a betegek írásos beleegyezésével történtek. A CRC betegek szövetmintáit korábban publikált módszerek szerint dolgoztuk fel [17, 20, 70]. Az izolált szövetdarabokat Matrigel-be ágyasztuk, és advanced DMEM/F12 médiumban

tenyésztettük, melyhez N2 és B27-kiegészítőket, 10 mM HEPES-t, 1 mM N-acetil-ciszteint, glutamint, penicillint/streptomocint, 500 nM A83-01-et (TGF β receptor gátló), 10 μ M SB202190-monohidrokloridot (p38 gátló) és 50 ng/ml EGF-et is adtunk. PDAC betegek esetében a szövetdarabokat kollagén/diszpáz emésztés után 10 nM gasztrin, 1 mM N-acetil-cisztein, 500 nM A83-01, 100 ng/ml egér Wnt3a és 500 ng/ml humán R-Spondin1 jelenlétében tenyésztettük.

Transzdukció lentivírussal

A humán *shANXA1* (sh1), humán *ANXA1*-et kódoló lentivírus konstrukciót, a kontroll expressziós vektort és a *PROX1* csendesítő konstrukciót (sh1) már korábban publikálták [66, 71]. Az egér *shAnxa1* (TRCN0000109728 és TRCN0000109729), humán *shPROX1* (sh2) (TRCN0000016252), *shANXA1* (sh2) (TRCN0000056099), *shFlna* (TRCN0000239210), *shFLNA* (TRCN0000062528 és TRCN0000062529) és a kontroll konstrukciók (SH002) a TRC1 könyvtárból (Sigma) származtak. A transzdukcióval sikeresen módosított sejteket 5 μ g/ml blaszticidinnel (Invitrogen) vagy 5 μ g/ml puomicinnel (Sigma) szelektáltuk.

Humán EV-k kimutatása anti-CD63 vagy anti-CD81 ellenanyaggal bevont gyöngyökkel

A sejt- vagy organoid tenyészetek felülúszóit összegyűjtöttük, és 300 g-vel 5 percig, majd 2000 g-vel 20 percig végzett centrifugálás után az EV-eket antitesttel bevont gyöngyökhöz kötöttük, és a gyöngyökhöz kapcsolt EV-eket 20 percig ellenanyaggal jelöltük. Ezután 10 000 gyöngyöt FACSCalibur (BD) vagy Cytoflex (Becton) áramlási citométerrel mértünk le. Minden kísérletben a sejteket Bürker kamrával megszámloltuk, és az eredményt a sejtszámra normalizáltuk.

Az EV-k kimutatása áramlási citometriával

Az áramlási citometriás EV detektálást a [72] szerint végeztük kisebb módosításokkal. A sejteket és a sejtfragmentumokat sorozatos centrifugálással (300 g 5 perc, 2000 g 20 perc) eltávolítottuk a felülúszóból. 50 μ l felülúszót FITC Annexin V-tel (Sony) 30 percig jelöltünk, majd 200 μ l annexinkötő puffert (BD Biosciences) adtunk hozzá. Az EV-eket 90 másodpercig mértük FACS Calibur-on, majd a mintákat 0,1% Triton X-100 kezelés után ismét elemeztük, mely az EV-eket lizálta. Az abszolút EV számot a mintákhoz adott számláló gyöngyök (Count Check Microbeads, Sysmex Partec GmbH) segítségével számítottuk ki.

Áramlási citometria és sejtszortolás

Az organoidokat eltávolítottuk a 3D mátrixból, erőteljes pipettázással mechanikusan szétörtük, majd TrypLE-vel (Thermo Fisher) emésztettük, amíg egysejtes szuszpenziót kaptunk (5–10

perc). Jelölés után 10 000 eseményt mértünk FACSCalibur citométerrel (Beckton Dickinson), vagy a sejt alpopulációkat fluoreszcens sejtszorterrel (Sony SH800S) választottuk szét. A sejteket ezután Matrigel cseppekbe ágyasztunk. Ugyanazt a sejtszámot használtuk a kísérleti csoportok között ugyanabban a kísérletben.

Az EV-k izolálása funkcionális tesztekhez

A sejt- vagy organoid tenyészetek felülúszóit 300 g-vel 5 percig és 2000 g-vel 20 percig centrifugáltuk a sejtek és sejtörmelékek eltávolítása céljából. A nagy/közepes EV frakciót ezután a felülúszó 12500 g 20 perces fugálása után nyertük. A kis EV-eket (sEV) ultracentrifugálással (UC) izoláltuk 100 000 g-vel 70 percig 4 °C-on. Az összes EV frakciót PBS-sel mostuk, és felhasználás előtt még egyszer centrifugáltuk vagy ultracentrifugáltuk. A miRNS-ek kimutatásához az EV-eket UC-vel vagy anti-CD63 és anti-CD81-bevonatú gyöngyök hozzáadásával szeparáltuk, majd Qiazol Lysis Reagent-ben (Qiagen) lizáltuk. Alternatív megoldásként az EV eredetű teljes RNS-t ExoRNEasy Serum/Plasma Starter Kit-tel (Qiagen) vontuk ki 2 ml felülúszóból a gyártó utasításai szerint.

Whole-mount immunfestés

Az organoidokat 4 vagy 8-lyukú kamrás tárgylemezeken (BD Biosciences) tenyésztettük, majd 4% paraformaldehidben (PFA) fixáltuk, PBS + 4% NaCl-dal mostuk és blokkoló pufferben (5% FBS, 0,2% marha szérum albumin (BSA), 0,3% Triton X-100) 30 percig blokkoltuk és permeabilizáltuk. Az elsődleges és másodlagos antitestek alkalmazása után az organoidokat DAPI-t (Thermo Fisher) tartalmazó rögzítő (mounting) médiumba helyeztük, és konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (Zeiss vagy Leica).

RNS izolálás és RNS mérések

RNS izoláláshoz az RNEasy Micro Kit-et (nagyobb RNS-ek), illetve a miRNeasy Micro Kit-et (teljes RNS, a miRNS-sel együtt) használtuk a gyártó utasításainak megfelelően (Qiagen). Egyes kísérletekben az EV eredetű miRNS-eket az ExoRNEasy Serum/Plasma Starter Kit (Qiagen) segítségével izoláltuk. A miRNS mérésekhez teljes RNS-t (beleértve a kis RNS-t is) írtunk vissza TaqMan Advanced miRNA cDNS Synthesis Kit-tel (Thermo Fisher) a gyártó leírása szerint. A PCR reakciókat ezután TaqMan Fast Advanced Master Mix és TaqMan Advanced miRNA Assay-k (Thermo Fisher) segítségével végeztük.

Az mRNS méréshez 0,5 µg teljes RNS-t írtunk vissza SensiFAST™ cDNS Synthesis Kit-tel (Bioline). A kvantitatív PCR reakciókat a SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline) segítségével hajtottuk végre ABI 7900HT Fast valós idejű PCR készüléken SYBRGreen

módszerrel. Az eredményt a következő képlet segítségével számítottuk ki: relatív expressziós szint = $2^{-\Delta Ct}$, ahol $\Delta Ct = Ct(\text{vizsgált gén}) - Ct(\text{háztartási gén})$.

TaqMan low density miRNS array

A kondicionált médiumot 300 g-vel 5 percig, 2000 g-vel 20 percig, majd 12 500 g-vel 20 percig centrifugáltuk, és az EV koncentrációt NTA-val (ld. alább) határoztuk meg. Az adott EV számot tartalmazó, egyforma térfogatú mintákból az EV-eket anti-CD63-mal és anti-CD81-gyel bevont gyöngyökkel izoláltuk éjszakán át, majd az EV-eket Qiazolban lizáltuk (Qiagen). A kis RNS-eket is tartalmazó teljes RNS-t a miRNeasy Micro Kit-tel (Qiagen, Hilden, Németország) izoláltuk a gyártó utasításai szerint. Megaplex RT primerekkel 2 μ L teljes RNS-t írtunk vissza, a mintákat Megaplex PreAmp Primerekkel amplifikáltuk, majd TaqMan Array Human MicroRNA A Cards v2.0 kártyát (Thermo Fisher) használtunk a gyártó előírásai szerint. A kártyákat ABI 7900HT műszerrel mértük le. Negatív kontrollként sejntmentes tenyészetekből izolált mintákat alkalmaztunk.

Nanorészecske követő elemzés (Nanoparticle tracking analysis, NTA)

Az EV-k méreteloszlását és koncentrációját ZetaView Z-NTA készüléken (Particle Metrix) elemeztük. Minden mérésnél 11 cellapozíciót pásztáztunk standard kamerabeállításokkal 80-as érzékenységgel. A videókat a ZetaView Analyze szoftver 8.05.10 segítségével elemeztük.

Simple Western (WES) analízis

Az EV-eket UC-vel 100 000 g-vel 70 percig 4 °C-on izoláltuk, majd az üledéket PBS-sel mostuk, ismét ultracentrifugáltuk, lizáltuk, a fehérjekoncentrációt a Micro BCA Protein Assay Kit-tel (Thermo Fisher Scientific) mértük meg. A lizátumból 3 μ L-t (mely 1,5 μ g fehérjét tartalmazott) vittünk fel kapilláris alapú Simple Western-analízis WES-re (ProteinSimple). Kontrollként 3 μ L ultracentrifugált szérumentes táptalajból készített lizátumot használtunk.

Statisztikai elemzés

Párosított vagy párosítatlan t-tesztet, Mann–Whitney U-tesztet, egyutas ANOVA-t és Tukey post hoc tesztet vagy Kruskal–Wallis tesztet Dunn post hoc tesztel alkalmaztunk * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,005$ értékekkel. Az értékeléshez Microsoft Excel, SPSS 25-ös verziót és Sigma Plot szoftvereket használtunk. Az átlag és az SD értékek $n=3-5$ biológiai ismétléssel vannak feltüntetve, ha az ábrafelirat mást nem jelez. A boxplotok a minimumot, az első kvartilist, a mediánt, a harmadik kvartilist és a maximumot mutatják.

5. Eredmények és megbeszélésük

Az egyes fejezetek utáni római számok a felhasznált saját publikációk jelzései a disszertáció végén megtalálható listában. A dolgozat könnyebb érthetősége érdekében az eredményeket az ismertetésük után, fejezetenként beszéljük meg.

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

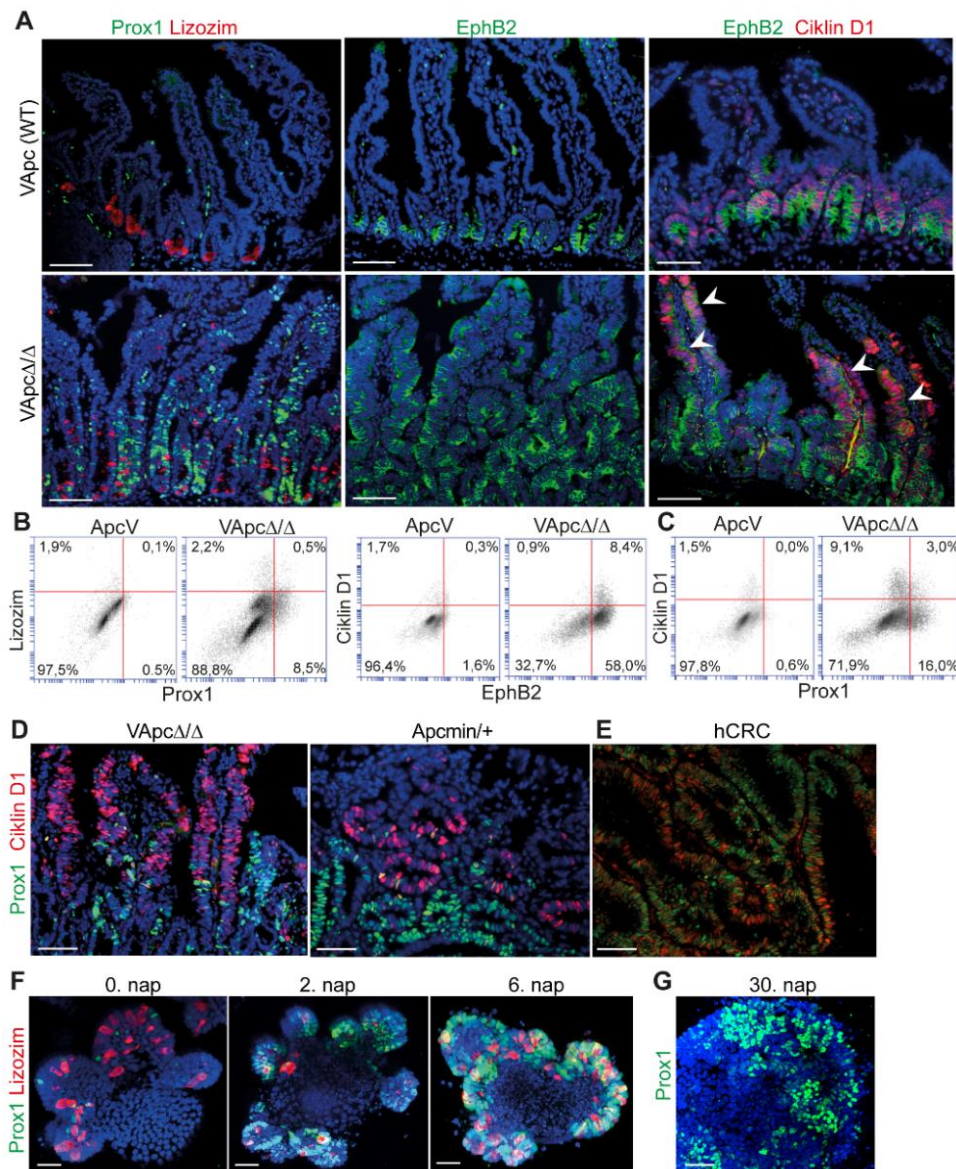
Az Lgr5+ sejtek képesek adenóma kialakulását elindítani az *Apc* gén mutációja esetén [28]. Emellett a bélhámsejt-progenitorok őssejtszerű fenotípust vehetnek fel gyulladáshoz vezető folyamatok során aktiválódó molekulák hatására, és ezáltal gyulladáshoz vezető körülmények között CRC kialakulásához is hozzájárulhatnak [29]. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az őssejtszerű fenotípus létrejötte kritikus a CRC tumorigenezisben.

Korábbi adatok alapján az *Apc* deléció utáni megemelkedett Wnt aktivitás a homeobox Prox1 transzkripciós faktor expresszióját indukálja az adenóma sejtekben. Amikor a *Prox1*-et *Apc* mutációval rendelkező egerekben kiütötték, az adenóma növekedése és a diszplázia kialakulása gátlódott a tumorokban [66]. Minthogy a szabályozatlanul aktivált Wnt útvonal központi jelentőségű a CRC esetek többségében, és a *PROX1* ennek az útvonalnak egy olyan célgénje, mely az intesztinális tumorokban fejeződik ki, így vizsgálatunkban arra voltunk kíváncsiak genetikailag módosított egértörzsek és az organoid technológia felhasználásával, hogy a PROX1 milyen módon fejti ki a tumorprogresszióban betöltött szerepét.

Az Apc gén deléciója Prox1 expressziót indukál az Lgr5+ sejtekben

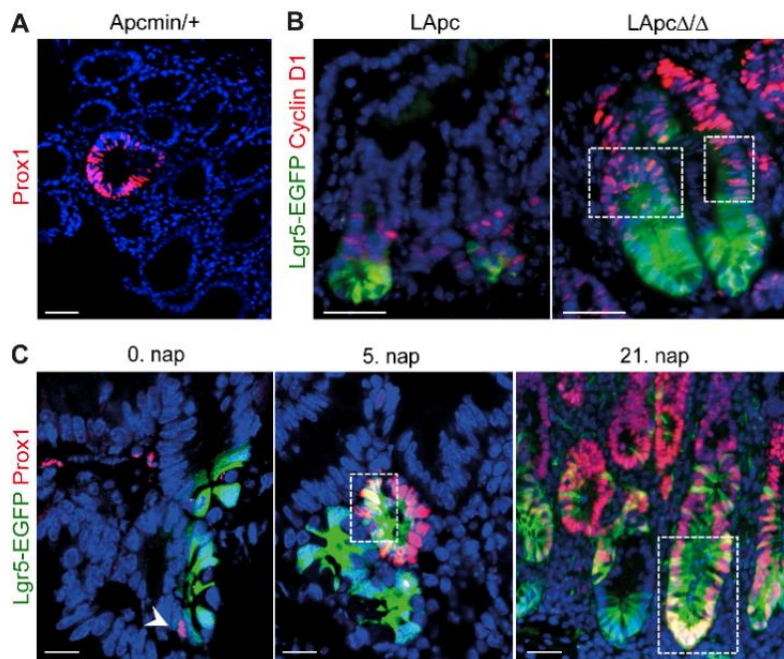
A Prox1-et expresszáló sejteknek az intesztinális adenómák patogenezisében betöltött szerepének vizsgálatára *Apc^{flx/flx}; villin-CreER* (VApc) egerekben az *Apc* gén delécióját egyetlen tamoxifen injekcióval indukáltuk a teljes bélhamban (VApc Δ/Δ). Várakozásainknak megfelelően a vad típusú (WT) vékonybélben a kripták alját jelölő Paneth sejtek a legtöbb *Apc* deléciót hordozó kriptában a bél lumene felé mozdultak el, és az aktív Wnt jelátviteli útvonallal jellemezhető, EphB2 pozitív sejtpopuláció mérete megnőtt 6 nappal a tamoxifen injekció után (4A-B. ábra) [73]. A legtöbb kripta szétszórt Prox1+ sejtcsoportot tartalmazott, amelyek lizozim-pozitív Paneth-sejtekkel keveredtek (5A. ábra). A ciklinD1 jelzi a proliferáló sejtpopulációt, beleértve a progenitor sejteket is a WT bélben [74]. A korábban publikált eredményekkel összhangban a ciklinD1-pozitív sejtpopuláció mérete megnőtt az *Apc* deléciót követően [75] (4A-B. ábra). A CyclinD1^{high} sejtek gyakran a Prox1+ sejtekhez közel helyezkedtek el, azonban a Prox1+ sejtekre nem volt jellemző a ciklinD1 magas szintje sem

V $Apc\Delta/\Delta$ egerekben, sem $Apc^{Min/+}$ egerek daganataiban (4C-D. ábra), sem pedig CRC betegekben (4E. ábra). Az *in vivo* kísérletekhez hasonlóan, amikor V Apc egerekből izoláltunk intesztinális organoidokat és 3D Matrigel tenyészetben a tamoxifen aktív formájával, 4-hidroxi-tamoxifen (4-OH-Tam) hozzáadásával az Apc gén delécióját indukáltuk, az organoidokban 2 nappal a 4-OH-Tam kezelés után Prox1+ sejtszoptok jelentek meg (4F. ábra). Későbbi időpontokban a Prox1 expresszió izolált sejtszoptokban maradt fenn (4G. ábra).



4. ábra. A Prox1+ tumorsejtekre nem jellemző a ciklinD1^{high} fenotípus. (A) Immunfestés Prox1, liozozim, EphB2 és ciklinD1-re V Apc (WT) és V $Apc\Delta/\Delta$ egerek mintáiban 6 nappal a tamoxifen injekció után. A nyílhegyek az EphB2+ és ciklinD1^{high} sejteket jelölik a V $Apc\Delta/\Delta$ mintákban. (B-C) A V $Apc\Delta/\Delta$ egerekből izolált intesztinális epitél sejtek áramlási citometriás elemzése 6 nappal a tamoxifen injekció után. (D) V $Apc\Delta/\Delta$ és $Apc^{min/+}$ egerek bélmetseteinek Prox1 és ciklinD1 immunfestése. A ciklinD1 jel intenzitását úgy állítottuk be, hogy csak a ciklinD1^{high} jelenjen meg. (E) A PROX1 és a CIKLIN D1 expressziója humán CRC mintában. (F-G) V $Apc\Delta/\Delta$ organoidok Prox1 és liozozim (F) vagy Prox1 (G) immunfestése különböző időpontokban 4-OH-Tam hozzáadása után. A Paneth-sejtek a kriptákban találhatóak. Méretarány: 100 μ m (A, D), 50 μ m (E) vagy 25 μ m (F-G).

Egy korábbi tanulmány arról számolt be, hogy a PROX1 a Wnt^{high} CRC őssejtre jellemző génexpressziós mintázat része [76]. Azt találtuk, hogy a Prox1 a széles körben használt egér intesztinális adenóma modellként használt $Apc^{min/+}$ egerek legkorábbi szövettani elváltozásaiban, az aberráns kripta gócban is expresszálódott (5A. ábra). A Prox1-nek az adenómák Lgr5+ intesztinális őssejtjeiben való expressziójának bizonyításához az $Apc^{flox/flox}; Lgr5-EGFP-IRES-CreER$ (LApc) egerek őssejtjeiben Apc deléciót indukáltunk ($LApc\Delta/\Delta$). A LApc és az $Lgr5-EGFP-IRES-CreER$ egérbelek zöld EGFP jelet mutatnak a kripták alján található Lgr5+ őssejtben [19]. A ciklinD1^{high} sejtek többnyire az Lgr5^{low} és Lgr5–sejtpopuláción belül dúsultak fel a bél adenómákban az Apc deléciót követően, mely megerősíti, hogy a ciklinD1^{high} sejtek nem az őssejtpopulációban halmozódnak fel (5B. ábra). A Prox1 kifejeződött néhány Paneth sejtben is a vékonybélhamban, a Prox1+ sejtek pedig a normál bélben gyakran az Lgr5+ sejtek közelében helyezkedtek el (5C. ábra). Öt nappal a tamoxifen injekció után azonban a fejlődő adenómák Lgr5+ sejtjeiben is megfigyeltük a Prox1 expresszióját (5C. ábra). Összességében tehát elmondhatjuk, hogy a Prox1 a tumorigenezis korai lépései során az adenóma sejtekben indukálódik mind *in vivo*, mind *ex vivo*, beleértve az Lgr5+ őssejtet is. Ugyanakkor a Prox1 jelenléte nem volt jellemző a ciklinD1^{high} sejtekre, melyek differenciáltabb vagy intesztinális progenitorszerű sejteket képviselhetnek.

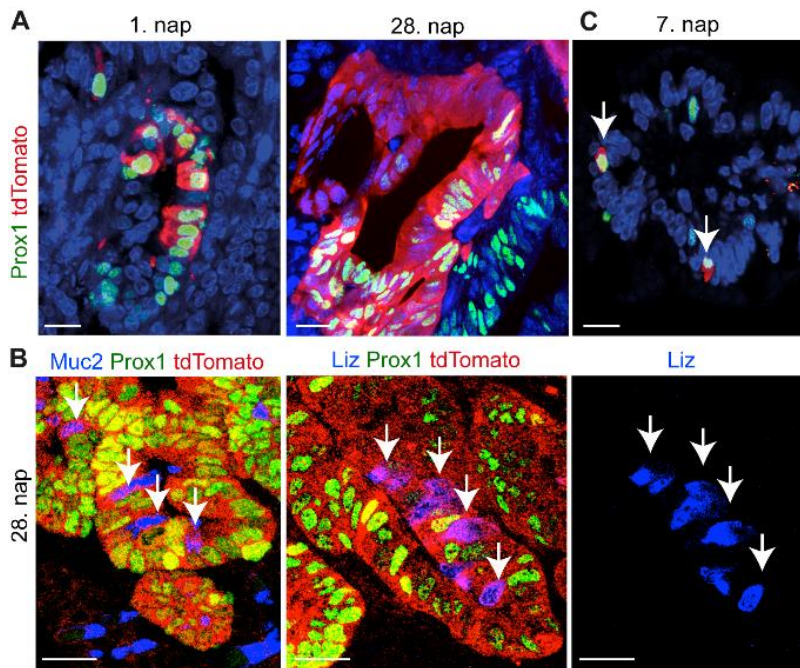


5. ábra. Prox1 expresszió béladenómákban Apc deléció után. (A) Prox1 expresszió egy aberráns kripta gócban $Apc^{min/+}$ bélszövetben. (B) Lgr5-EGFP és ciklinD1 festődés LApc egérbélben tamoxifen ($LApc\Delta/\Delta$) hozzáadása előtt (LApc) és 21 nappal utána. A keretezett terület átfedést mutat az Lgr5^{low} sejtpopulációval. (C) Az Lgr5-EGFP és a Prox1 jel eloszlása az LApc egerek bélhámjában egyetlen tamoxifen injekció beadása után. Míg a 0. napon nem figyelhető meg átfedés a Prox1+ (nyílhegy) és az Lgr5+ sejtek között, az 5. és 21. napon átfedés jelenik meg. Méretarány: 20 μ m-t (B) vagy 50 μ m-t (A és C).

A Prox1+ sejtek egy alpopulációja őssejt aktivitással rendelkezik béladenómákban

Annak vizsgálatára, hogy a Prox1+ sejteknek van-e őssejtaktivitása béladenómákban, $Prox1-CreER$ [69]; $Rosa26-tdTomato^{flox/Stop/flox}; Apc^{Min/+}$ egereket állítottunk elő sejsors követéshez (lineage tracing). Ebben a modellben egyetlen tamoxifen injekció aktiválta a Cre fehérjét, mely

eredményeként a tdTomato piros fluoreszcens fehérje csak a Prox1+ tumorsejtekben expresszáldott a tamoxifen injekció beadása után 1 nappal (6A. ábra). Ez megerősíti, hogy a Cre fehérje aktiválása specifikus volt a Prox1-et expresszáló daganatsejtekre. Érdekes módon azonban 28 nappal a tamoxifen injekció után azt tapasztaltuk, hogy a Prox1+ sejtekkel szomszédos sejtek gyakran tdTomato+/Prox1- fenotípust mutattak, és ezek a sejtek időnként a kehelysejtekre jellemző mucin2-t, vagy a Paneth sejtekre specifikus lizozimot tartalmaztak. Ez arra utal, hogy a Prox1+ tumorsejtpopuláció differenciálódott sejteket is létrehozhat béladenómákban (6A-B. ábra). Ugyanakkor a *Prox1-CreER; Rosa26-tdTomato^{fllox/Stop/fllox}*; [77] egerekben csak szórványos Prox1+ bélhámsejtek voltak pozitívak a piros fluoreszcens markerre 7 nappal a tamoxifen kezelés után (6C. ábra), és ezek a sejtek nem hoztak létre utódsejteket. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a normál béllal ellentétben, a Prox1+ sejtek egy alpopulációja őssejt tulajdonságokkal rendelkezik adenómában.



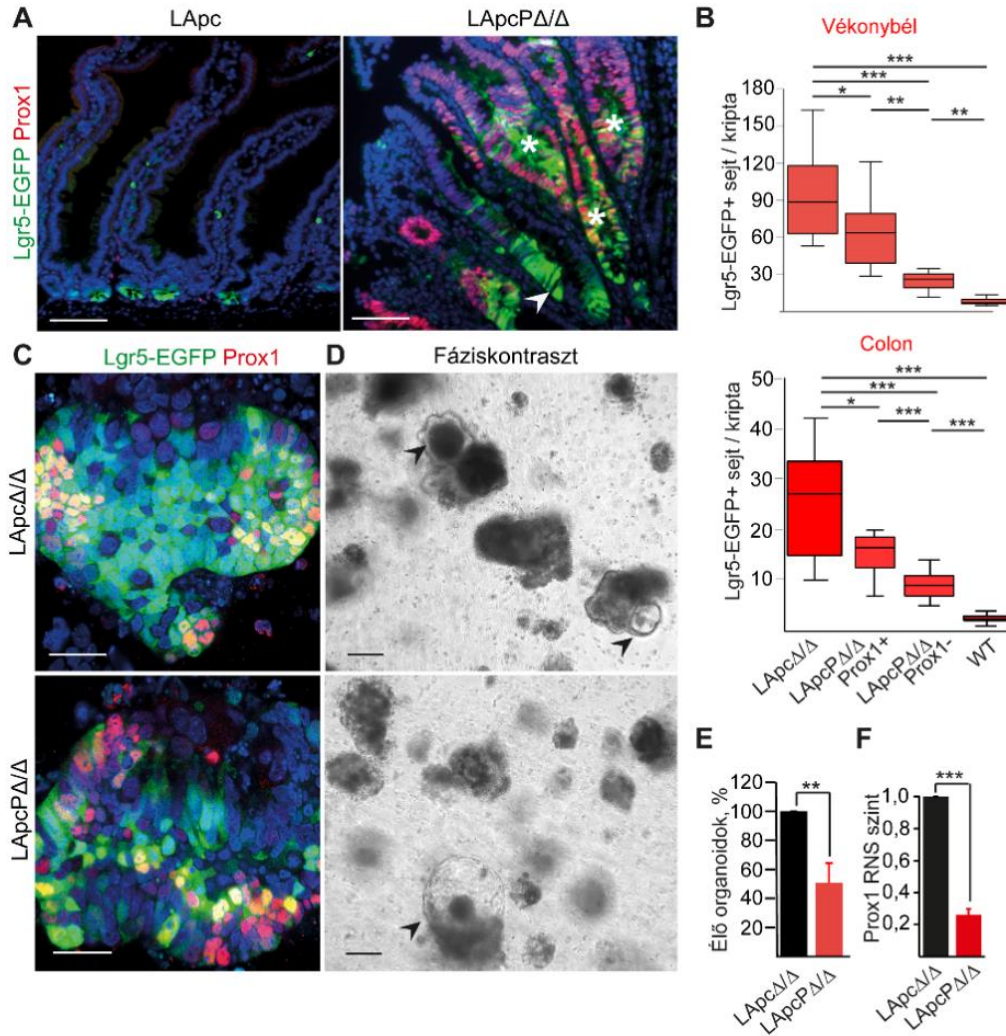
6. ábra. A Prox1+ sejtek tumor őssejt tulajdonságokkal rendelkeznek (sejtsors követés (lineage tracing) béladenómákban *Apc* deléció után). (A és B) *Prox1-CreER; Rosa26-tdTomato^{fllox/Stop/fllox}; Apc^{min/+}* egerekből származó adenómák immunfestése a

jelzett fehérjékre egyetlen tamoxifen injekció után (lineage tracing). A nyilak a tdTomato+/Prox1-/Mucin2+, ill. a tdTomato+/Prox1-/lizozim+ sejteket jelölik. (C) Prox1 és tdTomato jel *Prox1-CreER; Rosa26-tdTomato^{fllox/Stop/fllox}* egerekben 7 nappal a tamoxifen injekció után. A nyilak a ritkán előforduló Prox1+ sejteket jelzik a normál bélhámiban. Méretarány: 20 μ m-t.

A Prox1 deléciója az Lgr5+ őssejtek elvesztéséhez vezet béladenómában

Annak elemzésére, hogy a Prox1-nek mi a funkciója az adenóma őssejtekben, *Apc^{fllox/fllox}; Prox1^{fllox/fllox}; Lgr5-EGFP-IRES-CreER* (LApcP) egerek Lgr5+ sejtjeiben kiüttük az *Apc*-t és a *Prox1*-et (LApcP Δ/Δ). Érdekes módon az adenómák többsége tartalmazott néhány Prox1+ sejtet, ami a Prox1 nem teljes deléciójára utal az Lgr5+ őssejtekben (7A ábra). A Prox1+ adenómák azonban kevesebb Lgr5+ sejtet tartalmaztak a tamoxifennel kezelt LApcP

(LAp c P Δ/Δ) egérbelekben, mint az LAp $c\Delta/\Delta$ kontrollokban (7B. ábra). Az őssejtek száma továbbá még alacsonyabb volt a Prox1-negatív kriptaszerű struktúrákban, amelyek mind a vékony-, mind a vastagbélben diszlokált Lgr5+ sejteket tartalmaztak. Ez azt jelzi, hogy a sikeres Prox1 deléció gátolja az Lgr5+ sejtpopuláció méretének növekedését adenómákban (7B ábra).

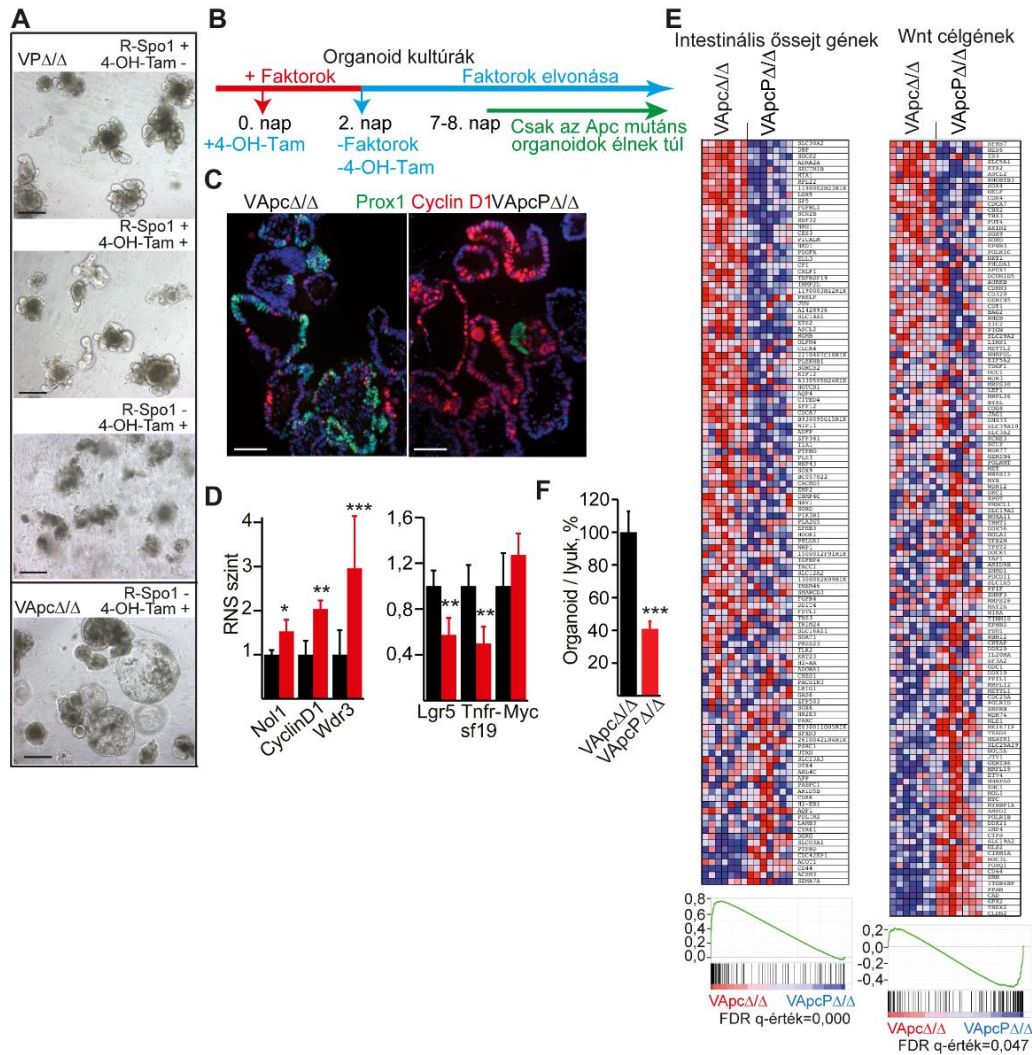


7. ábra. A Prox1 deléciója az Lgr5+ adenóma sejtekben gátolja az őssejtpopuláció expanzióját. (A) Az Lgr5-EGFP és a Prox1 jele kezeletlen LAp c és LAp c P Δ/Δ bélben 21 nappal tamoxifen után. A nyílhegy egy Prox1- kriptát jelöl, amelyben az *Apc* inaktivációja után jellemző fenotípus, az Lgr5+ sejtek diszlokációja figyelhető meg. A csillagok Prox1+ kriptákat jelölnek. (B) Az Lgr5+ sejtek száma a vékonybélben vagy vastagbélben lévő különböző típusú kriptákra vonatkoztatva (Kruskal-Wallis teszt). (C) Lgr5-EGFP és Prox1 jel az LAp $c\Delta/\Delta$ és LAp c P Δ/Δ organoidokban. (D és E) Életképes LAp $c\Delta/\Delta$ és LAp c P Δ/Δ organoidok (D, nyílhegyek) és ezek mennyiségi meghatározása (E). (F) Prox1 RNS szint az organoidokban. A (C)–(F) esetében a mintákat 8 nappal a 4-OH-Tam hozzáadása és 6 nappal a növekedési faktorok elvonása után elemeztük. A méretarányok 20 μ m-t (C) vagy 100 μ m-t (A és D) jelölnek.

A hipotézisünk további teszteléséhez LAp $c\Delta/\Delta$ és LAp c P Δ/Δ organoidokat használtunk. A Wnt-agonista R-Spondin1 szükséges a WT (LAp c vagy LAp c P) bélorganoidok túléléséhez és növekedéséhez [16]. R-Spondin1 nélkül csak az *Apc* delécióval és ezáltal állandóan aktív Wnt útvonallal rendelkező organoidok maradnak életben. 4-OH-Tam hozzáadása után 8 nappal az

L $Apc\Delta/\Delta$ organoidok Prox1+ sejtjei Lgr5-EGFP pozitívak voltak és zöld fluoreszcenciát mutattak, ha a tenyészeteket R-Spondin nélkül szelektáltuk (7C. ábra). Az Lgr5+ sejtekben az *Apc* és a *Prox1* egyidejű deléciója után 8 nappal azonban az életképes organoidok száma jelentősen csökkent (7D–7F. ábra). Az életképes organoidok ebben az időpontban tartalmaztak néhány Prox1+ sejtet (7C. ábra), ami arra utal, hogy a *Prox1* deléció nem volt teljes. Mivel *in vivo* vizsgálatainkban a Prox1 nem expresszáldott az Lgr5+ őssejtekben az *Apc* deléciója előtt, hanem csak az *Apc* kiütése után, így eredményeink azt mutatják, hogy a Prox1 expresszió elvesztése nem a tumorképzés gyakoriságát befolyásolja, hanem gátolja az Lgr5+ adenóma sejtpopuláció méretének növekedését.

A Prox1 és az őssejtszám közötti kapcsolat további közvetlen vizsgálata érdekében egy másik *ex vivo* organoid rendszert is felhasználtunk. *Apc^{fllox/fllox}; villin-CreER* (VApc) és *Apc^{fllox/fllox}; Prox1^{fllox/fllox}; villin-CreER* (VApcP) egerekből bélorganoid tenyészeteket készítettünk, ahol az *Apc* és *Prox1* a teljes bélhamban inaktiválható, beleértve a progenitor sejteket is. A Prox1-nek a *Prox1^{fllox/fllox}; villin-CreER* egerek teljes bélhámjában való kiütése nem indukált morfológiai változásokat az organoidokban (8A. ábra). Mindazonáltal az *Apc* és a *Prox1* deléciója (VApcP Δ/Δ) megnövelte a progenitorsejtekre jellemző *Nol1* és *Wdr3* markerek relatív expressziós szintjét [78], valamint a ciklinD1^{high} sejtek relatív számát azon organoidokhoz képest, melyek csak *Apc* delécióval rendelkeztek (8B–D. ábra). A tamoxifennel injektált VApc Δ/Δ egerekhez hasonlóan a Prox1+ sejtek ciklinD1^{low} fenotípust mutattak (8C. ábra). Emellett a Wnt célgének közé tartozó, a bélhám őssejtekre jellemző gének, mint az *Lgr5*, a *Tnfrsf19* és az *Ascl2* RNS-ének szintjében csökkenést mutattunk ki a Prox1 deléciójakor, míg a *c-Myc* RNS nem változott (8D. ábra és az adatok nem láthatók). A VApc Δ/Δ és VApcP Δ/Δ tenyészetek microarray elemzése az intesztinális őssejtmarkerek csökkent szintjét és a specifikus Wnt célgének expressziójának változását jelezte a VApcP Δ/Δ organoidokban 7 nappal a 4-OH-Tam hozzáadása után (8E. ábra). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a Prox1 deléció csökkenti az adenóma őssejtek számát, ami az *Apc* deléció után 7 nappal a progenitor populáció méretének változását eredményezi az organoidokban. A Prox1 deléciót hordozó organoidok emellett kisebb hatékonysággal hoztak létre új organoidokat (8F. ábra).

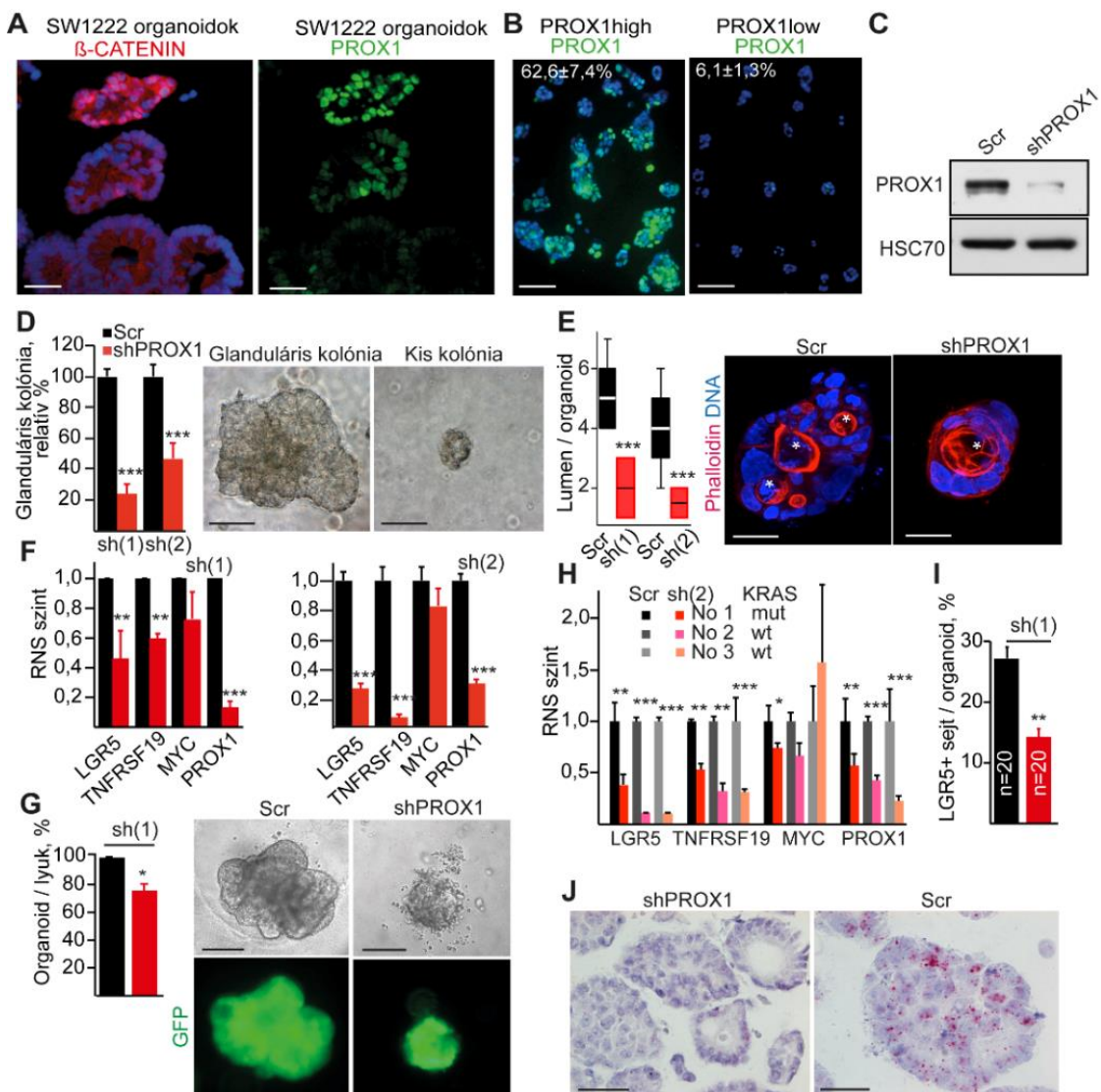


8. ábra. A *Prox1* deléció csökkent összejtaktivitáshoz vezet *ex vivo* egér organoidokban. (A) *Prox1^{fllox/fllox}*; *villin-CreER* ill. *VAp* organoidokat 4-OH-Tam-mal kezeltünk 2 napig (*VPΔ/Δ* és *VApΔ/Δ*), majd R-Spondin1 jelenlétében/hiányában 6 napig tenyésztettük (fáziskontraszt képek). (B) Az egér organoid kísérletek sematikus vázlatja. (C) A *VApΔ/Δ* és *VApPΔ/Δ* organoidokból származó metszetek *Prox1* és ciklinD1 immunfestése 7 nappal a deléció után és 5 nappal az R-Spondin1 médiumból való eltávolítása után. (D) A progenitor markerek (*Nol1*, *ciklinD1* és *Wdr3*), az összejt markerek (*Lgr5* és *Tnfrsf19*) és a *c-Myc* RNS szintjei *VApΔ/Δ* és *VApPΔ/Δ* organoidokban RT-qPCR-rel elemezve. (E) Microarray adatok génkészlet dúsítási analízise (GSEA). Az adatok *VApΔ/Δ* és *VApPΔ/Δ* organoid tenyészetekből származnak 7 nappal a 4-OH-Tam hozzáadása után. (F) A *VApΔ/Δ* és *VApPΔ/Δ* organoidsejtek organoidképzési gyakorisága. Méretarány: 100 μ m (A, C).

A PROX1 géncsendesítése csökkenti az összejtek számát humán CRC organoidokban

Annak modellezésére, hogy a PROX1 miként befolyásolja az összejtek aktivitását a CRC progressziójában, a humán SW1222 sejtvonalat választottuk. Ez a sejtvonal olyan összejteket tartalmaz, amelyek önmegújításra, valamint több irányba való differenciálódásra is képesek [79]. Az SW1222 sejtek 3D tenyészetekben ún. mikrokolóniákat és megakolóniákat képeznek. Míg a mikrokolóniáknak korlátozott a növekedési potenciálja, és nem rendelkeznek lumennel, addig a nagy, mirigyes szerkezetű megakolóniák kriptaszerű struktúrákat hoznak létre, amelyek

a központi lument körülvevő polarizált sejtekből állnak [79]. A lumenek kialakulása összejtfüggő tulajdonság, melyek daganatokban, valamint emberi és eger adenómákból származó *in vitro* 3D tenyészetekben is jelen vannak [80]. Mivel az SW1222 sejtek heterogén PROX1 és nukleáris β -KATENIN expressziós szinttel rendelkeznek (9A. ábra), olyan szubklónokat hoztunk létre, melyekben a PROX1+ sejtek aránya alacsony (PROX1^{low}) vagy magas (PROX1^{high}) volt (9B. ábra). Ezután a PROX1 kifejeződését a PROX1^{high} klónban két különböző, lentivírusba klónozott shRNS-sel csendesítettük (9C. ábra és nem mutatott adatok). Érdekes módon a PROX1-csendesített SW1222-PROX1^{high} sejtek kevesebb megakolóniát képeztek (9D. ábra), ami arra utal, hogy a PROX1 csendesítése fontos hatással van a CRC összejt aktivitásra. Mindemellett a PROX1 csendesítése csökkentette a lumenek számát az SW1222-PROX1^{high} sejtekből származó megakolóniákban (9E. ábra). 3D tenyésztés után az *LGR5* és *TNFRSF19* összejtmerek RNS szintjei csökkentek, míg más WNT-célgének, például a *MYC* expressziójában nem figyeltünk meg változást (9F. ábra).

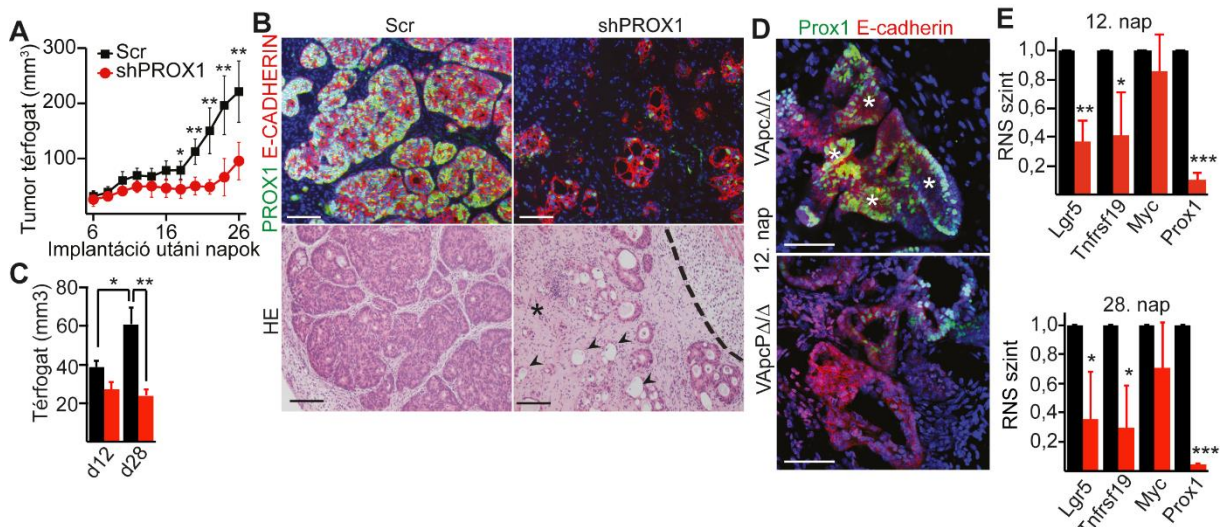


9. ábra. A *Prox1* deléció csökkent őssejtaktivitáshoz vezet *ex vivo* humán organoidokban. (A) PROX1 és β -CATENIN immunfestés SW1222 sejtekből származó organoidokban (14 nap). A nukleáris β -CATENIN-t mutató sejtek PROX1^{high} fenotípussal jellemezhetők. (B) A PROX1^{high} és PROX1^{low} SW1222 szubklónok PROX1 immunfestése. A számok a PROX1+ sejtek arányát jelzik a 2D sejttenyészetekben (átlag+SD). (C) SW1222-PROX1^{high} sejtek PROX1 immunblot elemzése kontroll (Scr) és shPROX1 (sh1) lentivírussal való transzdukció után. (D) 1000 SW1222-PROX1^{high} sejtéből (Scr kontroll, sh1 vagy sh2 PROX1 shRNS lentivírussal transzdukált) származó megakolóniák aránya. (E) Az Scr kontroll vagy shPROX1 transzdukált (sh1, sh2) SW1222-PROX1^{high} sejtekből származó glanduláris kolóniákban a lumenek száma a 14. napon. A lumeneket (csillaggal jelölve) az aktint jelölő phalloidin festéssel detektáltuk, és konfokális mikroszkópos képek optikai szeleteiben számoltuk meg. (F) Az shPROX1-et expresszáló SW1222-PROX1^{high} sejtek által képzett organoidokból származó RNS-ek szintje a 14. napon. (G) A CRC-betegekből származó Scr és shPROX1 lentivírus által transzdukált humán organoidok morfológiája és relatív, lument tartalmazó organoidképzési gyakorisága. A GFP jel a lentivírus transzdukció hatékonyságát mutatja. (H) A jelzett gének RNS szintje CRC beteg eredetű organoidokban, Scr kontroll vagy shPROX1 lentivírussal való transzdukció után. Míg az 1. minta a G12D klinikailag releváns *KRAS* mutációt hordozza, a 2. és 3. minta vad típusú. (I és J) *LGR5* in situ hibridizáció és az *LGR5*+ sejtek mennyiségi meghatározása a Scr kontroll és shPROX1 transzdukált SW1222-PROX1^{high} klónokban. Mértékarány: 50 μ m-t (A, B, D, E, G és J).

A *PROX1* némitása CRC beteg eredetű organoidokban szintén csökkentette az új lument tartalmazó organoidok gyakoriságát (9G. ábra) és az shPROX1 organoidok kis, lumen nélküli kolóniákat alkottak (9G. ábra). Az SW1222 sejtvonalhoz hasonlóan a *PROX1* csendesítése CRC beteg eredetű organoidokban az *LGR5* és *TNFRSF19* RNS szintek jelentős csökkenését eredményezte (9H. ábra) *KRAS* mutáció jelenlétében is. Az *LGR5* in situ hibridizáció továbbá azt mutatta, hogy a *PROX1* csendesítése csökkentette a CRC őssejtek számát (9I-J. ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy a *PROX1* csendesítése csökkenti a CRC őssejtek számát humán CRC-ben is, mely független a *KRAS* mutáció jelenlététől.

A PROX1 deléciója csökkent sejtosztódáshoz vezet a daganatokban in vivo

Eredményeink jelentőségének *in vivo* tesztelésére SW1222-PROX1^{high} és *PROX1* csendesített sejteket immunhiányos (NOD scid gamma, NSG) egerekbe ültettünk szubkután, és követtük a daganat növekedését. Hasonlóan a *Prox1* deléciót hordozó béladenómákhoz [66], a *PROX1* csendesített daganatok lassabban növekedtek, mint a kontroll shRNS-sel (Scr) transzdukáltak (10A. ábra). Ellentétben a kontroll shRNS transzdukált daganatokkal, a *PROX1* csendesített daganatok csak néhány mirigyes szerkezetű daganatfészket tartalmaztak (10B. ábra). A *PROX1* csendesített SW1222 sejtekhez hasonlóan a szubkután beültetett *Prox1* deletált egér VAp Δ/Δ organoidok lassabban növekedtek és kevesebb mirigyes struktúrát tartalmaztak, mint a VAp Δ/Δ organoidok (10C-D. ábra). A *Prox1* deléció csökkentette az *Lgr5* és *Tnfrsf19* szintjét a daganatokban, a *Myc*-et azonban nem változtatta meg, mely megerősíti *ex vivo* eredményeinket (10E. ábra).



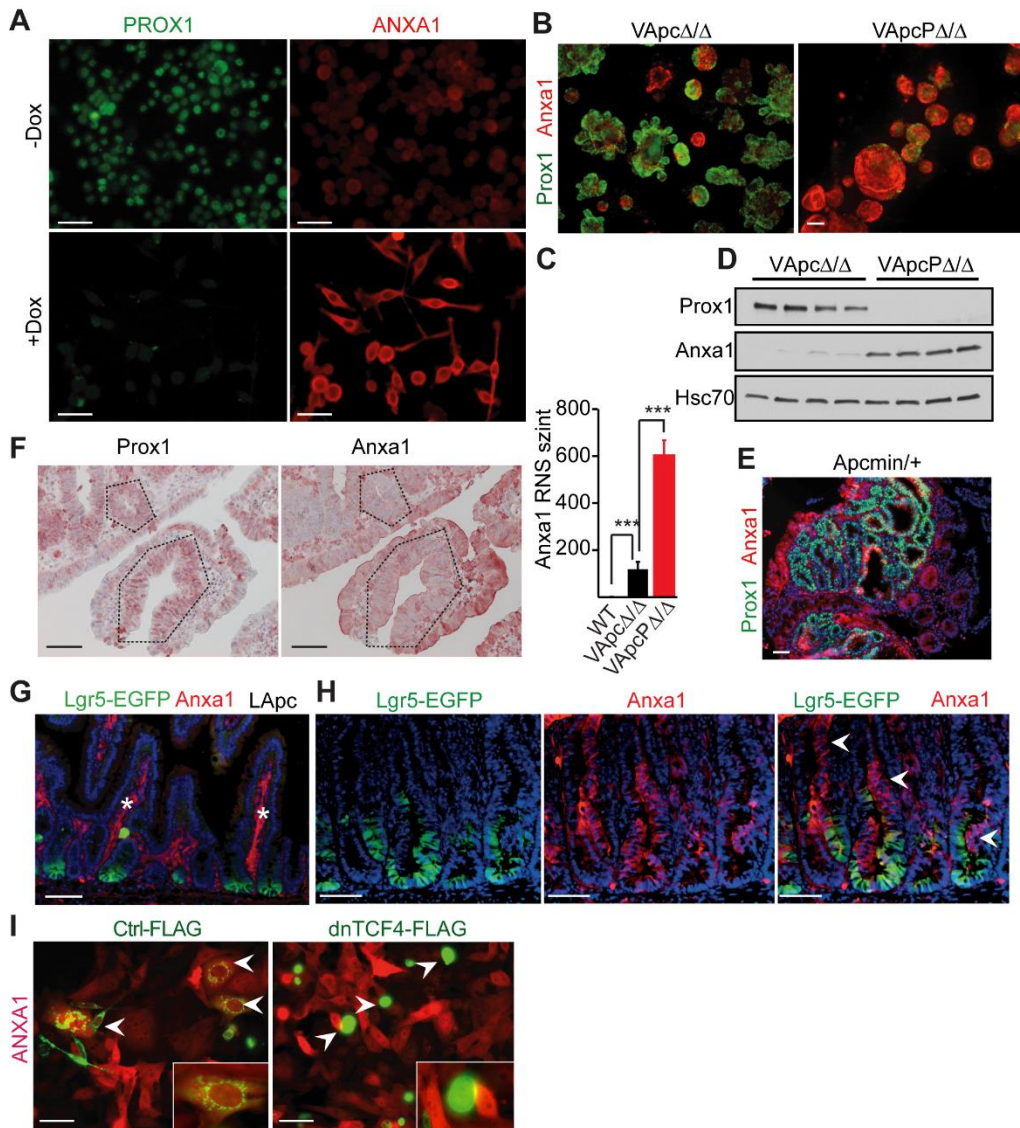
10. ábra. A PROX1 a sejtsztódáson keresztül szabályozza az őssejtek számát. (A) Scr kontroll vagy shPROX1-transzdukált SW1222-PROX1^{high} sejtekből származó szubkután daganatok növekedési görbéje immunhiányos NSG egerekben (n=10). (B) PROX1 és E-CADHERIN immunfestés és tumormetszet hematoxilin-eozin (HE) festése 21 nappal az SW1222-PROX1^{high} sejtek NSG egerekbe történő szubkután injekciója után. A szaggatott vonal jelzi a daganat határát, a nyilak a degeneráló mirigyes struktúrákra mutatnak, a csillag pedig a nekrotikus területet jelöli. (C–E) A VApCΔ/Δ (fekete oszlopok) és VApC PΔ/Δ (piros oszlopok) tumortérfogata (C), immunfestése (D) és RNS elemzése (E) az organoidok NSG egerekbe történő szubkután injekciója után 12 és 28 nappal. A csillagok a VApCΔ/Δ daganatok bonyolultabb mirigyszerkezetét mutatják a VApC PΔ/Δ-hoz képest. Mértékarány: 50 μm-t (B) és 100 μm-t (D).

A PROX1 inaktiválása növeli az Annexin A1 expresszióját több CRC modellben

Annak meghatározására, hogy mely gének felelősek a PROX1-nek az adenóma/CRC őssejtekre gyakorolt hatásáért, korábbi microarray adatokból szűrt géneket teszteltünk [66]. Előzetes eredményeink alapján a kalciumfüggő foszfolipidkötő fehérjére, az Annexin A1-re (ANXA1) koncentráltunk, amelyről kimutatták, hogy gátolja az emlőrák metasztázisát [81]. A PROX1 negatívan szabályozta az ANXA1 szintjét az SW480R-sh sejtekben (11A. ábra). Ezek a sejtek az SW480 CRC sejtvonálnak egy tumorigén, genetikailag módosított klónját képviselik, melyben doxiciklin hatására shPROX1 expresszálódik, így a PROX1 csendesítődik. Az Anxa1 szintje megemelkedett VApC organoidok 4-OH-Tam-nel való kezelése után is, és még tovább növekedett, amikor a Prox1-et is csendesítettük (11B-D. ábra), mely adatok arra utalnak, hogy a Prox1 gátolja az Anxa1 kifejeződését. Ezen kívül a Prox1-negatív sejtek intenzívebb Anxa1 immunfestődést mutattak, mint a Prox1+ sejtek *ApC*^{Min/+} egerekből származó tumormetszetekben (11E. ábra).

Az Anxa1 és Prox1 egymást kölcsönösen kizáró festődési mintázatát figyeltük meg humán CRC mintákban is (11F. ábra). Az Lgr5⁺ bélőssejtek az LApc egerekben nagyon alacsony szinten, vagy egyáltalán nem mutattak epiteliális Anxa1 expressziót az *ApC* deléció előtt (11G. ábra). Alacsony Anxa1 szintet tapasztaltunk a tamoxifen injekció után az Lgr5⁺ sejtekben, míg

az *Anxa1*^{high} sejtek *Lgr5*-re negatívak voltak a létrejövő adenómákban (11H. ábra). Amikor a Wnt útvonal célgénjeinek transzkripcióját gátló domináns negatív TCF4 konstrukciót juttattunk az SW480 CRC sejt vonal PROX1-negatív szubklónjába (SW480A) [66], az ANXA1 expresszió csökkenését figyeltük meg (11I. ábra). Ezek az adatok arra utalnak, hogy az *Anxa1* csak minimális szinten fejeződik ki a normál bélhamban. A Wnt útvonal *Apc* deléció utáni aktiválása növeli az *Anxa1* expressziót, amelyet a *Prox1* indukciója a tumorsejtekben csökkent.

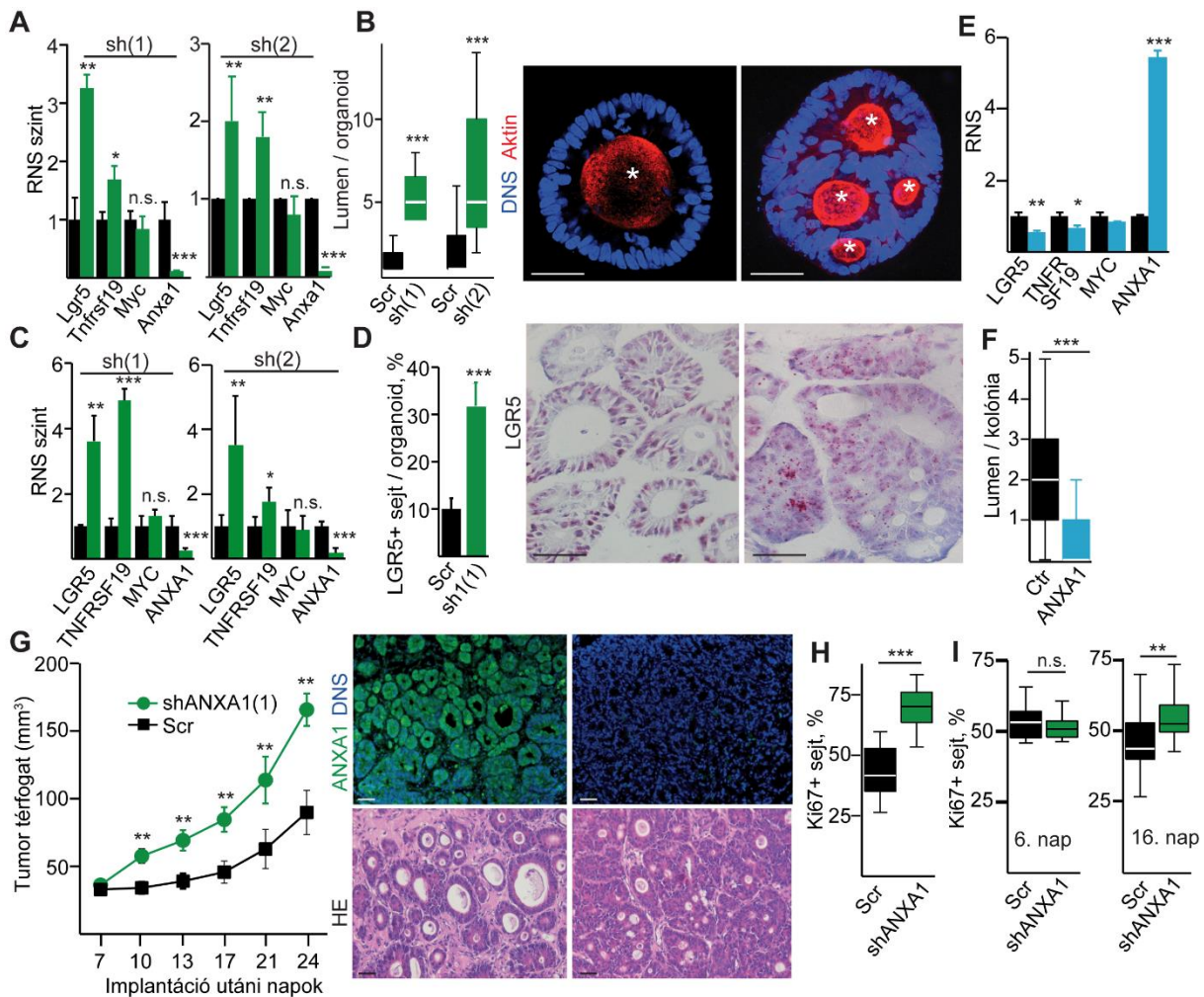


11. ábra. Az *Apc* deléció és a *Prox1* csendesítés hatása az Annexin A1 expresszióra. (A) PROX1 és ANXA1 immunfestés egy olyan SW480 CRC sejt szubklónban, melyben az shPROX1 expressziója doxiciklinnel indukálható. (B) *VAp Δ/Δ* és *VApP Δ/Δ* organoidok immunfestése a jelzett fehérjékre. (C) Az *Anxa1* RNS szint RT-qPCR elemzése *VAp* (WT), *VAp Δ/Δ* és *VApP Δ/Δ* organoidokban 4-OH-Tam hozzáadása után. (D) *Prox1* és *Anxa1* fehérjeszint *VAp Δ/Δ* és *VApP Δ/Δ* organoidokban 4-OH-Tam hozzáadása után. A Hsc70 háztartási kontrollként szolgált. (E) *Prox1* és *Anxa1* *Apc*^{min/+} tumorból származó metszetben. (F) Immunoperoxidázos festés egy CRC beteg daganatából származó metszeteken. (G-H) *Lgr5*-EGFP és *Anxa1* jel *LAp* (WT) (G) és *LAp Δ/Δ* bélben (H) 21 nappal a tamoxifen injekció után. A csillagok a mezenchimális szövetet jelölik. A nyílhegyek az *Anxa1*^{high} területeket jelzik a bélhamban. (I) ANXA1 expressziója domináns negatív dnTCF4-FLAG-gel vagy egy

kontrollkonstrukcióval (TIE1-FLAG) transzfektált SW480 sejtekben. A nyílhegyek a transzfektált sejteket jelzik. Méretarány: 100 μm (A, B, E, F, G, H, J) és 50 μm (I).

Az ANXA1 kifejeződésének gátlása a PROX1 hatásait utánozza CRC-ben

Ezt követően annak a lehetőségét teszteltük, hogy az ANXA1 gátlás közvetíti-e a PROX1 hatásait. Érdekes módon az *Anxa1* kiütése *VAp Δ/Δ* organoidokban megnövelte az *Lgr5* és *Tnfrsf19* őssejtmarker RNS szinteket anélkül, hogy befolyásolta volna a *Myc*-et (12A. ábra). Az *ANXA1* csendesítése megnövekedett lumenképződést (12B. ábra), a *TNFRSF19* és *LGR5* RNS-ek felszabályozását, valamint az LGR5+ sejtek számának növekedését eredményezte shANXA1-transzdukált sejtekből származó organoidokban (12C-D. ábra). Ezzel szemben az SW1222-PROX1^{high} sejtekben az ANXA1 túlzott expressziója csökkentette a megakolóniák arányát, az organoidokban a lumenek számát, valamint az *LGR5* és *TNFRSF19* RNS szintjét a kontrollhoz képest (12E–F. ábrák).



12. ábra. Az ANXA1 csendesítése megnövekedett őssejtaktivitáshoz és daganatnövekedéshez vezet intesztinális adenómában és CRC-ben. (A) Scr kontroll (fekete oszlopok) és shAnxa1-transzdukált *VAp Δ/Δ* organoidok (zöld szín) RNS elemzése. (B) A lumenek száma az SW1222-PROX1^{low}

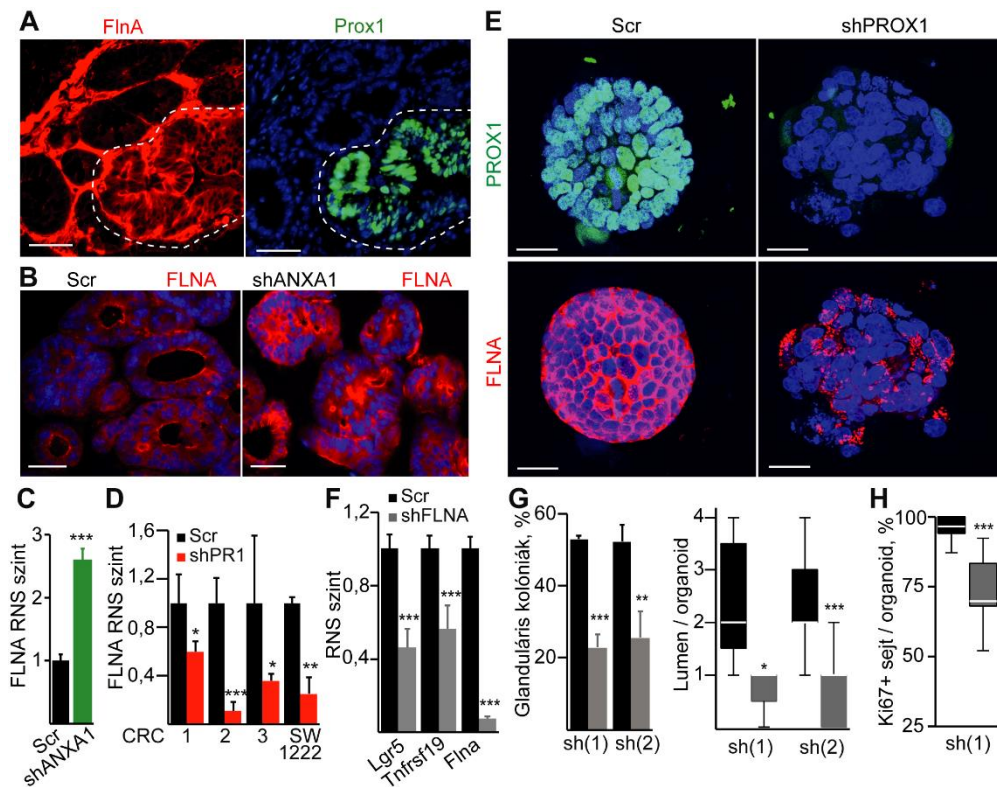
szubklónból származó organoidokban, amelyeket Scr kontrollt vagy shANXA1-et expresszáló lentivírusal transzdukáltunk, fluoreszcens phalloidinnel festettünk (aktin kimutatás), és konfokális képek optikai metszetei alapján elemeztünk. A fehér csillagok a lumeneket jelölik. (C-D) Az adott gének RNS szintjei (C) és az *LGR5* in situ hibridizáció (D) (vörös jel) eredménye SW1222-PROX1^{low} eredetű organoidokban, 16 napos Matrigel tenyésztés után. (E-F) A jelzett gének RNS szintje (RT-qPCR) Scr kontroll transzdukált vagy ANXA1-et túlexpresszáló (fekete és kék oszlopok) SW1222-PROX1^{high} sejt eredetű organoidokban 10 nap 3D tenyésztés után (E), valamint a kolóniákban a lumenek száma (F). (G) Növekedési görbék (n=6) és NSG immundeficiens egerekben szubkután növekvő SW1222-PROX1^{low} tumorok szövettani elemzése és immunfestése. A festéshez a daganatokat a beültetést követő 11. napon izoláltuk. (H) A KI67+ sejtek aránya Scr kontroll vagy shANXA1-transzdukált SW1222-PROX1^{low} sejtekben NSG egerekben való szubkután implantáció után. (I) A KI67+ sejtek aránya Scr kontroll vagy shANXA1 transzdukált SW1222-PROX1^{low} sejt eredetű organoidokban Matrigelbe való beágyazás után különböző időpontokban. Méretarányok: 50 µm.

Mindemellett az ANXA1-csendesített SW1222-PROX1^{low} sejtől származó daganatok gyorsabban növekedtek, mint a kontrollok, több KI67+ osztódó sejtet tartalmaztak, és nagyobb, több lumennel rendelkező, labirintusszerű struktúrákba szerveződő tumorfészkekből álltak (12G-H. ábra). Hasonlóan a PROX1 hatásához, az SW1222 sejtől származó organoidokban az ANXA1 elnémítása csak 16 nap után járt együtt fokozott sejtproliferációval, amikor az organoidok kiterjedt lumenképződést mutattak, a 6. napon azonban nem tapasztaltunk eltérést (12I. ábra). Eredményeink azt mutatják, hogy az ANXA1 csendesítése a PROX1 hatásait utánozza, mely a megnövekedett sejtproliferációs intenzitás révén az összejtkészlet bővüléséhez vezet.

Az aktinkötő filamin A fehérjét kódoló gén csendesítése csökkenti az őssejtek számát CRC-ben

Microarray adatok ismételt elemzése azt mutatta, hogy a fokális adhézio és az aktin citoszkeleton szabályozás voltak a legfontosabb Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) géncsoport kategóriák, amelyeket a PROX1 elnémítása érintett egy PROX1+ CRC sejtvonalban (SW480R). Így a már korábban publikált, CRC őssejtekre jellemző géncsoport [76], és a CRC alcsoportokra jellemző prognózis markerek között [82] kerestünk a PROX1 által szabályozott géneket, amelyek közvetlenül befolyásolhatják a citoszkeletont. Mindkét génkészletben megtaláltuk az aktinkötő fehérje filamin A-t (FLNA) kódoló gént. Az FLNA az aktin filamentumokat transzmembrán receptorokkal kapcsolja össze, modulálja a sejt migrációt, és a citoszkeleton központi mechanotranszdukciós elemeként működik [83, 84]. Érdekes módon nagymértékben megnövekedett *Flna*-expressziót találtunk a Prox1+ és Lgr5+ tumorsejtekben (13A. ábra és az adatok nem láthatók). A FLNA az ANXA1-csendesített organoidokban is felszabályozódott (13B-C. ábra). Emellett a PROX1 némitása SW1222-PROX1^{high} és CRC beteg eredetű organoidokban jelentősen csökkent *FLNA* RNS (13D. ábra) és fehérjeszintet (13E. ábra) eredményezett.

Mivel mind a PROX1, mind az ANXA1 szabályozta az FLNA expresszióját CRC organoidokban, megvizsgáltuk a FLNA funkcióját egy másik modellrendszerben is. A Flna expressziójának csendesítése $V_{Apc}\Delta/\Delta$ organoidokban és SW1222-PROX1^{high} sejtekben alacsonyabb *Lgr5* és *Tnfrsf19* RNS szinthez (13F ábra), az SW1222 sejtéből származó megakolóniák és a lumenek számának csökkenéséhez (13G. ábra), valamint a Ki67⁺ osztódó sejtek számának redukciójához vezetett az organoidokban (13H ábra).

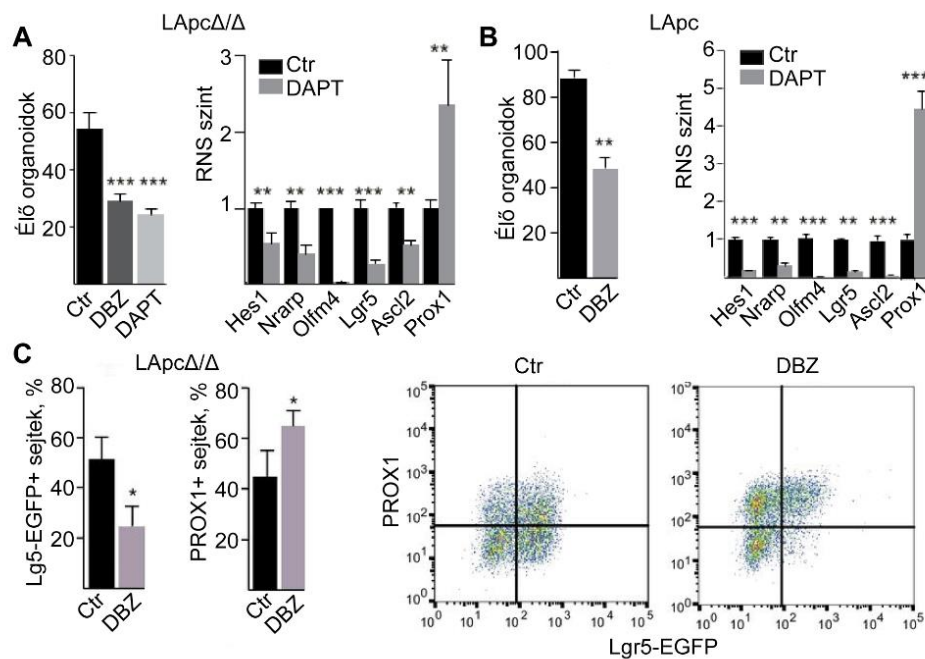


13. ábra. Az aktinkötő filamin A csendesítése gátolja az őssejt aktivitást. (A) A filamin A (Flna) és a Prox1 immunfestése $Apc^{min/+}$ egerek béladenómájában. (B és C) FLNA-festés (B) és RT-qPCR (C) Scr kontroll és shANXA1-transzdukált SW1222-PROX1^{low} sejt eredetű organoidokból (3D tenyésztés). (D) FLNA RNS CRC betegekből származó és SW1222-PROX1^{high} sejt eredetű organoidokban, Scr kontroll vagy shPROX1 lentivirussal transzdukálva (RT-qPCR). (E) PROX1 és FLNA immunfestés Scr kontroll vagy shPROX1-transzdukált, SW1222-PROX1^{high} sejt eredetű organoidokban, 7 napig Matrigelben való tenyésztés után (konfokális 3D rekonstrukció). (F) Az adott RNS-ek szintje a $V_{Apc}\Delta/\Delta$ organoidokban 10 nappal az Scr kontroll vagy shFlna lentivírus transzdukciója után (RT-qPCR). (G) A glanduláris kolóniák aránya és a lumenek száma SW1222 sejtekből származó kolóniákban, a jelzett lentivirussal való transzdukálás után. (H) A Ki67⁺ sejtek százalékos aránya Scr (fekete szín) vagy shFLNA-transzdukált (szürke) SW1222 sejtéből származó kolóniákban 3D tenyésztés után, konfokális optikai metszetekből számolva (n=12). Méretarányok: 50 μ m-t (A és B) vagy 25 μ m-t (E).

A Prox1+ sejtek függetlenné válnak a Notch útvonaltól a korai adenoma fázisban

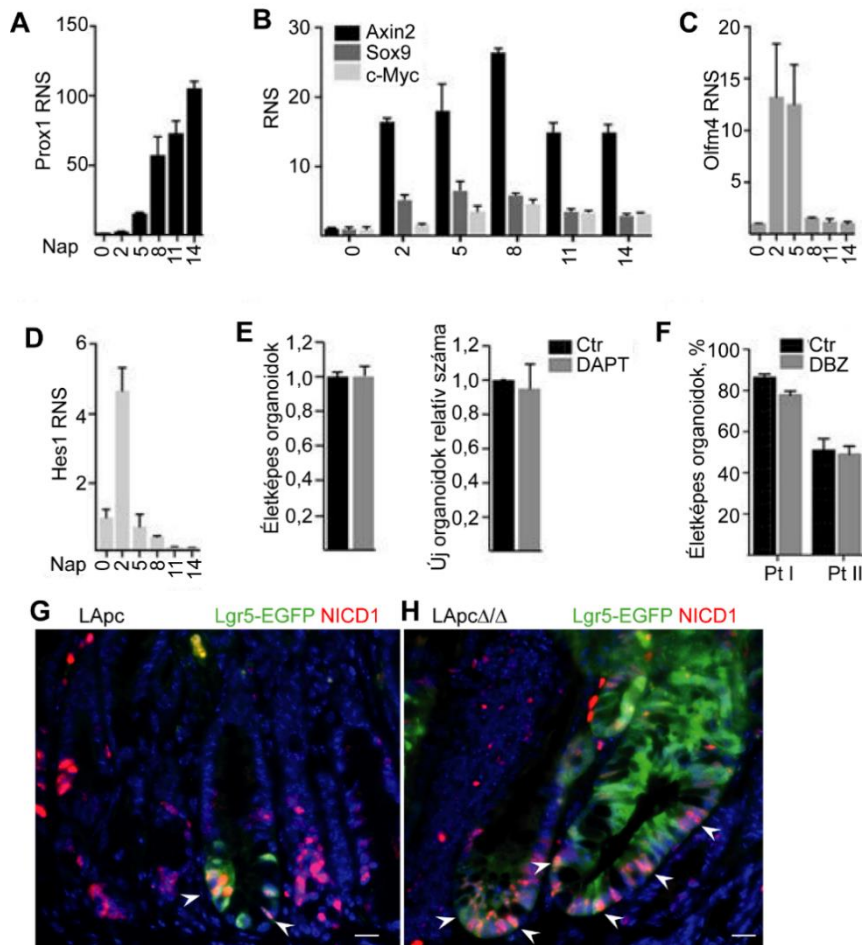
Eddigi eredményeink alapján a Prox1 fontos szerepet játszik az intesztinális adenómák növekedésében, valamint a CRC progressziójában. Következő kérdésként arra voltunk kíváncsiak, hogy mi a Prox1 funkciója az adenomaképzés kezdeti fázisában az *Apc* mutáció

után. Az intesztinális őssejtek fennmaradásához a Wnt és a Notch útvonalak együttes aktivitása szükséges. Minthogy a tumorképzés egyik fontos kiindulási sejt típusa az *Lgr5*⁺ őssejtek, így a korai tumorigenezis vizsgálatakor erre a sejt típusra fókuszáltunk. A NOTCH1-ről korábban leírták, hogy gátolja a PROX1 expresszióját a bél adenóma sejtekben [85]. Ennek a folyamatnak az adenóma őssejtekben történő tanulmányozására *LApC* egerekből származó organoidokat hoztunk létre. A daganatképződést 4-OH-Tam által az *Lgr5*⁺ sejtekben indukált *Apc* delécióval indítottuk el (*LApC* Δ/Δ), majd a Notch gátlókat 3 nap múlva adtuk a tenyészetekhez. A Notch gátlás csökkentette az életképes organoidok számát, valamint módosította a Notch célgének RNS szintjét (*Hes1*, *Nrarp*, *Olfm4*), illetve a Wnt célgéneket (*Lgr5*, *Axin2*) (14A-B. ábra). Az *Lgr5*-EGFP⁺ zöld fluoreszcens sejtek száma is csökkent, ami azt jelzi, hogy a Notch kritikus az *Lgr5* őssejtaktivitás szempontjából rövid idővel az *Apc* deléció után (14C. ábra). Továbbá a Notch gátlás növelte a *Prox1* RNS expresszióját és a PROX1⁺ sejtek számát (14A-C. ábra). Bár az *Lgr5*-EGFP⁺ őssejtek teljes száma csökkent, az *Lgr5*-EGFP⁺/PROX1⁺ sejt populációban csak kismértékű csökkenést figyeltünk meg (14C. ábra).



14. ábra. A Notch aktivitás fontos a bélőssejtek fennmaradásához az *Apc* deléciót követő korai átmeneti fázisban. (A-B) Az életképes organoidok százalékos aránya és az adott RNS-ek szintje *LApC* Δ/Δ organoidokban 8 nappal a 4-OH-Tam kezelést követően (A) és kezeletlen *LApC* (B) organoidokban. Az organoidokat 5 napig kezeltük a jelzett γ -szekretáz inhibitorral, melyek a Notch aktivitás gátlói, a 4-OH-Tam (A) hozzáadása utáni harmadik napon kezdve. (C) Az *Lgr5*-EGFP⁺ és *Prox1*⁺ sejtek mennyiségi meghatározása az *Lgr5*-EGFP fluoreszcencia és a PROX1 immunfestése alapján *LApC* Δ/Δ organoidokban az *Apc* deléciót követő 8. napon (áramlási citometria és konfokális mikroszkóp). Párosítatlan t-teszt, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

A 4-OH-Tam-mal kezelt *V_{Apc}Δ/Δ* organoidok kinetikai elemzése azt mutatta, hogy a *Prox1* és a többi Wnt célgén (*Axin2*, *Sox9*, *c-Myc*) fokozott expressziója korrelált a Notch célgénnek (*Olfm4*, *Hes1*) csökkent expressziójával (15A-D. ábra). Az *Apc* deléció követő 12. napon azonban a Notch gátlás már nem befolyásolta sem az élő organoidok arányát, kolóniaképzési hatékonyságát, sem a betegekből származó CRC organoidok életképességét (15E-F. ábra), ami arra utal, hogy az aktív Notch jelátvitel már nem volt szükséges az *Apc* mutáns bélhámsejtek fennmaradásához.



15. ábra. A *Prox1* indukciója korrelál a Notch célgénnek expressziós csökkenésével az *Apc* deléció után. (A–D) A *Prox1*-et (A), az *Axin2*, *Sox9* és a *c-Myc* (B) Wnt célgéneket, valamint az *Olfm4*-et (C) és a *Hes1*-et (D) kódoló RNS-ek kinetikai elemzése *V_{Apc}Δ/Δ* organoidokban. A napok az *Apc* deléció után eltelt időt mutatják. (E) Az élő és az új organoidok aránya a Notch gátló DAPT-vel előkezelt *LApcΔ/Δ* organoidokból indított tenyészetekben. A kezelést 12 nappal az *Apc* deléció után 5 napig végeztük. (F) Az életképes organoidok százalékos aránya a Notch gátló dibenzazepinnel (DBZ) kezelt CRC beteg eredetű organoidok tenyészetekben (Pt I és Pt II: két beteg). (G, H) *Lgr5*-EGFP és *NICD1* immunfluoreszcens festése *LApc* bélben az *Apc* deléció előtt (G) és 21 nappal (H) utána. Míg a kontroll kriptákban minden EGFP⁺ sejt *NICD1*⁺, az adenómákban csak néhány *Lgr5*-EGFP⁺ sejt *NICD1*⁺ (nyílhegyek: *NICD1*⁺ sejtek). Párosítatlan t-teszt, méretarány: 20 μm.

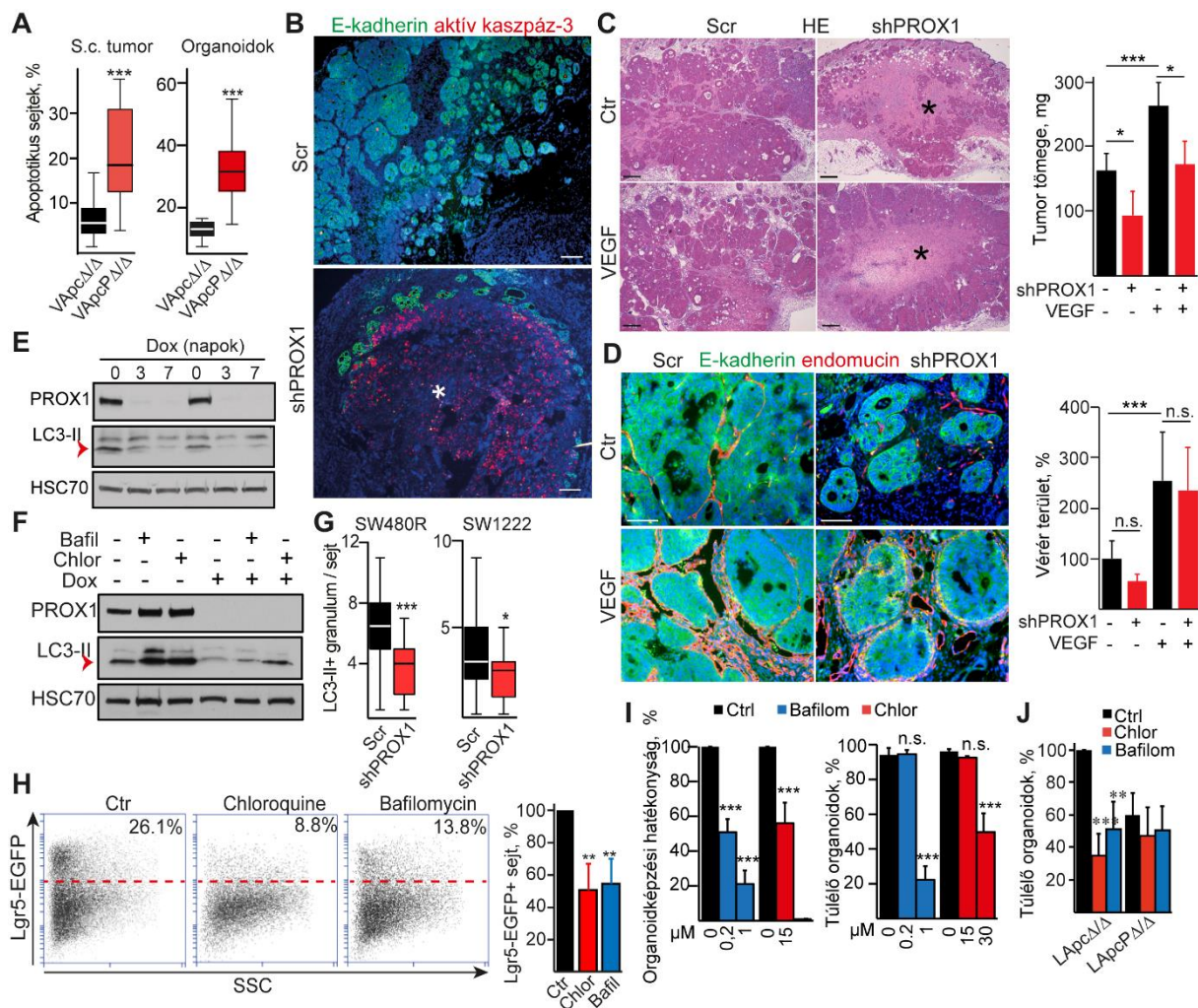
Ezzel összhangban az Lgr5-EGFP+ sejtek az LApc kontroll egerek belében pozitívak voltak a Notch1 intracelluláris doménra (NICD1), mely az aktív Notch útvonal markere (15G. ábra). Ezzel szemben az Lgr5-EGFP+ sejteknek csak 36%-a volt pozitív NICD1-re 21 nappal az Apc deléció után (15H. ábra). Az Lgr5-EGFP+ őssejtek többsége PROX1+ volt, a PROX1+ sejtek pedig negatívak voltak NICD1-re (nem mutatott eredmények), ami alátámasztja azt az elképzelést, hogy a Prox1+ sejtek szelektív növekedési előnnyel rendelkeznek az Apc deléciót követően. Összességében ezek az eredmények azt mutatják, hogy a Notch útvonal fontos az őssejtaktivitásban az Apc deléciót követő átmeneti fázisban. A magas Wnt aktivitás azonban bekapcsolja a Prox1-et a korai Lgr5+ adenóma sejtekben, melyekben inaktiválódik később a Notch útvonal, így a Prox1+/Lgr5+ sejtek Notch független őssejt fenotípust vesznek fel.

A PROX1 csendesítése csökkenti a sejtek túlélését hipoxiás tumor xenografiban

Érdekes módon a Matrigel-ben nagy méretre növesztett (>150 μm átmérő), vagy szubkután immunhiányos (NSG) egerekbe injektált, Prox1-re deléciót mutató VApc Δ/Δ organoidok több apoptotikus sejtet tartalmaztak, mint a VApc Δ/Δ organoidok (16A. ábra). Emellett az apoptózis marker aktív kaszpáz-3 intenzív festődését észleltük a PROX1-re csendesített, SW1222-PROX1^{high} sejtekből származó, szubkután növekvő tumorokban, amelyek pozitívak voltak a karbon anhidráz IX hipoxiamarkerre a tumorok belsejében, de nem a szélén (16B. ábra és nem mutatott adatok). Ez a tumorsejtek csökkent túlélésére utal az ischaemiás/hipoxiás tumor belsejében. Nem találtunk azonban különbséget az endomucin+ vérerek sűrűségében a Scr és az shPROX1 daganatok között, még akkor sem, ha a vérérképződésben fontos vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) túlexpresszáldott a tumorsejtekben (16C-D. ábra). Az shPROX1 tumorok azonban kisebbek voltak, mint a Scr kontrollok, és a VEGF-nek nem volt menekítő hatása a nagy nekrotikus területek kialakulására a PROX1-csendesített daganatokon belül (16C-D. ábra). Így a nagy nekrotikus területeknek az shPROX1 daganatokban megfigyelhető jelenléte nem magyarázható az angiogenetikus faktorok hiányával.

Bár az ANXA1 csendesítése utánozta a PROX1 számos hatását intesztinális adenóma és CRC modellekben, az ANXA1-némított, szubkután növekvő daganatokban az apoptózis nem változott szignifikánsan (nem mutatott adatok). Ez felvetette annak lehetőségét, hogy kedvezőtlen körülmények között alternatív útvonalak is hozzájárulhatnak az apoptózishoz az shPROX1 daganatokban. Az autofágia elengedhetetlen folyamat a sejtek túléléséhez hipoxia vagy tápanyaghiány esetén [86]. Érdekes módon az SW480R sejtekben a PROX1 csendesítése az autofágiához kapcsolódó LC3-II fehérje csökkenését eredményezte mind normál tápközegben, mind éhezési körülmények között (16E-F. ábra). Ezen kívül a PROX1 hiánya

megakadályozta az LC3-tartalmú korai autofagoszómák felhalmozódását a lizoszomális inhibitor bafilomicin A vagy chloroquin jelenlétében, amelyek gátolják az autofagoszómák fúzióját a lizoszómákkal (16F. ábra). A PROX1 csendesített SW480R vagy SW1222-PROX1^{high} sejtekben hipoxiás körülmények között csökkent LC3-tartalmú korai autofagoszómaszámot figyeltünk meg, amikor a lizoszómákkal való fúziójuk gátolt volt (16G. ábra), ami arra utal, hogy a PROX1 fokozza az autofágiát. A chloroquin vagy a bafilomicin A alacsony koncentrációja az Lgr5⁺ sejtek elvesztését eredményezte az *Apc* deléció követően (16H. ábra). Megjegyzendő, hogy ez a chloroquin koncentráció gátolta az új VAp Δ/Δ organoidok kialakulását, de nem befolyásolta a túlélésüket, amikor 2 nappal az organoidok passzálása után alkalmaztuk (16I. ábra). A chloroquinnak vagy bafilomicin A-nak kis dózisban az LAp Δ/Δ organoid tenyészetekhez való hozzáadása továbbá az életképes organoidok arányát olyan szintre csökkentette, mint ami az LAp Δ/Δ tenyészetekben a *Prox1* delécióval megfigyelhető volt. Ez rávilágít arra, hogy az autofágia specifikusan elősegíti a Prox1⁺ tumorsejtek túlélését (16J. ábra).

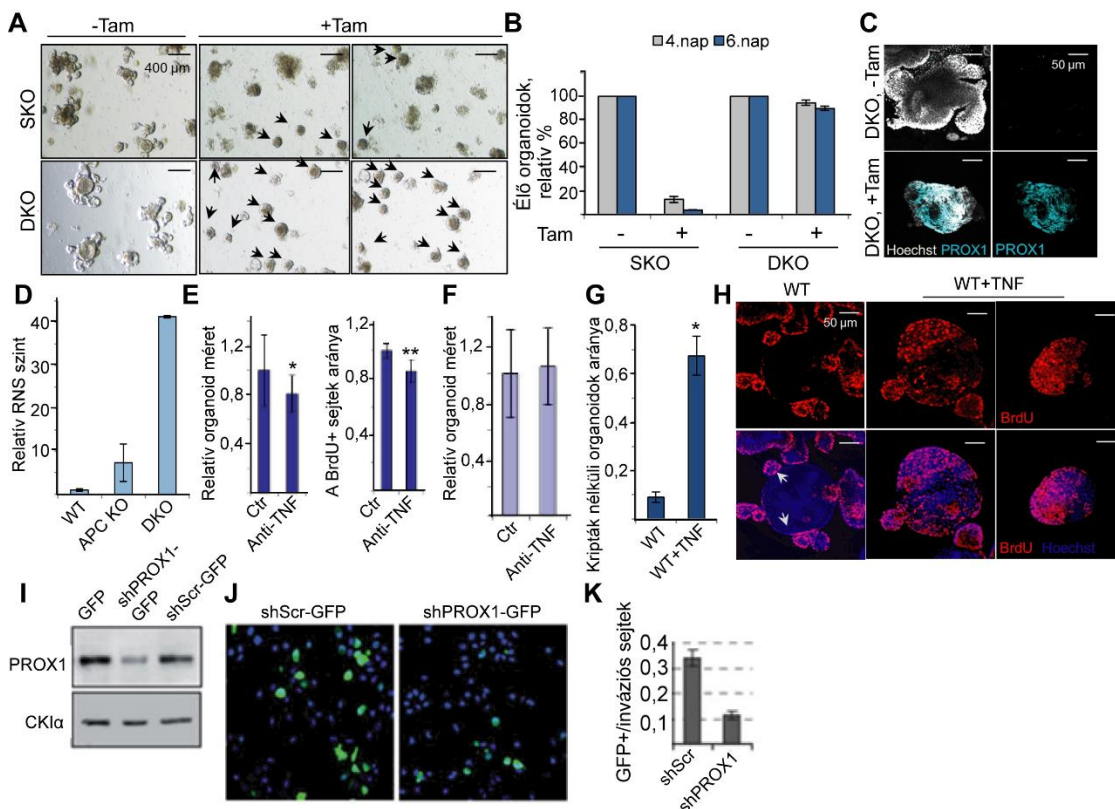


16. ábra. A PROX1 hiánya csökkenti a CRC sejtek túlélését kedvezőtlen körülmények között. (A) A kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek százalékos aránya az E-kadherin+ epiteliális sejtek között VAp Δ/Δ (fekete oszlopok) és Prox1-deletált (VAp Δ/Δ ; piros oszlopok) organoidokban (jobb panel, n=14) vagy NSG egerekben való szubkután tenyésztés után (bal panel, n=22). (B) Szubkután növekvő Scr és shPROX1-transzdukált SW1222-PROX1^{high} tumorok aktív kaszpáz-3 festése NSG egerekben. Az shPROX1-transzdukált tumorok belső része erősen apoptotikus (csillag). (C) Hematoxilin-eozin (HE) festés, valamint az NSG egerekben szubkután növekvő Scr és shPROX1-transzdukált SW1222-PROX1^{high} tumorok tömege kontroll (üres vektor) vagy humán VEGF165 expressziója esetén (n=5). Az shPROX1 daganatokon belül a nagy nekrotikus területeket csillagok jelölik. (D) E-kadherin és endomucin immunfestés, illetve a relatív endomucin+ vérerek területének kvantifikálása (n=10). ANOVA és Tukey post hoc teszt. (E-F) SW480R-shPROX1 sejtek immunblotja a jelzett fehérjékre. A sejteket vagy teljes médiumban (E), vagy aminosavakat nem tartalmazó éheztetési tápközegben tenyésztettük 8 órával a fehérjeizolálás előtt (F), 100 nM bafilomicin A vagy 30 μ M chloroquin jelenlétében vagy hiányában. (G) Az Scr vagy shPROX1 lentivírussal transzdukált és 100 nM bafilomicin A-t tartalmazó éheztetési médiumban tenyésztett sejtekben az LC3+ granulumok száma hipoxiában (n=50). (H) Az Lgr5-EGFP+ sejtek áramlási citometriás elemzése LAp Δ/Δ organoidokban, 9 nappal az Apc deléció után és 3 nappal 15 μ M chloroquin vagy 0,2 μ M bafilomicin A hozzáadása után. (I) A VAp Δ/Δ organoidok kolóniaképzési hatékonysága és túlélési százaléka chloroquin, illetve bafilomicin A jelenlétében vagy hiányában. Az organoid túlélés vizsgálata esetében a hatóanyagokat 2 nappal a passzálás után alkalmaztuk. (J) Az LAp Δ/Δ és LAp Δ/Δ organoidok relatív túlélési aránya 8 nappal a deléció(k) indukálása után és 6 nappal R-Spondin1-mentes tápközegben való tenyésztésük után. Chloroquin (15 μ M) vagy bafilomicin A-t (0,2 μ M) 4 nappal a 4-OH-Tam után 4 napig adtuk. Méretarány: 100 μ m.

A Prox1 asszociációt mutat az inváziós fenotípussal Apc mutációtól független egér CRC modellben

A fokozott Wnt aktivitás a betegek azon csoportjában is általában megfigyelhető, akiknél nincs APC/ β -katenin mutáció. Ennek modellezésére együttműködő partnerünk a β -katenint lebontó fehérjekomplex egy másik tagját, a kazein-kináz I α -t (CKI α) bélspecifikusan inaktíválta, mely szintén a Wnt jelátviteli útvonal kritikus szabályozója. A *Csnk1a1* (a CKI α -t kódoló gén) kiütése a *CKI α ^{flox/flox}; Villin^{Cre-ERT}* egerek bélhámjában tamoxifen kezelést követően (egyszeres knock out, SKO) jelentős Wnt aktivációt váltott ki, meglepő módon azonban tumorigenezis indukálása nélkül. A CKI α -hiányos epitélium a Wnt aktiválásán kívül a humán CRC kialakulásának számos jellemzőjét mutatta, különösen a DNS-károsodási válasz (DNA damage response, DDR) indukcióját és a sejtek szenescenciáját bizonyos esetekben, amelyek gátat jelentenek a rosszindulatú transzformáció ellen. Az egerekben a DDR-t a p53 jelentős aktiválása kíséri, ami arra utal, hogy a p53 útvonal ellensúlyozhatja a Wnt hiperaktiváció pro-tumorigén hatásait. A bél homeosztázisának fenntartásához CKI α -hiányos bélben p53-mediált növekedésszabályozásra van szükség, mivel a *Csnk1a1* és a *Trp53* bélspecifikus kombinált kiütése *CKI α ^{flox/flox}; p53^{flox/flox}; Villin^{Cre-ERT2}* (dupla knock out, DKO) egerekben diszpláziát indukált megnövekedett proliferációs intenzitással, mely invazív karcinómák kialakulásához vezetett az egész bél területén. A modell relevanciáját az is erősíti, hogy humán CRC minták egyes szöveti területein alacsony CKI α expresszió figyelhető meg.

A *Csnk1a1* (CKI α) kiütése egy alacsony fokú, a sejt szenescenciához köthető gyulladásszerű folyamatot aktivált a hámokban (SIR, senescence-associated inflammatory response), mely többek között tumor nekrozis faktor α (TNF α) termeléssel is párosult, és amely a daganat növekedését gátolta. A SIR azonban p53 hiányában elvesztette növekedésszabályozó képességét, és ehelyett felgyorsította a növekedést és az invazivitást. A SIR részletesebb vizsgálatához organoidokat izoláltam SKO és DKO egerekből, majd 4-OH-Tam-nel CKI α deléció (SKO) és kettős CKI α ;p53 deléció (DKO) indukáltam. Míg az SKO organoidok növekedése gyorsan leállt, és 4-5 napon belül szétestek, a DKO organoidok tenyésztethetők voltak növekedési faktorok és Wnt aktivátorok nélkül is (17A-B. ábra). Mind az SKO, mind a DKO organoidok eltérő morfológiát vettek fel a WT kultúrákhoz képest: gömb alakú szerkezetet a normál organoidokra jellemző kriptaszerű struktúrák nélkül, mely az aktivált Wnt útvonalat mutatja (17A. ábra). A DKO organoidok immunfestése továbbá a Prox1 indukcióját mutatta a kontrollhoz képest (17C. ábra). A p53 kiütése tehát megváltoztatta az SKO organoidok sorsát a transzformált fenotípussal jellemezhető halhatatlanság irányába.



17. ábra. A SIR p53 hiányában elveszti növekedésszabályozó képességét. (A) Reprezentatív képek SKO és DKO organoidokról, 4 nappal a 4-OH-Tam indukciót (+Tam) követően, mellyel a CKI α és a p53 delécióját indukáltuk. A nyilak élő organoidokat jeleznek a géntkiütés után. (B) Az élő organoidok mennyiségi meghatározása SKO és DKO tenyészetekben géntkiütés után vagy géntkiütés nélkül a 4. és 6. napon. (C) A PROX1 (világoskék) immunfestése DKO-ban. A sejtmagokat Hoechst (fehér) festés jelzi. (D) A *Tnfa* RT-qPCR elemzése WT, 4-OH-Tam által indukált *Apc^{fllox/fllox}*; *Villin^{CreERT}* (APC KO) és

DKO organoidokban (n=5-6). (E-F) Az organoidok relatív mérete és a BrdU+ sejtek aránya DKO (E) vagy APC KO (F) organoidokban. Az anti-TNF α ellenanyagot (2,5 μ g/ml) 4 napig alkalmaztuk. *p=0,0007, **p=0,002 (F). (G) A kriptákat nem képző WT organoidok relatív aránya 100 ng/ml TNF α -val végzett 4 napos kezelést követően a kezeletlen WT kontrollokhoz viszonyítva. *p = 0,002. (H) WT organoidok BrdU jelölése 100 ng/ml TNF α -val végzett 3 napos kezelést követően, összehasonlítva a kezeletlen WT kontrollokkal. A fehér nyilak a BrdU-pozitív kriptákat jelzik. I) GFP-t, shPROX1-et és GFP-t (shPROX1-GFP), illetve kontroll szekvenciát és GFP-t (shScr-GFP) expresszálo lentivírussal transzfektált COLO205 sejtek Western-blot analízise. A CKI α pozitív kontrollként szolgált. J) Matrigel inváziós vizsgálat az adott konstrukciót hordozó sejtekkel (zöld szín). A relatív transzfekeciós hatékonyság 1,07/1 volt. Hoechst festést (kék) használtunk az inváziós sejtek megjelenítéséhez. K) Az inváziós hatékonyság kvantifikálása (a transzfekeciós hatékonyságra normalizálva).

Eredményeim szerint a DKO organoidok szignifikánsan magasabb szinten expresszálták a TNF α -t, mint az *Apc* mutáns (APC KO), vagy WT egerekből izolált organoidok (17D. ábra). A TNF α -nak, mint a SIR egyik fontos komponensének a vizsgálatára a TNF α -t termelő DKO organoidokat és a kontroll APC KO organoidokat anti-TNF α neutralizáló antitesttel kezeltem. Az anti-TNF α következetesen 15–20%-kal gátolta a DKO organoidok növekedését (méret és BrdU beépülése alapján számolva), míg az APC KO organoidokra nem volt hatással (17E-F. ábra). Ugyanakkor az exogén TNF α kezelés erőteljes hatást fejtett ki a WT organoidokra: rendellenes növekedést és a kezeletlen DKO organoidokhoz hasonló morfológiai változást indukált, a kriptát tartalmazó organoidok aránya nagymértékben lecsökkent a TNF α -kezelést követően, a BrdU beépülése a kriptákból a teljes organoid területére transzlokálódott, és a WT organoidok a 4. napra proliferatív kriptá fenotípust nyertek (17G-H. ábra).

Együttműködő partnerünk adatai alapján 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, és amelyek feltehetőleg a megfigyelt *in vivo* invázióért felelősek. Annak igazolására, hogy a PROX1 közvetlenül részt vesz az invazivitás szabályozásában p53 hiányában, munkacsoportunkban COLO205 sejtekben csendesítettem a PROX1-et. A COLO205 CRC sejt vonal p53 mutációt is hordoz, és forbol-mirisztát-acetáttal (PMA) végzett stimuláció hatására inváziót mutat Matrigel-ben. Eredményeim szerint a PROX1 csendesítése az invázió jelentős csökkenését eredményezte transwell migrációs tesztben (17I-K. ábra).

Összességében ezek, valamint az együttműködő partnerrel együtt publikált, de a dolgozat részét nem képező adatok azt mutatják, hogy 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 részvevő. Megjegyzendő azonban, hogy a PROX1 expressziója egyedül nem volt elegendő az inváziós fenotípus *in vivo*

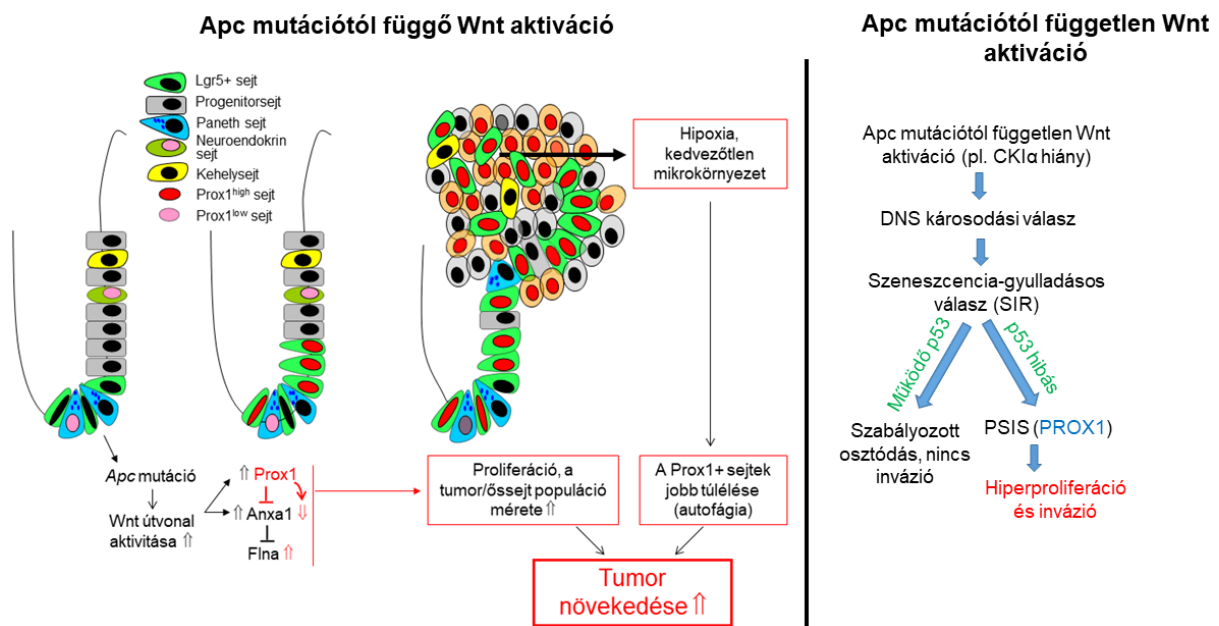
indukálásához, hanem több PSIS gén összehangolt aktivitása lehet szükséges a szöveti invázió elősegítéséhez.

Megbeszélés: Az őssejtek fontos gyógyszer-célpontot jelentenek a rákos esetekben, mivel a daganatokban tartósan fennmaradnak, önmegújításra képesek, és összefüggésbe hozhatók a daganatok kezelés utáni ismételt megjelenésével [41]. Ezért a rákos őssejteket célzó specifikus terápiák kifejlesztése javíthatja a túlélést. Érdekes módon korábban kimutatták, hogy a béladenómák kevesebb őssejtet tartalmaznak, mint az Lgr5+ sejtek száma, ami arra utal, hogy az Lgr5+ sejteknek csak egy alpopulációja működik őssejtként [46]. Minthogy a Prox1 szabályozza ennek a populációnak a méretét, és a normál bélhamban nem expresszálódik, az általa indukált valamelyik géntermék gátlása terápiás célpont lehet. A célgének közé tartozó ANXA1 gátolja a proinflammatorikus foszfolipáz A2-t, amely serkenti a CRC sejtek proliferációját különböző lipid mediátorok előállításával, és ezáltal szabályozza az intercelluláris molekuláris kapcsolatokat és az aktin citoskeleton [87, 88]. A FLNA bizonyos CRC klasszifikációkban a rossz túlélésű altípus egyik markere [82]. A FLNA expressziója számos tumortípus esetében megnövekszik, és kimutatták, hogy fokozza a hipoxia választ és a tumor progresszióját [89]. Ezzel összhangban a FLNA-t expresszáló PROX1+ tumorsejtek ellenállóbbak voltak az apoptózissal szemben, mint a FLNA^{low} PROX1-negatív tumorsejtek mind *in vivo*, mind az organoidokban. Feltűnően megemelkedett az apoptózis mértéke különösen a PROX1-csendesített, egerekben szubkután növekvő tumorok központi részein. A PROX1-negatív tumorsejtek apoptózissal szembeni érzékenysége azonban nem az angiogenezist serkentő növekedési faktorok elégtelen expressziójának volt köszönhető, mert a VEGF túlexpresszálatásának nem volt menekítő hatása, hanem a PROX1+ sejtekben az intenzív autofágiának, amelyről ismert, hogy elengedhetetlen a CRC sejtek túléléséhez [86]. Ez a megfigyelés különösen érdekes, ha figyelembe vesszük, hogy a hipoxia által kiváltott autofágia elősegítheti a tumorsejtek túlélését és alkalmazkodását a CRC terápiában alkalmazott angiogenezist gátló kezeléshez [90]. Eredményeink összhangban vannak Ragusa S és munkatársai megállapításaival, amelyek szerint a PROX1 elősegíti a CRC sejtek metabolikus adaptációját kedvezőtlen mikrokörnyezetben, és így kritikusan hozzájárul a CRC-k metasztázisához [91].

A CK1 α hiánya is a Wnt útvonalat aktiválta az *Apc* mutációtól függetlenül [68], amelyet egy epitéliumra jellemző, alacsony fokú gyulladás (SIR) és sejtszeneszcencia kísért tumorképzés nélkül. A p53 működésének egyidejű kiesése inváziós fenotípushoz vezetett, mely asszociációt mutatott egy jellegzetes géncsoport, a p53 által elnyomott inváziós gének (PSIS)

expressziójának fokozódásával, valamint a SIR hatását a tumorigenezist serkentővé alakította át. A PSIS egyik fontos tagja a Prox1. Minthogy a dolgozatban nem mutatott adataink szerint a nem szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID) csökkentik a SIR-t, így ennek az alacsony szintű gyulladásos folyamatnak a gátlása fontos mechanizmust jelenthet az NSAID-ok antikarcinogén hatásában.

Összességében eredményeink alapján 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 csak közvetlenül az Apc mutáció létrejötte után függ. A tumor transzplantátumok hipoxiás részeiben a PROX1 továbbá elősegíti a tumorsejtek túlélését autofágia által. A PROX1 tehát anélkül szabályozza az adenoma/CRC őssejtek számát, hogy befolyásolná a normál bél homeosztázisát, így vonzó terápiás célpontot biztosíthat gyógyszerfejlesztéshez CRC-ben (18. ábra). *Apc* mutációtól független Wnt hiperaktivációt mutató modellekben pedig a *Prox1* egy inváziós géncsoport tagja, mely p53 deléció után a SIR egyik végrehajtója (18. ábra).



18. ábra. A Prox1 tumorigenezisre kifejtett hatásának összefoglaló ábrája

5.2 A driver mutációk módosítják az intesztinális adenómasejteknek a TGFβ által kiváltott, Bim-mediált apoptózisra való érzékenységét (V)

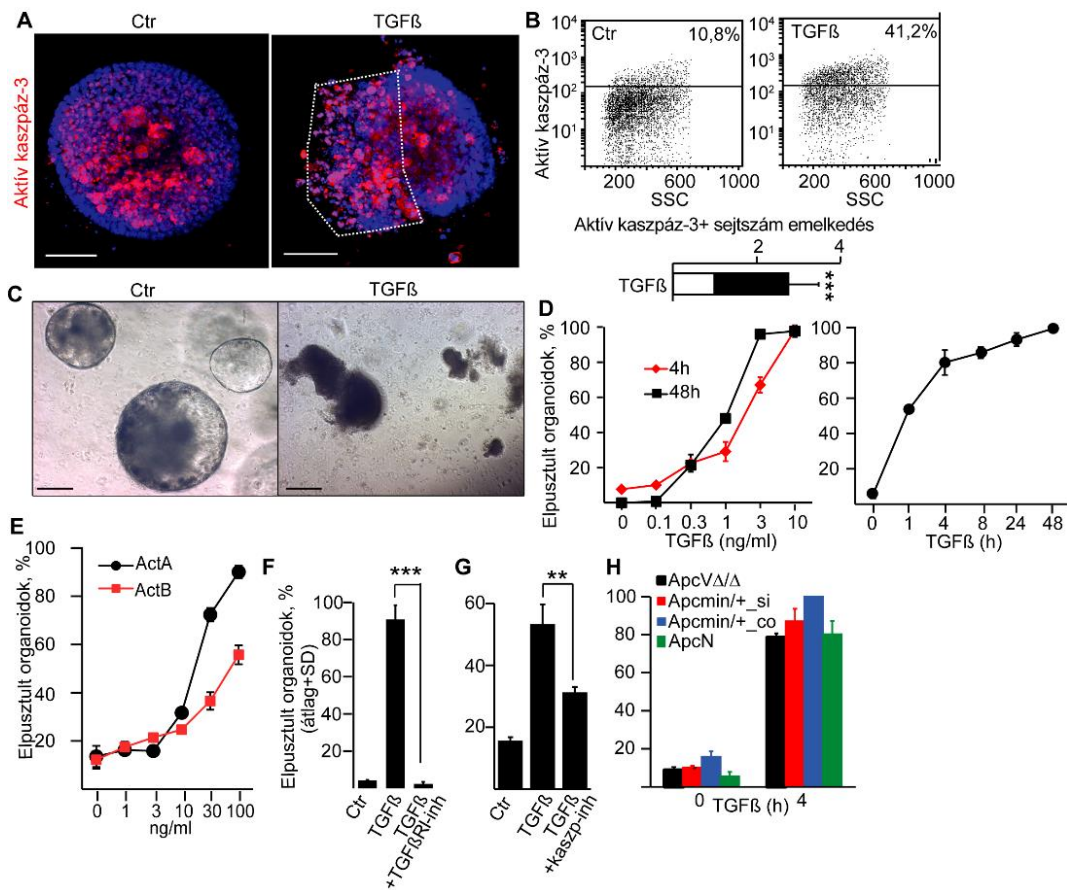
A CRC klasszikus modellje szerint a tumorigenezist elindító *APC*-ben vagy a β-katenint kódoló *CTNNB1*-ben megjelenő mutációt a *KRAS* géntermék onkogén aktiválása, valamint a TGFβ jelátviteli út és a p53 tumorsuppresszor inaktiválása követi. A TGFβ-nak a CRC-ben betöltött

központi szerepét az is jelzi, hogy a betegek jelentős részében a TGF β által aktivált jelátviteli útvonal valamelyik komponense mutációt szenved (pl. SMAD4, TGF β RII). A Cancer Genome Atlas Network-nek az egész genomra kiterjedő elemzése a Wnt, TGF β , foszfoinozítid-3-kináz (PI3K) és p53 útvonalak mutációinak magas gyakoriságát mutatta CRC-ben [31]. A vezető (driver) mutációk CRC-beli szerepének megértését azonban gátolta a CRC progressziójának tanulmányozására alkalmas *ex vivo/in vitro* modellrendszerek hiánya, ezért nehéz volt tanulmányozni a TGF β hatását az adenóma fázisban, illetve a mutációk felhalmozódásával párhuzamosan. Bár a TGF β receptorokat már kiütötték *Apc* mutáns egérmodellben [92, 93], ezek a publikációk nem tárták fel a TGF β részletes hatásmechanizmusát béladenómákban, valamint nem adtak további betekintést abba, hogy a progresszió során felhalmozódó mutációk hogyan befolyásolják a TGF β apoptotikus hatására való érzékenységet.

A fentebb említett problémák megoldása érdekében az *in vivo* modellek mellett organoid kultúrákat is használtunk arra, hogy feltérképezzük a TGF β hatásmechanizmusát adenómákban. Az organoid tenyésztési rendszerben az exogén Wnt-ligand R-Spondin1 nélkülözhetetlen a vad típusú (WT) bélkriptákból származó organoidok túléléséhez és növekedéséhez. R-Spondin1 nélkül csak a Wnt útvonal aktiváló mutációjával rendelkező organoidok maradnak meg 5 napon túl, mely szelekciós lehetőséget felhasználtuk arra, hogy bizonyos kísérletekben csak mutáns organoidokból álló tenyészeteket kapjunk.

A TGF β serkenti az adenómasejtek apoptózist a Bim indukcióján keresztül

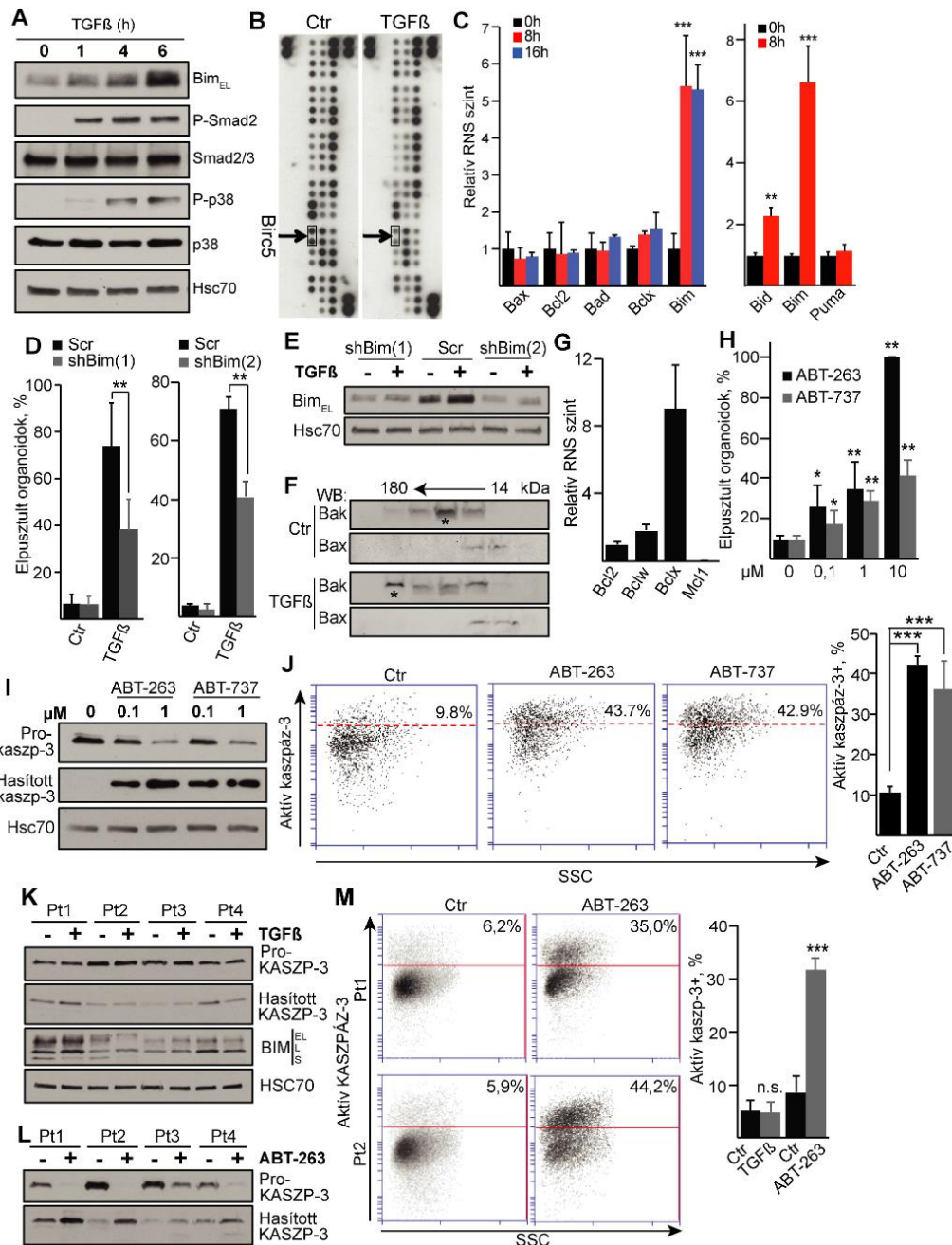
A TGF β által a korai béladenómákban kifejtett hatás tanulmányozására először kriptákat izoláltunk V*Apc* egerekből, és 4-OH-Tam kezeléssel indukáltuk az *Apc* gén bélhámspecifikus delécióját (V*Apc* Δ/Δ). Az organoidokban a belső sejtek apoptózis útján elpusztulnak, és az organoid üregébe kerülnek (19A. ábra, kontroll), míg a TGF β kezelés által indukált kaszpáz-3-függő apoptózis hatására a szabályos sima organoid felület elvesztését tapasztaltuk (19A. ábra, TGF β , szaggatott vonal és 19B. ábra), majd később az organoid szerkezet teljesen szétesett (19C. ábra). A TGF β mellett az activin A és B, a TGF β család két másik tagja is dózis- és időfüggő módon elősegítette az organoidok szétesését (19D-E. ábra). A TGF β által kiváltott sejthalált az SB431542, a TGF β I-es típusú receptor (TGF β RI) kináz inhibitora és a kaszpáz inhibitor Z-VAD-FMK (19F-G. ábra) blokkolta, alátámasztva a jelátviteli útvonal specificitását, valamint aktív kaszpázok részvételét ebben a folyamatban. Az eltérő mutáns *Apc* allélt hordozó *Apc*^{Min/+}, V*Apc* Δ/Δ és *Apc*^{1638N/+} (*Apc*N) egerek vastagbél és vékonybél organoidjai hasonlóan reagáltak, mely arra utal, hogy az *Apc* mutáció helye, valamint a mutáns organoidok forrása nem befolyásolja a TGF β -ra adott válaszkészségüket (19H. ábra).



19. ábra. A TGFβ idő-, dózis- és TGFβRI kináz-függő citotoxicitása mutáns Wnt útvonallal rendelkező organoidokban. (A) Immunfestés aktív kaszpáz-3-ra VAp Δ/Δ organoidokban TGFβ kezeléssel vagy anélkül (3 ng/ml 16 órán keresztül). A TGFβ-val kezelt organoidok külső epiteliális rétegében lévő apoptotikus sejteket szaggatott vonal jelzi. (B) Reprezentatív képek és az aktív kaszpáz-3 pozitivitás növekedése a TGFβ-val kezelt VAp Δ/Δ organoidokban (n=3, áramlási citometriás mérések). (C) VAp Δ/Δ organoidok fáziskontraszt mikroszkópos felvételei 48 órás TGFβ kezeléssel és anélkül. (D) TGFβ dózis-válasz görbe VAp Δ/Δ organoid tenyészetekben 48 vagy 4 órán keresztül kezelt, majd 44 óra után elvégzett analízissel. (E) Az aktivin A és az aktivin B (48 óra) hatása az VAp Δ/Δ organoidok pusztulására. (F) A TGFβRI kináz inhibitor SB431542 (10 μM) hatása a 48 órán keresztül kezelt tenyészetekben. (G) A kaszpáz inhibitor Z-VAD-FMK (50 μM) hatása a VAp Δ/Δ organoidokra 1h TGFβ kezelés után 48 órával elemezve. (H) A különböző *Apc* mutáns organoidok válasza 4 órás TGFβ kezelésre. A vékonybélből izolált organoidokat „si”-vel, a vastagbélből „co”-val jelöltük. Méretarány: 50 μm (A) vagy 100 μm (C).

A TGFβ –sejttípustól függően- sokféle célgénen és mediátoron keresztül fejtheti ki hatását [94]. A korai intesztinalis adenómákban a TGFβ által szabályozott sejthalál mechanizmusának tisztázása érdekében nagyszámú proapoptotikus és antiapoptotikus molekulát vizsgáltunk meg apoptózis fehérje array-vel és kvantitatív real-time PCR-rel VAp Δ/Δ organoidokban. A TGFβ gátolta a Wnt célgén által kódolt antiapoptotikus fehérje, a Birc5/survivin expresszióját, serkentette a TGFβ jelátviteli útban szereplő Smad2 transzkripció faktor és a p38 MAP kináz foszforilációját, valamint megemelte a proapoptotikus BH3-only fehérje Bim_{EL} izoforma (Bim) szintjét (20A-C. ábra). Ezzel szemben csak csekély növekedést figyeltünk meg a proapoptotikus *Bid* mRNS szintjében, és nem változott a szintén ebbe a csoportba tartozó *Puma*

a TGFβ kezelés után (20D. ábra). A VAp Δ/Δ organoidok transzdukciója shBim lentivírussal jelentős rezisztenciát eredményezett a TGFβ által kiváltott sejthalállal szemben két konstrukció esetében is (20E-F. ábra).



20. ábra. A TGFβ apoptózist indukál a bélorganoidokban Bim-en keresztül. (A) Az jelzett fehérjék immunoblot vizsgálata VAp Δ/Δ organoidokban. (B-C) A TGFβ hatása a pro/antiapoptotikus gének expressziós szintjére VAp Δ/Δ organoidokban. Apoptózis protein array (16 óra) (B) és RT-qPCR (TGFβ kezelés: 8 és 16 óra) (C). (D) A Bim csendesítés hatása a TGFβ-val 1 órán át kezelt VAp Δ/Δ organoidok halálára, a kezelés után 36 órával elemzve. (E) Scr kontroll vagy shBim lentivírussal transzdukált VAp Δ/Δ organoidok Bim immunoblot vizsgálata. (F) Bak és Bax immunoblot vizsgálata VAp Δ/Δ organoidok gélfiltrált frakcióiból, amelyeket TGFβ nélkül vagy jelenlétében tenyésztettünk 16 órán keresztül. A TGFβ a Bak oligomerizációját indukálta, de a Bax-ét (csillagok) nem. (G) Az antiapoptotikus fehérjéket kódoló RNS-ek relatív szintje VAp Δ/Δ organoidokban. (H-I) Az elpusztult VAp Δ/Δ organoidok százalékos aránya, valamint pro- és aktív kaszpáz-3 immunoblot 48 órával az

ABT-263 vagy ABT-737 kezelés után. (J) Reprezentatív képek és az áramlási citometriás adatok kvantitatív elemzése a kezeletlen, ABT-263-mal vagy ABT-737-tel kezelt (1 μM 48 órán át) V $\text{Apc}\Delta/\Delta$ organoidokban. (K) Az adott fehérjék immunoblot vizsgálata négy betegből (Pt1–4) származó humán CRC organoid mintákban, TGF β -val (3 ng/ml) vagy anélkül tenyésztve 48 órán keresztül. (L) Aktív kaszpáz-3 immunoblot humán CRC organoidokban 48 órával az ABT-263 (10 μM) (+) vagy DMSO oldószer kontroll (-) kezelés után. (M) Az aktív kaszpáz-3+ sejtek százalékos aránya humán CRC organoidokban ABT-263 vagy TGF β kezelés után (áramlási citometria).

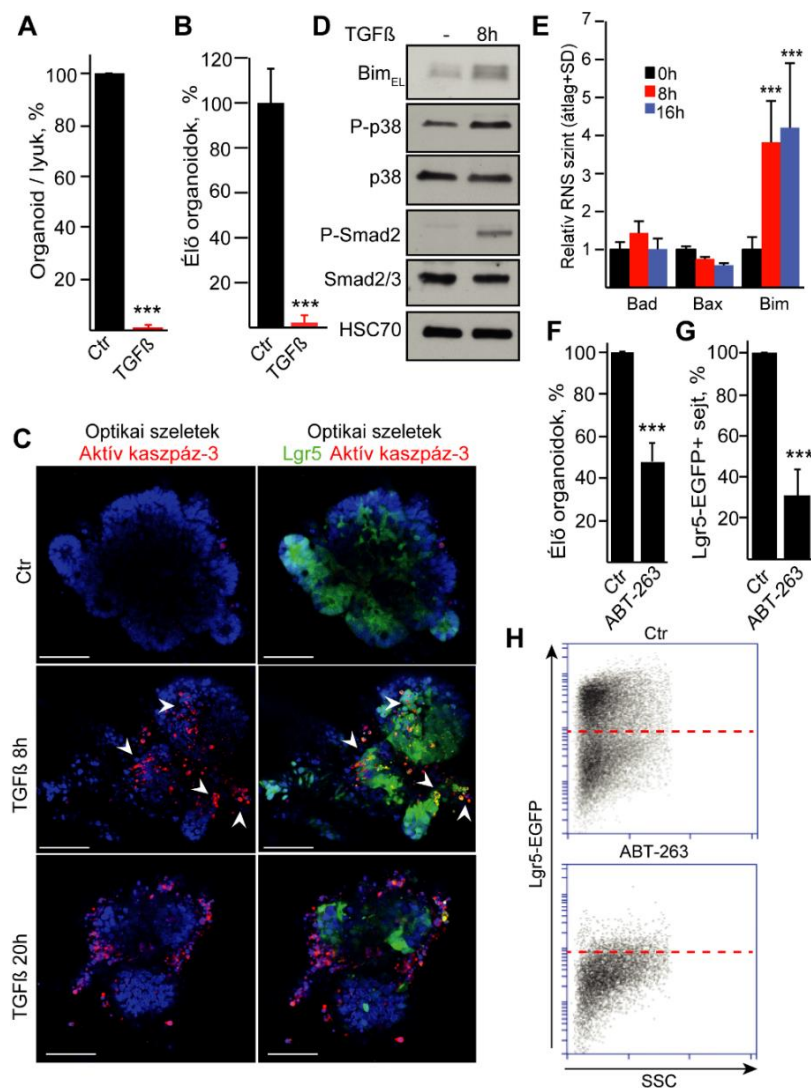
A Bim antiapoptotikus fehérjékhez kötődik, mint például a Bcl2, Bclx és Mcl1, mely által a Bax és/vagy Bak fehérjék felszabadulhatnak a gátlás alól, és aktiválódhatnak [95]. A Bax és/vagy Bak aktiválása oligomerizációt és pórusképződést eredményez a mitokondriális külső membránban, ami a citokróm c citoplazmába történő felszabadulásához, a kaszpáz kaszkád aktiválásához, végül apoptózis indukálásához vezet. TGF β hozzáadása után a Bak oligomerizációját figyeltük meg, míg a Bax esetében nem volt változás (20G. ábra). Ezen túlmenően az *Apc* mutáns V $\text{Apc}\Delta/\Delta$ organoidokban a *Bclx*, *Bcl2* és *Bclw* túlélést elősegítő gének magas RNS szintjét mutattuk ki, az *Mcl1* expressziója azonban alacsony volt (20H. ábra). A Bim hatásának utánzására ezután az ABT-263 és ABT-737 BH3 mimetikumokat alkalmaztuk, amelyekről ismert, hogy a Bclw-hez, Bclx-hez és Bcl2-höz kötődnek, az Mcl1-hez viszont nem kapcsolódnak, és a Bax és Bak felszabadulását, majd apoptózist eredményeznek. [96]. Mindkét BH3-utánzó vegyület növelte az elpusztult organoidok arányát, az aktív kaszpáz-3 szintjét, valamint az aktív kaszpáz-3-mal rendelkező apoptotikus sejtek arányát (20I-J. ábra). Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a TGF β elsősorban a Bim-en keresztül fejt ki apoptotikus hatását a korai béladenómát modellező *Apc* mutáns organoidokban.

A BIM és a BH3-only fehérjék CRC-ben betöltött szerepének vizsgálatára organoid tenyészeteket hoztunk létre késői stádiumú CRC betegekből, ahol a TGF β /SMAD4 útvonal inaktiválódott. Bár a TGF β kezelés nem eredményezte a különböző BIM izoformák (BIM_{EL}, BIM_L, BIM_S) fokozott expresszióját vagy apoptózist ezekben a tenyészetekben (20K, M. ábra), a BH3-utánzó ABT-263 kaszpáz-3 aktivációhoz, ill. az organoidok pusztulásához vezetett (20L-M. ábra). Így BH3 mimetikumok használatával a BIM-hez hasonló hatás váltható ki késői stádiumú CRC klinikai mintákban is.

A TGF β apoptózist indukál az Lgr5+ őssejtekben

Bár számos, a tumoros betegek kezelésére használt gyógyszer hatékonyan elpusztítja a daganatsejteket, sok betegnél a kezelés után a betegség kiújul, ami gyakran a tumor őssejtek viszonylagos gyógyszerrezisztenciájának tulajdonítható. Az a tény, hogy a TGF β kezelés megakadályozta új organoidok képződését V $\text{Apc}\Delta/\Delta$ tenyészetekből (21A. ábra), felveti annak

a lehetőségét, hogy az összejték különlegesen érzékenyek a TGF β által indukált sejthalálra. Ennek a hipotézisnek a tesztelésére LApC organoidokban az Lgr5⁺ sejtekben *Apc* delécióit indukáltunk (LApC Δ/Δ). A TGF β az LApC Δ/Δ organoidokban sejthalált indukált az VApC Δ/Δ organoidokhoz hasonló módon (21B. ábra). Az Lgr5⁺ sejtekben 8 órával a TGF β hozzáadása után az aktív kaszpáz jelenlétét figyeltük meg (21C. ábra, nyílhegyek). 20 órán belül az apoptózis áterjedt az organoidok nagy részére, ami csökkent Lgr5 jelet eredményezett (21C. ábra). A TGF β aktiválta a p38 és Smad jelátviteli útvonalakat, és megemelkedett a Bim expressziója az organoidokban (21D-E. ábra). Ugyanakkor a BH3-mimetikum ABT-263 csökkentette az LApC Δ/Δ organoidok túlélését (21F. ábra), és csökkentette az Lgr5-EGFP⁺ zöld fluoreszcens sejtpopuláció méretét (21G-H. ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a TGF β az apoptózis erőteljes kiváltója az Lgr5⁺ összejtékben is a Bim expresszió indukálásával.

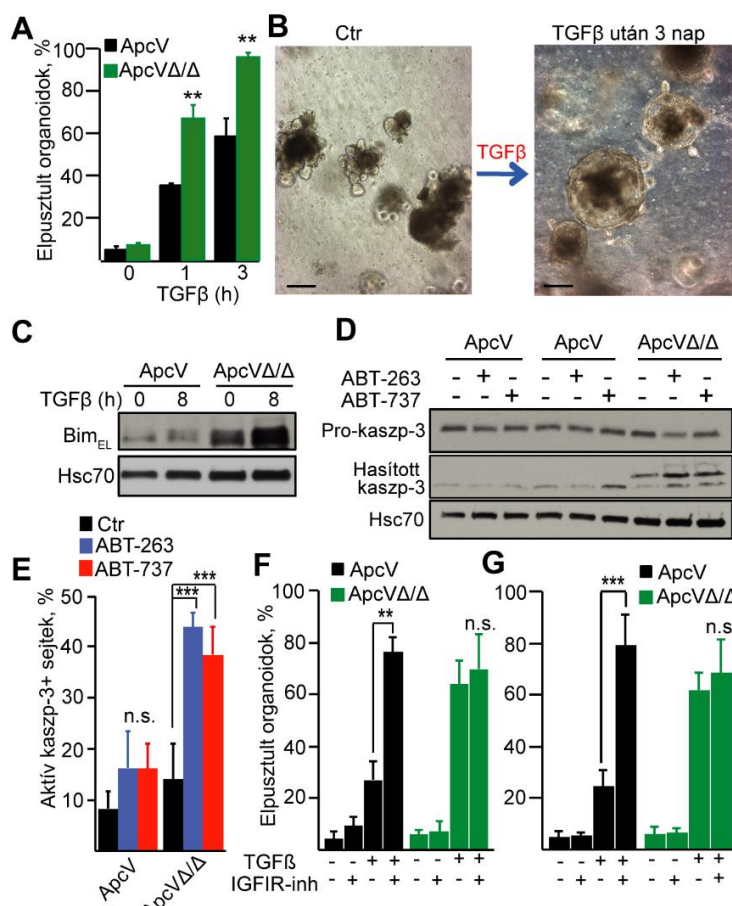


21. ábra. A TGF β az Lgr5⁺ adenoma összejték apoptózisát indukálja. (A) VApC Δ/Δ organoidokból alapított tenyészetek organoid iniciációs gyakorisága 3 ng/mL TGF β jelenlétében vagy hiányában. (B) Az R-Spondin1 hiányában tenyésztett, túlélő LApC Δ/Δ organoidok százalékos aránya. A TGF β -t 48 órán át alkalmaztuk. (C) Aktív kaszpáz-3 immunfestés LApC Δ/Δ organoidokban 11 nappal a 4-OH-Tam

hozzáadása után. Az organoidokat TGFβ jelenlétében vagy hiányában inkubáltuk a jelzett ideig. A nyílhegyek apoptotikus Lgr5+ sejtekben gazdag organoid régiókat jelölnek (méretarány: 50 μm.) (D) A kontroll és a TGFβ-val kezelt LApcΔ/Δ organoidok immunblotja az adott fehérjékre. (E) A TGFβ hatása a Bad, Bax és Bim expressziós szintjére LApcΔ/Δ organoidokban 7 nappal a 4-OH-Tam (RT-qPCR) hozzáadása után. (F) A túlélő LApcΔ/Δ organoidok százalékos aránya 2 és 8 nappal az ABT-263 (1 μM) és a 4-OH-Tam hozzáadása után. (G-H) Az Lgr5-EGFP-pozitív sejtek relatív százalékos aránya és a kontroll és ABT-263-mal kezelt LApcΔ/Δ organoid tenyészetek áramlási citometriás analízisének reprezentatív képei. Az adatokat párosított vagy párosítatlan t-tesztel elemeztük.

Az Apc mutáció növeli a TGFβ által kiváltott sejthalálra való érzékenységet

Annak elemzésére, hogy a daganatképzésben központi Apc mutáció hogyan befolyásolja a TGFβ által kiváltott sejthalált, WT (VApc) és Apc deletált VApcΔ/Δ bélorganoidokat hasonlítottunk össze. Érdekes módon az VApc tenyészetek ellenállóbbnak bizonyultak a TGFβ-val szemben, mint a VApcΔ/Δ organoidok azonos tenyésztési körülmények között (22A-B. ábra). A Bim szint mind a kezeletlen, mind a TGFβ kezelt VApc organoidokban alacsonyabb volt, mint a VApcΔ/Δ organoidokban (22C. ábra), és az VApc organoidok kevésbé voltak érzékenyek a BH3 mimetikumok által kiváltott apoptózisra (22D-E. ábra).



22. ábra. A WT intesztinális organoidok rezisztensebbek a TGFβ által kiváltott apoptózissal szemben, mint az Apc mutáns organoidok. (A) A TGFβ kezelés hatására elpusztult organoidok számának összehasonlítása VApc (WT) és VApcΔ/Δ organoidok esetében teljes (növekedési faktorokat is tartalmazó) tápoldatban tenyésztve. (B) Kezeletlen és TGFβ-kezelt (3 óra) VApc organoidok morfológiája 3 nap után (fáziskontraszt mikroszkóp, skála: 100 μm). (C) A Bim szintje VApc és VApcΔ/Δ organoidokban a jelzett időpontokban TGFβ hozzáadása után. (D-E) A BH3 mimetikumok (1 μM 48 órán keresztül) hatása a prokaspáz-3 és az aktív kaspáz-3 szintjére (D, immunoblot), valamint az aktív-kaspáz-3+ apoptotikus sejtek arányára (E, áramlási citometria). (F-G) Az IGF-I receptor inhibitor NVP-AEW (10 μM) (F) és picropodophyllotoxin (5 μM) (G) hatása a TGFβ által indukált organoid pusztulásra VApc (WT) és VApcΔ/Δ organoidokban, a kezelés után 48 órával elemezve. Az

inhibitorokat 30 perccel a TGFβ előtt adtuk hozzá.

Érdekes módon az inzulinszerű növekedési faktor I (IGF-I) receptor gátlószerének és a TGFβ-nak az együttes alkalmazása növelte a TGFβ által kiváltott organoid pusztulást a WT

tenyészetekben, az Apc deletált organoidokkal ellentétben (22F-G. ábra). Ezzel szemben nem ért el hatást a HGF receptor gátló (PHA665752 vs. oldószer, $p = 0,14$) vagy a fibroblaszt növekedési faktor (FGF) receptor gátló (PD173074 vs. oldószer, $p = 0,69$). Összességében eredményeink azt mutatják, hogy a WT kripták tenyészetei ellenállóbbak a TGF β által kiváltott apoptózissal szemben, mint az Apc mutáns adenómák tenyészetei, és hogy az IGF-I receptor útvonal aktivitása részben magyarázhatja a megfigyelt jobb túlélést.

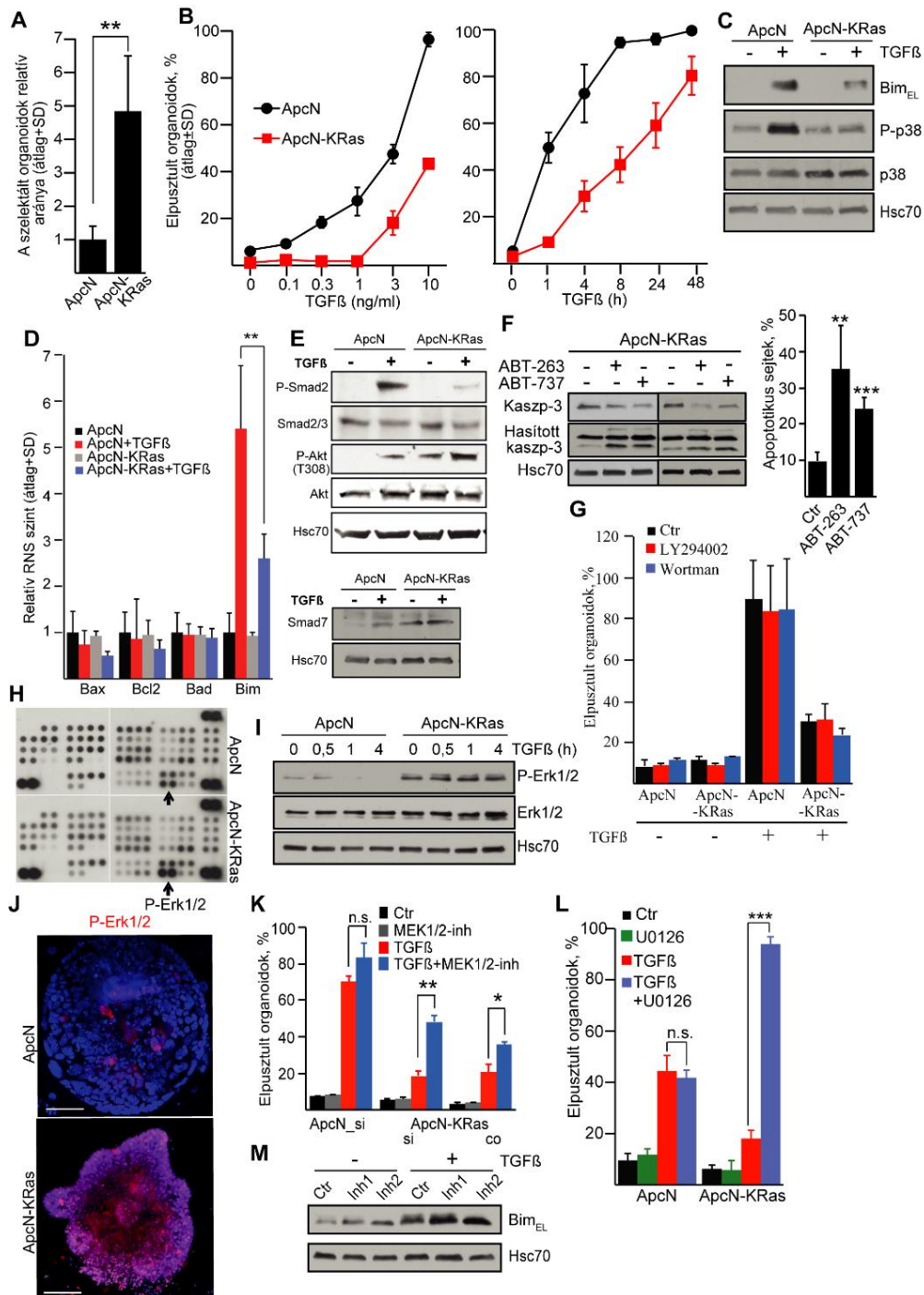
A mutáns KRas onkogén jelenléte részleges védelmet ad az Apc mutáns organoidoknak a TGF β által kiváltott sejthalállal szemben

A Vogelstein modell szerint a kezdeti APC vagy a β -katenint kódoló CTNNB1 mutációt gyakran a KRAS gén termékének onkogén aktiválódása követi [12]. A látható daganatok száma jelentősen megnő, ha a mutáns KRas gént bejuttatjuk Apc^{I638N/+} (ApcN) egerekbe, amelyek egyébként csak kevés béldaganattal rendelkeznek [97]. ApcN és ApcN-KRas egerek beléből organoidokat tenyésztettünk olyan körülmények között, amelyek esetében csak az Apc mutáns organoidok maradnak életben. Hasonló számú kiindulási kripta ötször több ApcN-KRas organoidot eredményezett az ApcN organoidokhoz képest 6 nappal az izolálási eljárás után (23A. ábra). Ez magasabb daganatképzési gyakoriságra és/vagy jobb tumorsejt túlélésre utal az ApcN-KRas egerekben.

Bár a VApc Δ/Δ és ApcN tenyészetek nem különböztek a TGF β -ra való érzékenységükben (19H. ábra), az ApcN-KRas organoidok késleltetett apoptózis indukciót, valamint csökkent Bim kifejeződést mutattak TGF β kezelés után az ApcN-hez képest (23B-D. ábra). Az ApcN-KRas organoid tenyészetek szintén csökkent p38 és Smad2 foszforilációt mutattak (23C. ábra és 23E. ábra), és megnövekedett a TGF β jelátviteli útvonalat negatívan szabályozó Smad7 [98] expressziója (23E. ábra). Az ApcN-KRas organoidok megőrizték azonban érzékenységüket az ABT-263 és ABT-737 BH3-mimetikumokkal szemben (23F. ábra).

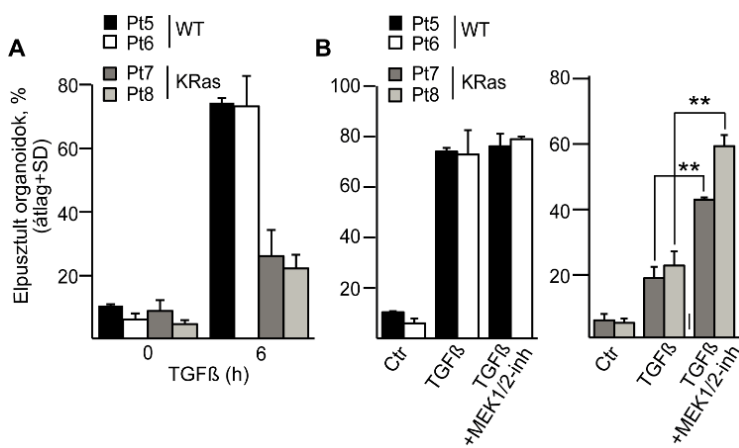
A KRas által indukált jelátviteli útvonalak tanulmányozásához az Akt protein kináz és az extracelluláris szignál által szabályozott kináz (Erk) 1/2 foszforilációját vizsgáltuk ApcN és ApcN-KRas organoidokban. Várakozásainknak megfelelően a KRas onkogén növelte az Akt aktiváló foszforilációját (23E. ábra), de az útvonalban felfelé található foszfoinozítid-3 kináz (PI3K) inhibitorai nem szüntették meg a KRas által kiváltott rezisztenciát (23G. ábra). Az ApcN-KRas organoidokban az Erk1/2 is erős foszforiláltságot mutatott, míg az ApcN-tenyészetekben sokkal gyengébb volt ez a jel (23H-J. ábra). Annak elemzésére, hogy az Erk1/2 foszforilálása szerepet játszik-e a KRas onkogén jelenlétében megfigyelhető, a TGF β által

kiváltott apoptózissal szembeni rezisztenciában, két különböző inhibitorot alkalmaztunk az Erk1/2-et foszforiláló mitogén által aktivált protein kináz kináz (MEK) 1/2 gátlására. Mindkettő megnövelte a TGFβ-indukált sejthalállal szembeni érzékenységet az ApcN-KRas organoidokban, az ApcN esetében viszont nem tapasztaltunk változást (23K-L. ábra). Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az Erk1/2 aktiválása csökkenti a Bim fehérje szintjét a Bim foszforilációja révén, amit proteasomális lebomlás követ [99]. Érdekes módon mindkét Erk1/2 inhibitor stabilizálta a Bim alapszintjét, és visszaállította a Bim TGFβ által módosított szintjét ApcN-KRas organoidokban (23M. ábra).



23. ábra. A KRas onkogén növeli a TGFβ hatásával szembeni rezisztenciát Apc mutáns organoidokban az Erk1/2 foszforilációja által. (A) A KRas onkogén hatása az R-Spondin1 nélkül szelektált ApcN mutáns organoidok számára azonos számú bélkriptából kiindulva. (B) Az elpusztult ApcN és ApcN-KRas organoidok aránya a TGFβ koncentráció és a kezelés idejének függvényében (4 órás stimuláció különböző dózissal vagy 3 ng/ml különböző időtartamokig), 48 óra után elemezve (n=3). (C) TGFβ-val vagy anélkül 16 órán át inkubált ApcN és ApcN-KRas organoidok Bim és foszfo-p38 immunoblotja. (D) A proapoptotikus és antiapoptotikus gének expressziója ApcN és ApcN-KRas organoidokban TGFβ hiányában vagy jelenlétében (3 ng/ml 8 órán keresztül, RT-qPCR). (E) Akt, foszfo-Akt (T308), Smad2/3, foszfo-Smad2 és Smad7 szintek az ApcN és ApcN-KRas organoidokban 16 órával a TGFβ hozzáadása után. (F) A BH3-mimetikumok (1 μM) hatása az aktív kaszpáz-3-ra ApcN-KRas organoidokban. Immunblot (balra) vagy áramlási citometriás (jobbra) elemzés. (G) A PI3K-gátló LY294002 (10 μM) ill. wortmannin (5 μM) hatása az ApcN és ApcN-KRas organoidok apoptózisára TGFβ jelenlétében vagy hiányában. Az inhibitorokat 1 órával a TGFβ előtt alkalmaztuk, és az eredményeket 48 óra múlva elemeztük. (H) Foszfoproteinek elemzése protein array-vel, a foszfo-Erk1/2 jel kiemelésével. (I) Foszfo-Erk1/2 és Erk1/2 immunoblot. (J) A foszfo-Erk1/2 immunfluoreszcencia konfokális képei ApcN-KRas és ApcN organoidokban (skála: 50 μm.) (K) ApcN-KRas vékonybél (si) és vastagbél (co) organoidok esetében a TGFβ (4 óra) által kiváltott organoid pusztulást a MEK1/2 inhibitor (PD98059, 20 μM) fokozta, míg ApcN esetében nem volt hatása. (L) A MEK1/2 inhibitor U0126 (20 μM) hatása a TGFβ által kiváltott (1 óra) apoptózisra az ApcN és ApcN-KRas organoid tenyészetekben 48 óra után. (M) A PD98059 (20 μM, Inh1) és U0126 (20 μM, Inh2) MEK1/2 inhibitorok hatása a Bim szintre ApcN-KRas organoidokban (TGFβ 1 óra, majd elemzés 16 óra múlva).

Eredményeink jelentőségének további igazolása céljából kolorektális adenóma betegek tumorszöveteiből organoidokat tenyésztettünk R-Spondin1 hiányában. A *KRAS* mutáns daganatokból származó organoidok lényegesen jobban ellenálltak a TGFβ által kiváltott apoptózisnak, mint a *KRAS* mutációt nem tartalmazó daganatokból származó organoidok, ami jól egyezik az egérmodell rendszerben tapasztalt megfigyeléseinkkel (24A. ábra). Ezen kívül az onkogén *KRAS* által kiváltott rezisztenciát csökkentették az ERK1/2 foszforilációt gátlók, míg a MEK1/2 inhibitor nem volt hatással a TGFβ által kiváltott apoptózisra a *KRAS* onkogén hiányában (24B. ábra). Adataink tehát azt mutatják, hogy a *KRAS* onkogén részben gátolja az alacsony dózisu TGFβ által kiváltott apoptózist az ERK1/2 útvonal aktiválásával és a BIM expressziójának gátlásával a CRC adenóma fázisában.

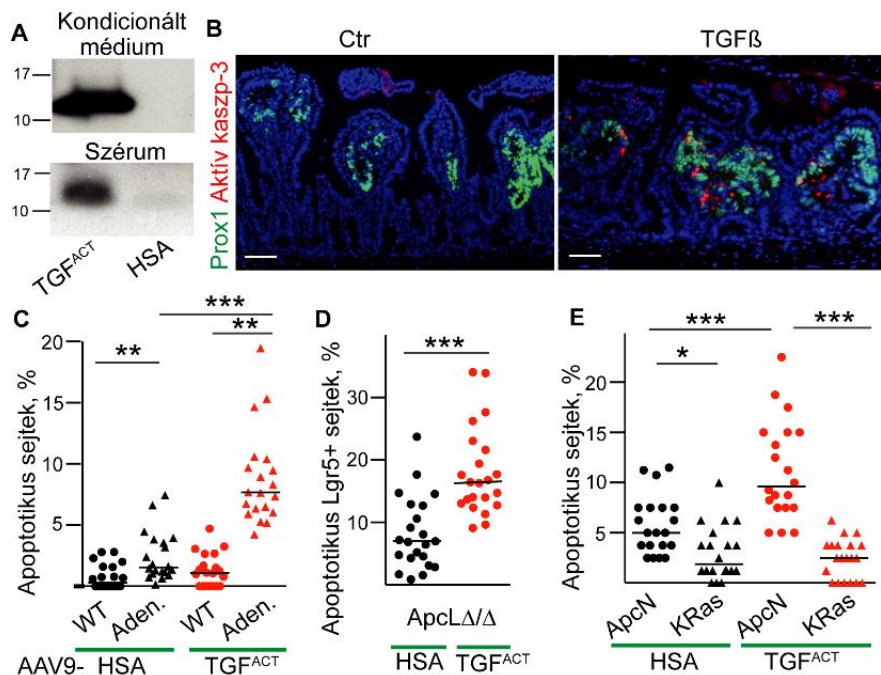


24. ábra. A KRAS onkogén növeli a TGFβ hatásával szembeni rezisztenciát humán adenóma/CRC organoidokban foszfo-ERK1/2 révén. (A) A TGFβ által kiváltott organoid pusztulás összehasonlítása (Pt5-7: adenóma, Pt8: karcinoma beteg). (B) A MEK1/2 kináz inhibitor PD98059 hatása a KRAS mutáns humán organoidok érzékenységére a TGFβ által kiváltott organoid pusztulással szemben

Az Apc és KRas mutációk módosítják az adenómasejtek TGFβ érzékenységét in vivo

Eredményeink *in vivo* jelentőségének megerősítésére az egér TGFβ1 aktív formáját (TGF^{ACT}) [100, 101] adeno-asszociált vírus 9-es típusú (AAV9) vektorba klónoztuk. A vektor által kódolt fehérje expresszióját a transzdukált sejtek felülúszójából történő immunprecipitációval igazoltuk (25A. ábra). Ezután LApc egerekben *Apc* delécióit indukáltunk tamoxifen injekcióval (LApcΔ/Δ), majd 21 nap múlva, amikor az egerekben már láthatók az adenómák, az állatokat AAV9-TGF^{ACT}-tal vagy a humán szérumalbumint (HSA) kódoló AAV9 kontrollal injektáltuk. Az AAV9-TGF^{ACT}-tal injektált egerek szérumából származó TGFβ immunprecipitátumokban kimutatható volt egy olyan sáv, mely a TGF^{ACT}-nak felelt meg az injekció utáni 5. napon. Ezt a jelet az AAV9-HSA-val injektált egereknél nem tudtuk megfigyelni (25A. ábra).

Az aktív kaszpáz-3 immunfestése azt mutatta, hogy az injekció beadása után 5 nappal a TGF^{ACT} megnövelte az apoptotikus sejtek arányát a Prox1 által detektált adenómákban, míg a WT bélkriptákra nem volt szignifikáns hatása (25B-C. ábra). Az apoptotikus Lgr5+ adenóma sejtek arányának jelentős növekedését is megfigyeltük TGF^{ACT} jelenlétében (25D. ábra). Ezen kívül azt találtuk, hogy míg a TGFβ az ApcN-ben fokozta az apoptózist, az ApcN-KRas adenómákban nem volt hatása (25E. ábra).



25. ábra. A bélhám TGFβ hatásra való érzékenységét az *Apc* és *KRas* mutációk *in vivo* is szabályozzák. (A) Az aktív TGFβ immunprecipitációs analízise 293T sejtenyészetek felülúszójában és tamoxifennel, valamint AAV9-HSA-val vagy AAV9-TGF^{ACT}-tal injektált LApcΔ/Δ egerek szérumában. (B és C) LApcΔ/Δ belek Prox1 és aktív kaszpáz-3 immunfestése és kvantifikációja. (D) Az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus Lgr5+ sejtek mennyiségi meghatározása LApcΔ/Δ belekben. (E) 20 adenóma régióban az apoptotikus sejtek mennyiségi meghatározása ApcN és ApcN-KRas egerekben 5

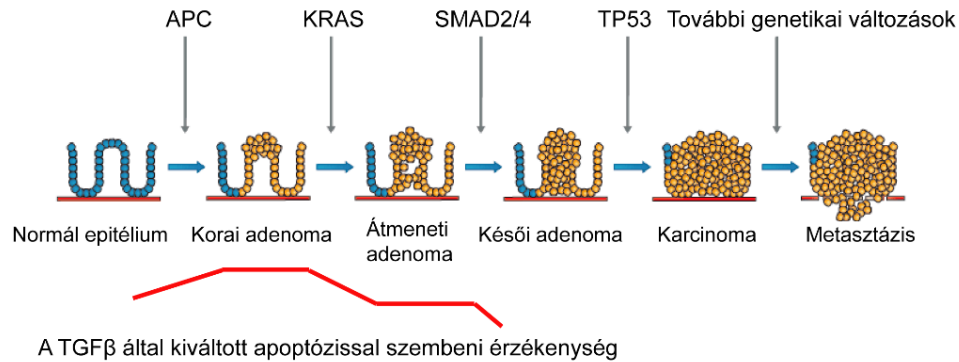
nappal az AAV9-HSA vagy AAV9-TGF^{ACT} injekció után. Kruskal–Wallis vagy Mann–Whitney U-tesztek (C–E). Méretarány: 50 μ m.

Megbeszélés: egér és humán 3D bélorganoid tenyészetekkel és transzgenikus *in vivo* modellekkel tehát megmutattuk, hogy a TGF β apoptózist indukál a BH3-only Bim fehérje által bél adenóma sejtekben, beleértve az Lgr5+ őssejteket is. Eredményeink arra utalnak, hogy a daganatképzés kezdeti stádiumára jellemző *Apc* mutáció növeli a TGF β által kiváltott sejthalálra való érzékenységet, míg a progresszióban fontos *KRas* mutáció növeli a sejthalállal szembeni rezisztenciát *in vitro* és *in vivo*, mely eredményt később egy másik kutatócsoport is megerősítette [40]. A TGF β által kiváltott apoptózissal szembeni rezisztencia ellenére azonban a *KRas* mutáns organoidok még mindig érzékenyek voltak a BH3 mimetikumokra, aminek klinikai jelentősége lehet. Eredményeink összhangban vannak azzal a ténnyel, hogy a sztrómasejtekből származó TGF β csak a betegség későbbi szakaszaiban segíti elő a CRC progresszióját egy mezenchima függő mechanizmuson keresztül [36]. Adataink megerősítik továbbá azt a modellt, hogy a tumor progresszió fokozatosan átalakítja a proapoptotikus TGF β jeleket olyan mechanizmusokká, amelyek elősegítik a tumor növekedését és metasztázisát [102]. A TGF β /BMP/SMAD útvonal lényeges elemei gyakran mutáltak CRC betegekben, ami szelekciós nyomást jelez ennek a jelátviteli rendszernek a genetikai inaktiválására a tumorsejtekben [103, 104]. Ezzel összhangban a *Smad4* genetikai inaktiválása *Apc* mutáns háttérben fokozza a daganatképződést és elősegíti a rosszindulatú daganat fenotípust [105].

A TGF β -ra adott sejtválaszok sejttípustól és kontextustól függenek, és a TGF β sokféle útvonalat használhat az apoptózishoz [94]. Eredményeink szerint a Bim, a mitokondriális Bcl2 fehérjecsald proapoptotikus, csak BH3-at tartalmazó tagja, a TGF β által kiváltott apoptózis kritikus molekulája béladenóma sejtekben. A tumorsejtek apoptózisa érzékeny a Bim fehérjeszint változásaira, és ismert, hogy a különböző tirozin kináz gátlók (TKI-k) közvetíthetik az apoptózist a Bim fokozása révén [106-108]. Ezenkívül az alacsony Bim szintek összefüggésbe hozhatók a TKI-rezisztenciával [109, 110]. A csak BH3-at tartalmazó fehérjék hatását utánzó gyógyszerekről kimutatták, hogy apoptózist indukálnak különböző tumormodellekben [111]. Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy nem csak a korai bél adenómát modellező *Apc* mutáns organoidok nagyon érzékenyek a BH3 mimetikumokra, hanem késői CRC sejtek is, melyekben a TGF β már nem vált ki apoptózist.

Érdekes módon azt találtuk, hogy a TGF β egyik fontos célcsoportja az Lgr5+ adenómasejt populáció. Ez azt jelzi, hogy a TGF β az adenóma őssejteket is megcélozza, amelyek elősegítik a daganatképződést, és a rákterápiák elsődleges célpontját képezik. Eredményünk, amely

szerint a TGF β apoptózist indukálhat a adenóma őssejtekben, különösen érdekes, mivel a rákos őssejtek rezisztenciája számos, a klinikákon használt citotoxikus szerrel szemben is kimutatható [41]. Vizsgálataink tehát azt mutatták, hogy mind a WT intesztinális kripták, mind a *KRAS* mutációt hordozó adenómasejtek jobban ellenállnak a TGF β által kiváltott sejthalálnak, mint az *Apc* mutáns adenómák, valamint az *Lgr5*⁺ őssejtek is a TGF β célpontjai *in vivo* (26. ábra).



26. ábra. Az onkogén mutációk módosítják az intesztinális tumorsejtek TGF β -val szembeni érzékenységét

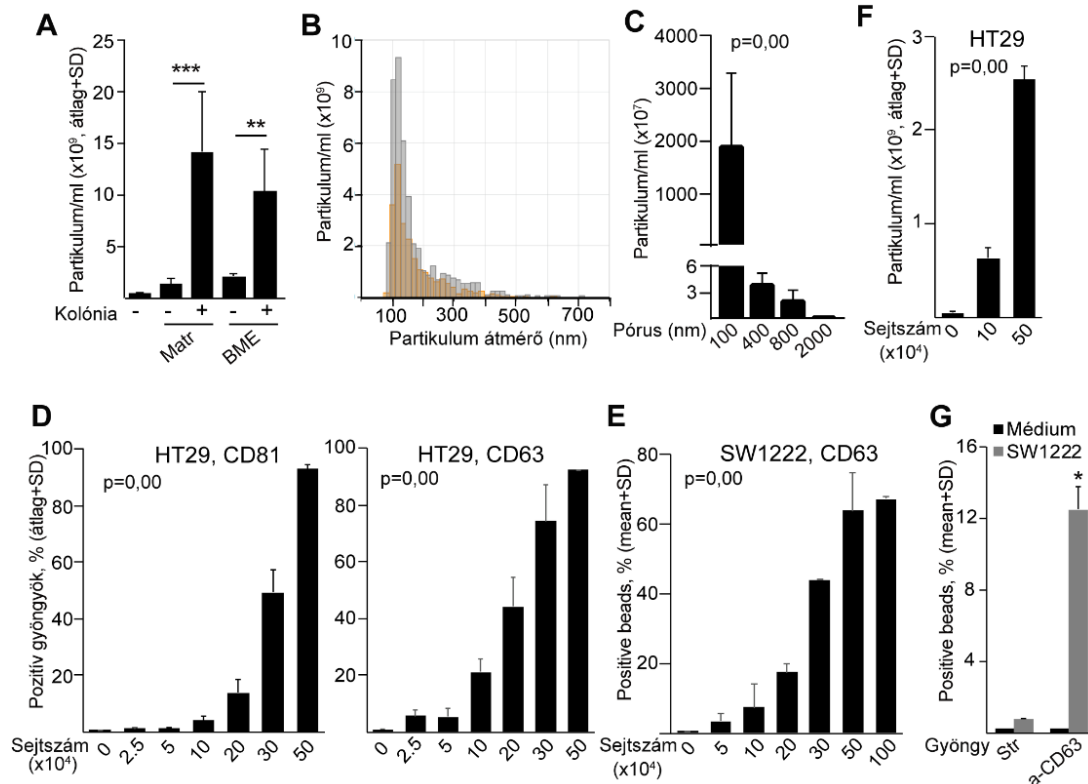
5.3 Az EV-k szekréciója az *Apc* mutáció által aktivált Wnt útvonal és más CRC progressziós faktorok befolyásoló hatása alatt áll (VI)

Mivel az EV-k nagy mennyiségben lehetnek jelen a testnedvekben, ígéretes eszközt jelenthetnek a tumorok korai diagnosztizálásában. Ez a feltételezés azon a tényen alapul, hogy a tumorsejtek a normál sejtekhez képest több EV-t bocsátanak ki [9], és a rákos sejtekből származó EV-k cargo-ja tumorspecifikus molekulákat hordoz membránnal körülvett, védett környezetben. Az EV termelés és azok molekuláris összetétele azonban nagymértékben függ a tenyésztési körülményektől, az izolálási módszerektől és a mindkét paramétert kritikusan befolyásoló külső tényezőktől [10]. Az EV-kre fókuszáló munkák többsége korábban hagyományos 2D sejtenyészeteket használt CRC-ben és PDAC-ben. Sajnos a hosszú ideig tenyésztett klasszikus 2D tumorsejtvonalak rákos betegek szelektált sejtpopulációjából származnak. Így az EV vizsgálatokhoz olyan modellrendszerre van szükség, amely jobban reprezentálja a daganatok *in vivo* tulajdonságait. Ezen túlmenően a sikeres EV alapú diagnosztika nagyban függ a daganatból származó EV-k mennyiségétől a testfolyadékokban. Következő lépésként tehát 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.

A CRC organoidok által kibocsátott EV-k kimutathatók 3D tenyészetek kondicionált médiumában

Az SW1222 CRC sejtvonal 3D mátrixban lumentartalmú komplex megakolóniákat is képez, amelyek differenciálatlan és differenciálódott rákos sejteket egyaránt tartalmaznak [79, 80]. Az EV detektáláshoz szükséges 3D tenyészetek beállításához kétféle 3D extracelluláris mátrixot (ECM) használtunk: bazális membrán kivonatot (BME), valamint Matrigel-t. A különböző méretű partikulumok kimutatására alkalmas tunable resistive pulse sensing (TRPS) mérések azt mutatták, hogy mind a BME mind pedig a Matrigel esetében a háttér partikulumszám elhanyagolható ahhoz képest, amikor a 3D mátrix kolóniákat is tartalmazott (27A-B. ábra). Ezen kívül az SW1222 kolóniák felülúszójában a kisebb méretű partikulumok magasabb koncentrációját figyeltük meg a nagyobbakhoz képest (27C. ábra).

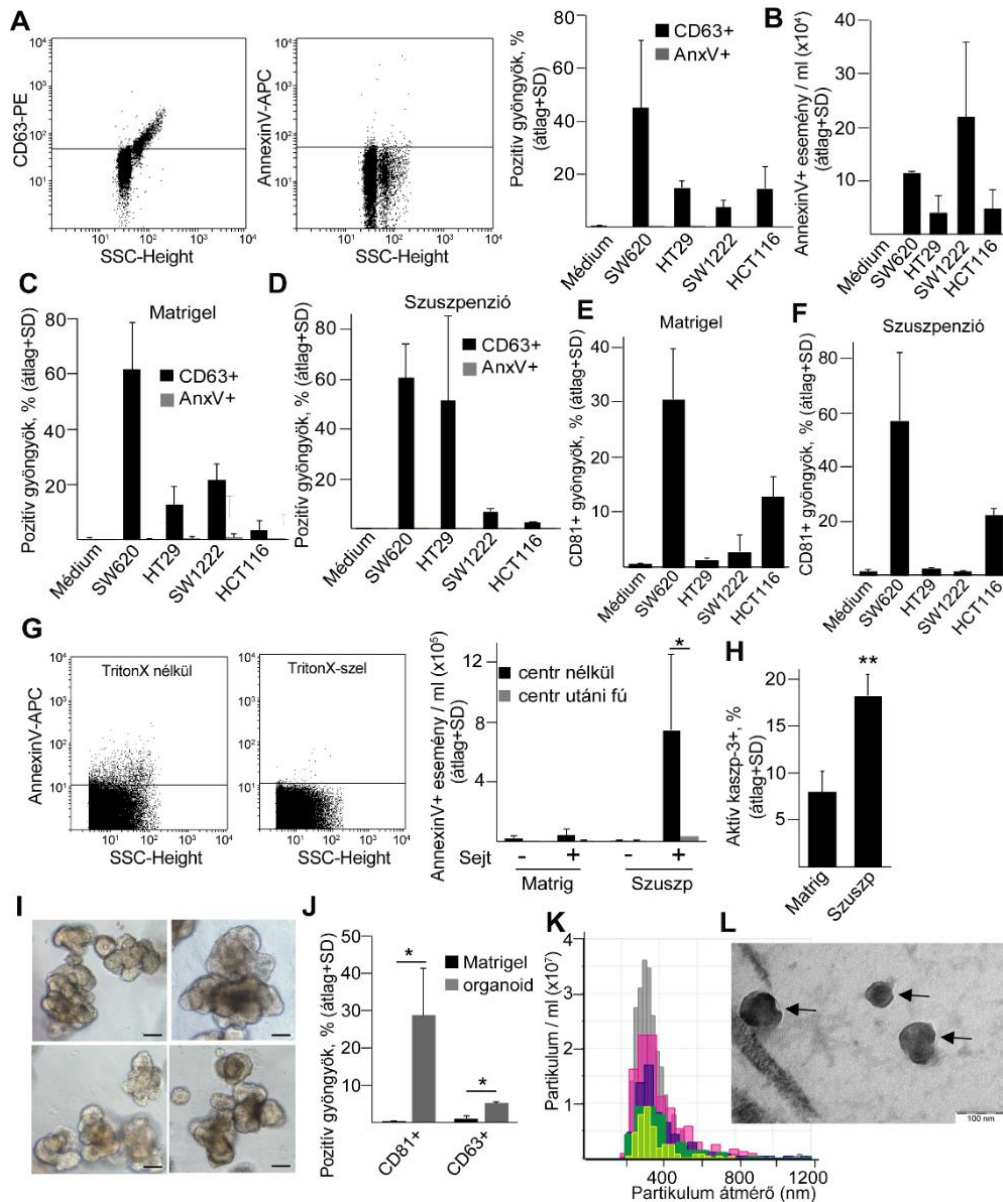
A sejtenyészetek felülúszójából származó EV-k azonosítására és értékelésére anti-CD63-mal vagy anti-CD81-gyel bevont mágneses gyöngyöket használtunk, és fluoreszcensen jelölt anti-CD63 vagy anti-CD81 antitestekkel és áramlási citometriával detektáltuk az EV-eket. A CD63 és a CD81 a kisebb EV-k markereinek tekinthetők, a plazmamembránról lefűződő nagyobb EV-eket pedig általában Annexin V-tel lehet megjelölni. Korábbi tanulmányokkal összeesengve [112] korrelációt figyeltünk meg a sejtszám és a pozitív gyöngyök százalékos aránya között két sejtvonalban is (27D-E. ábra), továbbá a sejtszám és a partikulumszám között is (27F. ábra), ami azt mutatja, hogy a gyöngy alapú módszer használható az EV-k szemikvantitatív mérésére. Mivel a sejtszám és a pozitív gyöngyök közötti korreláció csak egy adott sejtszám-küszöbérték felett volt érvényes, hasonló sejtszámokat használtunk valamennyi további összehasonlításunkban, és az összes eredményt sejtszámra normalizáltuk. Továbbá csak akkor fogadtuk el a kísérleti eredményeket valósnak, ha nem a legalacsonyabb százalékban pozitív gyöngyöket tartalmazó mintában volt a sejtszám legalacsonyabb a minták közül. Érdekes módon az SW1222 sejtek által kibocsátott EV-k csak az anti-CD63-mal bevont gyöngyökhöz kötődtek, a streptavidin által fedett kontroll gyöngyökhöz nem, mely igazolja a beállított rendszer specifitását (27G. ábra).



27. ábra. 3D tenyészetekből származó EV-k kimutatása. (A) Matrigel-ből vagy BME-mátrixból, azonos számú SW1222 sejttel vagy anélkül indított tenyészetekből származó kondicionált médium partikulumszáma. A kolóniákat 12 napig tenyésztettük, majd a tápközeg cseréje után 48 óra múlva mintát vettünk (TRPS, 100 nm pórusméretű membrán, $n=3$, párosított t-teszt). (B) Az EV-k méreteloszlása az SW1222 kolóniákból származó felülúszóban Matrigelben (szürke) vagy BME-ben (narancssárga). (C) Különböző pórusméretű NanoPore membránokkal mért partikulumkoncentrációk (TRPS, $n=4$, ANOVA). A Matrigel sejtmentes kontroll háttér partikulumszámát kivontuk a minták értékéből. (D-E) A pozitív gyöngyök százalékos aránya növekvő sejtszámú 2D HT29 (D) vagy SW1222 (E) tenyészetekben (áramlási citometria, $n=2-3$, ANOVA). Mivel az SW1222 tenyészetek esetében a CD81+ gyöngyök aránya még magas sejtszám (1×10^6 sejt) mellett is 5% alatt volt, csak az anti-CD63 bevonatú gyöngyök eredményeit használtuk. (F) Partikulumkoncentráció különböző sejtszámoknál HT29 sejttenyészetekben (TRPS, 400 nm pórusméret, $n=3$, ANOVA). (G) Az anti-CD63-mal vagy streptavidinnel (Str, kontroll) bevont és anti-CD63-mal kimutatott pozitív gyöngyök százalékos aránya. A gyöngyöket 3D tenyészet kondicionált médiumában (SW1222), vagy sejt nélküli Matrigel felülúszóban (médium) inkubáltuk (áramlási citometria, $n=3$, t-teszt). Minden kísérletben 400 μ l felülúszót használtunk a jelzett sejtszámból az EV-k kimutatására.

Ezután más CRC sejtvonalakat is felhasználtunk. A 2D tenyészetekben CD63+/Annexin V- EV-eket detektáltunk gyöngyalapú módszerrel, valamint Annexin V+ nagy EV-eket is ki tudtunk mutatni áramlási citometriával az összes sejtvonalban (28A-B. ábra). Hasonlóképpen, a Matrigelben lévő 3D kolóniák, illetve a 3D mátrixból eltávolított és szuszpenziós körülmények között tovább tenyésztett kolóniák is termeltek CD63+/Annexin V- EV-eket (28C-D. ábra). Ezzel párhuzamosan CD81+ EV-eket is detektáltunk (28E-F. ábra). Érdekes módon azonban a nagyobb méretű, Annexin V+ EV-k nagyobb mennyiségben voltak jelen a szuszpenziós tenyészetekben, mint a 3D mátrixban növesztett kolóniákról származó kondicionált médiumban

(28G. ábra). Ezekben a kísérletekben az Annexin V+ EV-k érzékenyek voltak Triton X-100-zal való lízisre egy korábban publikált, áramlási citometrián alapuló módszerrel [112]. Összefoglalva eredményeink arra utalnak, hogy a nagyobb EV-k jelentősen magasabb szinten mutathatók ki szuszpenziós kolóniák esetében, mint 3D Matrigel tenyészetekben. A szuszpenziós tenyésztési körülmény azonban az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek számának növekedését is eredményezte (28H. ábra), ami azt mutatja, hogy a szuszpenziós állapot nem optimális a kolóniák számára.



28. ábra. Az EV-k kimutatása CRC organoidokból. (A) A jelzett sejtvonalak sejtjeit 2D-ben tenyésztettük, az EV-eket anti-CD63-mal bevont gyöngyökkel izoláltuk, majd anti-CD63-mal vagy annexin V-tel detektáltuk, és a pozitív gyöngyök százalékos arányát áramlási citometriával mértük. A bal és a középső panelen az SW1222 sejtekből származó reprezentatív áramlási citometrikus mérések láthatók. Jobb oldali panel: az áramlási citometria eredményeinek számszerűsítése. (B) Az annexin V+ események kimutatása az EV kapuban 2D tenyészet felülúszójából. A legnagyobb, apoptotikus testeket tartalmazó EV-eket a mérés előtt centrifugálással távolítottuk el. Ezekben a kísérletekben az EV-

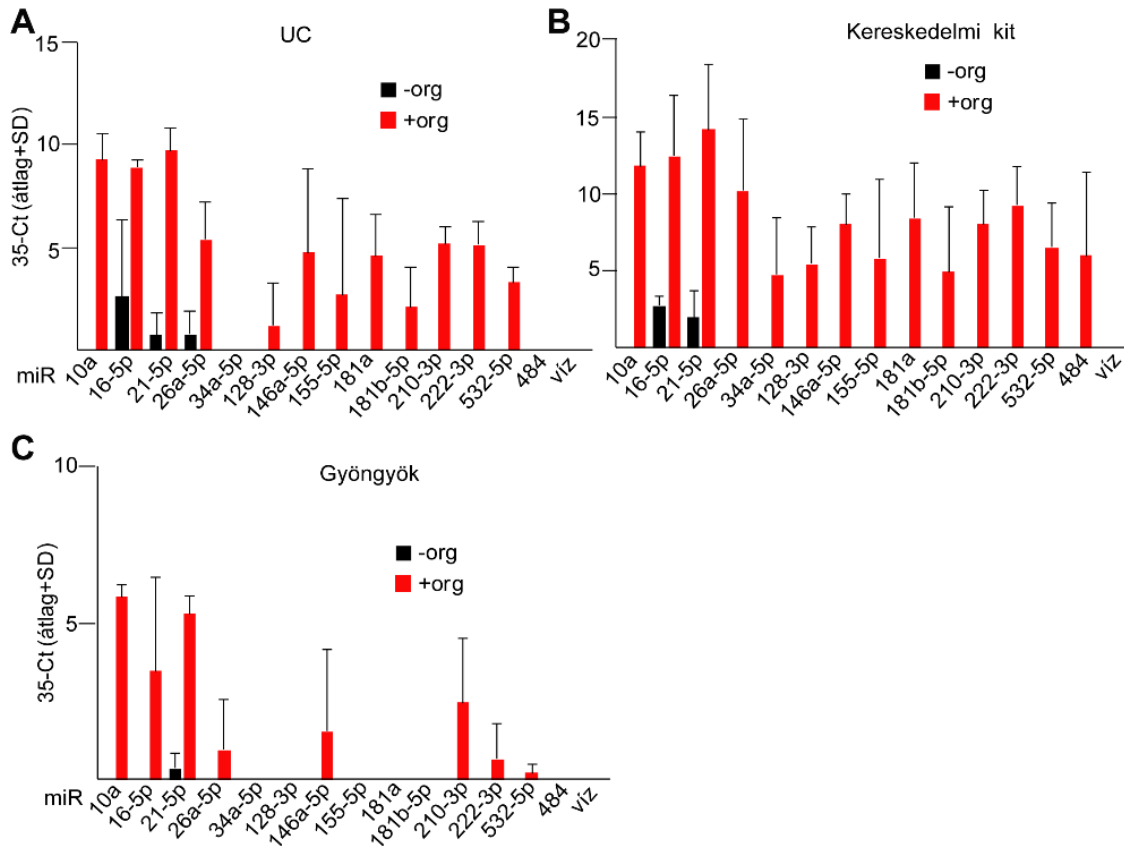
ket közvetlenül áramlási citometriával mértük. (C-D) A pozitív gyöngyök százalékos aránya Matrigelben 3D tenyésztett, különböző CRC sejtvonalakból származó kolóniák felülúszójából (C), vagy 48 órás szuszpenziós tenyésztés után (D). (E-F) A Matrigel tenyészetek (E) vagy szuszpenziós tenyészetek (F) felülúszójában inkubált CD81+ gyöngyök százalékos aránya. Az adatokat 500 000 sejtre normalizáltuk (áramlási citometria, n=3). (G) Az Annexin V+ események száma az SW1222 sejtek kondicionált felülúszójában, amelyek 3D tenyészetekből vagy szuszpenzióban tartott kolóniákból származnak Matrigelből való eltávolítás után (áramlási citometria). Bal oldali és középső panel: reprezentatív áramlási citometriás mérések szuszpenziós tenyészetekből. Az Annexin V + események meghatározása Triton X-100 hozzáadása előtt és után történt, mely az EV-eket lizálja. Jobb oldali panel: a minták mennyiségi meghatározása sejtek jelenlétében vagy anélkül, valamint 12 500 g-vel 20 percig való centrifugálás előtt vagy után. Az EV-k nem mutathatók ki a felülúszóból centrifugálás után (n = 3, t-teszt). (H) Az aktív kaszpáz-3 események százalékos aránya SW1222 sejtek különböző tenyésztési körülményei között (áramlási citometria, n=3-5, t-teszt). A pozitív gyöngyök százalékos arányát sejt számra normalizáltuk. (I) A CRC betegekből származó organoidok morfológiája (skála: 50 µm). (J) Az EV-t megkötött, anti-CD81 vagy anti-CD63 bevonatú gyöngyök százalékos aránya. Az EV-eket a gyöngyök felszínén anti-CD81 vagy anti-CD63 ellenanyaggal detektáltuk (áramlási citometria, n=3, t-teszt). A pozitív gyöngyök százalékos arányát 300 000 sejtre normalizáltuk. (K) Méreteloszlás és az EV-k száma organoid tenyészetekből (TRPS 400 nm pórusméretű membránnal). (L) Differenciált ultracentrifugálással izolált CRC organoidok transzmissziós elektronmikroszkópos képe (nyilak).

Kísérleteinkben az összes CRC betegből származó organoid CD63+ és CD81+ EV-t termelt 3D tenyészetekben (28I-J. ábra), és az EV-k jelenlétét az organoid tenyészetek felülúszójában TRPS-sel (28K. ábra) és transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) is megerősítettük (28L. ábra). További kísérleteinkben három CRC beteg eredetű organoid vonalat (CRC1-3) használtunk. Annak vizsgálatára, hogy a CRC organoidok mely útvonalakban tartalmaznak mutációkat, a túlélésüket R-Spondin1 vagy EGF nélkül, illetve nutlin-3 jelenlétében teszteltük (lásd [113, 114]). A nutlin-3 meggátolja a p53-nak az MDM2 ubiquitin ligázhoz való kötődését, így a normál p53-mal rendelkező sejtekben megáll a sejtciklus, majd apoptózison mennek keresztül. Várakozásainknak megfelelően mindegyik organoid vonal növekedést mutatott, amikor a Wnt agonista R-Spondin1 hiányzott, de egyik sem élte túl az EGF hiányát, és nem voltak érzékenyek nutlin-3-ra, mely eredmények megegyeztek a *KRAS* és *TP53* szekvenálási adatokkal (nem mutatott adatok). Így mindhárom organoid tenyészetben a Wnt útvonal aktív, valamint p53 mutánsak, de a *KRAS* útvonalban nem volt eltérés a normálhoz képest.

Az ellenanyaggal fedett gyöngyökkel izolált EV-k esetében figyelhető meg a legkisebb miRNS háttér

Az EV izolálás és a detektált miRNS-ek közötti összefüggés vizsgálatára 14 miRNS-t elemeztünk három különböző módszerrel izolált EV preparátumban. Míg a miR-484-et vagy a miR34a-5p-t csak az egyik kereskedelmi forgalomban lévő EV RNS izolációs módszer mutatta ki, a legtöbb más miRNS jelen volt a differenciált ultracentrifugálással előállított EV preparátumban is, bár eltérő mennyiségben (29A-B. ábra). Érdekes módon antitesttel (anti-

CD63, anti-CD81) bevont gyöngyök használatakor a 14 mért miRNS-ből mindössze 8 miRNS-t tudtunk kimutatni (29C. ábra), és ez az izolálási módszer eredményezte a legalacsonyabb nem specifikus háttérrel. Így az EV izolálási módszer nagymértékben befolyásolja a detektált miRNS profilt.

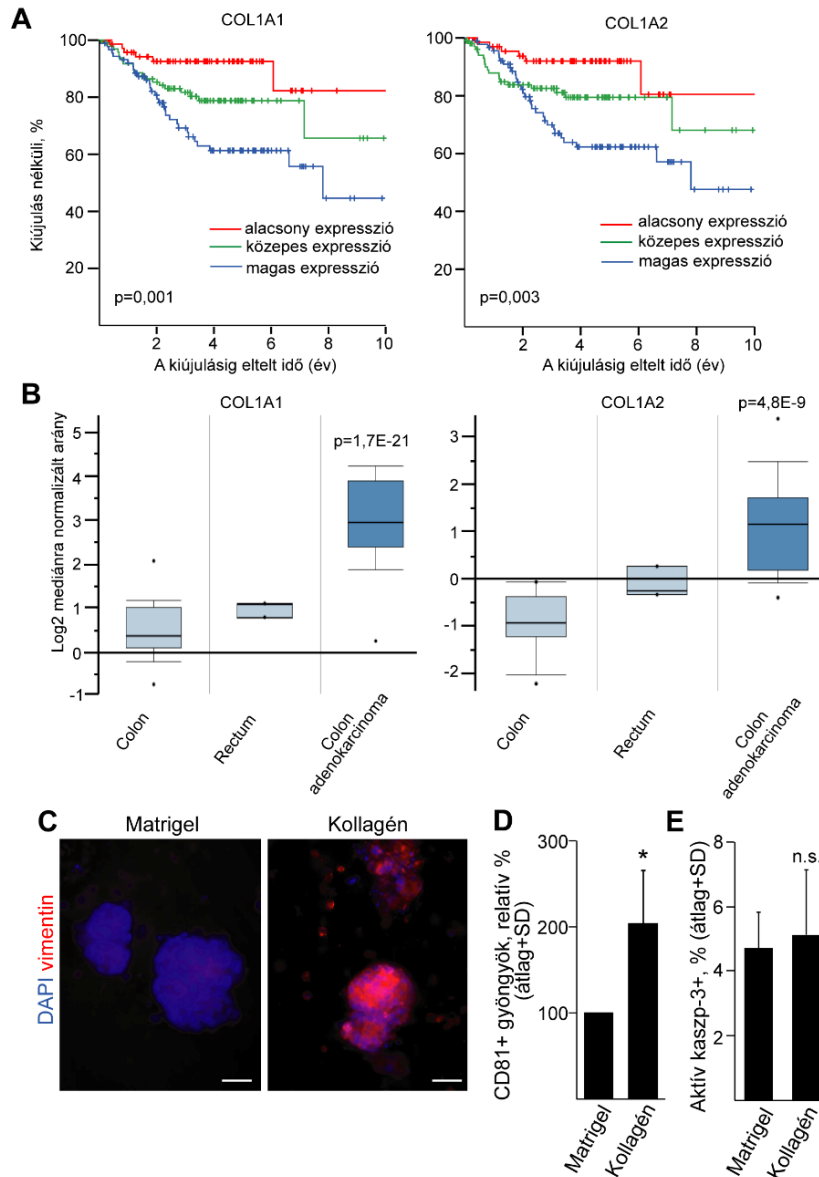


29. ábra. CRC organoid eredetű EV-k miRNS profilozása. (A-C) A jelzett miRNS-ek 35-Ct értékei az EV-k különböző módszerekkel történő izolálása után. UC: differenciált centrifugálás és ultracentrifugálás (A), Kit: ExoRNEasy Serum/Plasma Starter Kit (Qiagen, B), Gyöngy: anti-CD63 bevont gyöngyök (C). Minden esetben azonos sejtszámot és médiumtérfogatot használtunk a kísérletekben (TaqMan assay, n=3).

A kollagén I ECM fehérje hatására nagyobb EV mennyiség mérhető a CRC organoidok kondicionált médiumában

Miután bizonyítottuk, hogy az organoidok által kibocsátott EV-k kimutathatók a 3D tenyészetek kondicionált médiumában, ezt a rendszert kívántuk alkalmazni az EV kibocsátást befolyásoló tényezők azonosítására. Az extracelluláris mátrix (ECM) összetételében bekövetkezett változások, például az I-es típusú kollagén felhalmozódása központi jelentőségű a CRC progressziójában [115], és a kollagén I-et kódoló *COL1A1* és *COL1A2* gének expressziós szintje a betegek csökkent túlélésével erős korrelációt mutat (30A. ábra). A The Cancer Genome Atlas (TCGA) adatsornak az Oncomine adatbázisban való elemzése azt

mutatta, hogy a CRC betegek magasabb *COL1A1* és *COL1A2* szintet mutatnak az egészséges kontrollokhoz képest (30B. ábra).



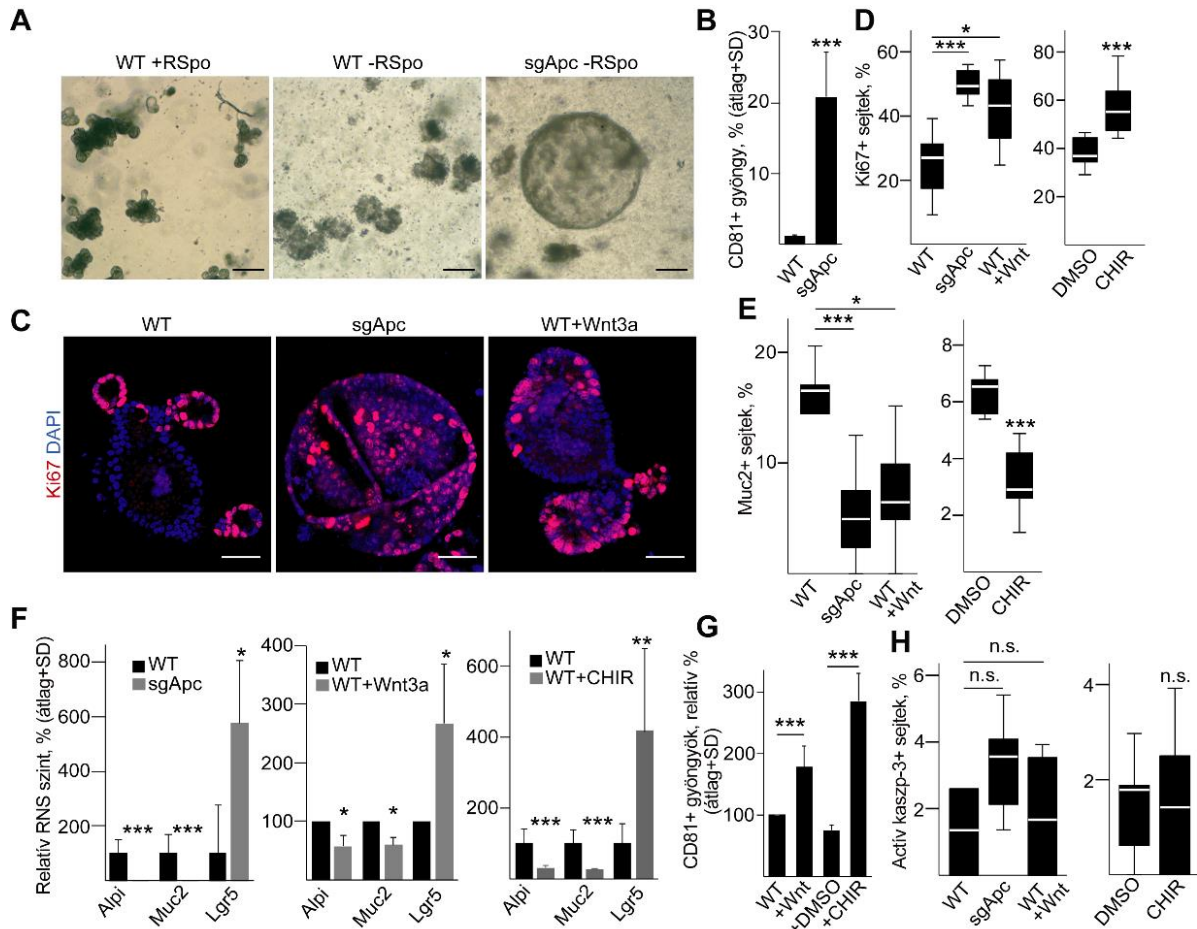
30. ábra. A Matrigel kollagén I-re való kicserélése megnövekedett EV szintet eredményez a CRC organoidok kondicionált médiumában. (A) A jelzett gének Kaplan-Meier túlélési diagramja (alacsony expresszió: z-score normalizált adatok $<-0,5*SD$, magas expressziós csoport: expressziós szint $>0,5*SD$, közepes: $-0,5*SD < z\text{-score normalizált érték} < 0,5*SD$). A log rank tesztből származó p-értéket mutatjuk (a *COL1A1* próba azonosítója: 202311_s_at, a *COL1A2* esetében: 202404_s_at). (B) A jelzett gének normalizált expressziós szintje a TCGA génkészletben (Oncomine adatbázis analízis, www.oncomine.org, A_23_P207521 riporter a *COL1A1* esetében és A_23_P255247 a *COL1A2* esetében). (C) Az egyik CRC organoid vonal vimentin whole-mount immunfestése, Matrigelben vagy kollagénben tenyésztve. (D) A humán CRC organoidok kondicionált médiumában inkubált CD81+ gyöngyök relatív százaléka. Páronkénti kísérleteket végeztünk, és minden kísérletben a sejtszámra normalizált kollagén adatokat összehasonlítottuk a normalizált Matrigel eredetű adatokkal (n=4). A pozitív gyöngyök százalékos aránya az organoidok nélküli Matrigel és kollagéntenyészetekben $<1\%$ volt. (E) Az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek mennyiségi meghatározása CRC organoidokban (konfokális mikroszkópos képek kvantifikálása). Méretarány: 20 μm . Párosított (D) vagy párosítatlan (E) t-tesztet végeztünk.

A betegekből származó CRC organoidok sejtjei inváziót mutattak, amikor kollagén I-ben tenyésztettük őket, és az epiteliális-mezenchimális tranzícióra (EMT) jellemző marker, a vimentin expressziója is ezzel párhuzamosan megemelkedett, valamint magasabb EV szintet tapasztaltunk a tenyésztés utáni 2. napon (30C-D. ábra). Ugyanakkor ebben az időpontban még nem láttunk masszív apoptózist (30E. ábra). Ezek az adatok együttesen azt jelzik, hogy az ECM összetétele kritikus az EV felszabadulás szempontjából a CRC tumorigenezisben.

Az Apc mutáció növeli az EV szekréciót 3D organoidokban

Széles körben elfogadott, hogy az EV szekréció megemelkedik a daganatokban a normál szövetekhez képest. Az azonban még nem ismert, hogy ez különböző mutációknak tulajdonítható-e. Mivel a CRC sejtek a daganatképződés késői szakaszát képviselik, és sokféle mutációt hordoznak, ezért jól meghatározott genetikai háttérrel rendelkező egérmodellt alkalmaztunk. CRISPR-Cas9 segítségével *Apc* mutációt vittünk be vad típusú (WT) intesztinális organoidokba, majd a béldaganatok adenóma stádiumát képviselő *Apc* mutáns organoidokat kisselektáltuk a külső Wnt-agonista R-Spondin1 hiányában (31A. ábra). Érdekes módon a CD81+ EV szekréció masszív növekedését figyeltük meg az *Apc* mutációt követően (31B. ábra).

Az *Apc* mutáció a Wnt útvonalat aktiválja. Annak tesztelésére, hogy a Wnt útvonal aktiválása fokozott EV szekrécióhoz vezethet-e, a WT bélorganoidokat Wnt3a-val vagy a GSK-3 inhibitor CHIR99021-gyel kezeltük, amelyek a Wnt jelátviteli útvonal ismert aktivátorai. Az *Apc* mutációhoz hasonlóan mind a Wnt3a, mind pedig a CHIR99021 a Ki67+ proliferáló sejtek arányának növekedését, valamint a Mucin2+ kehelysejtek százalékos arányának csökkenését eredményezte. Emellett a *Mucin2*, valamint az enterocita marker *Alpi* RNS-szintjének csökkenését, és az őssejt marker *Lgr5* Wnt célgén emelkedését figyelhettük meg (31C-F. ábra). Érdekes módon mind a Wnt3a, mind a CHIR99021 masszív emelkedést eredményezett az EV szekrécióban az *Apc* mutációhoz hasonlóan (31G. ábra), anélkül, hogy megnövekedett volna az apoptotikus sejtek száma (31H. ábra). Eredményeink alátámasztják azt a hipotézist, hogy az *Apc* mutáció növeli az EV szekréciót azáltal, hogy aktiválja a Wnt útvonalat az organoidokban. Mivel az *Apc* mutáció általában korai esemény az intesztinális daganatképződésben, adataink arra utalnak, hogy már az adenóma stádiumban fokozott EV kibocsátás következik be.



31. ábra. Az intesztinális organoidok EV kibocsátása megemelkedik az *Apc* mutációt követően. (A) Az egér bél organoidok morfológiája az *Apc* mutáció előtt (bal és középső képek) és után (jobb panel). R-Spondin1 (RSpo) nélkül csak az *Apc* mutáns organoidok élnek túl (jobb oldali panel), a vad típusúak (WT, középső panel) azonban nem. Méretarány: 100 μm. (B) CD81+ gyöngyök százalékos aránya, azonos sejtszámra normalizálva (áramlási citometria). Az anti-CD81-bevonatú gyöngyöket WT vagy *Apc* mutáns (sgApc) tenyészetek felülúszójában inkubáltuk, és az EV-kötött gyöngyöket anti-CD81-gyel (n = 4) detektáltuk. (C) Wnt3a-val kezelt WT, *Apc* mutáns és WT organoidok konfokális mikroszkópos felvételei (100 ng/ml 3 napig, méretarány: 50 μm). A Ki67+ (D) vagy Mucin2+ sejtek (E) százalékos aránya *Apc* mutáció vagy a jelzett kezelések jelenlétében. A Wnt útvonalat aktiváló CHIR99021-gyel (3 μM 3 napig) kezelt organoidok esetében az eredményeket az 1%-os DMSO-ban tartott kontroll mintákkal hasonlítottuk össze. (F) A jelzett gének relatív RNS szintjei (qPCR, n = 5). (G) A CD81+ gyöngyök relatív százaléka (áramlási citometria). Az eredményeket minden esetben a sejtszámra normalizáltuk, majd összehasonlítottuk a kezeletlen kontroll mintával. Az organoidok nélküli Matrigel kontroll minták minden mérésnél < 1% pozitivitást adtak a CD81+ gyöngyökre nézve (n = 5). (H) Az aktív kaszpáz-3+ sejtek százalékos aránya *Apc* mutáció és a jelzett kezelések után (n = 10).

Megbeszélés: a legtöbb tanulmány 2D sejtenyészeteket használt az EV-k funkcióinak azonosítására CRC-ben és más rákos megbetegedésekben. Különböző sejtvonalak és eltérő tenyésztési körülmények alkalmazása azonban alacsony konzisztenciájú adatokat eredményezett. Ez részben azzal magyarázható, hogy ezek a sejtvonalak különböző betegeket reprezentálnak, és a 2D-s tenyésztési protokollok során szelektív előnyhöz jutottak a gyorsan osztódó, a 2D körülményekhez jól alkalmazkodó daganatsejtek. A 3D organoid technológia

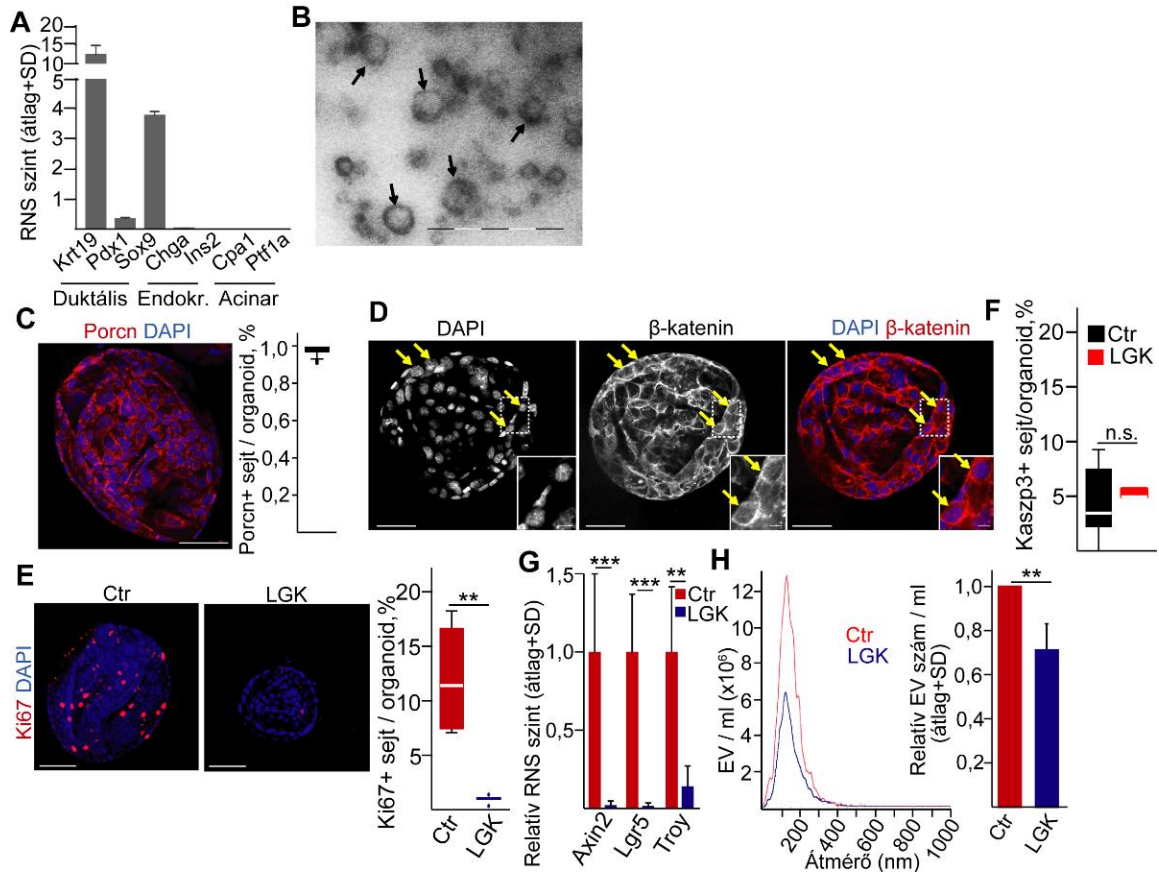
kiváló modellt képvisel, amely fenntartja az *in vivo* daganatok sejtes heterogenitását mezenchimális sejtek nélkül [13, 70, 116, 117]. Munkánk úttörő jelentőségű volt a 3D organoid technológiának EV elemzésre való alkalmazásában közvetlen, CRC betegekből származó minták felhasználásával. Érdekes módon a 2D és 3D szuszpenziós kultúrákkal ellentétben a 3D mátrixban lévő kolóniák és organoidok felülúszóiban elsősorban a kisebb méretű EV-eket tudtuk detektálni.

Bár az *in vivo* és *in vitro* vizsgálatok megemelkedett EV felszabadulást mutatnak a tumorsejtekből [9, 118, 119], az e hatásért felelős tényezőkkel csak néhány kutatás foglalkozott. Például a p53 jelenléte kritikus a tüdőrák sejtvonalakban a DNS károsodás utáni fokozott EV felszabadulás szempontjából [120]. A *KRAS* mutációk egy másik fontos genetikai eseményt jelentenek számos ráktípusban; a CRC-ben a mutáns *KRAS*-sal végzett vizsgálatok többnyire az EV-k molekuláris cargo-jában bekövetkezett változásokra összpontosítottak, és néhány RNS szelektív becsomagolását mutatták ki [121, 122]. Így azon megállapításaink, miszerint az organoidokból való EV felszabadulás indukálódik az *Apc* mutáció után, ami egy kritikus genetikai esemény CRC-ben, különösen érdekes lehet az EV alapú diagnosztikai eszközök fejlesztésében. Vizsgálataink továbbá azt jelzik, hogy az *Apc* mutáció a Wnt útvonal indukálásával fejt ki hatását az EV felszabadulásra. A Wnt aktivitás és a sejtproliferáció szorosan összefügg a bélhámban és a béladenómákban. Mivel azonban minden adatunkat a sejtszámra normalizáltuk, a megnövekedett sejtszám nem magyarázza a magasabb EV kibocsátást. Eredményeink tehát rávilágítanak az organoid technológia erejére az EV-k jellemzésére vonatkozó vizsgálatokban, és támpontot adnak az EV-k diagnosztikai markerként való használatához CRC-ben.

5.4 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 szekréció intenzitása szorosan összefügg bél adenóma sejtekben. Annak vizsgálatára, hogy ez általános jelenség-e más sejt típusokban is, először egér hasnyálmirigy duktális organoidokat használtunk, melyek duktális eredetét és EV szekrécióját is bizonyítottuk (32A-B. ábra). Érdekes módon az organoid sejtek túlnyomó többsége pozitív volt porcypine-ra (Porcn), mely enzim a Wnt fehérjék palmitoilálása által kulcsfontosságú szerepet játszik a szekréciójukban [123] (32C. ábra). Ezen kívül néhány sejtben nukleáris β -katenint figyeltünk meg (32D. ábra), amely a Wnt útvonal aktivitását mutatja. A PORCN blokkolása gátolja a Wnt fehérjék poszttranszlációs módosulását, ami a

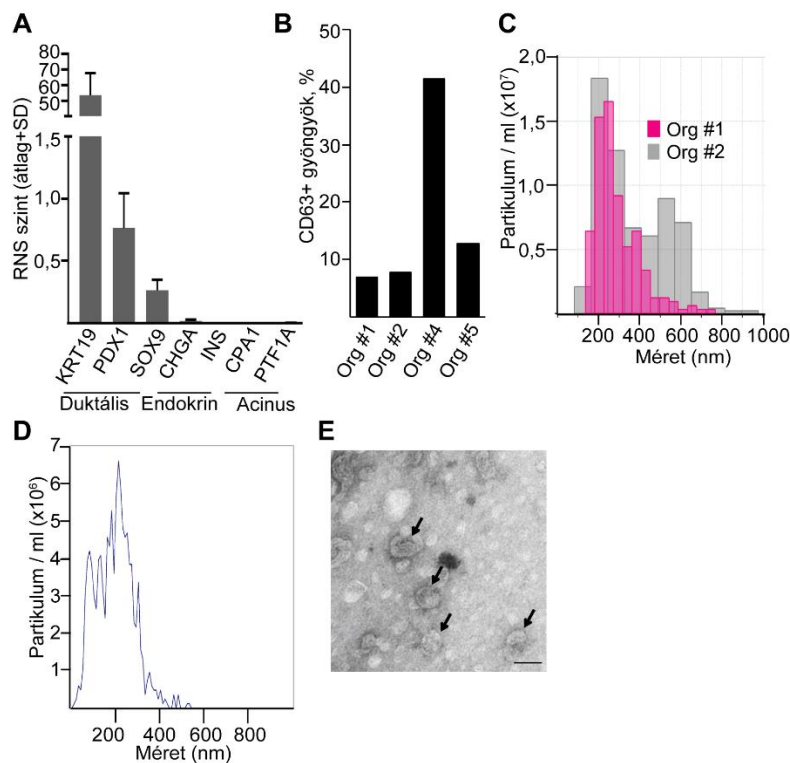
Wnt-k szekréciójának és aktivitásának csökkenéséhez vezet [123]. Ezzel összhangban a Porcn inhibitor LGK974 alkalmazása csökkentette a Ki67+ proliferáló sejtek arányát (32E. ábra), de nem volt hatással az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtekre (32F. ábra). Az inhibitor az *Lgr5*, *Axin2* és *Troy* (*Tnfrsf19*) Wnt célgének alacsonyabb RNS szintjét eredményezte (32G. ábra), és csökkentette az EV-k számát az organoidok kondicionált médiumában (32H. ábra).



32. ábra. A Wnt szekréció befolyásolja az EV-k mennyiségét egér pancreas duktális (PD) organoidokban. (A) Duktális, endokrin és acinus markerek relatív RNS szintje (RT-qPCR). (B) EV-k (nyilak) kimutatása egér pancreas duktális organoidok kondicionált médiumában (TEM). (C) Porcupine (Porcn) immunfestés és a konfokális mikroszkópos képek kvantifikálása. (D) β -katenin kimutatása PD organoidokban (konfokális mikroszkóp). A nyilak a nukleáris β -katenint tartalmazó sejteket jelölik. (E) Immunfestés a Ki67 proliferációs markerre Porcn inhibitor jelenlétében (LGK974) vagy hiányában (Ctr). Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek (bal oldali panelek) és azok mennyiségi értékelése. (F) Aktív kaszpáz-3+ sejtek kvantifikálása az inhibitor jelenlétében/hiányában. (G) Az *Axin2*, *Lgr5* és *Troy* (*Tnfrsf19*) relatív RNS szintjei LGK974 kezelés után (RT-qPCR, n=6). A *Hprt1* háztartási génre normalizált adatokat összehasonlítottuk a kezeletlen kontrollal. (H) NTA mérések reprezentatív képei és azok kvantifikálása (n=5). Az adatokat 10^6 sejtre normalizáltuk, majd összehasonlítottuk. A (C, E) panelek esetében három kísérletről 15–20 képet elemeztünk. Mann-Whitney U-teszt (E, F), párosított vagy párosítatlan t-teszt (G, H), **p < 0,01 és ***p < 0,005 értékkel. Méreterány: 500 nm (B), 50 μ m (C–E) vagy 10 μ m (D, nagyított panelek).

Ezután a duktális eredetű tumortípusra, a PDAC-ra fókuszáltunk. A PDAC betegekből indított organoid vonalak expresszálták a *KRT19*, *PDX1* és *SOX9* duktális markereket, míg nem tudtuk kimutatni a *PTF1A* és *CPA1* acinus markereket, illetve a *CHGA* és *INS* endokrin hasnyálmirigy

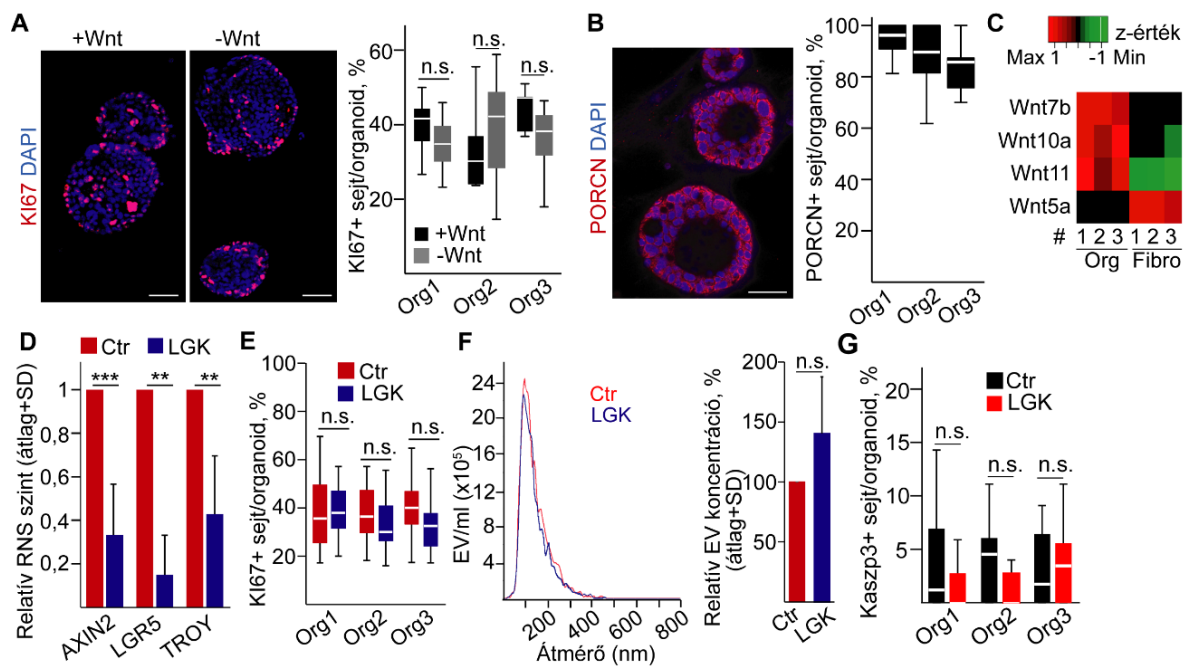
markerek expresszióját (33A. ábra). Az összes organoid vonalunkat EGF nélkül tartottuk fenn, bizonyítva, hogy az EGF receptor jelátviteli út vonal mindegyikben mutált, bár nem minden organoid vonal hordozott mutációt a *KRAS*-ban. Az organoidok noggin hiányában is fenntarthatók voltak, ami a PDAC organoidok másik fontos jellemzője [65]. Ezen túlmenően a legtöbb PDAC organoid vonalunk *TP53* mutációt is hordozott, és ezeket nutlin-3 jelenlétében is fenn tudtuk tartani, amely a sejtciklus leálláshoz és apoptózishoz vezet vad típusú p53-mal rendelkező sejtekben (nem mutatott adatok) [113]. Ezek az eredmények együttesen azt bizonyítják, hogy tenyészteteink PDAC eredetű organoidokat tartalmaztak. Anti-CD63-mal fedett gyöngyök és áramlási citometria segítségével EV-eket detektáltunk a PDAC organoid vonalak kondicionált médiumában (33B. ábra), melyet TRPS és NTA, valamint TEM felvételek is igazoltak (33C-E. ábra).



33. ábra. A PDAC betegekből származó organoidok EV-eket bocsátanak ki. (A) Duktális, acinár és endokrin markerek RNS szintjei a PDAC organoid vonalakban (n=5, RT-qPCR). (B) A CD63+ gyöngyök százalékos aránya PDAC organoidok kondicionált médiumából való inkubálás után, áramlási citometriával kimutatta. (C) Partikulumok kimutatása organoid tenyészetekből TRPS-sel 300 g és 2000 g centrifugálás után. 400 nm-es pórusméretű membránt (185-1100 nm mérési tartomány) alkalmaztunk. (D-E) NTA mérés (D) és transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM) reprezentatív képe (E). Méretarány: 100 nm (E)

A PDAC progressziója során a tumorsejtek függetlenné válhatnak a külső Wnt ligandumoktól [65]. Annak eldöntésére, hogy organoidjaink a Wnt-függő vagy Wnt-független csoportba tartoznak-e, Wnt3a-val vagy anélkül tenyésztettük őket, mely a Wnt fehérjék prototípusának tekinthető [65]. Organoid vonalaink még exogén módon hozzáadott Wnt3a fehérje hiányában

is növekedtek (34A. ábra), és egységesen PORCN expressziót mutattak (34B. ábra). A PDAC sejtekre jellemző Wnt géneket, mint például a *WNT7A*, *WNT10A* és *WNT11*, magasabb szinten expresszálták, mint a PDAC betegekből származó fibroblasztok (34C. ábra), ami azt mutatja, hogy a PDAC organoidok képesek Wnt fehérjéket termelni maguk számára. Ezen ellentétben nem tudtuk kimutatni a stromális *WNT5A* gén RNS-ét [65] PDAC organoidokban (34C. ábra). Várakozásainknak megfelelően az LGK974 Wnt szekréció gátló alkalmazása az *AXIN2*, *LGR5* és *TROY* Wnt célgének csökkent expresszióját eredményezte PDAC organoidokban (34D. ábra). Egy korábbi publikációval összhangban, amely szerint bizonyos mutációk (pl. a *TP53*-ban) a Wnt fehérjék megvonásával szembeni rezisztenciát okoznak PDAC organoid sejteknél [65], nem találtunk változást sem a KI67+ osztódó sejtek arányában, sem pedig az EV szekrécióban LGK974 kezelés után (34E-F. ábra). Hasonlóképpen nem találtunk különbséget az apoptotikus sejtek százalékos arányában (34G. ábra). Összefoglalva eredményeink azt mutatják, hogy míg a Wnt fehérjék aktivitásának gátlása döntő hatással van a sejtproliferációra és az EV szekrécióra normál hasnyálmirigy duktális organoidokban, ezt a kapcsolatot nem tudtuk kimutatni PDAC-ban.



34. ábra. A PDAC organoidokban a Wnt szekréció nem kapcsolódik a sejtproliferációhoz és az EV termeléshez. (A) Immunfestés a KI67 proliferációs markerre és a konfokális mikroszkópos képek kvantifikálása három organoid vonalra. Reprezentatív képek az 1. számú organoidról láthatók. Egyes kísérletekben organoidokat tenyésztettünk rekombináns WNT3A-val vagy anélkül. (B) PORCN-ra immunfestett organoidok konfokális mikroszkópos elemzése. (C) A jelzett Wnt gének expressziós szintje PDAC organoidokban és fibroblasztokban (RT-qPCR, n=3). A háztartási génekre normalizált adatokat z-értékre transzformáltuk. A piros és a zöld szín magasabb, illetve alacsonyabb RNS szintet jelez. A fekete szín az expresszió hiányára ($Ct > 36$) utal. (D) Az *AXIN2*, *LGR5* és *TROY* (RT-qPCR) RNS szintje. Az LGK974-gyel tenyésztett és *HPRT1*-re normalizált minták eredményeit

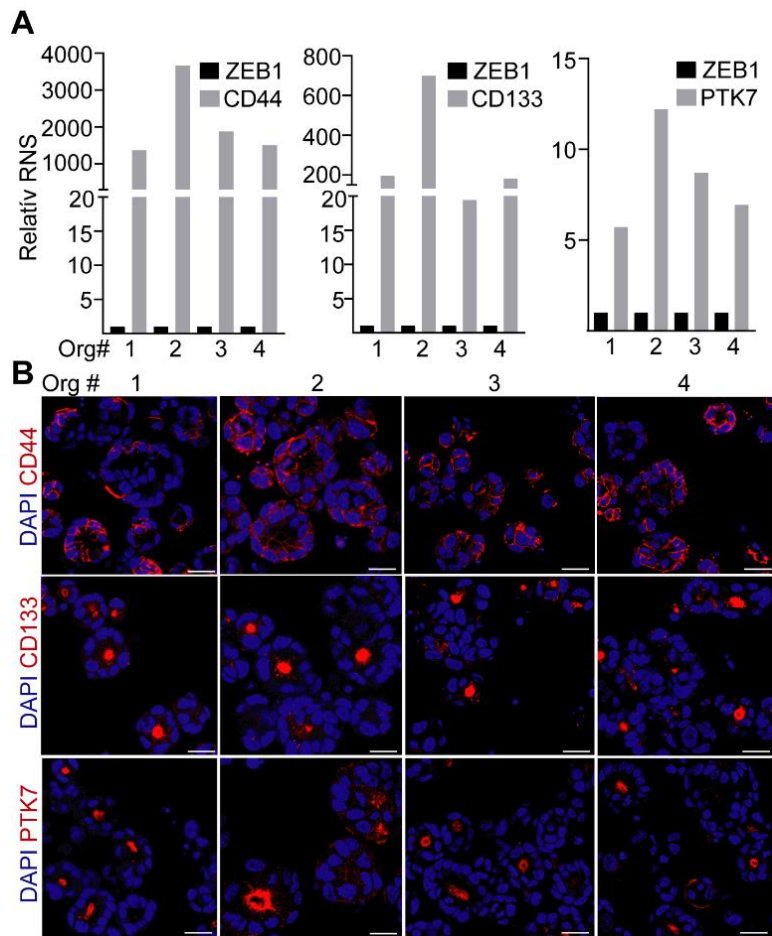
összehasonlítottuk a kezeletlen kontrollokkal (n=3 három organoid vonalból). (E) A KI67+ sejtek százalékos aránya az organoidokban LGK974-gyel vagy anélkül (konfokális mikroszkópos képek elemzése). (F) Az NTA mérések reprezentatív képei (bal oldali panel) és azok mennyiségi értékelése (jobb oldali panel, 10^6 sejtre normalizálva, n=5) kontroll mintákban és LGK974 kezelés után. (G) Aktív kaszpáz-3+ sejtek aránya a PDAC organoidokban. Az A, B, E, G panelek esetében a kísérleteket háromszor megismételtük minden organoid vonalra. Mann–Whitney U-próbát (A, E, G), párosított t-próbát (D, F) alkalmaztunk $**p < 0,01$ és $***p < 0,005$ szignifikancia értékekkel. $p > 0,05$ nem volt szignifikáns. Méretarány: 50 μm (A, B).

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

Az Apc funkciójának kiesése, illetve mutációjának következtében kialakuló magas Wnt aktivitás fokozott EV kibocsátást indukál intesztinális adenóma sejtekben. A tumorsejtek között azonban molekuláris és fenotípusos heterogenitás figyelhető meg, mely felveti az eltérő EV kibocsátással és cargo-val jellemezhető CRC sejtek jelenlétét. Az eltérő EV szekrécióval jellemezhető CRC sejtpopulációk azonosítása érdekében a CD44-re, a CD133-ra és PTK7-re fókuszáltunk, melyek sejtfelszíni molekulák, és magas expressziójuk agresszív viselkedésű CRC sejteket azonosít.

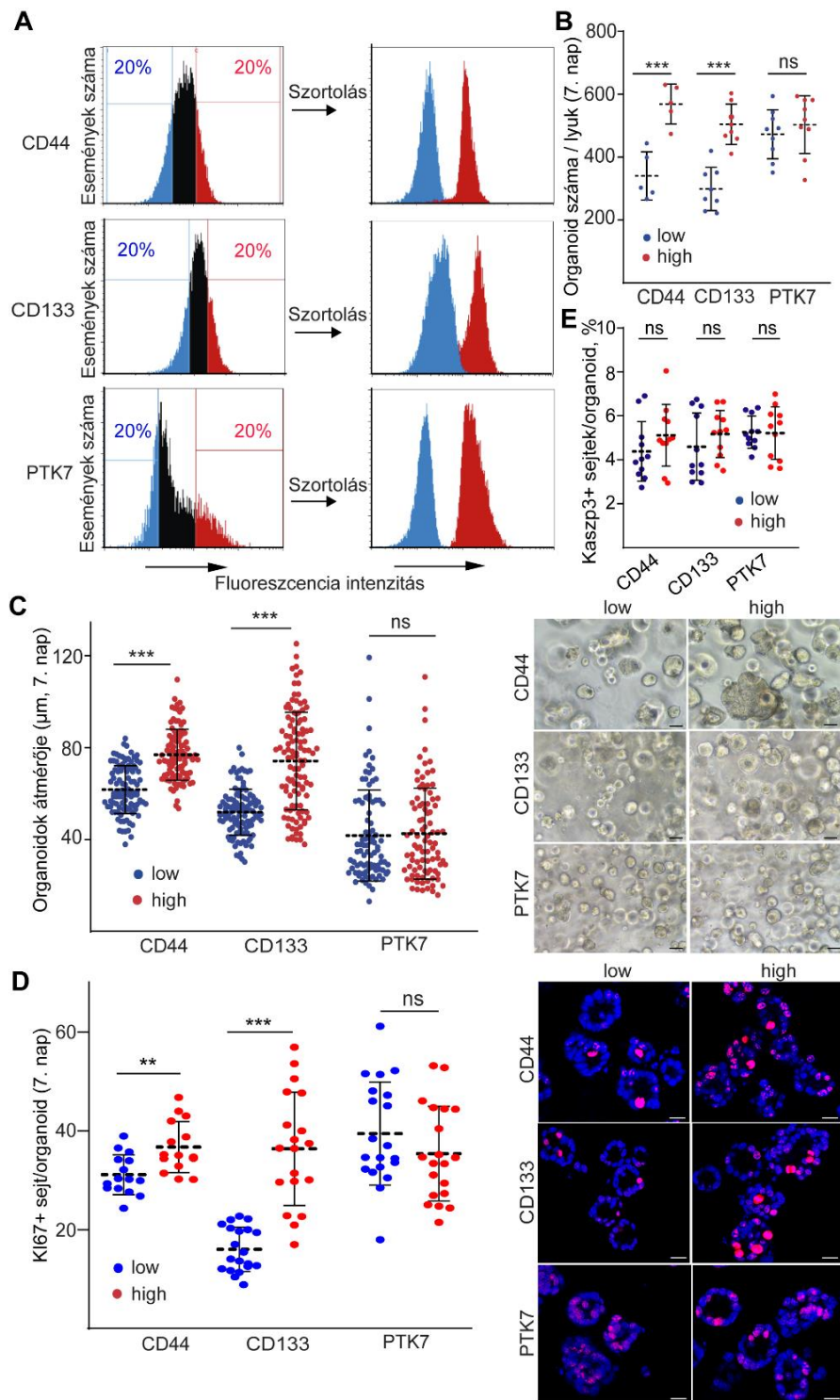
A CD44 és CD133 nagy osztódási intenzitással rendelkező CRC organoid sejtpopulációkat jelöl

Számos olyan molekulát publikáltak már, amelyek agresszív sejtpopulációkat jeleznek CRC-ben, ezek közé tartozik például a CD44, a CD133 és a PTK7. Ezen molekulák intratumorális heterogenitásának tanulmányozására CRC betegekből származó organoidokat használtunk. A vizsgált markerek RNS-ét minden organoid vonalunkban ki tudtuk mutatni. Bár a CD44, a CD133 és a PTK7 RNS szintje eltérő volt az egyes betegekből származó organoidok között, azonban minden organoidban jelentősen magasabb szintet észleltünk ezen markerek esetében, mint a kontrollként használt ZEB1 mezenchimális markernél (35A. ábra). Immunfestéssel elvégzett kísérleteink azt mutatták, hogy míg a CD133 és a PTK7 a CRC sejtek apikális felszínén lokalizálódott, a CD44 esetében nem találtunk ilyen aszimmetrikus eloszlást (35B. ábra). Ezen kívül sejtes heterogenitást figyeltünk meg a CD44, CD133 és PTK7 expressziója tekintetében ugyanabból a betegből származó organoid vonalon belül és az organoidok között is (35B. ábra). Fontos megemlíteni, hogy mindhárom molekulát a vizsgálatainkban használt mind a négy organoid vonalban ki tudtuk mutatni (35B. ábra).



35. ábra. Sejtes heterogenitás a CD44, CD133 és PTK7 szintre CRC organoidokban. (A) Az adott gének RNS szintje négy CRC organoid vonalban. Az RNS szinteket a *HPRT1* háztartási génre normalizáltuk, majd a normalizált *ZEB1* szintet 1-nek vettük. (B) A CD44, CD133 és PTK7 whole-mount immunfestése. Méretarány: 50 μ m.

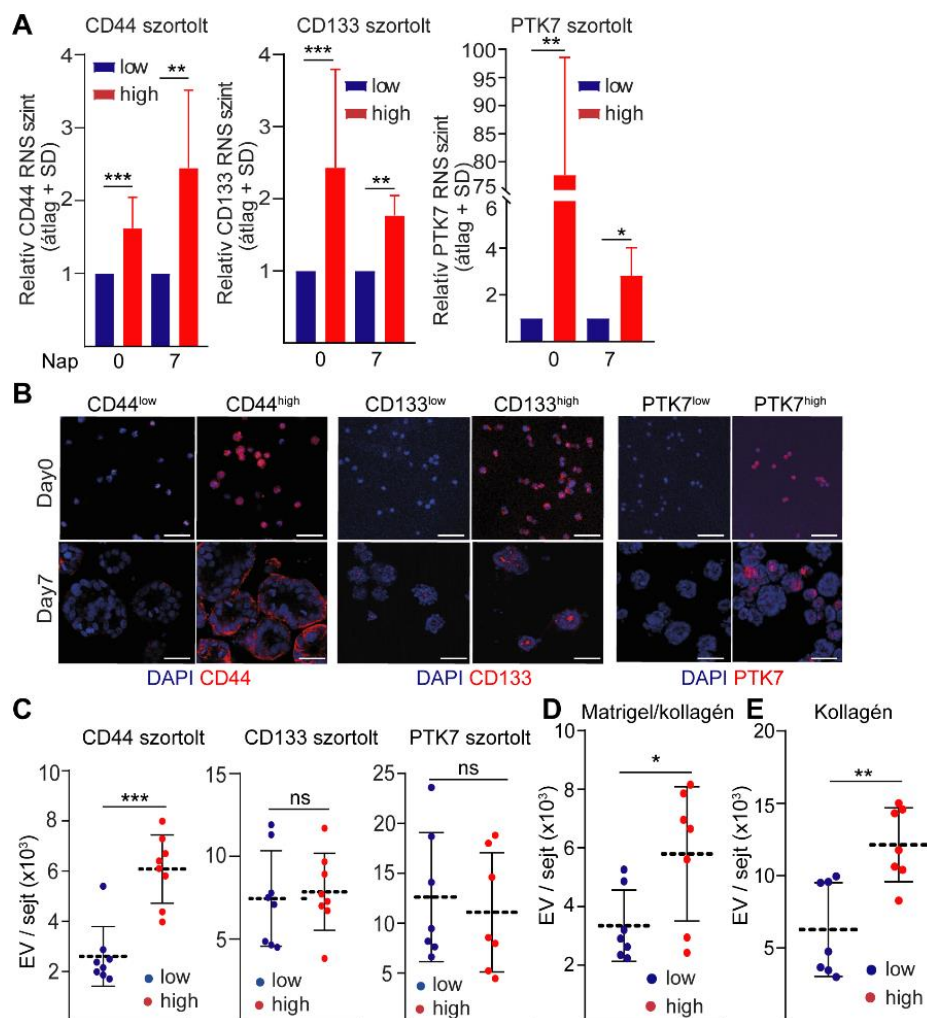
Következő lépésként CRC sejteket szortoltunk CD44, CD133 és PTK7 szint szerint úgy, hogy az adott markerre nézve a legmagasabb és a legalacsonyabb expressziót mutató sejteket választottuk el egymástól (36A. ábra). Várakozásainknak megfelelően ezek a sejtpopulációk a markerek különböző szintjeit mutatták közvetlenül a szortolás után (36A. ábra). Míg a kolóniaképző képességben nem találtunk különbséget a PTK7^{high} és a PTK7^{low} sejtek összehasonlításakor, a CD44^{high} és CD133^{high} sejtek több organoidot képeztek a CD44^{low} és CD133^{low} sejtekhez képest (36B. ábra). Ezen kívül az organoidok átmérője, valamint a KI67+ proliferáló sejtek aránya nagyobb volt a CD44^{high} és CD133^{high} sejtekből kialakult organoidokban az adott marker alacsony szintjét tartalmazó sejtekből származó organoidokkal való összehasonlításban, mely eltérés nem volt megfigyelhető a PTK7 esetében (36C-D. ábra). Érdekes módon egyetlen szubpopulációban sem találtunk eltérést az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek arányában (36E. ábra). Eredményeink tehát azt jelzik, hogy a PTK7-tel ellentétben a CD44 és a CD133 magas proliferációs potenciállal rendelkező CRC sejteket jelez.



36. ábra. A $CD44^{high}$ és a $CD133^{high}$ sejtekből származó organoidok több proliferáló sejt tartalmaznak, mint a $CD44^{low}$ és a $CD133^{low}$ organoidok. (A) A $CD44$, $CD133$ és $PTK7$ szortolási stratégiája és szintjük a szortolt populációkban. (B) Az adott markerek alacsony és magas szintjére szortolt sejtekből kialakult organoidok száma (1–2 szortolás négy organoid vonalból). (C) Az organoidok átmérője a szortolt sejtek Matrigel-ben való tenyésztése után. (D) A $KI67^{+}$ proliferáló sejtek százalékos aránya. A (C) és (D) esetében a kvantifikáció (bal oldali panel) és reprezentatív képek (jobb panel) láthatók (két szortolás négy organoid vonalból). (E) Az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek százalékos arányának összehasonlítása a $CD44^{low}$ és $CD44^{high}$, $CD133^{low}$ és $CD133^{high}$, valamint a $PTK7^{low}$ és $PTK7^{high}$ organoidokban (az adatokat négy organoid vonalból gyűjtöttük). Méretarány: 25 µm (C, D), Mann–Whitney U teszt (B–D).

A $CD44^{high}$ CRC sejtekből származó organoidok több EV-t bocsátanak ki, mint a $CD44^{low}$ organoidok

Annak meghatározására, hogy a sejtek heterogenitása hogyan befolyásolja az EV szekréció intenzitását, a CD44, CD134 vagy PTK7 szintjük alapján szortolt sejteket 3D körülmények között tenyésztettük. A szortolt sejtekből származó organoidok megtartották ezen molekulák magas vagy alacsony expressziós mintázatát a 7. napon is, melyet RT-qPCR-rel (37A. ábra) és immuncitokémiával (37B. ábra) bizonyítottunk. Ezért úgy döntöttünk, hogy a szortolás utáni 7. napon vizsgáljuk az organoidokból származó EV-eket. A $PTK7^{high}$ vagy $CD133^{high}$ sejtekből származó organoidok EV szekréciója nem különbözött a $PTK7^{low}$, illetve $CD133^{low}$ sejtekhez képest NTA méréseink alapján (37C. ábra). Ezzel szemben magasabb EV szekréciót találtunk a $CD44^{high}$ organoidok esetében (37C. ábra).



37. ábra. A $CD44^{high}$ sejtek több EV-t bocsátanak ki a $CD44^{low}$ CRC sejtekhez képest. (A) Az adott gének relatív RNS szintje közvetlenül a CD44, CD133 vagy PTK7 alapján történt szortolás után (d0), illetve a tenyésztésük 7. napján. Az adatokat a háztartási kontrollra normalizáltuk, és a $CD44^{low}$, $CD133^{low}$ vagy $PTK7^{low}$ populáció expressziós szintjét 1-nek vettük (RT-qPCR, n=4 négy organoid vonalból). (B) Immunfestés CD44-re, CD133-ra és PTK7-re közvetlenül a szortolás után (d0), vagy a 3D tenyésztés 7. napján (konfokális mikroszkópos elemzés, 3. organoid vonal). (C) EV koncentráció az

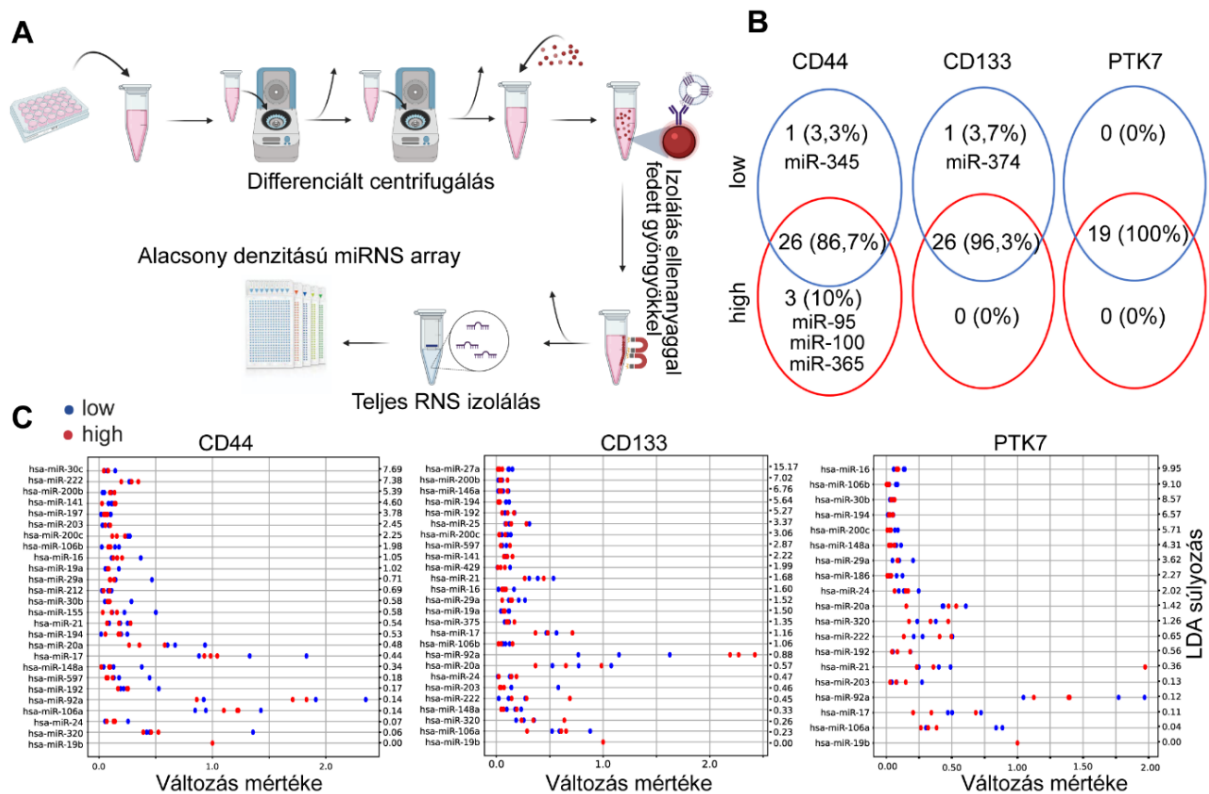
organoidok kondicionált médiumában 7 nappal a szortolás után (négy organoid vonalból, sejtszámra normalizálva). (D-E) EV koncentráció a CD44^{high} és CD44^{low} szortolt sejtekből származó organoidok kondicionált médiumában (NTA). Az organoidokat Matrigel/kollagén I-ben (1:1 arányban) (D), vagy kollagén I-ben (E) tenyésztettük. Méretarány: 50 µm (B). Párosított t-próbát (A) és Mann–Whitney U tesztet (C, D, E) alkalmaztunk.

A kollagén I felhalmozódik a CRC progressziója során, és ez jelentős változáshoz vezet az ECM összetételében. Érdekes módon a CD44^{high} sejtekből származó organoidok esetében magasabb EV szintet mutattunk ki kollagén I tenyészetek kondicionált médiumában, valamint kollagén I és Matrigel keverékében (1:1 arányban) is a CD44^{low} sejtekhez képest (37D-E. ábra). Mivel az összes EV kibocsátási adatot sejtszámra normalizáltuk, ez a megközelítés biztosította azt, hogy az EV mennyiségben megfigyelt különbségek ne az eltérő sejtproliferációt tükrözzék. Így adataink azt mutatják, hogy a magas CD44 szint egy nagy EV szekréciónal jellemezhető CRC sejtpopulációt jelez.

A CD44^{high} és a CD44^{low} CRC sejtekből származó EV-k cargo-ja csak néhány miRNS-ben különbözik

Következő lépésként összehasonlítottuk a CD44^{high} és CD44^{low}, CD133^{high} és CD133^{low}, illetve a PTK7^{high} és PTK7^{low} sejtek által képzett organoidokból származó EV-k cargo-ját. Mivel az EV-k által szállított miRNS-ek kiemelkedő jelentőségűek a sejt-sejt kommunikációban, ezekre a molekulákra összpontosítottunk. A tiszta EV preparátum előállításához organoidok kondicionált médiumából az EV-eket anti-CD63 és anti-CD81 bevonatú gyöngyökkel izoláltuk, amely módszer a többihez képest a legalacsonyabb nem specifikus miRNS háttérrel eredményezi (lásd korábban). Ezután az EV miRNS-eket miRNS array-vel elemeztük (38A. ábra). Kontrollként sejtmentes Matrigel mintákból kondicionált médiumot gyűjtöttünk, a detektált miRNS-eket háttérnek tekintettük és kizártuk a további elemzésből. Továbbá csak azokra a miRNS-ekre fókuszáltunk, amelyek legalább egy kísérleti körülmény összes párhuzamos biológiai mintájában kimutathatók voltak. Ezen kritériumok alkalmazásával a 377 elemzett miRNS-ből 26, 26, illetve 19 miRNS-t detektáltunk, amikor összehasonlítottuk a különböző CD44, CD133 vagy PTK7 fehérjeszinttel jellemezhető organoidokat (38B. ábra). Csak egy olyan miRNS-t találtunk, amely eltérő szinttel volt jellemezhető a CD133^{high} és CD133^{low} organoid eredetű EV-kben, és egyetlen miRNS sem volt specifikus a PTK7^{high} és PTK7^{low} CRC sejt eredetű EV-kre. Másrészt bioinformatikai elemzésünk azt mutatta, hogy a miR-95, a miR-100 és a miR-365 specifikusak voltak a CD44^{high}-ra, a miR-345 pedig a CD44^{low} organoid eredetű EV-kre (38B. ábra). Következő lépésként az EV cargo miRNS-eket a miR-19b szintjére normalizáltuk, melynek szintje a legstabilabbnak mutatkozott a minták között.

Ezeket a normalizált értékeket lineáris diszkriminancia analízishez (LDA) használtuk, hogy a kísérleti csoportok között eltérő mennyiségben jelen lévő miRNS-eket találjunk. Amikor csak azokra a miRNS-ekre összpontosítottunk, amelyek mind a CD44^{high}, mind a CD44^{low} organoid eredetű EV-kben kimutathatók voltak, ez a bioinformatikai módszer magasabb miR-20a szintet mutatott a CD44^{low} sejtből származó EV-kben, mint a CD44^{high} sejtek által kibocsátott EV-kben (38C. ábra). A miR-27a, miR-92a és miR-203 szintjei között is találtunk különbséget a CD133^{high} és CD133^{low} organoidok által kibocsátott EV-k között. A különböző PTK7 alpopulációkból származó EV-k azonban nem mutattak eltérést a cargo miRNS mintázatban (38C. ábra). Így arra a következtetésre jutottunk, hogy a CRC szubpopulációk által kibocsátott EV-k miRNS cargo-jában csak kismértékű különbség figyelhető meg.



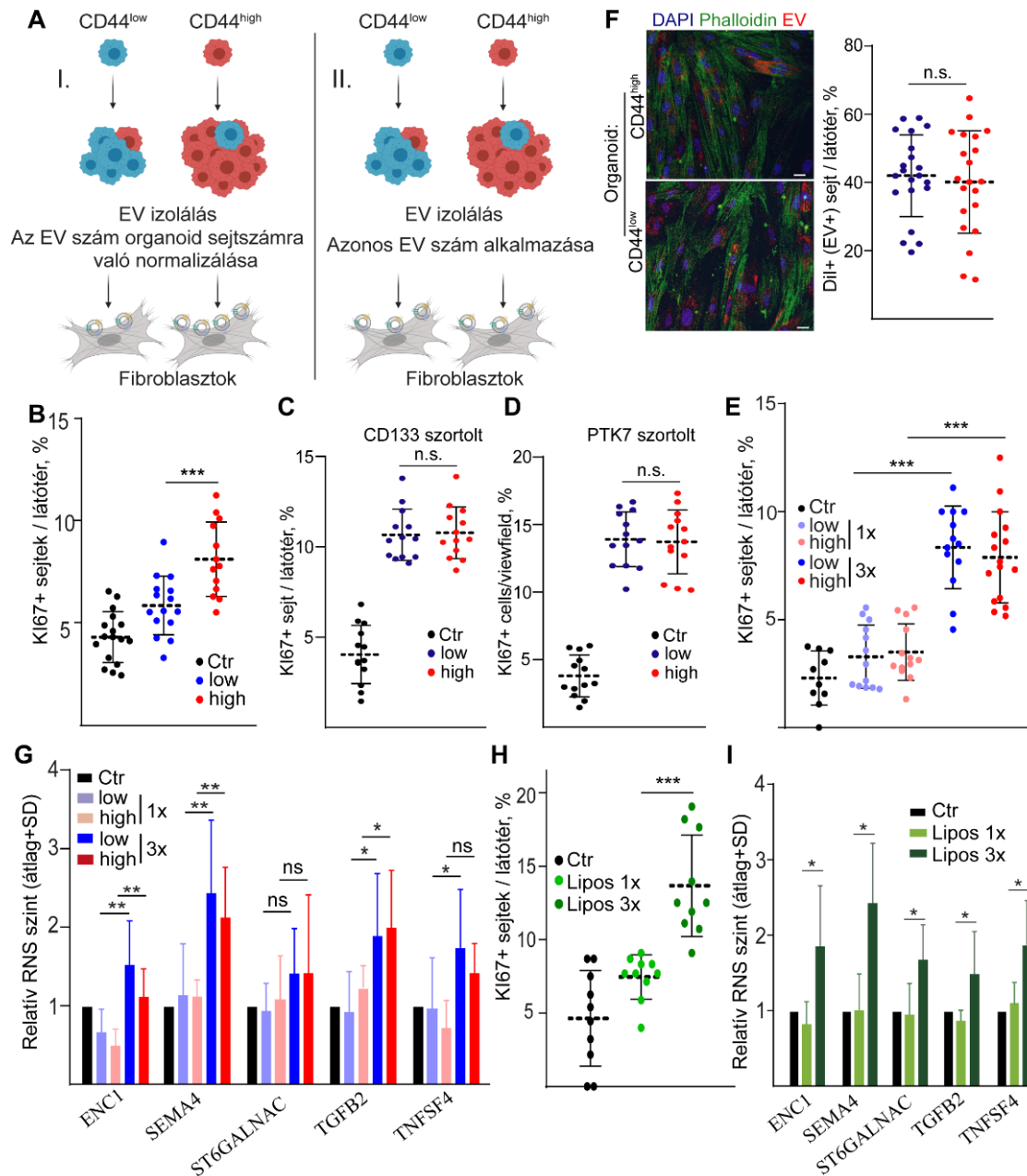
38. ábra. Nincs jelentős eltérés a CD44^{high} és CD44^{low}, CD133^{high} és CD133^{low}, illetve a PTK7^{high} és PTK7^{low} sejtek által kibocsátott EV-k miRNS cargo-ja között. (A) Az EV izolálás és a miRNS cargo elemzésének lépései. (B) A szortolt sejtek által képzett organoidokból a 7. napon izolált EV-k közös és eltérő miRNS-ei Venn diagramon ábrázolva. A miRNS-ek száma és százaléka látható. (C) A normalizált miRNS szintek LDA elemzése. Az adott kísérleti csoportokhoz tartozó összes mintában jelen lévő miRNS-eket elemeztük.

A CD44^{high} és CD44^{low} CRC organoid eredetű EV-k dóziszfüggő hatást fejtenek ki a fibroblasztokra

Mivel adataink azt mutatták, hogy számos tényező indukálja az EV felszabadulást CRC sejtekből, az organoid rendszert az EV-k tumor-sztróma kommunikációban betöltött

szerepének tisztázására is alkalmaztuk. Először a CRC organoid eredetű EV-knek humán vastagbél fibroblasztokra kifejtett hatását teszteltük. A fibroblasztok kritikus szerepet játszanak a CRC sejtek mikrokörnyezetének kialakításában. Humán vastagbél fibroblaszt sejteknek a CRC organoidok kondicionált médiumából előállított alacsony dózisu EV-vel való kezelése után nem találtunk szignifikáns eltérést a fibroblasztok aktivációjában, vagy a migrációjukban sebgyógyulási tesztekben, és a mikroarray kísérletek is csak korlátozott változást mutattak a génextpressziós mintázatban (nem mutatott adatok). Ezekben a kísérletekben azonban alacsony EV mennyiséget alkalmaztunk, mely felveti az EV dózis fontos szerepét.

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 azonos sejtszámra normalizált mennyiségű EV-k használatakor (lásd az 39A. ábrán az I. kísérleti beállítást) a CD44^{high} organoidok által szekretált EV-k nagyobb arányban indukáltak KI67+ proliferáló sejteket vastagbél fibroblaszt tenyészetekben, mint a CD44^{low} sejtől származó EV-k (39B. ábra). Ezt a különbséget nem figyeltük meg az azonos számú CD133^{high} és CD133^{low}, vagy PTK7^{high} és PTK7^{low} sejtekből származó EV-k tesztelésekor (39C-D. ábra). Annak eldöntésére, hogy ez a hatás a CD44^{high} és CD44^{low} sejtek eltérő EV kibocsátásától, vagy a különböző miRNS cargo-tól függ-e, a kísérleteket emelkedő mennyiségű EV-vel is megismételtük úgy, hogy az összehasonlításokor a különböző sejtpopulációkból származó EV-ekből azonos számút alkalmaztunk (lásd a II. kísérleti beállítást az 39A. ábrán). Érdekes módon azt figyeltük meg, hogy a KI67+ fibroblasztok százalékos aránya az EV dózistól függött (alacsony dózisonál nem volt hatás), de független volt attól, hogy CD44^{high} vagy CD44^{low} organoidokból izoláltuk-e őket (39E. ábra). Továbbá nem találtunk különbséget abban, hogy a CD44^{high} és CD44^{low} sejtekből származó EV-ből a fibroblasztok mennyit vesznek fel (39F. ábra). Ezen kísérleteinkben szortolt sejtekből származó organoidokat membránjelölő festékkel kezeltünk, majd a jelölt EV-eket gyűjtöttük. Ezek az eredmények tehát azt mutatják, hogy nem az eltérő miRNS cargo, hanem az EV-k száma a kritikus tényező. Továbbá az aktivációs markerek expressziós intenzitása a vastagbél fibroblasztokban [54] az EV-k számától függött, és ismét nem találtunk különbséget a CD44^{low} és a CD44^{high} sejtekből származó EV-k hatása között (39G. ábra). Érdekes módon a mesterségesen előállított liposzómák hasonló, dóziszfüggő hatással voltak mind az osztódó sejtek arányára, mind az aktivációs markerek expressziójára a fibroblasztokban (39H-I. ábra), ami arra utal, hogy a CD44^{low} és CD44^{high} sejtekből izolált EV-k közös miRNS cargo-ja sem játszik fontos szerepet.



39. ábra. Az EV-k fibroblasztokra kifejtett hatása a dózistól, és nem a miRNS cargo-tól függ. (A) A kísérleti elrendezések sematikus ábrázolása. A fibroblasztokat vagy azonos sejtszámból származó EV-kkel (bal oldali panel, I. felállítás), vagy különböző CRC alpopulációkból származó azonos EV számokkal (jobb panel, II. felállítás) kezeltük. (B) A KI67+ colon fibroblasztok százalékos aránya 10^6 sejtől származó EV alkalmazásakor. Az EV-eket a CD44^{high} vagy CD44^{low} sejt eredetű organoidok felülűszojából gyűjtöttük a 7. napon, és a fibroblasztokat 48 órán keresztül kezeltük (konfokális mikroszkópos képek kvantitatív értékelése, I. kísérleti beállítás). A kontroll minták nem kaptak EV-t. (C-D) A KI67+ fibroblasztok százalékos aránya EV-k alkalmazásakor (10^6 sejtől). A CD133^{high} és CD133^{low} (C) vagy PTK7^{high} és PTK7^{low} (D) sejt eredetű organoidok felülűszojából a 7. napon gyűjtöttük a mintát (I. felállítás). (E) A proliferáló fibroblasztok százalékos aránya emelkedő számú CD44^{high} vagy CD44^{low} organoid eredetű EV alkalmazásakor (II. kísérleti felállítás). (F) Fluoreszcens EV jelre pozitív colon fibroblasztok. Az EV-eket DiI membránfestékkel jelölt CD44^{high} vagy CD44^{low} organoidokból (org #2) gyűjtöttük, majd a fibroblasztokat 24 órán keresztül kezeltük a jelölt EV-kkel. Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek (bal panel) és kvantifikálásuk. A kezeletlen sejtek nem mutattak piros jelet (nem mutatott adatok). A phalloidint a sejtek vizualizálására használtuk. (G) A jelzett gének RNS szintje CD44^{high} vagy CD44^{low} organoidból származó, különböző dózisban alkalmazott EV-kkel kezelt fibroblasztokban (II. beállítás). Az adatokat a *HPRT1* háztartási génre normalizáltuk, majd

összehasonlítottuk a kontroll (Ctr) mintákkal, amelyek nem kaptak EV-t (RT-qPCR, n=4 négy organoid vonalból). (H) A KI67+ fibroblasztok százalékos aránya különböző számú liposzómával kezelve. (I) Az adott gének relatív RNS szintje, amikor a colon fibroblasztokat különböző mennyiségű liposzómával kezeltük (RT-qPCR, n=4 független kísérletekből). Kruskal–Wallis és Dunn tesztet (B, C, D, H), Mann-Whitney U-tesztet (F), vagy párosított t-próbát (G, I) alkalmaztunk. Az EV és a liposzómaszám $2 \times 10^5/200 \mu\text{L}$ tápközeg (1 \times) és $6 \times 10^5/200 \mu\text{L}$ (3 \times) a II-es felállásban. Méretarány: 10 μm (F).

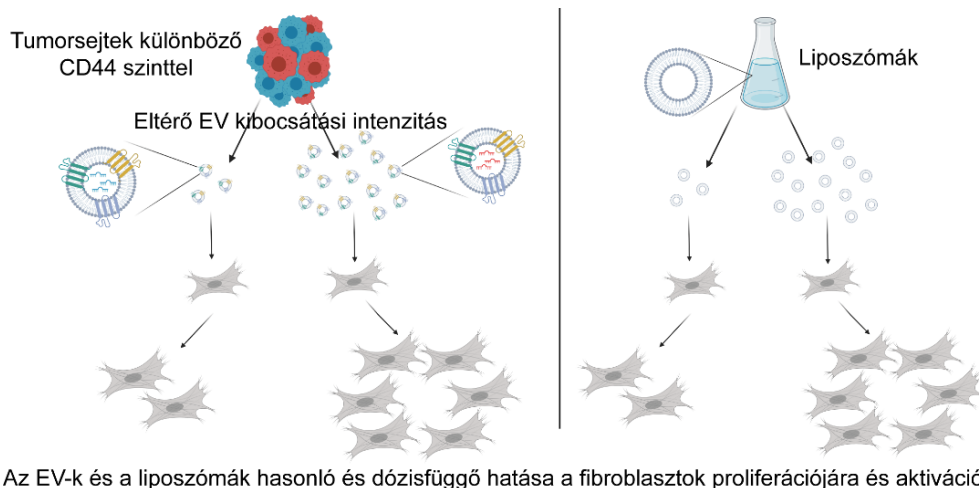
Megbeszélés: kísérleteinkben a különböző EV kibocsátási képességgel rendelkező CRC sejt alpopulációk azonosítását tűztük ki célul. Azokra a molekulákra összpontosítottunk (PTK7, CD133, CD44), amelyek az agresszív viselkedésű CRC sejtpopulációk markerei [124-126]. Ezen markerek közül azt találtuk, hogy a CD44 magas szintje egy olyan CRC sejtpopulációt jelölt a betegekből származó organoidokban, amelyek nagyobb proliferációs kapacitással és magasabb EV kibocsátással rendelkeznek, mint a CD44^{low} sejtek.

Számos tanulmány kimutatta a miRNS-ek jelenlétét különböző testnedvekben. A keringő miRNS-ek jelentős része az EV-kben koncentrálódik [127], és stimulálhatják, vagy gátolhatják a célsejtek proliferációját [128]. Vizsgálatainkban 26 miRNS-t észleltünk a CD44^{high} vagy CD44^{low} CRC sejtekből származó EV-kben. Egy metaanalízis arra utalt, hogy a kimutatott miRNS-ek többsége jelen volt a CRC-s betegek plazmamintájában, összehasonlítva az egészséges kontrollokkal is [129]. Megjegyzendő, hogy három miRNS-t (miR-95, miR-100, miR-365) csak a CD44^{high} sejtpopulációból származó EV-kben észleltünk, míg a CD44^{low} sejtek által kibocsátott EV-kre egyetlen miRNS (miR-345) bizonyult specifikusnak.

Azt találtuk, hogy az EV-k növekvő száma nemcsak az aktivált fibroblasztokra jellemző gének expresszióját indukálta, hanem a proliferációjukat is. Ez a hatás ugyanakkor független attól, hogy az EV-ket CD44^{high} vagy CD44^{low} sejtekből izoláltuk-e. Bár az EV-k miRNS cargo-ját általában az intercelluláris kommunikáció fontos szereplőjének tekintik, a két EV-csoportban eltérően jelenlévő miRNS-ek valószínűleg nem gyakorolnak jelentős hatást modellünkben. Ezen túlmenően liposzómák alkalmazásakor hasonló dózisfüggő hatást figyeltünk meg a fibroblasztokon, ami arra utal, hogy a különböző CRC alpopulációk között az EV-k közös miRNS cargo-ja sem játszik domináns szerepet. Mivel a tanulmányban használt liposzómákat foszfofolinból és koleszterinből állítottuk elő együttműködő partnerünk segítségével további cargo nélkül, ez felveti annak lehetőségét, hogy az EV-k és liposzómák lipidmolekulák átvitelével fejtik ki dózisfüggő hatásukat a fibroblasztokra. Ezt az elképzelést Sun és munkatársai munkája is alátámasztja, akik kimutatták, hogy a koleszterin indukálta a prosztataráksejtek számos funkcióját, például a proliferációt és a migrációt [130]. Ezen túlmenően a sejten belüli és a sejten kívüli jelek átprogramozhatják a koleszterin anyagcserét

több daganatban, és elősegíthetik a daganatképződést [131]. A lipidfelvétel továbbá nem csak a rákos sejtek, hanem a fibroblasztok proliferációját is indukálhatja [132].

Eredményeink tehát arra utalnak, hogy (i) a fibroblaszt aktivációt az EV-k vagy liposzómák dóziszfüggő módon indukálják, feltehetően lipidkomponenseik révén, valamint (ii) a CD44^{high} CRC sejtek magasabb EV szekréciója, és nem azok különböző miRNS cargo-ja a fontos tényező a CD44^{high} és CD44^{low} sejtekből származó EV-k eltérő hatásaiban. A CRC sejtekből származó EV-k hatása tehát elsősorban dóziszfüggő, és nem a miRNS cargo-n múlik (40. ábra).



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

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

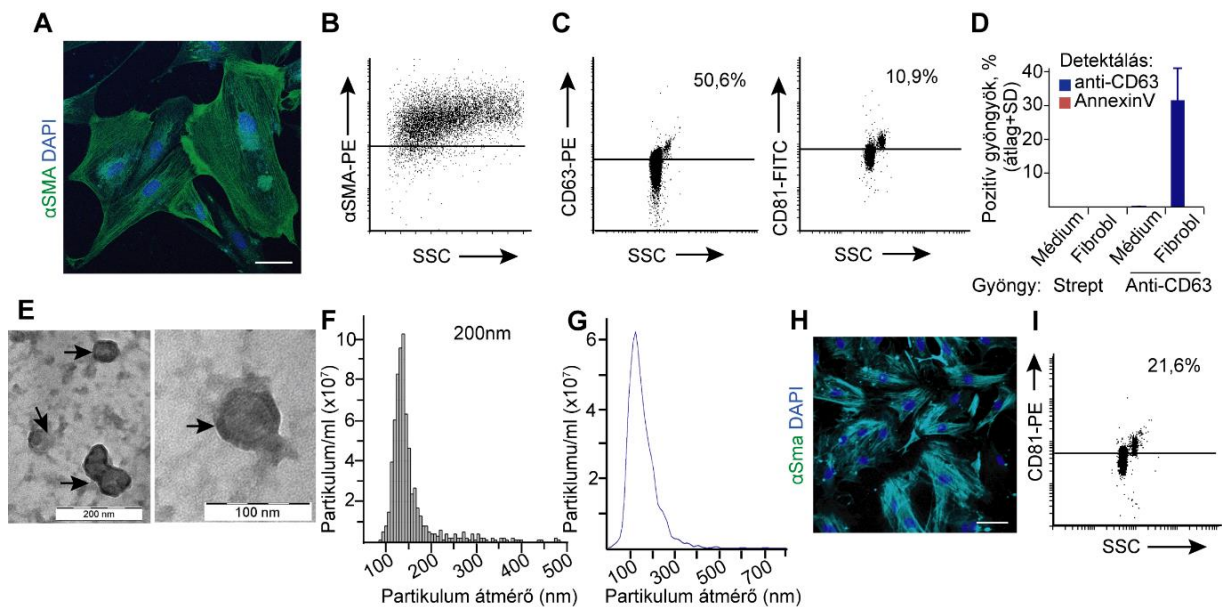
5.6 Az EV-k EGF aktivitást közvetítenek a bél őssejt niche-ben (X)

A CRC kialakulásában központi szerepet játszanak az Lgr5+ intesztinális őssejtek. Az LGR5+ sejtekben fellépő APC mutáció a tumorigenezis első lépésének tekinthető a CRC betegek jelentős részénél, mely hosszú távú adenómaképzéshez vezet. Az Lgr5+ őssejtek egy speciális mikrokörnyezetben, az őssejt niche-ben (ISCN) helyezkednek el, mely biztosítja az őssejt tulajdonságok fennmaradását. Ehhez a niche-hez tartoznak például a Wnt, R-Spondin fehérjék, az EGF család tagjai, illetve a Bmp gátló molekulái (pl. noggin), melyek jelentős része az őssejtek körüli fibroblasztokban termelődnek. Következő lépésként tehát arra koncentráltunk, hogy bizonyítsuk a fibroblasztokból származó EV-k szerepét az ISCN kialakításában és fenntartásában, valamint meghatározzuk a fibroblaszt EV-k cargo-jában az aktív molekulát, mely CRC-ben is fontos szerepet játszhat.

Az intesztinális fibroblasztok által szecernált EV-k jellemzése

Az EV-k által a bélhám ISCN-ben közvetített jelek tanulmányozására kereskedelmi forgalomban elérhető normál humán colon fibroblasztokat (HCF) és C57Bl/6J egerekből izolált

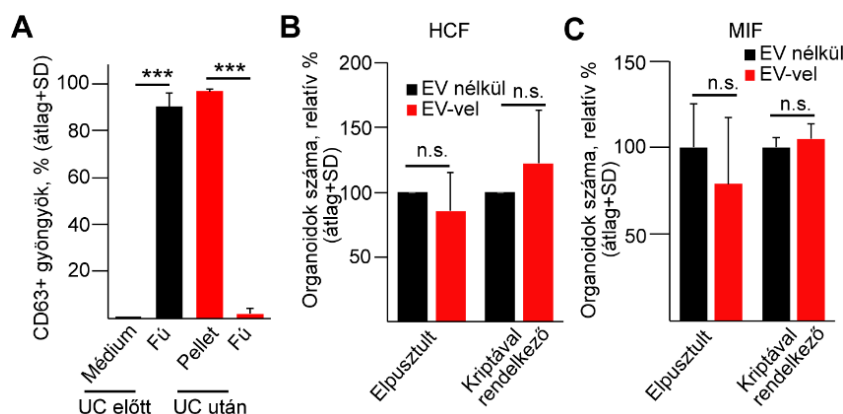
intesztinális fibroblasztokat (egér vékonybél fibroblaszt – MIF) is felhasználtunk. A HCF tenyészetek egységesen pozitívak voltak α SMA-ra (41A-B. ábra), mely igazolta a fibroblaszt tenyészetek tisztaságát. Az anti-CD63-mal vagy anti-CD81-gyel bevont gyöngyökkel ellentétben (41C-D. ábra) a streptavidinnel borított kontroll gyöngyök nem voltak képesek megkötni az EV-eket, bizonyítva a CD63+, illetve CD81+ EV-k jelenlétét a fibroblaszt kultúrák kondicionált médiumában (41D. ábra). Ezen kívül az anti-CD63-mal bevont gyöngyökhöz kötött EV-k negatívak voltak Annexin V-re, amely elsősorban a nagyobb méretű EV alpopuláció markere (41D. ábra). TEM-mel is kimutattuk az EV-k jelenlétét a HCF eredetű kondicionált felülúszó ultracentrifugált pelletjében (41E. ábra). Továbbá a TRPS és az NTA azt mutatták, hogy az EV-k mérete a kisebb tartomány felé tolódott el az EV preparátumokban (41F-G. ábra). A HCF-hez hasonlóan a MIF tenyészetek is pozitívak voltak α Sma-ra (41H. ábra), és a kondicionált médiumban kimutattuk az EV-k jelenlétét anti-CD81-gyel bevont gyöngyökkel (41I. ábra). Adataink tehát azt mutatják, hogy mind a humán, mind az egér intesztinális fibroblasztok kondicionált médiumában kimutathatók az EV-k.



41. ábra. A humán colon (HCF) és az egér vékonybél fibroblasztok (MIF) által kibocsátott EV-k jellemzése. (A) HCF-ek α SMA immunfestése. (B) Az α SMA szintjének áramlási citometriás analízise HCF-ekben. (C) A HCF eredetű kondicionált médiumban inkubált, anti-CD63 vagy anti-CD81-mal bevont pozitív gyöngyök százalékos aránya. (D) A pozitív gyöngyök aránya sejtmentes médiumban vagy HCF eredetű kondicionált médiumban történő inkubálást követően, anti-CD63-mal vagy Annexin V-tel kimutatva. A gyöngyök vagy anti-CD63-mal, vagy kontrollként streptavidinnel voltak bevonva (n=3). A (C) és (D) kísérleteket különböző sejtszámokkal végeztük. (E) TEM képek HCF eredetű EV-kről, melyeket ultracentrifugálással (UC) izoláltunk. A nyilak az EV-eket mutatják. (F-G) HCF eredetű felülúszó minták EV méreteloszlása UC után TRPS-sel (F, membrán pórusméret: 200 nm, melynek mérési tartománya: 85-500 nm), vagy NTA-val (G) mérve. (H) MIF-ek α Sma immunfestése. (I) Az anti-CD81-bevonatú pozitív gyöngyök százalékos aránya, amelyeket MIF eredetű kondicionált médiumban inkubáltunk és anti-CD81 antitesttel detektáltunk áramlási citometriával. Méretarány: 50 μ m (A, H).

Az intesztinális fibroblaszt eredetű EV-k nem módosítják az ISC aktivitást az ISC niche faktorok jelenlétében

Az ISC-k a Lieberkühn kripták alján találhatóak, és az összes bélhámsejt-típus előállításáért, valamint az organoidokban a kriptaszerű struktúrák megjelenéséért is felelősek („budding”). Így az élő, kriptaképző (budding) vagy elpusztult organoidok számának meghatározása egy robusztus és egyszerű módszert biztosít az ISC aktivitás detektálására. Az exogén módon hozzáadott EGF, a Bmp-t gátló noggin, valamint a Wnt agonista R-Spondin1 központi jelentőségűek az ISC populáció fenntartásában vékonybél (SI) organoidokban [20]. A HCF-ekből származó kondicionált médium ultracentrifugálása (UC) után az EV-k az üledékből voltak kimutathatók, a felülúszóból nem (42A. ábra). Az UC által izolált koncentrált HCF, vagy MIF-eredetű EV-k nem befolyásolták a túlélő vagy kriptaképző SI-organoidok számát (42B-C. ábra). Így sem a vastagbél, sem a vékonybél fibroblaszt eredetű EV-k nem hordoznak olyan molekulákat, melyek serkentő, vagy gátló hatást fejthetnek ki az ISCN kialakulásában, ha az összes lényeges niche faktor jelen van a médiumban.

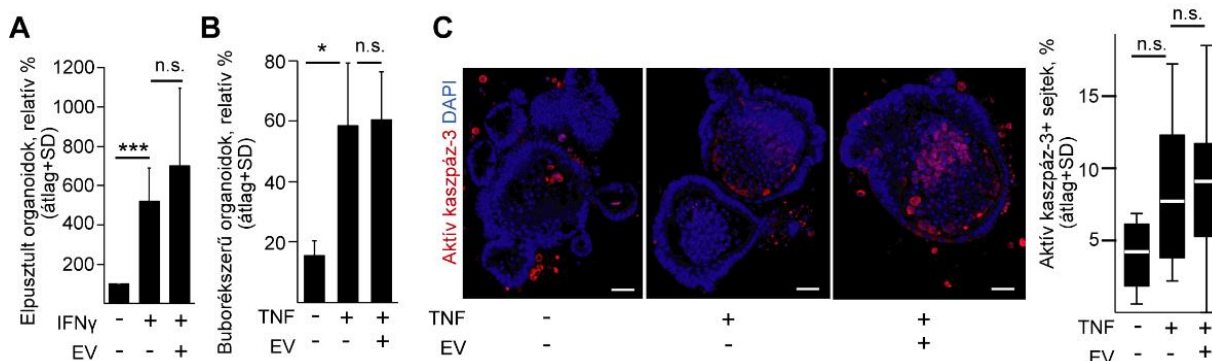


42. ábra. A fibroblasztokból származó EV-k nem módosítják az intesztinális organoidok túlélését az összes niche faktor jelenlétében. (A) A sejtmentes médiumban, vagy HCF eredetű felülúszóban inkubált, anti-CD63-mal bevont pozitív gyöngyök százalékos aránya az ultracentrifugálás (UC) előtt, vagy az EV-ben dúsított üledékben és az EV depletált felülúszóban UC után (UC). A gyöngyökhöz kötött EV-eket jelölt anti-CD63 antitesttel detektáltuk. A pozitív gyöngyök kimutathatók a sejtenyészetek kondicionált felülúszójában az UC előtt és a pelletben az UC után. (B) Az elpusztult organoidok, vagy a kettőnél több kriptát tartalmazó organoidok relatív százalékos aránya HCF eredetű EV-k jelenlétében vagy hiányában. A kísérleteket az összes lényeges niche faktor (R-Spondin1, EGF, noggin) jelenlétében végeztük (n=3). (C) Az elpusztult, vagy kriptát tartalmazó organoidok százalékos aránya a jelzett kezelések esetében. Az EV-eket MIF tenyészetekből izoláltuk (n=3). Statisztikai teszt: párosítatlan t-próba (A), vagy párosított t-próba (B, C).

A fibroblaszt eredetű EV-k nem módosítják az ISCN-ben ható IFN γ és TNF α hatását

Annak tesztelésére, hogy a fibroblaszt eredetű EV-knek van-e kombinatorikus hatása más, az ISCN-ben ható faktorokkal, a TNF α -t és az IFN γ -t választottuk, melyek hatása jól ismert az ISC-kre és/vagy a bélkriptákra, és mindkettő központi szerepet játszik az intesztinális

immunválaszban. Várakozásunknak megfelelően az IFN γ az SI organoidok pusztulásához vezetett [133], a TNF α pedig cisztaszerű organoidok megjelenését eredményezte anélkül, hogy az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek arányát módosította volna (ld. korábban és 43A-C. ábra). Érdekes módon azonban a fibroblaszt eredetű EV-k hozzáadásának sem IFN γ , sem pedig TNF α jelenlétében nem volt hatása ezekre a paraméterekre (43A-C. ábra).



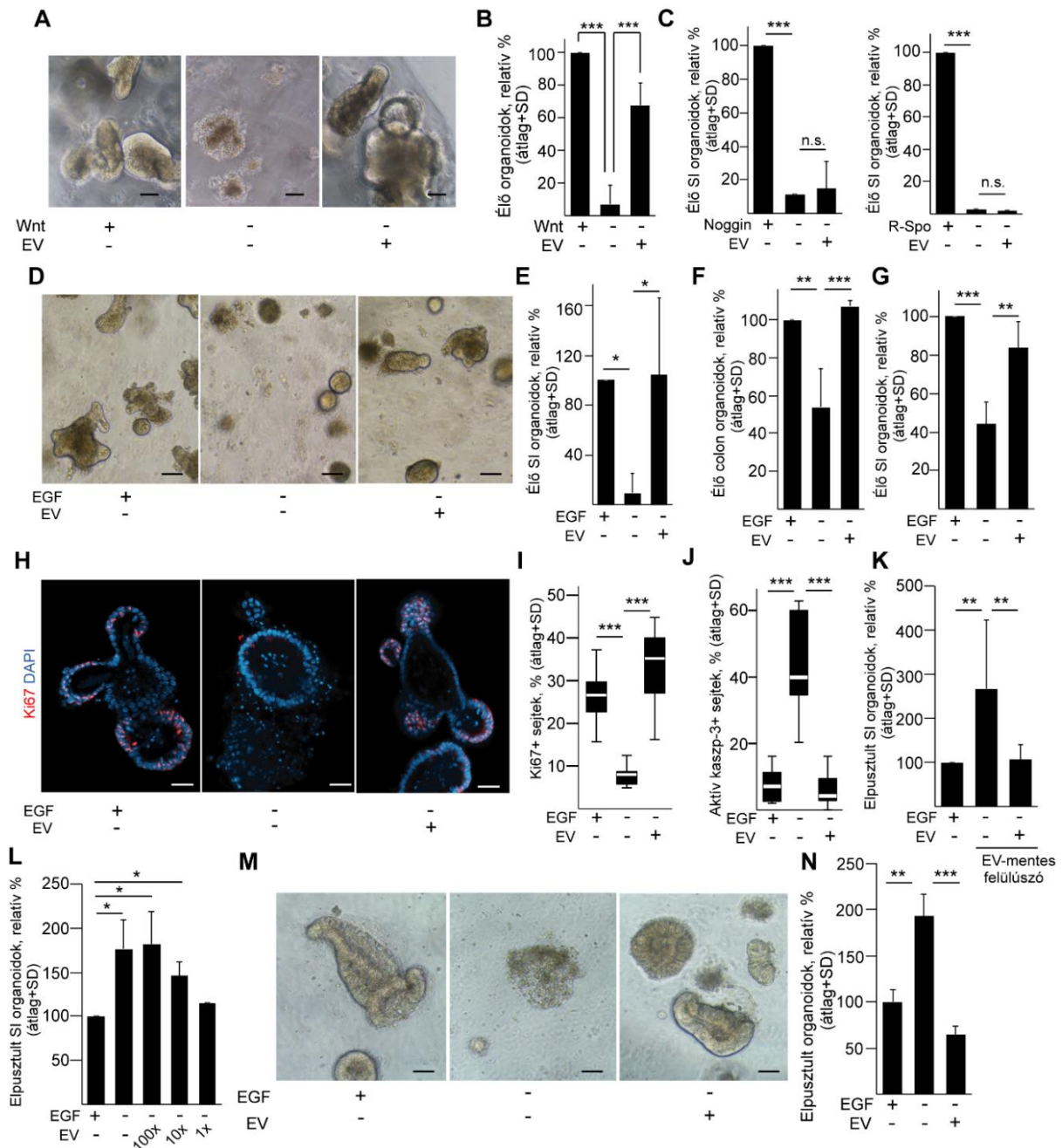
43. ábra. A fibroblaszt eredetű EV-k nem módosítják az ISCN-ben ható IFN γ vagy TNF α hatását. (A) Az elpusztult organoidok relatív aránya az összes lényeges niche faktor, valamint IFN γ (10 ng/ml) és HCF eredetű EV-k jelenlétében a 4. napon számolva (n=3). (B) A buborékszerű morfológiájú organoidok százalékos aránya a jelzett kezelések alkalmazásakor. TNF α -t (50 ng/ml) és HCF eredetű EV-eket használtunk 4 napig (n=4). (C) Az organoidokból származó aktív kaszpáz-3+ sejtek reprezentatív képei és azok kvantitatív értékelése (n=10-12, skála: 50 μ m). ANOVA-t Tukey post hoc teszttel (A, B), és Kruskal-Wallis próbát Dunn post hoc teszttel (C) alkalmaztunk.

A fibroblaszt eredetű EV-k EGF aktivitást közvetítenek az ISCN-ben

A Wnt faktorok erősen hidrofób molekulák, és a Wnt aktivitás magasabb, ha liposzómákhoz kötve adják őket [134]. Annak vizsgálatára, hogy egyes niche faktorok EV-khez kötve érik-e el a célsejteket, először az ISCN-ben lévő Wnt fehérjékre koncentráltunk. Ellentétben az SI organoidokkal, ahol a Paneth-sejtek Wnt fehérjét termelnek, a vastagbél organoidok –a Paneth-sejtek hiánya miatt- külső Wnt faktoroktól függenek [17]. A HCF eredetű EV-k jelentős menekítő hatást mutattak a vastagbél organoidok túlélésére, amikor a Wnt3a hiányzott a tenyésztő médiumból (44A-B. ábra), mely azt bizonyítja, hogy az EV-k hozzájárulnak a normál Wnt aktivitáshoz az ISCN-ben.

Annak tesztelésére, hogy a többi fontos ISC niche faktor is fibroblaszt eredetű EV-khez kötődve hat, az R-Spondin1-et, a noggint vagy az EGF-et egyesével eltávolítottuk a médiumból. Amint várható volt, a faktorok egyikének hiánya jelentősen csökkent organoid túléléshez vezetett már a 4. napon, ami az ISC aktivitás eltűnését mutatta (44C-E. ábra). Míg a fibroblaszt EV-k nem befolyásolták az organoidok R-Spondin1 vagy noggin hiányában megfigyelt csökkent túlélését (44C. ábra), a HCF EV-k jelentős menekítő hatást mutattak nem csak SI-ben, hanem vastagbél organoidokban is, ha az EGF-et elvontuk a médiumból (44D-F. ábra). Ezt a megfigyelést

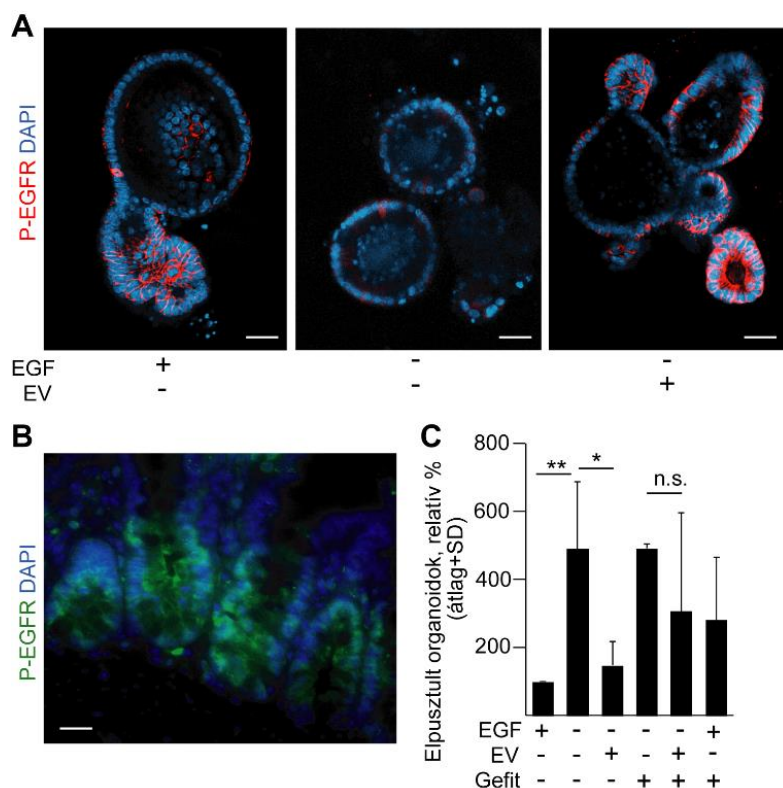
megerősítettük SI organoidokban MIF eredetű EV-kkel is (44G. ábra), ami arra utal, hogy mind a vastagbél, mind a vékonybél fibroblasztok képesek EGF aktivitást biztosítani.



44. ábra. A fibroblasztokból származó EV-k Wnt és EGF aktivitást továbbítanak az intesztinális őssejt niche-ben (ISCN). (A) Reprezentatív képek Wnt3a (100 ng/ml) és humán colon fibroblaszt (HCF) eredetű EV-k jelenlétében vagy hiányában (méretarány: 20 µm). (B) Az élő colon organoidok számának kvantifikálása 4 nap után (n=3). (C) A vékonybél (SI) organoidok túlélése 4 nappal a noggin vagy R-Spondin1 eltávolítása és/vagy HCF eredetű EV-k hozzáadása után. (D és E) Reprezentatív képek (D) SI organoidokról az EGF eltávolítása, vagy HCF eredetű EV-k hozzáadása után, valamint az eredmények kvantifikálása a 4. napon (E) (n=5). (F) Az élő colon organoidok aránya az adott kezeléseknél. Az EV-eket HCF felülűszökből izoláltuk (n=3). (G) Az élő SI organoidok mennyiségi meghatározása EGF hiányában, vagy eger vékonybél fibroblasztból (MIF) származó EV-k hozzáadása után. (H-I) Reprezentatív képek (H) és az SI organoidokban megfigyelhető Ki67+ proliferáló sejtek mennyiségi meghatározása (I) EGF hiányában, vagy HCF eredetű EV-k jelenlétében (n=10-12 három

kísérletből). (J) Az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek százalékos aránya SI organoidokban a jelzett kezelésekkel a 3. napon (n=10-12 három kísérletből). (K) Az elpusztult SI-organoidok relatív százalékos aránya ultracentrifugálás (UC) utáni HCF eredetű felülúszó alkalmazásakor. Az UC eltávolítja az EV-eket a felülúszóból. EGF-et vagy UC utáni EV-eket az EV mentesített UC felülúszóval adtuk az organoidokhoz (n=3). (L) Az elpusztult organoidok aránya, ha HCF eredetű EV-eket alkalmaztunk különböző hígításokban (1×, 10×, 100×) EGF hiányában. (M) Reprezentatív képek humán colon organoid tenyészetekből a jelzett kezelésekkel. Az EV-eket HCF eredetű kondicionált médiumból ultracentrifugáltuk. (N) Az elpusztult humán colon organoidok számszerűsítése (n=3). ANOVA és Tukey post hoc tesztet (B, N), Kruskal-Wallis tesztet és Dunn post hoc tesztet (I, J) vagy ANOVA-t és Tukey post hoc tesztet (C, E, F, G, K, L) alkalmaztunk. Méretarány: 50 µm, vagy 25 µm (M).

A fibroblaszt eredetű EV-k helyreállították továbbá a Ki67+ proliferáló és aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek arányát, amikor az EGF hiányzott a tápoldatból (44H-J. ábra). Ezen kívül az elpusztult organoidok százalékos arányának jelentős növekedését figyeltük meg, amikor a HCF-ből származó kondicionált médiumból eltávolítottuk az EV-eket, és amely helyreállt EV-k jelenlétében (44K. ábra). Ez arra utal, hogy az EGF aktivitás jelentős részben a fibroblaszt felülúszók EV tartalmához köthető. Mindemellett a HCF eredetű EV-k dóziszfüggő hatást mutattak az organoidok pusztulására EGF hiányában (44L. ábra). Érdekes módon a HCF eredetű EV-k akkor is megakadályozták az organoidok pusztulását, amikor az EGF humán colon organoid tenyészetekből hiányzott, mely azt bizonyítja, hogy az EGF aktivitás EV-ken keresztül a humán ISCN-ben is továbbítható (44M-N. ábra).

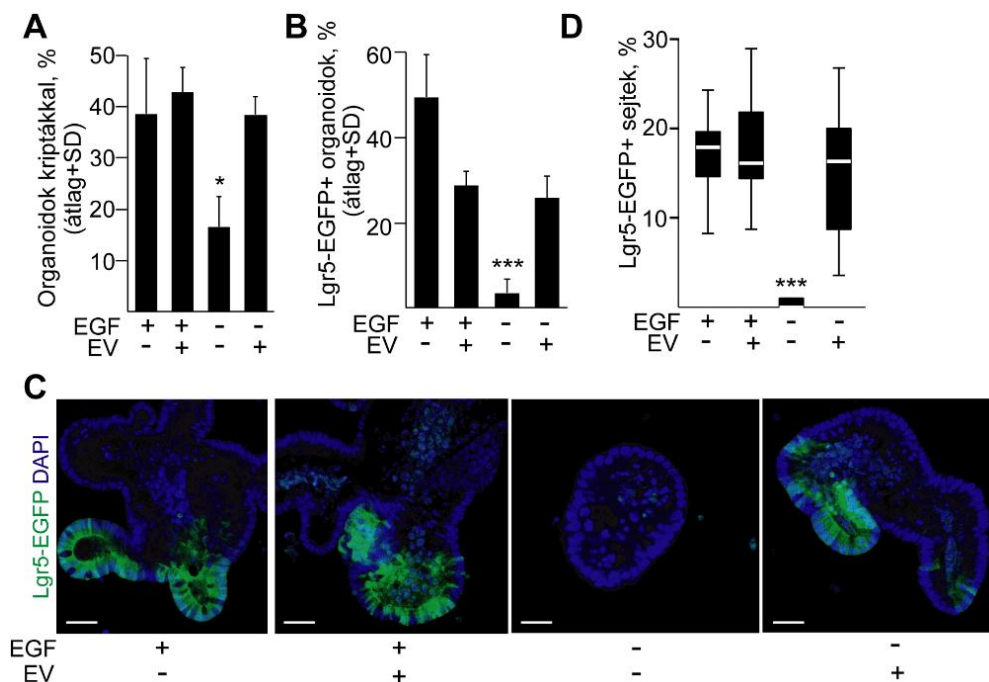


45. ábra. Az EGF receptor blokkolása gátolja a fibroblaszt eredetű EV-k hatását. (A) Konfokális felvételek foszfo-EGF receptorra immunfestett organoid tenyészetekből a jelzett kezelésekkel. Az EV-eket HCF tenyészetek kondicionált médiumából izoláltuk. (B) Foszfo-EGF receptor immunfestés egér

vékonybél metszetben. (C) Az elpusztult organoidok aránya a jelzett kombinációkkal való kezelés után. A gefitinibet 30 perccel a többi kezelés előtt alkalmaztuk 1 μ M-os koncentrációban (n=4). ANOVA és Tukey teszt (C). Méretarány: 50 μ m

Annak további bizonyítására, hogy az EGF aktivitást az ISCN-ben EV-k is továbbíthatják, immunfestést végeztünk foszforilált EGF receptorra, és ebben az esetben is megfigyeltük az EV-k menekítő hatását exogén hozzáadott EGF hiányában (45A. ábra). Várakozásunknak megfelelően egér bélszövet metszetekben a Lieberkühn kripták sejtei pozitivitást mutattak foszfo-EGF receptor immunfestésre (45B. ábra), mely igazolta a festési protokollunk specifitását. Emellett az EGF receptort gátló gefitinibet is alkalmaztuk kísérleteinkben. Hasonlóan az exogén módon hozzáadott EGF-hez, az inhibitor jelenléte is blokkolta az EV-k menekítő hatását (45C. ábra).

Ezután *Lgr5-EGFP-IRES-CreER* egerekből SI organoidokat izoláltunk, melyek az EGFP zöld fluoreszcens fehérjét fejezik ki az ISC-kben [19]. Annak érdekében, hogy az EGFP+ zöld ISC populáció mérete nagyobb legyen az SI organoidokban, mely megkönnyíti az ISC-k elemzését, a GSK3-at gátló, Wnt útvonalat aktiváló CHIR99021-et alkalmaztuk [135]. Amikor az EGF-et eltávolítottuk a tápoldatból, jelentős csökkenést tapasztaltunk a kriptaképző és az EGFP+ sejtet tartalmazó organoidok arányában, és a fibroblaszt eredetű EV-k menekítési hatást fejtettek ki (46A-B. ábra). Érdekes módon az EGFP+ sejtek teljesen eltűntek EGF hiányában, azonban továbbra is tudunk zöld sejteket detektálni az SI organoidokban HCF eredetű EV-k jelenlétében (46C-D. ábra). Kísérleteink tehát további bizonyítékkal szolgálnak arra nézve, hogy az EGF aktivitás jelentős részben az EV-ken keresztül továbbítódik az ISCN-ben.

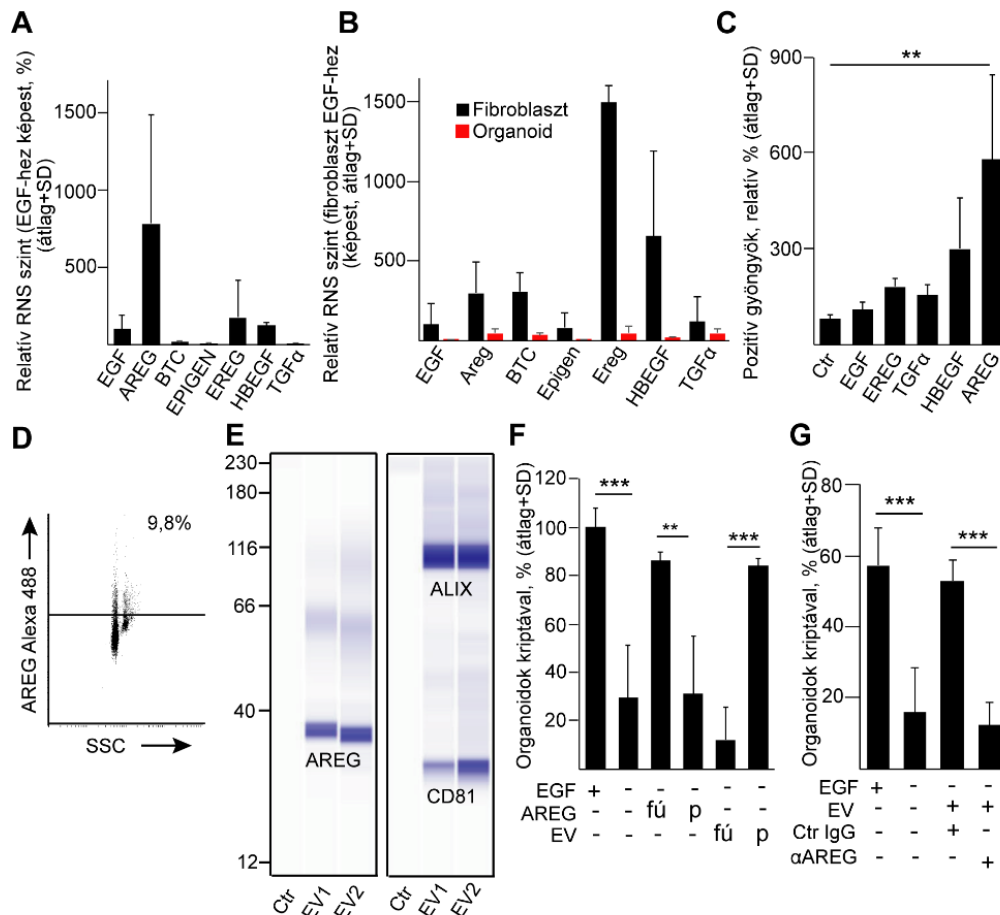


46. ábra. A fibroblasztokból származó EV-k menekítik az Lgr5-EGFP+ intesztinális őssejtpopulációt EGF hiányában. (A) A kettőnél több kriptával rendelkező Lgr5-EGFP organoidok százalékos aránya a 4. napon a jelzett kezelések után. Az EV-eket HCF-ből izoláltuk (n=4). (B) Az EGFP+ sejteket tartalmazó organoidok aránya (n=4). A Wnt útvonalat aktiváló CHIR99021-et a kezelések előtt 3 nappal alkalmaztuk. (C) Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek, melyek az EGF eltávolítása és/vagy az EV-k hozzáadása után készültek (méretarány: 50 µm). (D) Az EGFP+ sejtek százalékos aránya az organoidokban (n=10-11 három kísérletből). ANOVA-t és Tukey post hoc tesztet (A, B), vagy Kruskal-Wallis és Dunn post hoc tesztet (D) alkalmaztunk.

A fibroblaszt eredetű EV-k amfiregulint továbbítanak az ISCN-ben

RNS elemzésünk azt mutatta, hogy mind a HCF-ek, mind a MIF-ek az EGF család tagjainak széles skáláját expresszálták, mint például az EGF, a bétacellulin, az amfiregulin, az epiregulin és a HBEGF, bár az egyes EGF családtagok relatív mRNS szintje az egér és a humán sejtek között eltérést mutatott (47A-B. ábra). Ezzel szemben ezeknek a fehérjéknek az RNS szintje nagyon alacsony volt, vagy egyáltalán nem volt kimutatható SI organoidokban (47B. ábra). A fibroblaszt tenyészetekből anti-CD63 antitesttel bevont gyöngyökkel izolált EV-k amfiregulinra pozitívnak bizonyultak (47C-D. ábra), és kapilláris alapú Western-blottal is kimutattuk az amfiregulint a HCF eredetű, EV-ben feldúsított ultracentrifugált üledékben (47E. ábra). Kísérleti eredményeink tehát arra utalnak, hogy az EGF család tagjai közül legalább az amfiregulint a fibroblaszt eredetű EV-k szállítják az ISCN-ben. Gyöngyökön alapuló vizsgálataink azt is megerősítették, hogy az UC utáni üledékben megfigyelhető EGF aktivitás nem az EV izolálás során fellépő szennyezési műtermékek köszönhető. További kísérletként amfiregulint adtunk a tápoldathoz, majd az UC után a felülúszót és az üledéket SI organoid tenyészetekben alkalmaztuk. Érdekes módon ebben az esetben csak a felülúszónak volt menekítő hatása az organoidok pusztulására, ami azt mutatja, hogy az exogén módon hozzáadott amfiregulin nem centrifugálódott le aspecifikus módon a kísérletekben (47F. ábra).

Az EGF családtagok ellen általunk használt antitestek a növekedési faktorok extracelluláris doménjeit ismerik fel, ami arra utal, hogy az EV-k által szállított amfiregulin képes lehet a receptorához kötődni. Amikor az amfiregulint neutralizáló ellenanyaggal blokkoltuk fibroblaszt eredetű EV-kben, mielőtt azokat az organoidokhoz adtuk volna EGF aktivitás hiányában, jelentős csökkenést figyeltünk meg a kriptaképző organoidok arányában, ami a csökkent őssejtaktivitást mutatja (47G. ábra). Összességében a fibroblasztokból származó EV-k aktív amfiregulint szállítanak EGF aktivitásként az ISCN-ben.

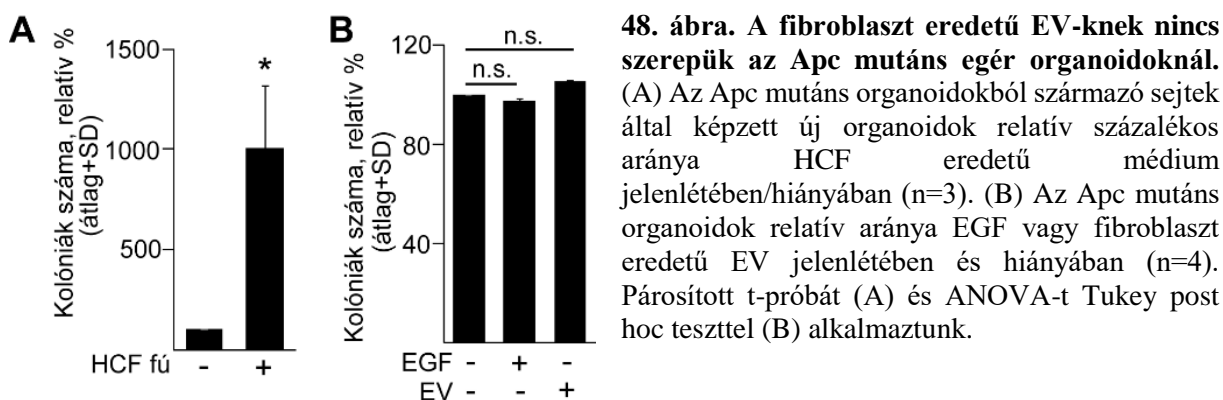


47. ábra. Az EGF családtagok jelen vannak az EV-ken. (A) Az EGF család tagjainak relatív RNS szintjei HCF-ben (RT-qPCR). A *HPRT1* háztartási génre normalizált expressziós szinteket összehasonlítottuk az *EGF* relatív szintjével. (B) Az EGF család tagjainak expressziós szintje MIF- és vékonybél organoidokban. A MIF-ekben a háztartási kontrollra normalizált *Egf* RNS-t 100%-nak vettük (n=3, RT-qPCR). (C-D) A pozitív anti-CD63 bevonatú gyöngyök relatív százalékos aránya HCF eredetű EV-kkel való inkubálás után, az adott EGF családtagok elleni antitestekkel való kimutatás után (C), valamint egy reprezentatív áramlási citometriás mérés anti-amfifiregulin (AREG) antitest használatakor (D). Az EV-eket UC után PBS-ben szuszpendáltuk a gyönggyel való izolálás előtt (n=3, ctr: minta kontroll primer antitesttel). (E) Kapilláris WES immunblot elemzés két HCF eredetű ultracentrifugált mintából (EV1, EV2) AREG-re (34 kDa) és EV-markerekre (CD81: 29 kDa, ALIX: 108kDa). A kontroll minta sejtmentes médiumból készült. (F) A kriptát tartalmazó organoidok százalékos aránya, amikor amfifiregulin tartalmazó médiumot (AREG, 50 ng/ml), vagy HCF eredetű mintákat (EV) ultracentrifugáltunk, és a felülúszót (fú), vagy a pelletet (p) alkalmaztuk (n=3). Az AREG-et nem tudtuk a médiumból ultracentrifugálni. (G) A kriptát tartalmazó organoidok aránya, amikor a HCF eredetű EV-eket kontroll, vagy neutralizáló anti-amfifiregulin antitesttel előinkubáltuk az organoidokon való alkalmazásuk előtt (n=5). ANOVA és Tukey post hoc teszt.

A fibroblaszt eredetű EV-knek nincs szerepük az ISCN fenntartásában olyan modellben, ahol az EGF nélkülözhető

Az egér intesztinalis adenóma organoidok függetlenek az ISC niche faktoroktól, beleértve az EGF család tagjait is [16]. A fibroblaszt eredetű EV-k szerepének egy EGF független modellben való tanulmányozásához *Apc* mutáns SI organoidokat használtunk, melyeket korábban a

CRISPR-Cas9 technológiával hoztunk létre (ld. fentebb). Míg a HCF eredetű felülúszó drámai hatással volt az *Apc* mutáns sejtek kolóniaképző hatékonyságára (48A. ábra), ez a növekedés sem az EGF-nek, sem az EV-knek nem volt tulajdonítható (48B. ábra), melyet az UC utáni felülúszó, vagy üledék hozzáadásával bizonyítottunk. Az EGF-hez hasonlóan tehát a fibroblaszt eredetű EV-knek is fontos szerepük van a normál ISCN fenntartásában, de nélkülözhetők EGF független adenómasejtek számára.



Megbeszélés: az erősen hidrofób Wnt fehérjék kritikus faktorok az ISCN-ben. Farin és munkatársai azt találták, hogy az ISC-k plazmamembránja Wnt fehérjékben gazdag, a termelő és a fogadó sejtek közötti átvitelt azonban nem azonosították [136]. Mások bizonyították, hogy a Wnt fehérjék EV-ken keresztül utazhatnak az intercelluláris térben [137], melyet már számos modellben igazoltak, például tüdőfibrózisban vagy szívbetegségekben [138-140]. A Wnt-k kötődhetnek lipoproteinekhez, amelyek szintén stabilizálják őket [134, 141]. Érdekes módon a makrofágokból származó EV-k Wnt fehérjéket hordoznak az ISC-k számára a bélhám regenerációja során [142]. Vizsgálatainkkal bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a fibroblaszt eredetű EV-k Wnt aktivitást hordoznak az ISCN-ben a WT-organoidok esetében is.

Az EGF család tagjai membránhoz kötött molekulákként szintetizálódnak, majd proteázok általi hasítás után szecernálódhatnak. Érdekes módon az EGF család tagjai, beleértve az amfiregulint is, parakrin, autokrin és juxtakrin módon hatnak [143, 144]. Eredményeink megegyeznek egy korábbi publikációval, amely azt mutatta be, hogy az EGF család egyes tagjait, például az amfiregulint az EV-k szállítják, valamint az amfiregulin teljes hosszúságú, membránhoz kötött formaként van jelen az EV-ken [145]. Az EV-kötött amfiregulin és a HBEGF továbbá hozzávetőleg ötször hatékonyabb a rekombináns fehérjékhez képest [145]. Vizsgálataink szolgáltatják az első bizonyítékot a fibroblaszt eredetű EV-k szerepére az EGF aktivitás, mint például az amfiregulin átvitelére nem tumoros sejtek között organoid rendszerben, mely az ISCN modelljeként szolgál. Mivel a neutralizáló ellenanyag blokkolta a

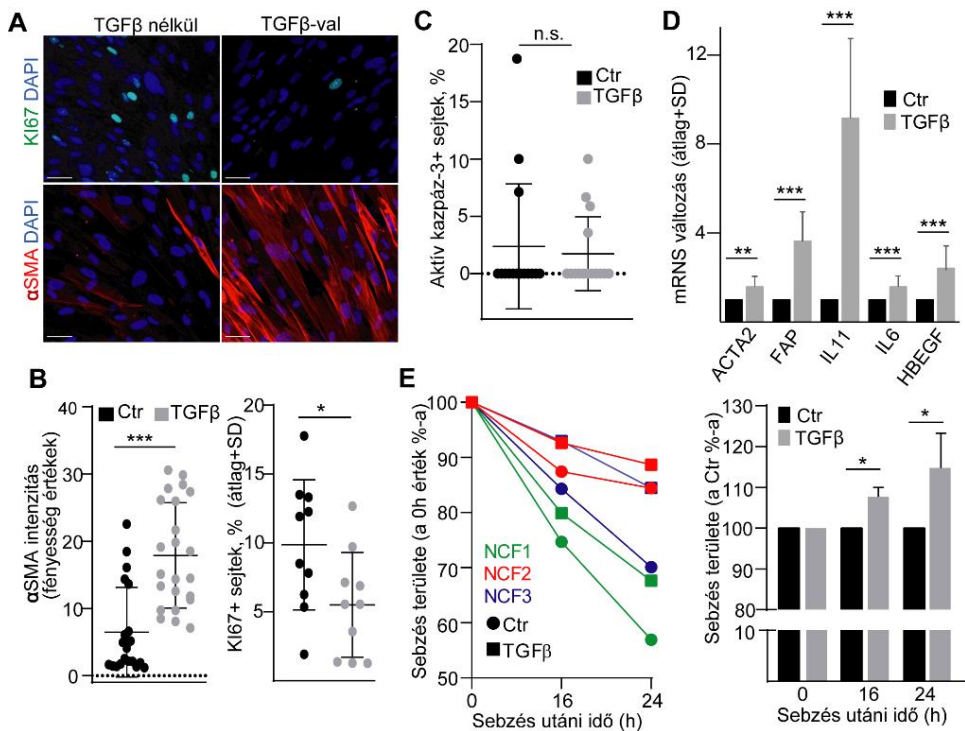
fibroblaszt eredetű EV-k hatásait, ez azt jelzi, hogy az amfiregulin megfelelő orientációban van jelen az EV-k felületén. Adataink összességében tehát azt mutatják, hogy a vastagbél és vékonybél fibroblaszt eredetű EV-k EGF családtagokat (pl. amfiregulin) hordoznak, amelyek az ISC-k niche faktoraként működnek. Az EV-k ezáltal hozzájárulnak az ISC fenotípus fenntartásához. Mivel a niche faktorok biztosítása nem csak a homeosztázis, hanem a bélhám sérülései után is fontos, az EV-k új eszközként járulhatnak hozzá jobb regenerációs stratégiák kidolgozásához azáltal, hogy niche faktorokat szállítanak az ISCN zavarával járó betegségekben.

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

Eredményeink alapján tehát a fibroblasztokból származó EV-k EGF aktivitást közvetítenek amfiregulin (AREG) szállítása által. 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 AREG transzportja fontos mechanizmus lehet-e a CRC kialakulásában is.

A fibroblasztok aktiválása nem módosítja az EV kibocsátás intenzitását

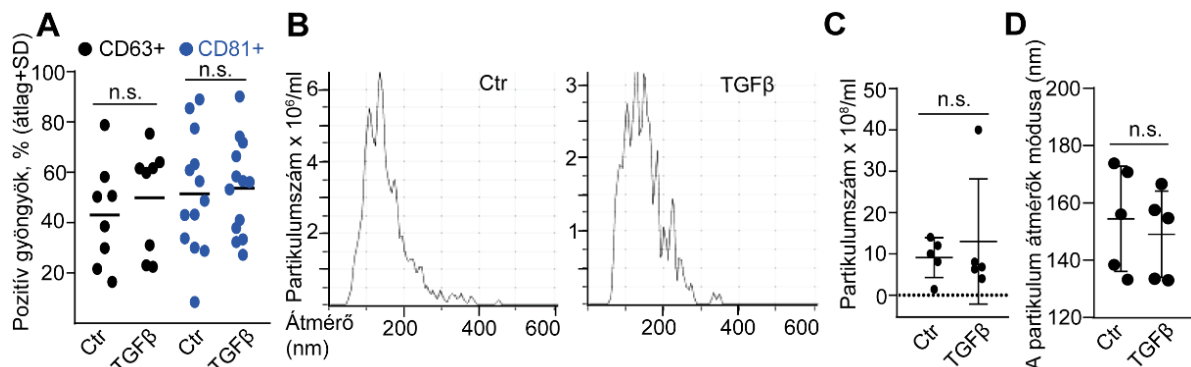
A tumorokban lévő fibroblasztok jellegzetes génexpressziós profillal jellemezhetők, és ezek a tumor-asszociált fibroblasztok (CAF) aktivált állapotban vannak. A TGF β kritikus szerepet játszik a vastagbél fibroblasztok aktiválásában, indukálja például az áttétképzés kezdeti lépéseit azáltal, hogy serkenti az IL11 szekréciót a fibroblasztokból [36]. Annak érdekében, hogy az aktivált fibroblasztok által kibocsátott EV-knek a CRC sejtekre gyakorolt hatását tanulmányozhassuk, először a már korábban említett normál humán vastagbél fibroblasztokat (NCF) alkalmaztunk, melyeket TGF β -val aktiváltunk. Amint azt korábban már publikálták, a TGF β csökkentette a KI67+ proliferáló sejtek arányát [37], és növelte az α SMA expresszió intenzitását, amely a bél myofibroblasztjainak általános markere (49A-B. ábra). Ugyanakkor nem találtunk változást az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek százalékos arányában (49C. ábra). Várakozásainknak megfelelően az *FAP*, az *ACTA2* (mely az α SMA-t kódolja), az *IL6*, az *IL11* és a *HBEGF* RNS szintjének növekedését figyeltük meg, mely bizonyította, hogy a TGF β kezelés jellegzetes transzkripciós változásokhoz vezetett (49D ábra). Emellett a TGF β nagyobb sebzési területet eredményezett sebgyógyulási vizsgálatunkban (49E ábra), amely az NCF-ek csökkent migrációját mutatja.



49. ábra. A TGFβ aktiválja a normál colon fibroblasztokat (NCF). (A-B) NCF-

ek KI67 és αSMA immunfestése TGFβ-val való kezelés után vagy anélkül (4 nap). Konfokális mikroszkópos képek (A) és kvantifikálásuk (B). Az αSMA intenzitást az ImageJ szoftverrel határoztuk meg. (C) Az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus NCF sejtek aránya kontroll vagy TGFβ kezelt mintákban immuncitokémia és konfokális mikroszkópos képek alapján. (D) Az adott RNS-ek változása NCF-ekben (RT-qPCR, n=6, párosított minták). (E) Relatív sebzési terület a kezdeti értékhez (bal oldal) és a kezletlen minták területéhez képest különböző időpontokban (jobb panel) konfluens fibroblaszt tenyészetekben (párosított minták). Az adatokat három ismétlésből nyertük (B-C). Mann-Whitney U-próbát (B, C) vagy párosított t-tesztet (D, E) alkalmaztunk. Méretarány: 50 μm (A).

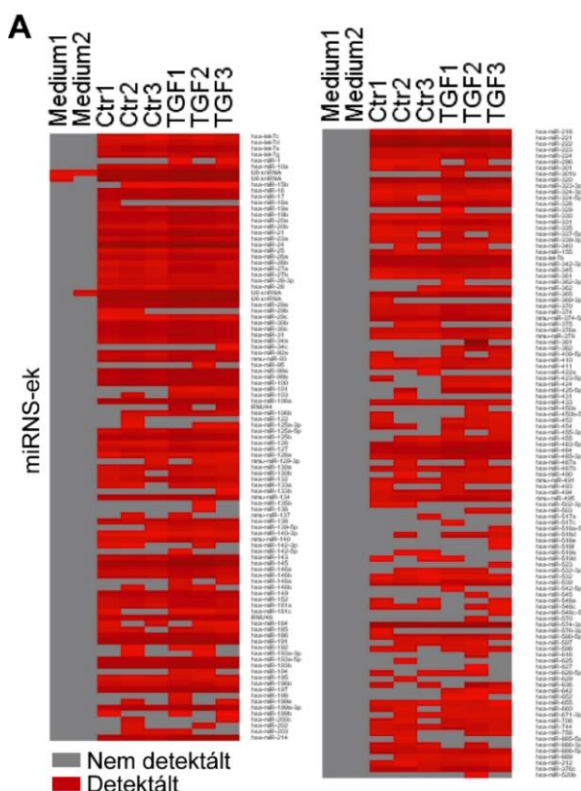
Ellenanyaggal fedett gyöngyök alkalmazásával nem találtunk megnövekedett CD81+ vagy CD63+ EV szintet TGFβ alkalmazása után (50A. ábra), az NTA szintén nem mutatott eltérést az EV-k koncentrációjában, és nem módosult az EV méreteloszlás sem a kezelés hatására (50B-D. ábra). Minthogy az adatokat sejtszámra normalizáltuk, ezáltal kizártuk annak a lehetőségét, hogy a TGFβ kezelés után a proliferáló sejtek százalékos arányának változása befolyásolja következtetéseinket. Így eredményeink azt mutatják, hogy a TGFβ által indukált NCF aktivációnak nincs jelentős hatása az EV szekrécióra.



50. ábra. A TGFβ nincs hatással a normál colon fibroblasztokból (NCF) származó EV-k mennyiségére. (A) A pozitív gyöngyök százalékos aránya kontroll vagy TGFβ-val kezelt (10 ng/ml, 4 nap) NCF kondicionált médiumban történő inkubálás után (sejtszámra normalizálva). (B–D) Reprezentatív képek (B), az EV-k koncentrációja (C, 100 000 sejtre normalizálva) és méretük módusa (D) a kontroll és a TGFβ-val kezelt NCF felülszókban (NTA). Mann–Whitney U-próba.

A TGFβ által indukált fibroblaszt aktiváció módosítja az EV-k miRNS cargo-ját

Az NCF-ek aktiválása során az EV-k cargo változásának meghatározásához először a miRNS-ekre koncentráltunk. Korábban igazoltuk, hogy az antitesttel bevont gyöngyökkel izolált EV-ekből származó miRNS preparátumok kisebb nem specifikus miRNS-háttérrel rendelkeznek más módszerekhez képest (ld. fentebb). Így miRNS elemzésünkhöz anti-CD63-mal és anti-CD81-



B

Csak a TGF mintákban jelen
miR-101
miR-382
miR-424
miR-642

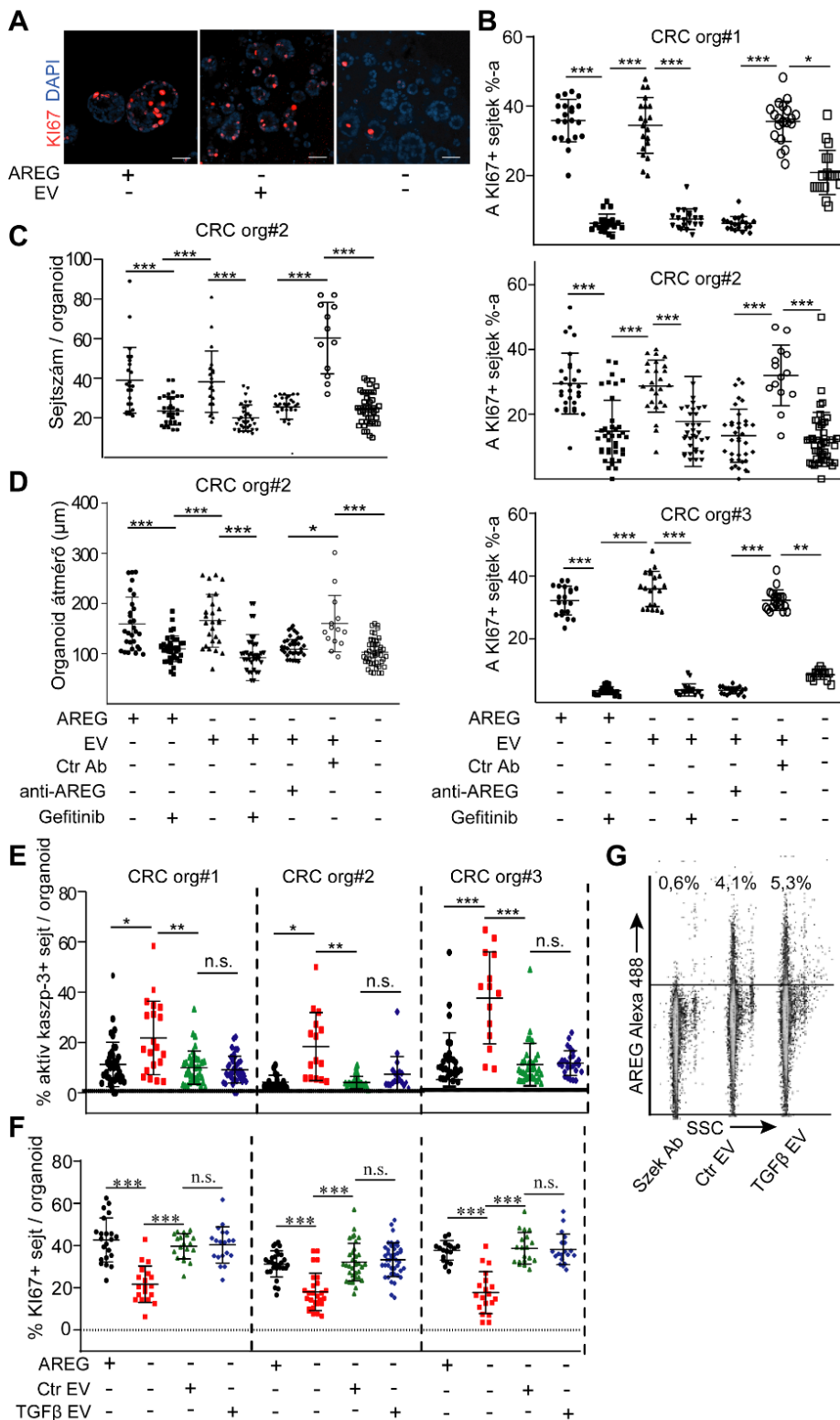
gyel bevont gyöngyöket alkalmaztunk. A 377 miRNS-t elemző szűrés 209 miRNS-t mutatott ki a hat vizsgált minta közül legalább az egyikben (51A. ábra). Érdekes módon azt találtuk, hogy négy miRNS (hsa-miR-101, 382, 424 és 642) csak a TGFβ-val kezelt sejtekből származó EV-mintákban volt jelen (51B. ábra). Így az NCF aktiválása kis mértékben, de megváltoztatja az EV cargo miRNS profilját.

51. ábra. A TGFβ kis mértékben módosítja az NCF-eredetű fibroblaszt EV-k miRNS profilját. (A) miRNS-ek jelenléte/hiánya a kezeletlen/kezelt NCF EV mintákban. Csak azok a miRNS-ek láthatók, amelyek legalább az egyik mintában jelen voltak. (B) miRNS-ek, melyek minden TGFβ-val kezelt mintában jelen voltak, és hiányoztak minden kontrollból.

A fibroblasztokból származó EV-k serkentik a CRC sejtek osztódását AREG transzportálása által, a TGFβ hatásától függetlenül

Adataink szerint az EGF család legalább egyik tagja, az AREG, fibroblaszt eredetű EV-ken keresztül utazik az őssejt niche-ben (ld. fentebb). Így az EV-k fontosak lehetnek a csak WT KRAS-t és BRAF-ot tartalmazó, egyben EGF-függő organoidok számára olyan esetekben, amikor nincsenek jelen az EGF család tagjai más forrásból. Először NCF eredetű EV-eket adtunk

a betegekből származó, EGF-függő organoid vonalainkhoz. AREG hiányában jelentős csökkenést figyeltünk meg a KI67+ proliferáló organoid sejtek százalékában, amelyre az NCF eredetű EV-k menekítési hatást gyakoroltak (52A-B. ábra).



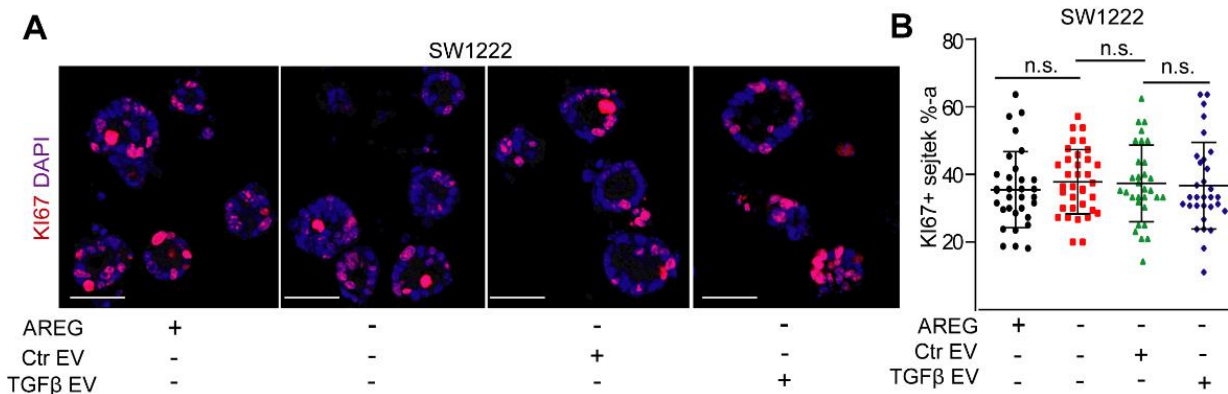
52. ábra. Az NCF eredetű EV-k AREG transzportálása által a CRC organoid sejtek proliferációját indukálják. (A, B) Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek (A) és a KI67+ sejtek mennyiségi meghatározása (B) CRC beteg eredetű organoid vonalakban. $2,5 \times 10^7$ NCF eredetű EV-t

alkalmaztunk. (C, D) A CRC organoidok sejtszáma (C) és átmérője (D). (E) Az aktív kaszpáz-3+ sejtek százalékos aránya a CRC organoid vonalakban AREG, kontroll vagy TGFβ kezelt NCF eredetű EV-k jelenlétében vagy hiányában. (F) Az NCF eredetű EV-k hatása a CRC organoidokra. Az NCF-eket TGFβ-val előkezeltük (TGFβ EV), vagy kezeletlenül tenyésztettük az EV-k összegyűjtése előtt (Ctr EV). (G) AREG kimutatása kontrollból (Ctr EV) vagy TGFβ-val kezelt NCF-ekből (TGFβ EV) izolált és latex gyöngyökhöz kötött EV-ken (áramlási citometria). Kruskal–Wallis és Dunn teszt. Méretarány: 100 μm (A).

Továbbá az EGF-receptor blokkolása a gátló gefitinib által, vagy az EV-k előinkubálása neutralizáló anti-AREG antitesttel gátolta az EV-k hatását (52B-D. ábra), mely bizonyította az EV-hez kötött AREG kritikus szerepét a CRC sejtekben proliferációjában. Ezzel párhuzamosan az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus organoid sejtek aránya megnőtt AREG hiányában, és ezt a hatást a kontroll vagy TGFβ-kezelt NCF-eredetű EV-k menekítették (52E. ábra). Érdekes módon nem figyeltünk meg különbséget a KI67+ sejtek százalékos arányában, amikor a CRC organoidokat azonos számú kontroll, vagy TGFβ-aktivált NCF-ből izolált EV-vel kezeltük (52F. ábra). Az AREG mind a kontroll, mind pedig az aktivált NCF-eredetű EV-ken jelen volt, melyet az EV-eket megkötő gyöngyök, anti-AREG and áramlási citometria segítségével mutattunk ki (52G. ábra). Bár a TGFβ tehát az EV-k miRNS cargo-ját kis mértékben megváltoztatta, ez azonban nem volt hatással a CRC sejtek proliferációjára, és mind a kontroll, mind pedig az aktivált fibroblasztokból származó EV-k AREG-függő CRC sejtproliferációt indukáltak EGF aktivitástól függő organoidokban.

Az EV-k nem módosítják az EGF-független CRC sejtek osztódását

Következő lépésként egy olyan 3D CRC sejttes modellrendszert teszteltünk, amely független az EGF aktivitástól. Az SW1222 sejtek által 3D alkotott megakoloníák hasonlítanak az organoidokhoz, és ezeknek a sejteknek nincs szükségük az EGF család tagjaira. Várakozásunknak megfelelően a rekombináns AREG nem növelte meg a KI67+ sejtek arányát, és sem a kontroll, sem a TGFβ-aktivált NCF eredetű EV-k nem módosították a proliferáló sejtek számát (53A-B. ábra). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a fibroblasztok által kibocsátott EV-k nincsenek hatással a CRC sejtek proliferációjára, ha az EGF aktivitás nélkülözhető.

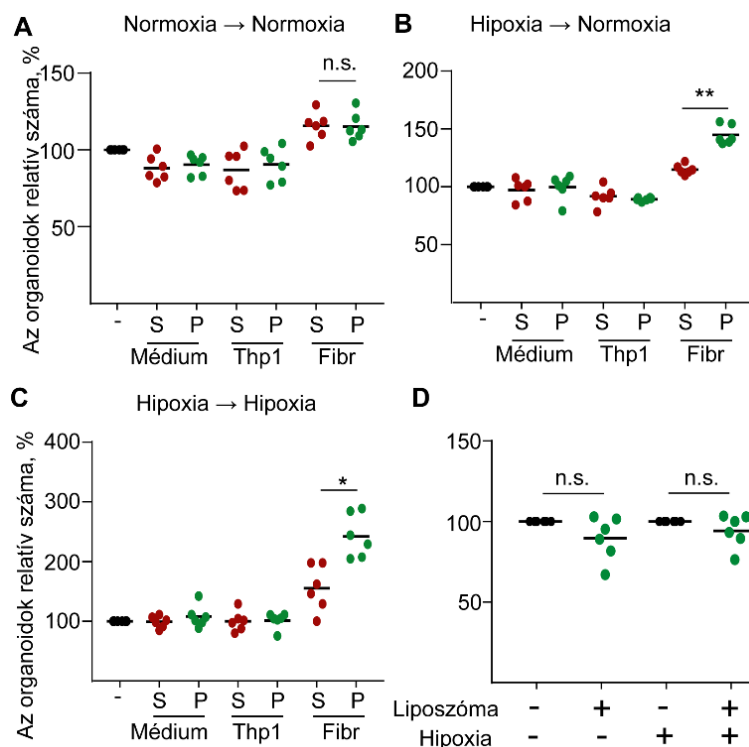


53. ábra. Az EV-k nem módosítják a CRC sejtek osztódását EGF-független 3D modellben. (A, B) A KI67+ sejtek százalékos aránya az SW1222 sejtekből származó kolóniákban a jelzett kezelések jelenlétében. Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek (A) és kvantitatív értékelésük (B). Az EV-eket kontroll vagy TGFβ-val kezelt NCF tenyészetekből izoláltuk. Kruskal–Wallis és Dunn teszt. Méretarány: 50 μm.

A normoxiás fibroblasztokból izolált EV-knek nincs hatásuk EGF-független organoidokban külső EGF jelenlétében

További kísérleteinkben normoxia vagy hipoxia alatt növesztett humán vastagbél fibroblasztokból EV-t izoláltunk, majd EGF-független 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 (54A-C. ábra), és ezt a jelenséget EV-mentes felülúszóval nem tudtuk kimutatni. A leukémiás beteg eredetű THP-1 monocita sejtvonalból, mint negatív kontrollból izolált EV-knek, illetve a liposzómáknak nem volt hatása (54A-D. ábra), ami arra utal, hogy a nagyobb organoidképzési hatékonyság specifikusan a fibroblaszt EV-khez kapcsolódik hipoxiában. Bár hipoxia esetében a fibroblaszt EV-knek EGF aktivitás-független hatásuk is volt kísérleteinkben, normoxiás fibroblasztokból származó EV-k esetében ezt nem figyeltük meg EGF-független

organoidoknál külsőleg adott EGF jelenlétében.

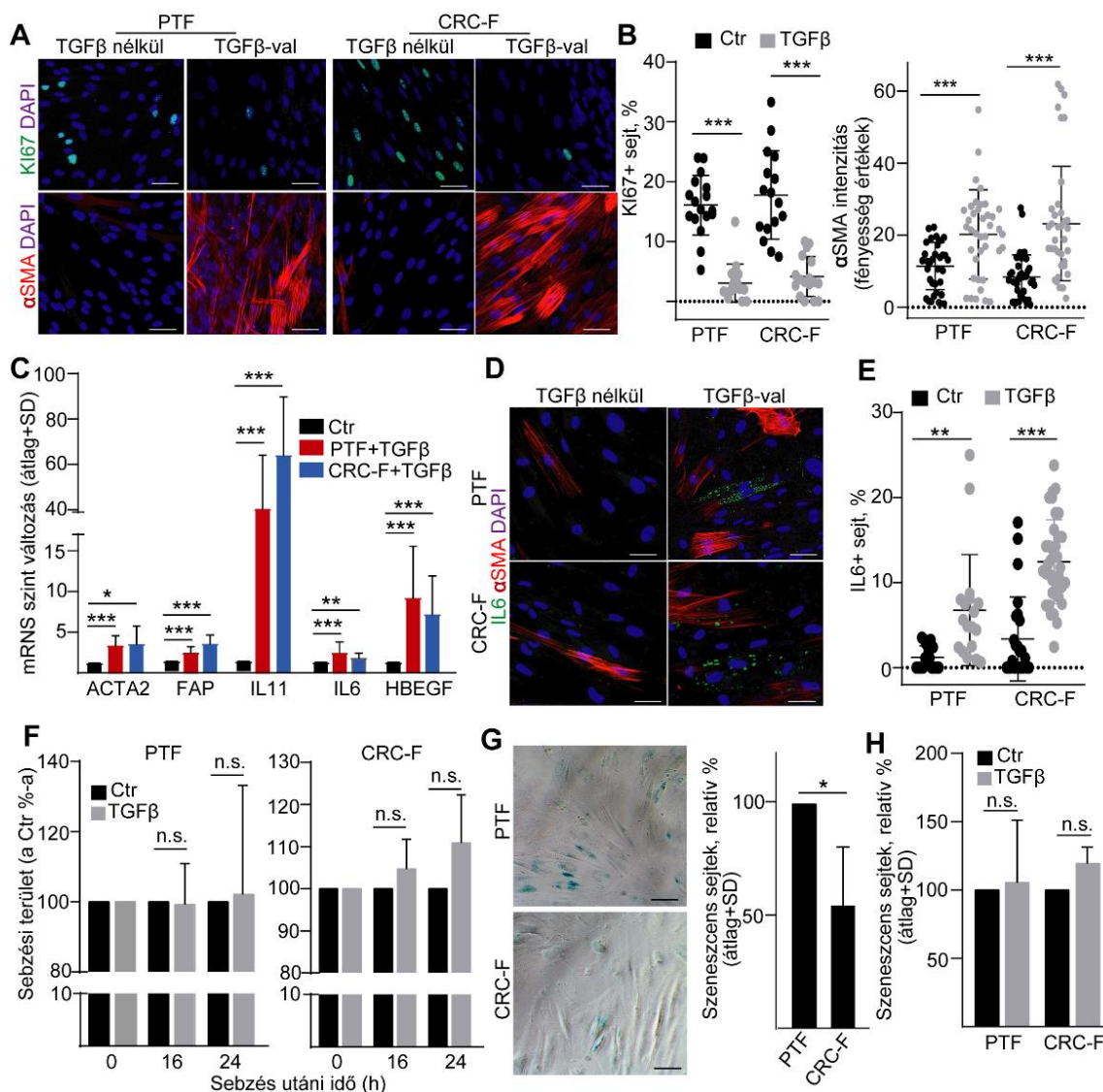


54. ábra. Normoxiás fibroblasztokból származó EV-k nem indukálják az EGF-független CRC sejtek organoid képzését külsőleg adott EGF jelenlétében. A Thp-1 sejtek vagy fibroblaszt tenyészetekből (Fibr) származó kondicionált médiumból az EV-eket 2 nap után izoláltuk ultracentrifugálással (UC), majd az UC utáni EV-ben szegény felülúszót (S) vagy az EV-ben gazdag pelletet (P) alkalmaztuk. Kontrollként sejtmentes médiumot használtunk. A normoxiás (A) vagy hipoxiás állapotból (B-C) származó mintákat ezután CRC organoid sejtekkel teszteltük, és az organoidképzést 4 nap elteltével mértük normoxiában

(A-B) vagy hipoxiában (C). Három CRC organoid vonalat kétszer teszteltünk (Kruskal–Wallis és Dunn post hoc teszt). (D) Új organoidok száma 1×10¹¹ liposzómával végzett kezelés után. Minden kísérletben az eredményeket a kezeltlen kontrollhoz hasonlítottuk. A liposzómákat 2 napig normoxiában vagy hipoxiában inkubáltuk, hozzáadtuk a CRC organoid sejtekhez, és az organoid képződést normoxiában vagy hipoxiában teszteltük.

A TGFβ nem módosítja az EV kibocsátást CRC beteg eredetű fibroblasztokban

Eredményeinknek egy másik modellrendszerben való bizonyítására a betegek peritumorális (normál) vastagbélmintáiból (PTF) és CRC szövetéből (CRC-F) is fibroblaszt tenyészeteket hoztunk létre. Az NCF-ekhez hasonlóan a TGFβ csökkentette a proliferáló sejtek arányát és növelte az αSMA expresszió intenzitását, amely a bél miofibroblasztjainak általános markere mind a CRC-F-ekben, mind pedig a PTF-ekben (55A-B. ábra). Továbbá az *FAP*, *ACTA2*, *IL6*, *IL11* és *HBEGF* megnövekedett RNS szintjét figyeltük meg (55C. ábra). Az NCF-ekkel ellentétben a TGFβ az IL6+ sejtek megjelenését indukálta mind a PTF, mind a CRC-F esetében (55D-E. ábra), ami sejtes heterogenitást eredményezett a fibroblaszt tenyészetekben.

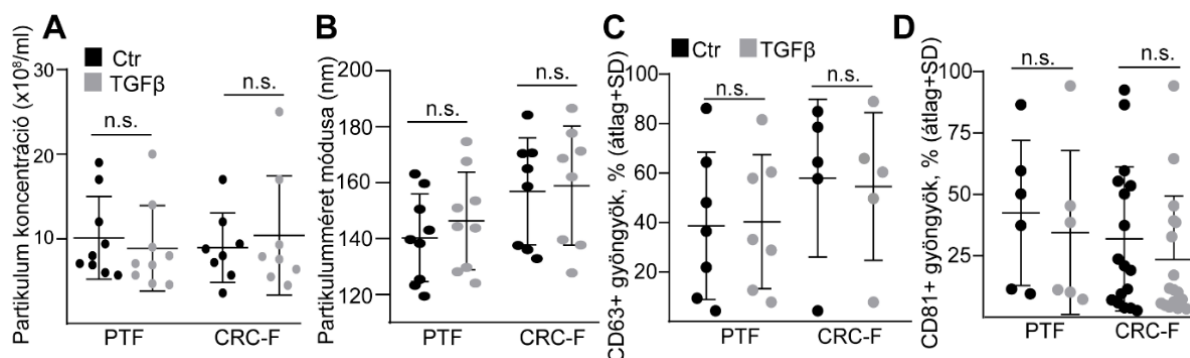


55. ábra. A TGFβ mind a PTF-eket, mind pedig a CRC-F-eket aktiválja. (A, B) αSMA és KI67 immunfestés kontroll és TGFβ-kezelt (4 nap) PTF-ek vagy CRC-F-ek esetében (konfokális mikroszkópia; (A) és ezek mennyiségi meghatározása (B)). Az αSMA expressziós intenzitását az ImageJ szoftverrel határoztuk meg. (C) A jelzett mRNS-ek szintjének változása a TGFβ-val kezelt fibroblasztokban a kezetlen kontrollokhoz képest (RT-qPCR, n=4). Páronkénti összehasonlítást végeztünk a kontroll és a kezelt minták között. (D) IL-6 és αSMA kimutatása PTF-ekben és CRC-F-

ekben. (E) Az IL6+ sejtek aránya a jelzett kezelések után. (F) A TGFβ-val kezelt fibroblasztok relatív sebzési területe a kontroll konfluens fibroblaszt tenyészetekhez képest (n=3). (G–H) A SA-β-galaktozidáz aktivitással rendelkező sejtek aránya. Reprezentatív mikroszkópos képek (G) és ezek mennyiségi értékelése (G-H, n=3, párosított minták). Mann–Whitney U-próbát (B, E) vagy párosított t-tesztet (C, F, G, H) alkalmaztunk. Méretarány: 50 μm.

A fibroblaszt tenyészetek TGFβ-ra adott válaszanak további jellemzése érdekében sebgyógyulási vizsgálatot is végeztünk. Érdekes módon nem észleltünk különbséget a sebzés területén a TGFβ kezelés után sem PTF-ekben, sem CRC-F tenyészetekben (55F. ábra). Ezenkívül a CRC-F-ek esetében kevesebb sejt mutatta a sejt szenescenciára jellemző szenescencia-asszociált (SA)-β-galaktozidáz aktivitást, mint a párosított PTF mintákban (55G. ábra). A TGFβ egyik fibroblaszt alpopulációban sem volt hatással a szenescens sejtek arányára (55H. ábra).

Mindemellett NTA-val, valamint anti-CD63-mal és anti-CD81-gyel bevont gyöngyökkel elvégzett vizsgálataink szerint a TGFβ által indukált fibroblaszt aktiválás nem módosította a kibocsátott EV-k mennyiségét sem PTF-ekben, sem CRC-F-ekben (56A–D. ábra). Összefoglalva tehát azt találtuk, hogy a TGFβ hasonló változást indukált mind PTF-ekben, mind CRC-F-ekben.

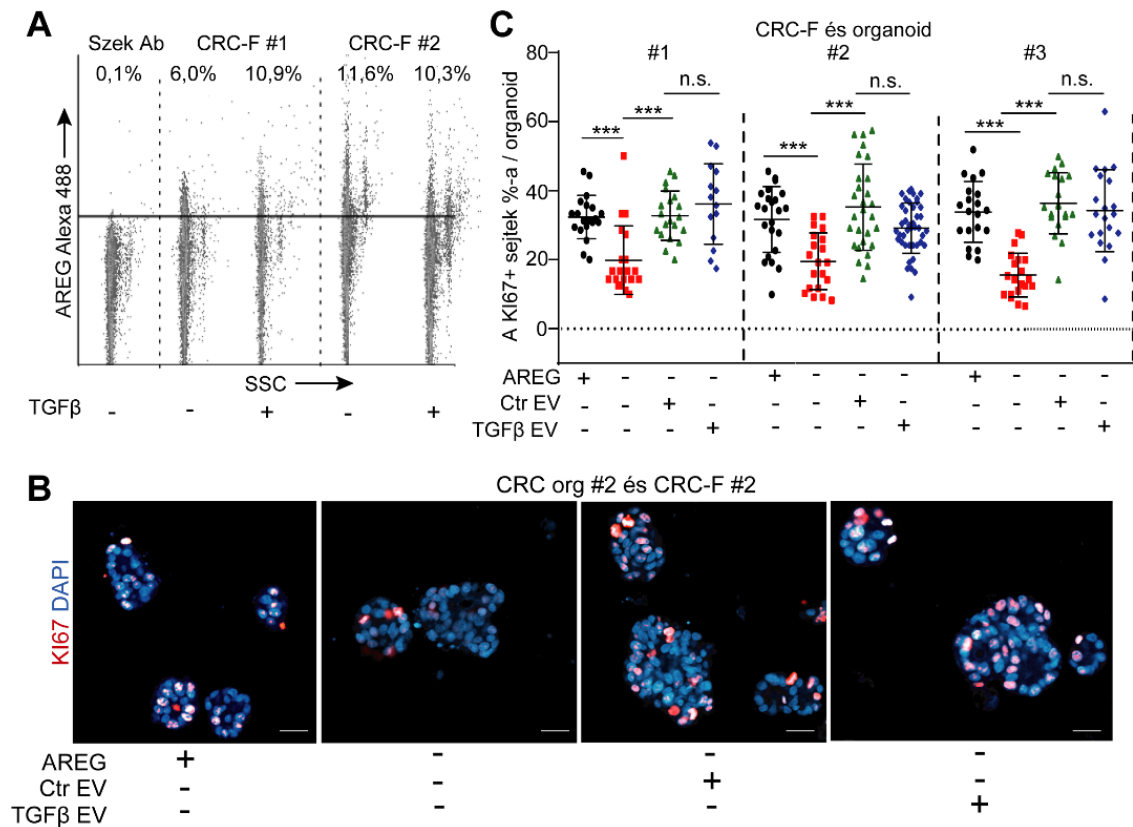


56. ábra. A TGFβ nem módosítja az EV kibocsátást a PTF vagy CRC-F fibroblasztokból. (A, B) A PTF vagy CRC-F sejtekből származó EV-k koncentrációja (A, 100 000 sejtre normalizálva) és a méretük módusa (B) TGFβ-val végzett előkezeléssel vagy anélkül (10 ng/ml, 4 nap, NTA adatok). (C, D) Az anti-CD63 (C) vagy anti-CD81 bevontú (D) pozitív gyöngyök százalékos aránya (sejtszámra normalizálva). Mann–Whitney U-teszt.

A CRC-F-ből származó EV-k proliferációt indukálnak az EGF-függő CRC organoidokban

Mivel nem találtunk különbséget a PTF és a CRC-F tenyészetek között az aktivációjuk tekintetében, így további kísérleteinkben a CRC-F fibroblasztokra koncentráltunk. Az NCF-ekhez hasonlóan a kontroll és a TGFβ-kezelt CRC-F eredetű EV-ken is kimutattuk az AREG-et áramlási citometriával (57A. ábra), és ezek az EV-k helyreállították a KI67+ CRC sejtek arányát az EGF-függő organoidokban exogén hozzáadott EGF hiányában (57B-C. ábra). Nem

tapasztaltunk továbbá különbséget az osztódó CRC sejtek számában, amikor a CRC-F tenyészeteket TGFβ-val előkezeltük, majd azonos számú EV-t alkalmaztunk (57B-C. ábra). Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a fibroblaszt eredetű EV-k egy aktiválástól független mechanizmuson keresztül, AREG transzportja által indukálják a CRC sejtek proliferációját, mely csak EGF aktivitástól függő CRC organoidokban figyelhető meg.



57. ábra. A CRC-F sejtekből származó EV-k a TGFβ-val végzett előkezeléstől függetlenül növelik a proliferáló CRC organoid sejtek arányát. (A) Az AREG kimutatása kontroll vagy TGFβ-val előkezelt CRC-F sejtekből izolált és latex gyöngyökhöz kötött EV-ken (áramlási citometria). (B, C) A kontroll, vagy kezelt CRC-F-ből származó EV-ekkel, illetve AREG-gel kezelt organoidokban a KI67+ CRC sejtek százalékos aránya (párosított fibroblaszt és organoid minták). Kruskal–Wallis és Dunn teszt (C), méretarány: 50 μm.

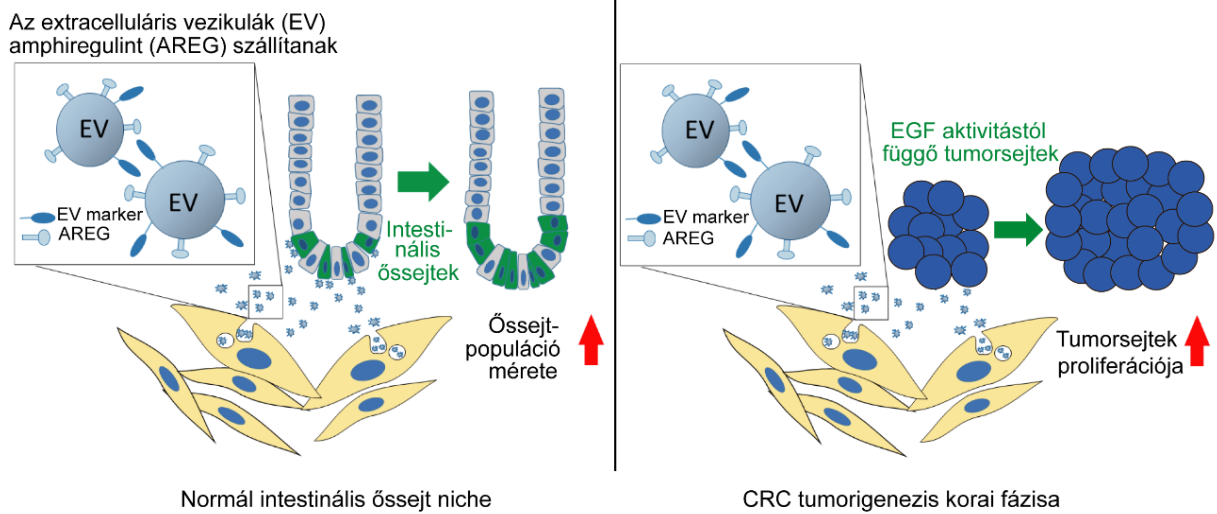
Megbeszélés: bár a sztrómasejtek, például a fibroblasztok kritikus szerepet játszanak számos tumortípus progressziójában, pontos aktivációs mechanizmusuk és a fibroblaszt alpopulációk szerepe még mindig kevésbé ismert. Vizsgálatainkban bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a TGFβ kritikus szerepet játszik a fibroblaszt heterogenitás kialakításában mind a PTF-ekben, mind a CAF-okban. A sejt heterogenitásának fontosságát a normál humán vastagbél fibroblasztokban is igazolták eltérő expressziós profillal rendelkező alpopulációk azonosításával [146].

A peritumorális fibroblasztokat gyakran használják normál fibroblaszt kontrollként [54]. Egy tanulmány azonban csak korlátozott mértékű különbséget talált a génexpresszióban a PTF-ek és a CRC-F-ek között, és az α SMA, amelyet általában az aktivált fibroblasztok markereként tartanak számon, a PTF-ekben is jelen volt [54]. Ezen kívül a TGF β -t a fibroblaszt aktiváció fő indukálójának tekintik CRC-ben [36], ami jellegzetes gének, például az *IL11* expressziójához vezet [36]. Érdekes módon mind a PTF-ek, mind a CRC-F-ek több *IL11*-et, *ACTA2*-t, *HBEGF*-et, *IL6*-ot és *FAP*-ot termeltek, amikor TGF β -val kezeltük őket, ami arra utal, hogy ezek a sejtek tovább aktiválhatók *in vitro*. Kísérleteinkben a PTF-ek és a CRC-F-ek hasonlóan viselkedtek a TGF β kezelést követően a vizsgált paraméterekben, mint például a sejtes heterogenitás, génexpressziós változások, sebméret a sebgyógyulási vizsgálatokban vagy a sejtek szenescenciája. Így ezek az eredmények azt mutatják, hogy vagy a PTF-ek már előre aktivált állapotban voltak, vagy a CRC-F-ek elvesztették aktivált funkcióikat a rendszerünkben.

Vizsgálatainkban egy új mechanizmust azonosítottunk, mely szerint a fibroblaszt eredetű EV-k CRC tumorigenezist serkenthetnek AREG által. Változást találtunk továbbá az EV cargo-ban a miR-101, 382, 424 és 642 esetében, amelyek csak a TGF β -val kezelt aktivált fibroblasztok által kibocsátott EV-kben voltak jelen. Ezeknek a miRNS-eknek a CRC proliferációjában és apoptózisában betöltött szerepe ellentmondásos [147-149]. Eredményeink alapján az EV-k által szállított AREG kritikus fontosságú az EGF aktivitástól függő organoidok sejtproliferációjának indukálásában, azonban a fibroblaszt aktiválást követő EV cargo miRNS változásai nem játszanak központi szerepet a CRC proliferáció indukálásában. Továbbá, ellentétben a miR-92a-3p hatásával [150], nem találtunk különbséget a CRC sejtek osztódásában vagy apoptózisában, ha normál fibroblasztokat, CRC-F-eket használtunk, vagy ha ezeket a sejteket előkezeltük TGF β -val, ami arra utal, hogy az AREG által közvetített EV hatás független a fibroblaszt aktivációtól.

A 3D organoid modell segítségével vizsgálatainkban bizonyítottuk, hogy a fibroblaszt eredetű EV-k AREG-et szállítanak, és növelik az osztódó CRC sejtek számát olyan organoid vonalakban, amelyek külső EGF aktivitástól függenek. Ezzel szemben EGF független modellrendszerben nem hatásosak. Bár a TGF β által aktivált NCF-ek EV-ket szecernálnak, miRNS tartalmukban jellemző különbséggel a kontrollokhoz képest, nem találtunk különbséget az EV-k hatásában, amikor az NCF-eket TGF β -val előaktiváltuk. Hasonlóképpen, a TGF β által előaktivált CRC-F-ekből származó EV-k nem módosították a proliferáló CRC organoid sejtek arányát. Mindezek az adatok a fibroblaszt eredetű EV-k által szállított AREG kritikus szerepét bizonyítják nem csak az ISC-k niche faktoraként a normál bélhámában, hanem a CRC

tumorigenezisének korai szakaszában is, amikor az EGF jelátviteli útvonal még nem mutált (58. ábra).



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

5.8 A sejtfelszíni IFITM1 szint eltérő EV felvétellel jellemezhető CRC sejtpopulációkat jelöl (XII)

Mivel az EV-k molekulárisan szerkeszthetők és specifikus molekulákkal tölthetők fel, amelyeket aztán védett módon szállítanak, továbbá az EV-eket hatékonyan veszik fel a célsejtek, így a tumorterápia szempontjából is ígéretes eszközöknek tekinthetők [11]. Még nem megfelelően ismertek azonban azok a molekulák és mechanizmusok, 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 sejtek különböző kompartmentjeiben szabályozzák a membránnal burkolt vírusok sejtbe való bejutását, így jelentősen hozzájárulnak a sejteknek a vírusok széles körével szembeni rezisztenciájához [151]. Az IFITM fehérjék közül az IFITM1 a plazmamembránban működik [152, 153]. Minthogy az EV-k is membránnal burkoltak, így mindezen irodalmi adat alapján az IFITM1-ről feltételezhető, hogy szabályozza az EV felvételt is.

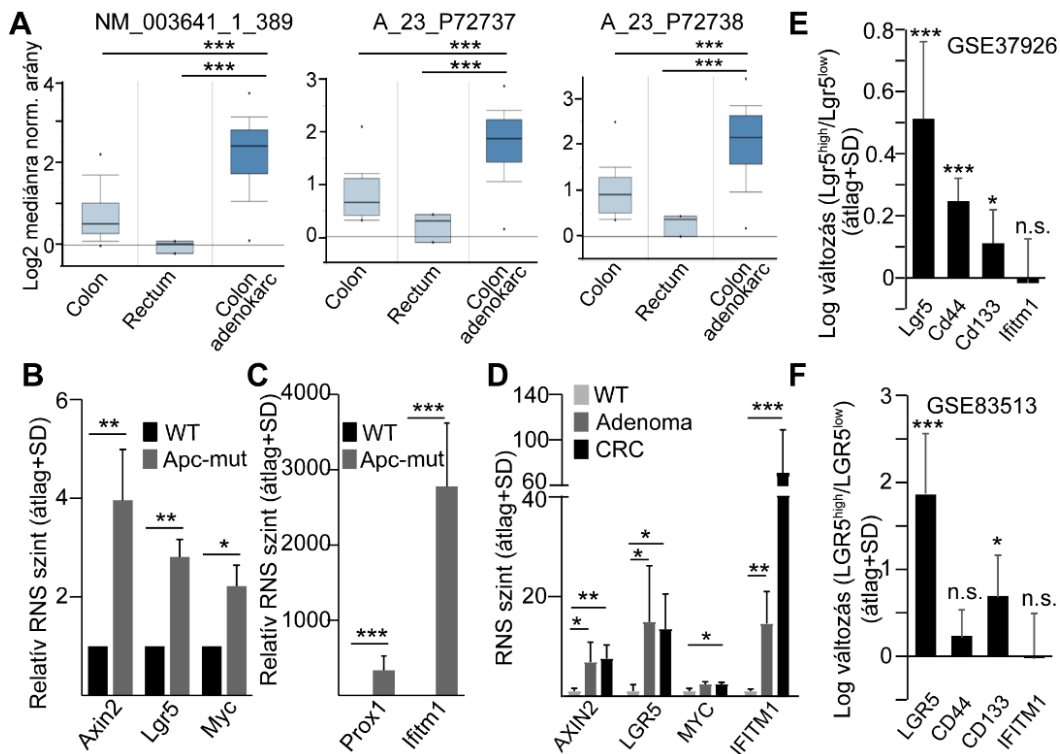
Az Ifitm1 expressziója megemelkedik az Apc mutációja után

A p53 elvesztése és a Wnt útvonal aktivációja által indukált géncsoport (a p53 által elnyomott inváziós géncsoport, PSIS) hozzájárul az invazív tulajdonság kiváltásáért (ld. fentebb). Annak érdekében, hogy olyan géneket találjunk, amelyek szerepet játszhatnak a CRC sejtek

rosszindulatú viselkedésében és a CRC sejtek EV felvételében, az IFITM1-re koncentráltunk, mely a PSIS és az interferon által indukált géncsalád egyik sejt felszíni tagja. Az oncomine adatok elemzése (TCGA colorectalis adatsor, <http://www.oncomine.org>) azt mutatta, hogy az IFITM1 magasabb szinten van jelen a CRC mintákban a normál vastag- és végbélhez képest (59A. ábra), ami arra utal, hogy az IFITM1-et a Wnt útvonal szabályozza. Ennek a hipotézisnek a tesztelésére organoid kultúrákat hoztunk létre WT egér vékonybélből, melyekben *Apc* mutációt indukáltunk a Wnt útvonal folyamatos aktiválása céljából. Várakozásainknak megfelelően az ismert Wnt célgének (*Lgr5*, *Axin2* és *Myc*) RNS szintje jelentősen megemelkedett (59B. ábra). Ezenkívül az *Apc* mutáció a *Prox1* expressziójának nagymértékű emelkedését is eredményezte [66], és több, mint 2500-szoros emelkedést tapasztaltunk az *Ifitm1* expressziójában is (59C. ábra).

Az IFITM1 szabályozásának további vizsgálatára CRC betegek normál vastagbélből és daganatából organoid tenyészeteket készítettünk. Ezen kívül mintákat vettünk vastagbél adenómával diagnosztizált betegektől is. Az adenóma és a CRC organoidokat a Wnt agonista R-Spondin1 és Wnt3a nélkül tenyésztettük, így a mintákat a konstitutívan aktív Wnt útvonallal rendelkező organoidokra tudtuk kisselektálni. Érdekes módon nem csak az *AXIN2*, *LGR5* és *MYC*, hanem az *IFITM1* esetében is magasabb RNS szintet észleltünk mind az adenóma, mind a CRC organoidokban a normál colon organoidokkal való összevetés során (59D. ábra).

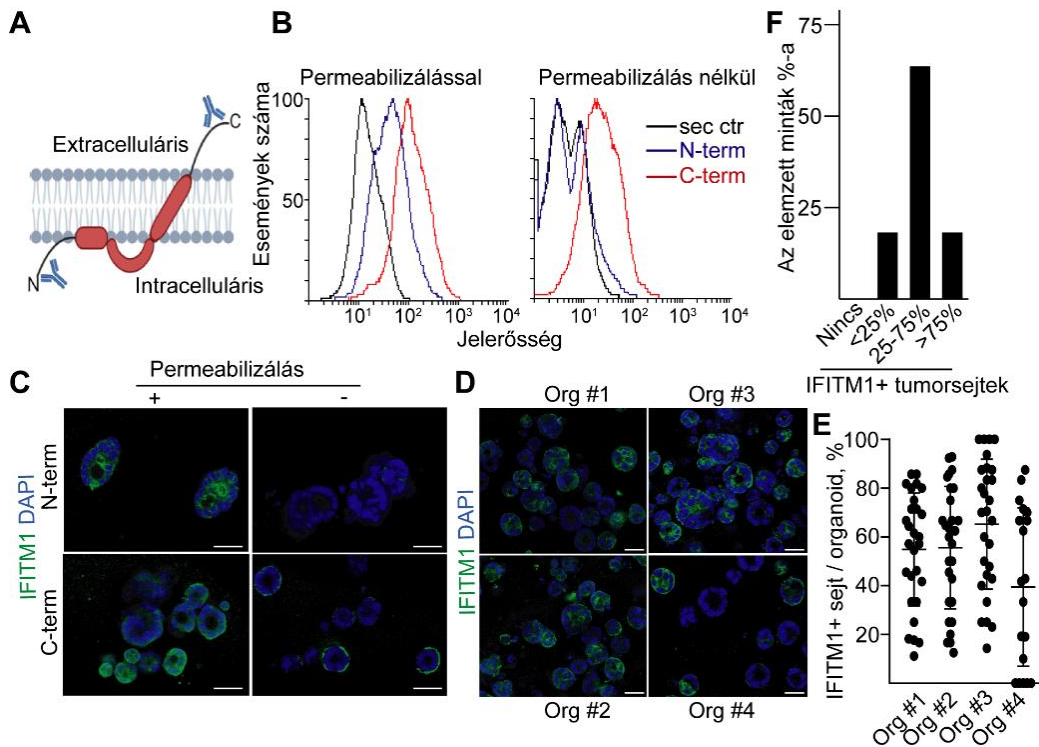
Annak eldöntésére, hogy az *Ifitm1* expressziója specifikus-e az *Lgr5*+ adenóma/CRC őssejtekre, az *Lgr5*^{high} és *Lgr5*^{low} egérbél adenóma sejtekből származó, nyilvánosan elérhető microarray adatokat elemeztük [42]. Míg a *Cd44* és a *Cd133* (két másik, gyakran CRC őssejt markernek tekintett gén) RNS szintje magasabb volt az *Lgr5*^{high} sejt populációban, az *Ifitm1*-ben nem találtunk különbséget (59E. ábra). Hasonlóképpen, míg a *CD133* RNS szintje magasabb volt az *LGR5*^{high}, mint az *LGR5*^{low} humán CRC organoid sejtekben RNS expressziós adatsorok alapján [44], nem találtunk különbséget az *IFITM1* expressziójában a két sejt populáció között (59F. ábra). Elemzéseink tehát arra utalnak, hogy az *IFITM1* a Wnt útvonal szabályozása alatt áll, de nem specifikus az őssejt jellemzőkkel rendelkező *LGR5*^{high} CRC sejtekre.



59. ábra. Az *Apc* mutáció *Ifitm1* expressziót indukál az intesztinális organoidokban. (A) Az adott próbákhoz tartozó TCGA adatsor expressziós elemzése az Oncomine adatbázisban (<http://www.oncomine.org>). (B) A jelzett gének relatív RNS szintje WT és *Apc* mutáns egér vékonybél organoidokban (RT-qPCR, n = 4). (C) Az *Ifitm1* és a Wnt célgén *Prox1* relatív RNS szintje (RT-qPCR, n = 4). (D) *AXIN2*, *LGR5*, *MYC*, *IFITM1* RNS szintek normál (WT), adenóma és CRC betegekből származó organoidokban (RT-qPCR). (E) Az *Lgr5*^{high} és *Lgr5*^{low} egér adenóma sejtek expressziós szintje közti eltérés (a GSE83513 adatkészlet bioinformatikai elemzése a GEO2R online szoftverrel). (F) Az *LGR5*, *CD44*, *CD133* és *IFITM1* expressziós szintjének összehasonlítása az *LGR5*^{high} és *LGR5*^{low} sejtek között CRC beteg eredetű organoidokban (GSE83513 adatkészlet). Párosítatlan t-próbát (A, D), párosított t-tesztet (B, C), vagy t-tesztet Benjamini és Hochberg többszörös hipotézis korrekcióval (E, F) alkalmaztunk.

A CRC betegekből származó organoidok heterogenitást mutatnak az IFITM1 expresszióra

Bár az IFITM1 membrántopológiája még nem teljesen ismert, a legújabb publikációk azt sugallják, hogy a fehérje C-terminális része az extracelluláris tér felé néz [152, 153]. Ezekkel a tanulmányokkal összhangban csak akkor észleltünk áramlási citometriás jelet az IFITM1 N-terminális része ellen termelt antitesttel, ha a sejteket a jelölés előtt permeabilizáltuk (60A–C. ábra). Ezzel szemben a C-terminális rész elleni antitest permeabilizáció nélkül is megjelölte a sejteket (60A–C. ábra), és az immunfestés sejtes heterogenitást mutatott ki az IFITM1 expressziójára nézve ugyanabból a betegből származó organoidok között (60D–E. ábra). Továbbá a Protein Atlas adatainak elemzése (<http://www.proteinatlas.org>) azt mutatta, hogy ugyanabból a mintából származó tumorsejtek heterogének az IFITM1 jelenlétére (60F. ábra). Így az IFITM1 expressziója heterogén az ugyanazon organoid vonalhoz tartozó CRC sejtek között is.

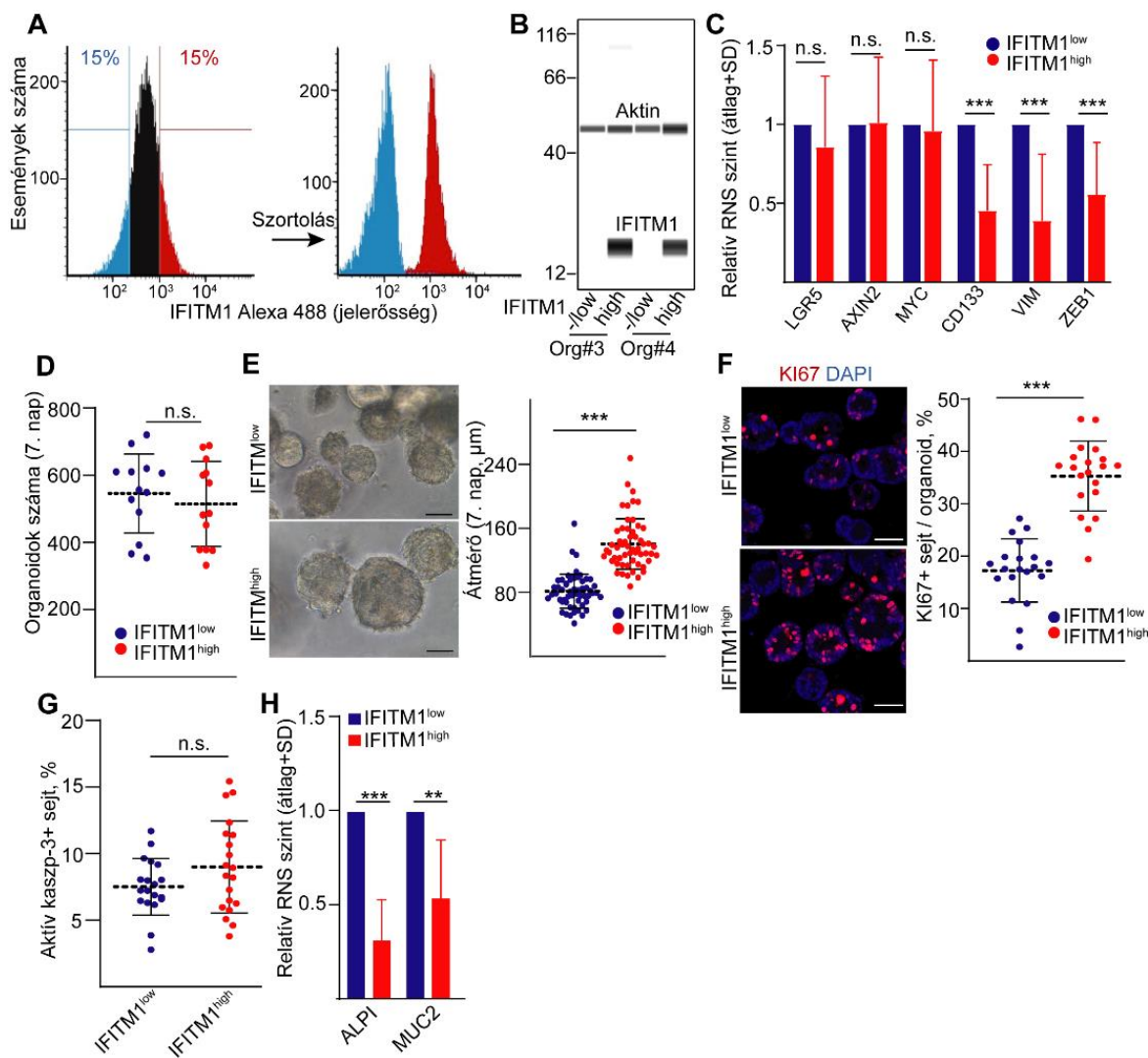


60. ábra. Az IFITM1 expressziós szintje heterogén a humán CRC organoidokban. (A) Az IFITM1 topológiája és az N-terminális és C-terminális végekre specifikus antitestek kötőhelyei. (B) Áramlási citometria az IFITM1 N-terminális (N-term) vagy C-terminális (C-term) részére specifikus antitestekkel. A mintákat vagy közvetlenül jelöltük, vagy fixáltuk és permeabilizáltuk a jelölés előtt. (C) CRC organoidok whole-mount immunocitokémiája az IFITM1 fehérje N-terminális vagy C-terminális részéhez kötődő antitestekkel. Az immunfestést permeabilizációval vagy anélkül végeztük (org #1). (D, E) IFITM1 expresszió négy CRC organoid vonalban, a fehérje C-terminális részét felismerő antitesttel. Reprezentatív képek (D) és a konfokális képek kvantifikációja (E) (whole mount immunfestés). (F) Az IFITM1-re 0%, <25%, 25-75%, vagy >75% pozitív CRC sejtet tartalmazó CRC minták százalékos aránya (a Protein Atlas, www.proteinatlas.org adatainak elemzése alapján). Méretarány: 50 μ m (C, D).

Az *IFITM1*^{high} CRC populáció több proliferáló sejtet tartalmaz

Ezt követően az *IFITM1*^{high} és *IFITM1*^{low} CRC organoid sejteket sejtszorterrel elválasztottuk (61A. ábra), a különbséget az *IFITM1* fehérje expressziós szintjében áramlási citometriával és kapilláris alapú immunblot vizsgálattal ellenőriztük (61A-B. ábra), majd a mintákból RNS analízist végeztünk. Míg az *AXIN2*, *LGR5* vagy *MYC* Wnt célgén RNS-ében nem találtunk különbséget, az *IFITM1*^{high} sejtek a *VIM* és a *ZEB1* mezenchimális markergéneket alacsonyabb szinten fejezték ki (61C. ábra). Emellett a *CD133* csökkent RNS expresszióját figyeeltük meg (61C. ábra). Meglepő módon nem észleltünk különbséget a két szortolt sejt populáció által képzett organoidok számában (61D. ábra). Az *IFITM1*^{high} sejtekből származó organoidok átmérője azonban szignifikánsan nagyobb volt, több KI67+ proliferáló sejtet tartalmaztak, de nem volt különbség az aktív kaszpáz3+ apoptotikus sejtek százalékos arányában (61E-G. ábra). Ezzel párhuzamosan a *MUC2* (kehelysejtek) és az *ALPI* (enterociták) differenciálódási

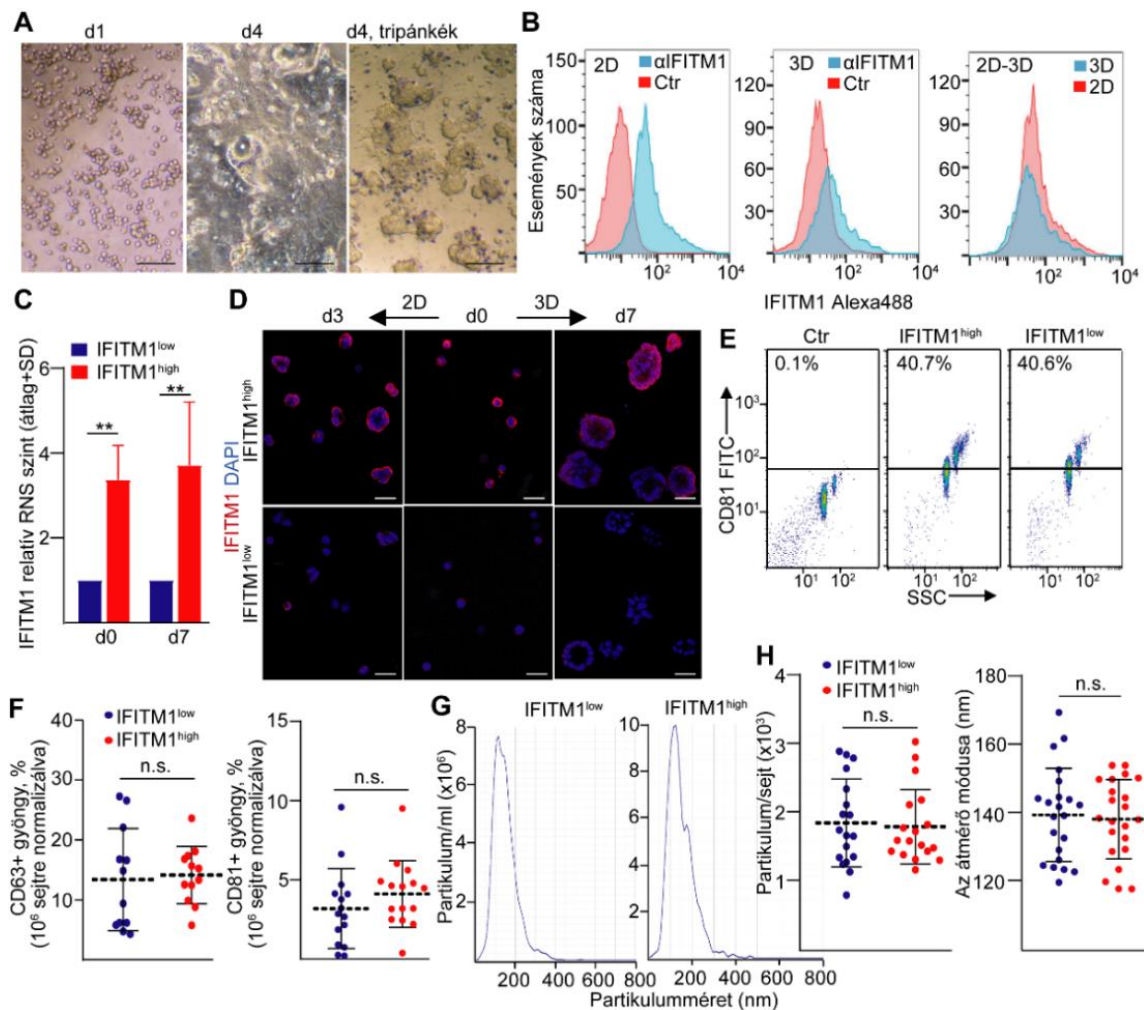
markerek RNS-ében alacsonyabb szintet figyeltünk meg IFITM1^{high} sejtből származó organoidokban (61H. ábra), amely a proliferáló és más sejttípusok arányai közötti eltolódást mutatják. Bár a klasszikus őssejt-jellegű markerek nem expresszálódnak erősen az IFITM1^{high} sejtekben, az IFITM1^{low} populációhoz képest nagyobb proliferációs potenciállal rendelkező organoidokat állítottak elő.



61. ábra. Az IFITM1^{high} CRC sejt eredetű organoidok több proliferáló sejtet tartalmaznak, mint az IFITM1^{low} organoidok. (A) Az IFITM1^{high} és IFITM1^{low} sejtek fluoreszcencián alapuló szortálási stratégiája és elemzése áramlási citometriával. (B) Két CRC organoid vonalból szortolt sejtek IFITM1 fehérjeszintje (kapilláris alapú WES immunoblot). Az aktint háztartási kontrollként használtuk. (C) A jelzett gének relatív RNS szintjei a szortolt sejtekben (RT-qPCR, n = 4). (D) 20 000 szortolt sejt által képzett organoidok száma a 7. napon. Minden pötty egy szortálási kísérletet jelent. (E) Reprezentatív képek (bal oldali panel) és a CRC organoidok átmérője (jobb oldali panel), amelyek az IFITM1^{low} vagy IFITM1^{high} szortolt sejtekből származnak. (F) A KI67⁺ proliferáló sejtek százalékos aránya. Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek és mennyiségi értékelésük (whole-mount immunfestés). (G) Az aktív kaszpáz-3⁺ apoptotikus sejtek százalékos aránya az IFITM1^{high}, vagy IFITM1^{low} CRC sejtekből származó organoidokban (whole-mount immunfestés). Három kísérlet képeit elemeztük. (H) Az ALPI (enterocita marker) és a MUC2 (kehelysejt marker) relatív RNS szintje szortolt sejtek által képzett organoidokban (RT-qPCR, n=3). Méretarány: 50 μ m (E, F). Párosított t-próbát (C, H) és Mann-Whitney U-próbát (D-G) alkalmaztunk.

Az *IFITM1*^{high} és az *IFITM1*^{low} CRC sejtek nem különböznek az EV kibocsátás intenzitásában

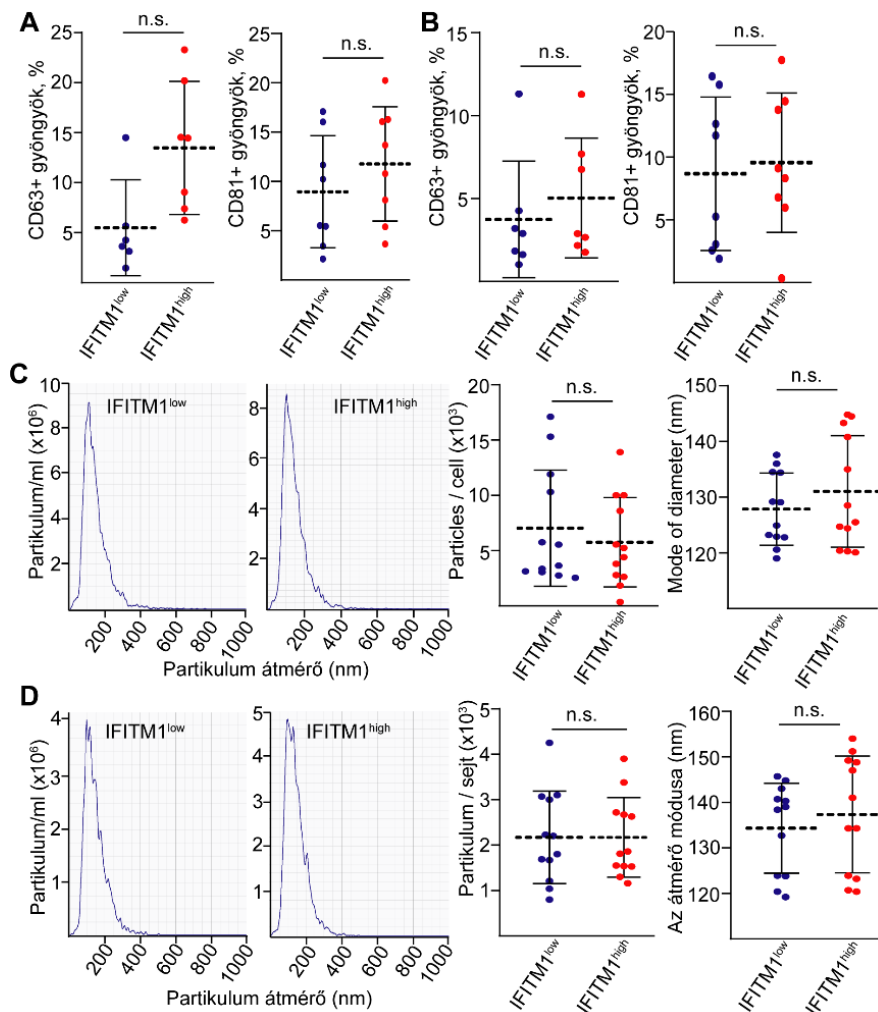
Az *IFITM1* sejt felszíni fehérje részt vesz membránnal körülvett vírusok sejtekbe történő felvételének gátlásában [154, 155], ami felveti annak a lehetőségét, hogy az *IFITM1* az EV-k forgalmát is befolyásolja. Ennek tanulmányozásához először meghatároztuk az *IFITM1* expressziós mintázat stabilitását a szortolt sejtpopulációkban. Az organoid eredetű CRC sejtek életképesek voltak Matrigel-lel bevont lemezekben (62A. ábra), és nem találtunk különbséget a sejt felszíni *IFITM1* expresszióban a 2D vagy 3D körülmények között tenyésztett sejteknél (62B. ábra). A szortolt sejtek megtartották továbbá *IFITM1*^{high} vagy *IFITM1*^{low} expressziós mintázatukat a 7. napon is (62C. ábra). Ezen kívül az *IFITM1*^{high} CRC sejtek magasabb *IFITM1* expressziót mutattak immuncitokémiával még 3 nap után is 2D, illetve 7 nap után 3D tenyészetekben (62D. ábra). Így az *IFITM1* expressziós mintázata mind a rövid távú 2D, mind a 3D tenyészetekben megmarad.



62. ábra. Az *IFITM1*^{high} és *IFITM1*^{low} CRC sejt eredetű organoidok nem különböznek egymástól az EV kibocsátásukban. (A) Egy és négy napig 2D körülmény között tenyésztett, disszociált CRC organoid sejtek tenyésztete és életképességük a 4. napon (tripánkék festés). (B) Az *IFITM1* sejt felszíni szintje 2D vagy 3D Matrigel tenyészetekben (4. nap, fixálatlan sejtek áramlási citometriája, Ctr: izotípus

antitest kontroll). (C) A szortolt sejtek (d0) és a szortolt sejtekből származó organoidok (d7) relatív IFITM1 RNS szintjei. Az IFITM1^{low} minták RNS-szintjét (a háztartási kontrollra normalizálva) minden kísérletben 1-nek vettük (RT-qPCR, n = 4). (D) IFITM1 immunfestés közvetlenül a szortolás után, illetve 2D vagy 3D körülmények között a jelzett időtartamig végzett tenyésztés után (immunfestés és whole-mount immunfestés). (E, F) Az anti-CD63 vagy anti-CD81-mal bevont pozitív gyöngyök százalékos aránya sejtmentes médiumban (Ctr), illetve IFITM1^{low} vagy IFITM1^{high} organoid eredetű kondicionált médiumban történő inkubálás után. (áramlási citometria). Reprezentatív mérések (E) és az adatok kvantifikálása (F). Az adatokat sejtszámra normalizáltuk. (G, H) Az organoid felülúszók NTA elemzése ultracentrifugálás után. Reprezentatív NTA képek (G) és sejtszámra normalizált adatok (H). Méretarány: 50 µm (A, D). Párosított t-próba (C), vagy Mann–Whitney U teszt (F, H).

Ezután összehasonlítottuk az IFITM1^{high} és az IFITM1^{low} sejt-eredetű organoidok kis EV (sEV) kibocsátását. Nem találtunk különbséget a sEV koncentrációban a két szortolt sejtpopulációból származó organoidok között sem a gyöngyalapú szemikvantitatív módszerrel (62E-F. ábra), sem pedig NTA-val (62G-H. ábra). Hasonló adatokat kaptunk, amikor a szortolt sejteket egy másik mátrixban, kollagén I-ben vagy kollagén I és Matrigel keverékében tenyésztettük (63A-D.



ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az IFITM1^{high} és IFITM1^{low} CRC sejtek sEV kibocsátása között nincs különbség egyik 3D mátrixban sem.

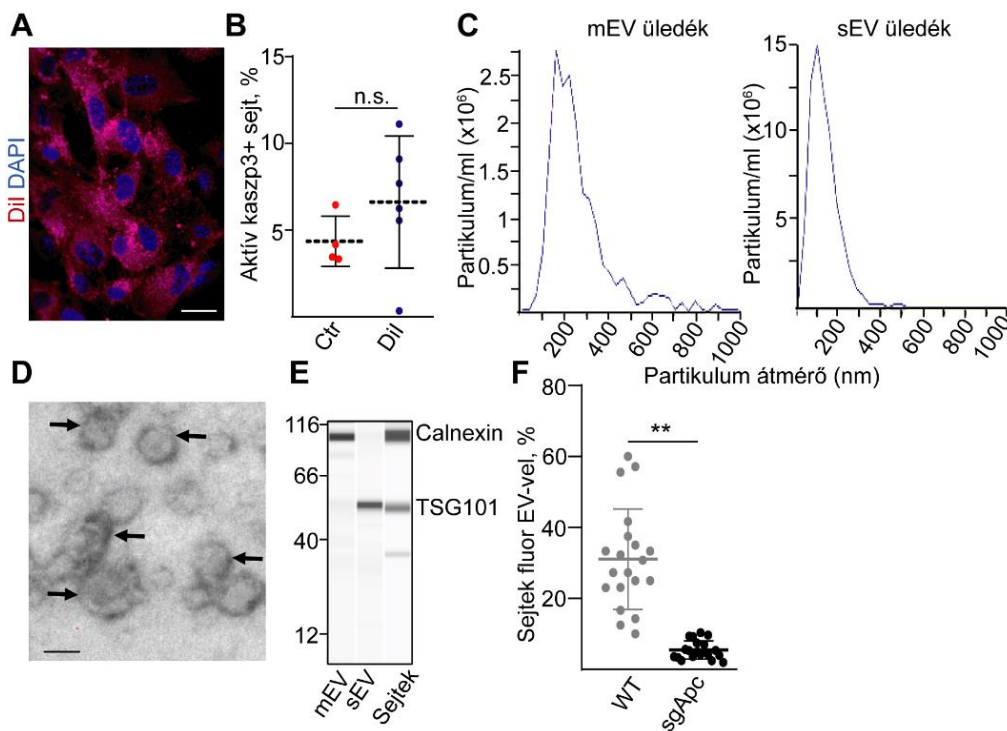
63. ábra. Nincs különbség az EV kibocsátásban a kollagénben vagy Matrigel/kollagénben tenyésztett IFITM^{high} és IFITM^{low} CRC sejt eredetű organoidok között. (A-B) A pozitív anti-CD63 vagy anti-CD81-mal bevont gyöngyök százalékos aránya organoid eredetű kondicionált médiumban

való inkubálás után (áramlási citometria). Az organoidokat 50% Matrigel/50% kollagén I-ben (A) vagy kollagén I-ben (B) tenyésztettük. (C-D) Reprezentatív NTA mérések, a sejtszámra normalizált partikulumszámok és méretük (módus). Az IFITM1^{high} és IFITM1^{low} sejt eredetű organoidokat Matrigel/kollagén I-ben (C) vagy kollagén I-ben (D) tenyésztettük, a kondicionált médiumot 12 500 g-

vel 20 percig centrifugáltuk, és az elsősorban kis EV-eket (sEV) tartalmazó felülúszót NTA mérésekben alkalmaztuk. Mann-Whitney U-teszt.

Az *IFITM1*^{high} CRC sejtek kevesebb EV-t vesznek fel

Következő lépésként azt vizsgáltuk, hogy a különböző *Ifitm1* expressziós szinttel rendelkező sejtpopulációk eltérő EV felvételi képességekkel rendelkeznek-e. A kérdés megválaszolására WT és *Apc*-mutáns egér bélorganoidokból származó sejteket tenyésztettünk 2D körülmények között rövid ideig, és 12500 g centrifugálással izolált EV-kkel kezelést végeztünk (közepes EV-frakció, mEV). Az EV-eket membránfestékekkel előkezelt fibroblasztokból izoláltuk (64A. ábra). Nem találtunk növekedést az aktív kaszpáz-3+ sejtek százalékos arányában a jelölés hatására, ami azt mutatja, hogy a kezelés nem indukált apoptózist a fibroblasztokban (64B. ábra). Mivel az EV-eket nem közvetlenül jelöltük, és a sejteket a festék elvonása után mostuk, így ez kizárta annak a lehetőségét, hogy festék aggregátumot mértünk. Az EV-eket kimutattuk a fibroblaszt tenyészetek felülúszójában NTA-val, amikor mEV-eket vagy sEV-eket izoláltunk (64C. ábra). TEM-mel igazoltuk továbbá az EV-k jelenlétét ultracentrifugálás után (64D. ábra). Ezen kívül a kapilláris alapú immunoblot a TSG101 sEV marker jelenlétét csak a sEV preparátumokban mutatta ki, míg a kalnexint az mEV frakcióban tudtuk detektálni (64E. ábra) [156]. Az *Apc* mutáns organoidok, amelyek az *Ifitm1*-et magasabb szinten fejezték ki, kevesebb fibroblasztból származó mEV-t akkumuláltak, mint a vad típusú bélorganoidok (64F. ábra).



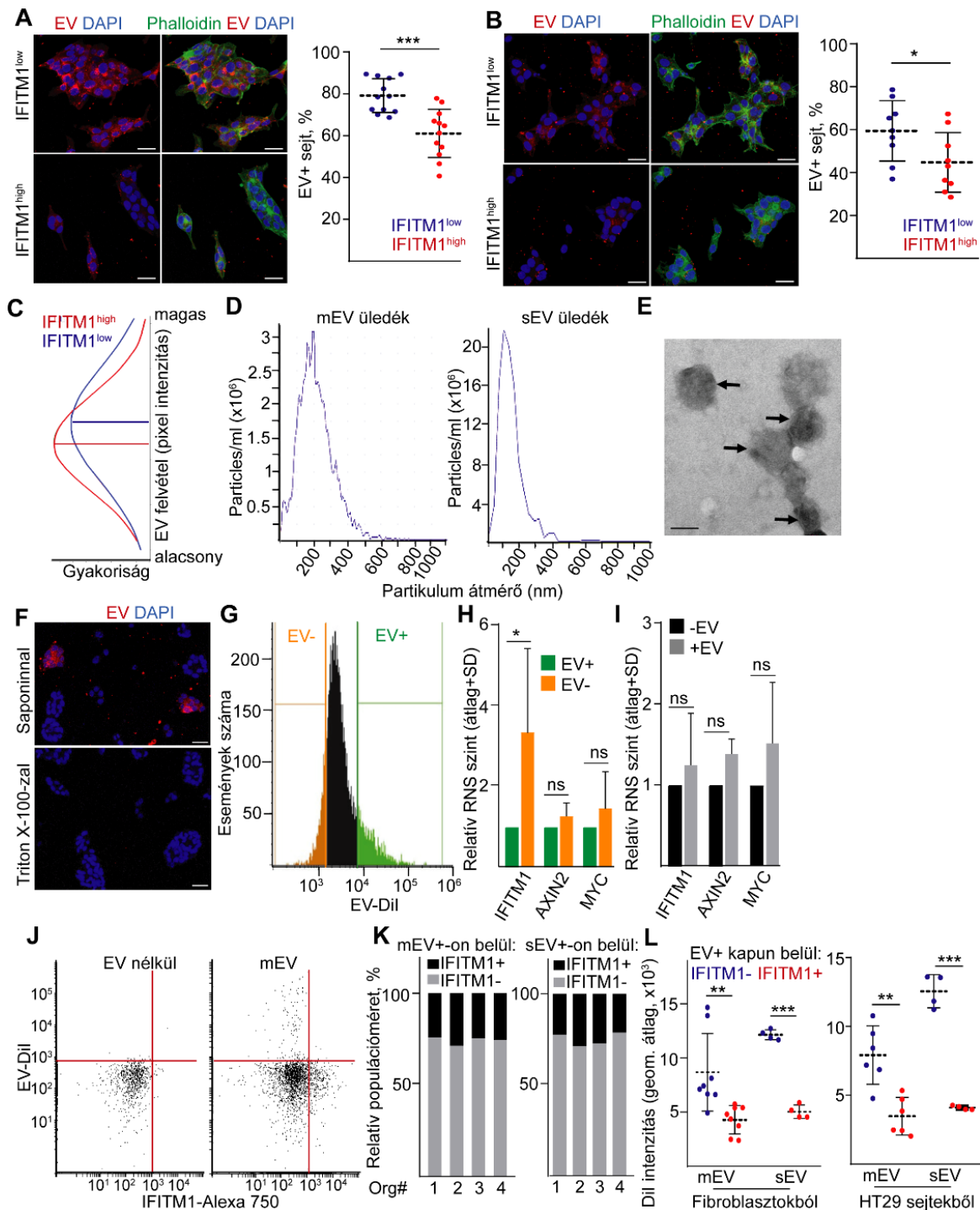
64. ábra. Az *Apc* mutáns intesztinális organoid sejtek kevesebb EV-t vesznek fel a WT sejtekhez képest. (A) Colon fibroblasztok a membránba épülő fluoreszcens DiI-vel történő jelölés után. (B) Az aktív kaszpáz+ apoptotikus fibroblasztok százalékos aránya jelölés nélkül (Ctr) és DiI jelöléssel

(immunfestés és konfokális mikroszkóp, párhuzamos kísérletekből készült felvételek). (C) NTA mérések humán colon fibroblasztból származó 12 500 g-os üledékből (bal oldali panel, közepes méretű EV-k, mEV) és az ultracentrifugálás utáni pelletből (jobb panel, sEV). (D) Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) ultracentrifugált fibroblaszt tenyészet kondicionált médiumából. A nyilak az sEV-ket jelölik. (E) Centrifugált (mEV), ultracentrifugált (sEV) fibroblaszt EV minták és a sejtlizátum kapilláris alapú Western-blot analízise a jelzett fehérjékre. (F) A fluoreszcens EV jellel rendelkező WT és Apc mutáns (sgApc) egér intesztinális organoid sejtek százalékos aránya. Az mEV-ket olyan fibroblasztokból izoláltuk, amelyeket a fluoreszcens membránjelölő DiI festékkel előkezeltünk. Méretarány: 50 μm (A), 100 nm (D). Mann-Whitney U-teszt.

Annak vizsgálatára, hogy az EV-felvétel intenzitása különbözik-e a CRC sejt alpopulációk között, ezután IFITM1^{high} és IFITM1^{low} sejteket szortoltunk, és jelölt mEV-kkel vagy sEV-kkel tenyésztettük őket. Konfokális mikroszkópos vizsgálatunk szerint az IFITM1^{high} CRC sejtek kevesebbet vettek fel mind a HT29 CRC sejt vonal eredetű, mind pedig a humán vastagbél fibroblaszt eredetű mEV-ekből az IFITM1^{low} CRC sejtekhez képest (65A-B. ábra). Ezen kívül a fibroblaszt eredetű EV-kkel kezelt IFITM1^{high} sejtek alacsonyabb jelintenzitást mutattak a mEV-kre, mint az IFITM1^{low} sejtek (65C. ábra). Eredményeink tehát arra utalnak, hogy az EV felvételben megfigyelhető különbség nem korlátozódik egy adott sejt típusból származó EV-re. Fontos megjegyezni, hogy az mEV-k és az sEV-k jelenlétét NTA-val és transzmissziós elektronmikroszkóppal is igazoltuk HT29 sejtek kondicionált médiumában (65D-E. ábra). Mindemellett a minták Triton X-100-zal való kezelésére az EV jel eltűnt a sejtekből (65F. ábra), ami azt bizonyítja, hogy kísérleteinkben membránnal körülvett EV-ket vizsgáltunk.

Következő kísérletként a CRC organoid sejteket fibroblaszt eredetű jelölt EV-kkel kezeltük 2D tenyészetekben, majd a legmagasabb és legalacsonyabb fluoreszcens jellel rendelkező sejteket kiszortoltuk. Ezek magas, illetve alacsony EV felvételi képességű sejt populációkat képviselnek (65G. ábra). Míg az *AXIN2* és a *MYC* szintjében nem találtunk különbséget, az *IFITM1* szignifikánsan magasabb RNS szintjét mértük az alacsony EV-felvételű sejtekben (65H. ábra). Mivel az *IFITM1* expressziójában nem találtunk növekedést az EV-kkel végzett kezelés után (65I. ábra), ez megerősíti, hogy az IFITM1^{high} sejtek kevesebb EV-t vesznek fel. Mindemellett a magas IFITM1 szinttel jellemezhető sejtek többsége a jelölt fibroblaszt eredetű mEV-ekkel végzett kezelés után negatív volt a fluoreszcens jelre (65J. ábra). Továbbá az mEV+ sejt populáción belül az IFITM1^{low} sejtek felhalmozódását figyeltük meg áramlási citometriával elvégzett kísérleteinkben (65K. ábra). Amikor azokra a sejtekre összpontosítottunk, amelyek mEV-t vettek fel, akkor a magasabb mEV felvételt jellemző magasabb jelintenzitást tapasztaltunk az IFITM1^{low} sejt populáción belül (65L. ábra). Hasonló eredményt kaptunk, amikor a CRC organoid sejteket jelölt fibroblasztokból vagy HT29 sejtekből készített sEV-frakcióval kezeltük (65L. ábra). Az adatok együttesen tehát azt

bizonyítják, hogy (i) eltérő mEV/sEV felvételi képességgel rendelkező sejtpopulációk mutathatók ki CRC-ben, és (ii) az IFITM1^{high} jelöli az alacsonyabb EV felvételű sejteket.

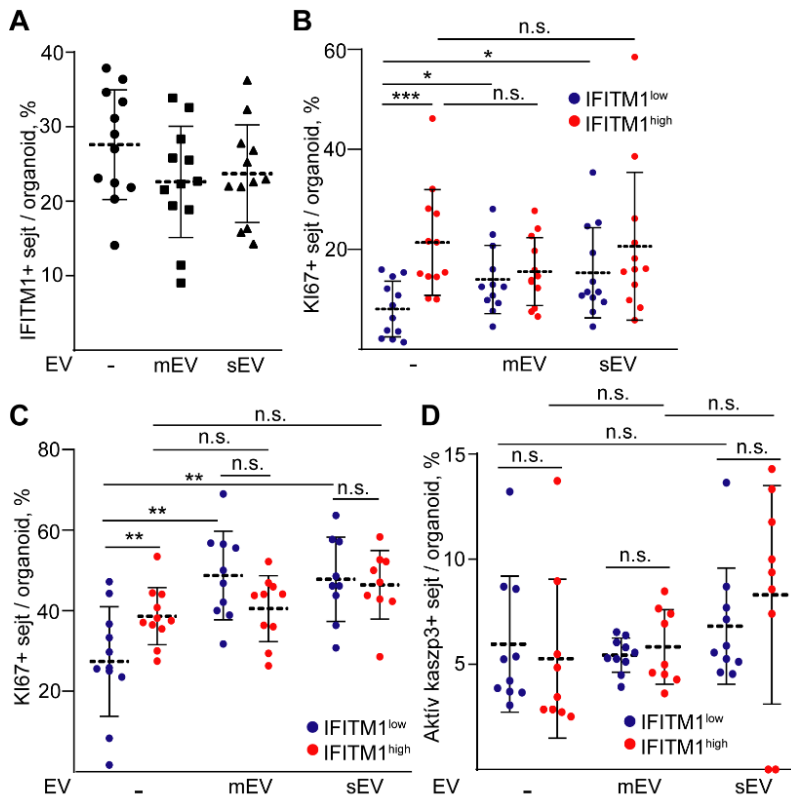


65. ábra. Az IFITM1^{high} sejtek csökkent EV felvevő képességgel rendelkeznek. (A, B) Közepes méretű EV (mEV) felvétel IFITM1^{low} és IFITM1^{high} szortolt sejtekben. Reprezentatív képek (bal oldali panelek) és számszerűsítésük (jobb oldali panelek). A szortolt sejteket 2D-ben tenyésztettük 3 napig, és DiI-vel jelölt HT29 CRC sejtekből (A) vagy humán colon fibroblasztokból (B) származó mEV-ekkel kezeltük. Az mEV-k piros fluoreszcenciát mutatnak, a phalloidint pedig a sejtek vizualizálására használtuk. (C) A DiI jelintenzitás eloszlásának eltolódása az IFITM1^{low} és IFITM1^{high} sejtekben. A sejteket DiI-vel jelölt fibroblasztokból származó mEV-ekkel kezeltük. (D) NTA mérések a HT29 CRC

sejtenyészet kondicionált médiumából centrifugált mEV és ultracentrifugált sEV frakcióiból. (E) TEM kép a HT29 sejtenyészet kondicionált médiumának ultracentrifugálása utáni EV-t tartalmazó üledékből. A nyilak az EV-eket jelölik. (F) A mEV-k fluoreszcens jele IFITM1^{low} szortolt sejtekben 3 napos 2D körülmények közötti tenyésztés után. A mEV-eket DiI-jelzett fibroblasztokból gyűjtöttük, és a mintákat szaponinnal vagy Triton X-100-zal kezeltük. A triton X-100 használatakor az EV jel eltűnik. (G) DiI-val jelölt, fibroblaszt eredetű sEV-kkel előkezelt CRC organoid sejtek szortolása 2D tenyészetekből. (H) Az *IFITM1*, *AXIN2* és *MYC* relatív RNS szintjei a szortolt EV⁺ és EV⁻ CRC sejtekben (RT-qPCR, n = 3). Az EV⁺ minták háztartási kontrollra normalizált RNS szintjét mindig 1-nek vettük. (I) A jelzett gének relatív RNS-e CRC organoid sejtekben (2D körülmények között tenyésztve) fibroblaszt eredetű sEV-kkel vagy anélkül (RT-qPCR, n = 3). (J) IFITM1 szint és a CRC organoid eredetű sejtek EV felvétele fibroblaszt eredetű mEV jelenlétében/hiányában (áramlási citometria). (K) Az IFITM1^{high} és IFITM1^{low} sejtek relatív százalékos aránya mEV-t (bal oldali panel), vagy sEV-t (jobb panel) felvett sejtekben négy CRC organoid vonalban (áramlási citometria). (L) A EV-DiI fluoreszcens jel intenzitása IFITM1^{-/low} és IFITM1^{high} sejtekben fibroblasztokból (bal oldali panel) vagy HT29 sejtekből (jobb panel) származó mEV-vel, vagy sEV-vel végzett kezelés után. Négy organoid vonalat mértünk (áramlási citometria). Méretarány: 20 μm (A, B, F), 100 nm (E). Párosított t-próba (H, I), vagy Mann–Whitney U-teszt (A, B, L).

A fibroblaszt-eredetű EV-k az IFITM1^{low} CRC organoidok proliferáló sejttségének jelentős növekedését eredményezik

A CRC sejt alpopulációk közötti eltérő EV felvétel funkcionális jelentőségének tesztelésére először fibroblaszt eredetű mEV-eket vagy sEV-eket adtunk a CRC sejtekhez, majd 7 nap elteltével detektáltuk az IFITM1 expressziót és a KI67-et az organoidokban. Sem a sEV-k, sem az mEV-k nem eredményeztek változást az IFITM1⁺ CRC sejtek százalékos arányában (66A. ábra).



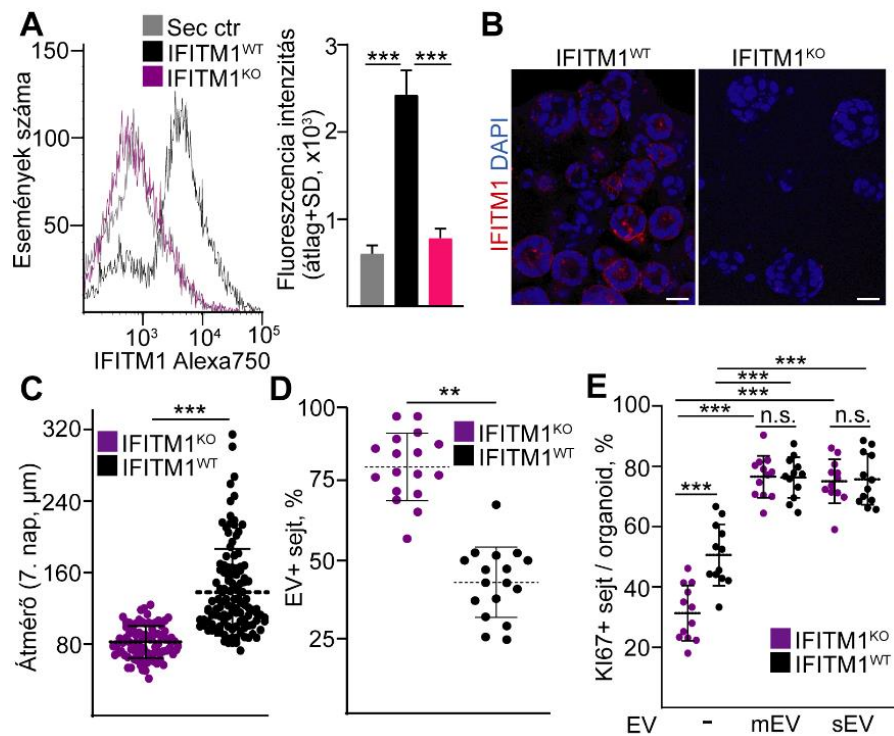
66. ábra. A fibroblaszt eredetű EV-k az IFITM1^{low} CRC sejtek proliferációját indukálják. (A) Az IFITM1⁺ CRC sejtek aránya fibroblaszt eredetű EV-k hiányában vagy sEV-k, illetve mEV-k hozzáadása után. (B) Az IFITM1^{low}/KI67⁺ és IFITM1^{high}/KI67⁺ sejtek százalékos aránya a CRC organoidokban a jelzett kezelések után. (C) A KI67⁺ proliferáló sejtek százalékos aránya az IFITM1^{high} vagy IFITM1^{low} CRC sejt eredetű organoidokban, amelyeket fibroblaszt sEV-kkel vagy mEV-kkel kezeltünk közvetlenül a szortolás után (whole-mount immunfestés és konfokális mikroszkópos képek). (D) Az aktív kaszpáz-3⁺ apoptotikus sejtek aránya az IFITM1^{low} és IFITM1^{high} sejtpopulációkból származó CRC

organoidokban, mEV-kkel, sEV-kkel, vagy EV nélkül tenyésztve. Kétutas ANOVA és Tukey post hoc teszt. Csak a releváns összehasonlításokat ábrázoltuk.

Az IFITM1^{-/low} sejtpopuláción belül azonban a proliferáló sejtek aránya lényegesen jobban növekedett, mint az IFITM1^{+ /high} sejtpopulációban EV-k jelenlétében (66B. ábra). Amennyiben fibroblasztokból származó mEV-ket vagy sEV-ket adtunk a szortolt IFITM1^{low} sejtekhez, az általuk képzett organoidokban jelentősen megnőtt a KI67+ sejtek száma az IFITM1^{high} sejtből származó organoidokhoz képest (66C. ábra). A proliferáló sejtek százalékos arányában mutatkozó kezdeti különbség továbbá eltűnt a két CRC sejt alpopuláció között mEV-kkel vagy sEV-kkel végzett kezelés hatására (66C. ábra). Másrészt nem észleltünk változást az aktív kaspáz-3+ apoptotikus sejtek százalékos arányában (66D. ábra). Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a CRC sejt alpopulációk eltérő mEV vagy sEV felvétele jelentősen módosítja a proliferáló sejtek százalékos arányát organoid modellben.

Az IFITM1 inaktiválása magasabb EV felvételt eredményez CRC organoid sejtekben

Annak tesztelésére, hogy az IFITM1 funkcionálisan fontos-e az IFITM1 expresszióval jellemezhető sejtek fokozott proliferációs képességéhez és csökkent EV felvételéhez, az IFITM1-et a CRISPR-Cas9 rendszerrel inaktiváltuk CRC organoidokban (IFITM1^{KO} sejtek). Az IFITM1 nagymértékben csökkent szintjét áramlási citometriával és immuncitokémiával bizonyítottuk (67A-B. ábra). Emellett az IFITM1^{KO} sejtekből származó organoidok átmérőjének csökkenését is megfigyeltük (67C. ábra). Jelölt humán vastagbél fibroblasztokból izolált EV-k használatakor azt tapasztaltuk, hogy az IFITM1^{KO} organoidokban az EV+ sejtek aránya lényegesen magasabb volt az IFITM1^{WT} sejtekhez képest (67D. ábra), ami azt jelzi, hogy az IFITM1 hiánya indukálta az EV felvételt. Az IFITM1^{low} és IFITM1^{high} populációkhoz hasonlóan az IFITM1^{KO} organoidokban is lecsökkent a KI67+ sejtek aránya az IFITM1^{WT} organoidokhoz képest (67E. ábra). A fibroblaszt eredetű mEV-k vagy sEV-k azonban nagyobb hatást gyakoroltak az IFITM1^{KO} organoidok proliferációjára (67E. ábra), ami az IFITM1-hiányos sejtek fokozott EV felvételének funkcionális hatását jelzi. Összességében ezek az adatok arra utalnak, hogy az IFITM1 nem csak egy olyan marker, amely egy csökkent EV felvétellel jellemezhető CRC sejtpopulációt jelöl, hanem ez a molekula funkcionálisan is részt ennek a folyamatnak a gátlásában.



67. ábra. Az IFITM1 inaktiválása nagyobb EV felvételt eredményez. (A) Az IFITM1 sejtfelszíni expressziója CRC organoid sejteken a molekula CRISPR-alapú inaktiválásával (IFITM1^{KO}), vagy anélkül (IFITM1^{WT}) (áramlási citometria, Ctr: izotípus kontroll IFITM1^{WT} sejtekből). Repreratív hisztogramok (bal oldali panel) és azok mennyiségi analízise látható (jobb oldali panel, n=4, a GeoMean értékeket elemeztük). (B) IFITM1^{WT} vagy IFITM1^{KO} sejtekből származó CRC organoidok immunfestése. (C) Az IFITM1^{WT} és IFITM1^{KO} organoidok átmérői a 3D tenyésztés 7. napján. (D) A jelölt EV jellel rendelkező CRC sejtek százalékos aránya 2D-tenyészetekben. A sejteket az adott genetikai háttérrel rendelkező organoidokból izoláltuk és jelölt fibroblaszt eredetű mEV-kkel kezeltük. (E) A KI67+ organoid sejtek százalékos aránya EV-k hiányában és fibroblaszt-eredetű mEV-k vagy sEV-k jelenlétében (négy organoid vonal konfokális mikroszkópos képeinek mennyiségi meghatározása). Párosítatlan t-próba (A), Mann-Whitney U-próba (C,D) vagy Kruskal-Wallis és Dunn teszt (E). Méretarány: 50 μ m (B).

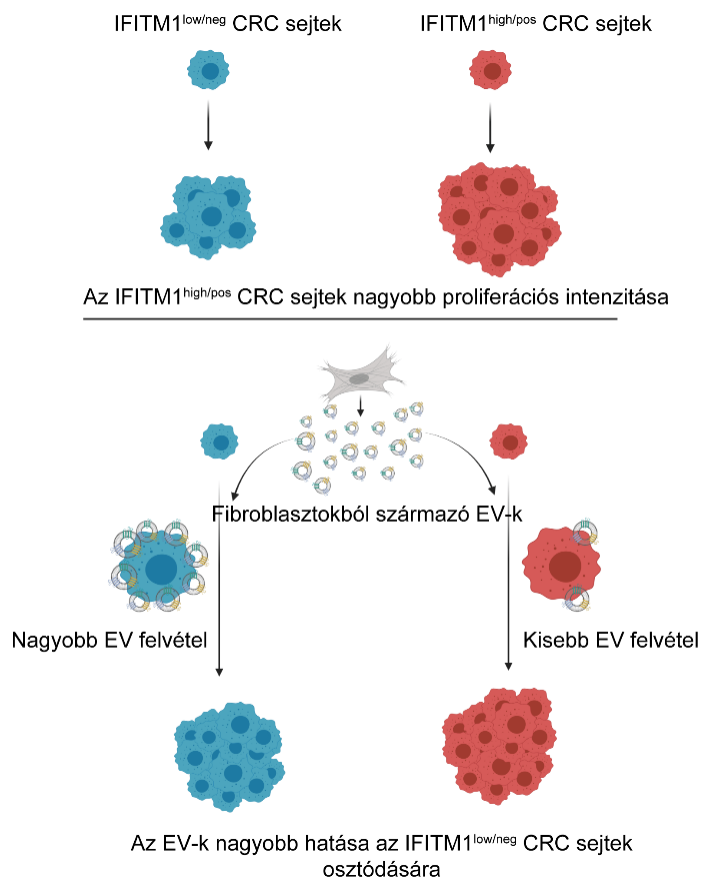
Megbeszélés: az IFITM család tagjait molekuláris markerként azonosították humán kolorektális daganatokban [157]. Más publikált tanulmányok is összekapcsolták az IFITM1-et a vastagbélrák progressziójával, kimutatva, hogy módosítja a CRC sejtvonalak proliferációs, invazív és metasztatikus képességét [158]. A korábbi adatok többsége azonban 2D-ben tenyésztett sejtvonalakat használó modellekből származott, és a mi vizsgálatunk az első, ahol betegekből származó organoidokat használtak az IFITM1+ CRC sejtek jellemzésére.

Az IFITM géneket általában az I-es és II-es típusú interferonok szabályozzák. Genetikailag módosított egér bél organoidok használatával bizonyítottuk, hogy az *Apc* mutáció kritikus tényező az *Ifitm1* expresszió szabályozásában. Eredményeink megegyeznek Lickert és munkatársaival [159], akik a Wnt útvonal szabályozó hatását találták az *Ifitm* génekre gasztruláció során. Ezen kívül megerősítettük Andreu és munkatársai eredményeit [160], amely számos *Ifitm* géncsalád tag szabályozását vizsgálta egérbél adenóma modellekben. Érdekes

módon azonban nem találtunk különbséget az *IFITM1* expressziójában az LGR5^{high} CRC sejtekben az LGR5^{low} sejtekhez képest. Bár az LGR5^{high} sejtek összejt-jellemzőkkel és magas Wnt aktivitással rendelkező CRC-sejtpopulációt képviselnek [43], ez a megállapítás arra utal, hogy az *IFITM1* expresszióját nem csak a Wnt aktiváció erőssége szabályozza, hanem más jelátviteli útvonalak is kritikus hatással lehetnek.

Az IFITM fehérjék rezisztenciát biztosítanak a sejtek számára számos burokkal és burokkal nem rendelkező vírussal szemben, nemcsak *in vitro*, hanem *in vivo* is [161, 162]. Bizonyos vírusokhoz hasonlóan az EV-k is tartalmaznak membránburkot. Bár az IFITM fehérjék hatásmechanizmusa nagyrészt ismeretlen, néhány tanulmány azt javasolta, hogy vírusellenes hatásukat a biológiai membránok fluiditásának, vagy egyéb fizikai tulajdonságainak megváltoztatásával fejtik ki [163, 164], ami az EV felvételre is érvényes lehet. Adataink szerint az IFITM1^{high} sejtek kevesebb EV-t vesznek fel az alacsony IFITM1 expressziójú sejtekhez képest. Eredményeink tehát azt jelzik, hogy a CRC-n belül eltérő az EV felvétel intenzitása. Az IFITM1 inaktiválásával továbbá azt is megmutattuk, hogy ez a molekula funkcionálisan fontos ebben a folyamatban. Érdekes módon az IFITM1^{low} populáció kevesebb osztódó sejtet tartalmazott, mint az IFITM1^{high} populáció. A fibroblaszt eredetű EV-k azonban csökkentették ezt a különbséget az IFITM1^{high} és az IFITM1^{low} sejtek között, és erősebb stimuláló hatásuk volt a sejtproliferációra az IFITM1^{low} CRC alpopulációban, amely több EV-t vett fel. Ezek az adatok nem csak a CRC-ben a proliferáció komplex szabályozását emelik ki, hanem a tumorsejtek eltérő EV felvételének biológiai jelentőségét is illusztrálják.

Az EV-k membránjukban olyan fehérjéket tartalmaznak, amelyek fokozzák a felvételüket, így hatékony szállítási rendszert biztosítanak a gyógyszerek vagy RNS-ek számára az RNS-interferencia (RNAi) alapú megközelítésekben. Ennek a megközelítésnek a használhatóságát a közelmúltban két elegáns tanulmány igazolta, ahol az onkogén KRAS-t specifikusan célzó RNAi célba juttatására szerkesztett EV-eket használtak hasnyálmirigy duktális adenokarcinóma modellekben [165, 166]. Ezek az eredmények lehetőséget teremtenek olyan szerkesztett EV-alapú terápiákra, amelyek más rákos megbetegedések, például a CRC onkogénjeit célozhatják. A tervezett cargo-t szállító EV-k megfelelő és hatékony használata azonban kritikusan függ attól, hogy a daganatsejtek felveszik-e őket. Vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy az IFITM1 gátolja az EV felvételt bizonyos CRC sejtekben. Bár az IFITM1^{low/neg} sejtek kisebb proliferációs potenciállal rendelkeznek, az EV-k hozzáadása nagyobb hatással van osztódásukra, mint az IFITM1^{high} sejteknél (68. ábra). Így az IFITM1 által szabályozott EV felvétel intenzitása kritikus tényező egyes CRC sejtek fontos tumorigén tulajdonságainak, például



proliferációjának módosításában. Mivel ez a tény befolyásolhatja az EV-k hatását a klinikai alkalmazásokban, ezt figyelembe kell venni, amikor az EV-ket terápiás eszközként tervezzük CRC-ben.

68. ábra. Az IFITM1^{low} és IFITM1^{high} CRC sejtek eltérő EV felvétele jelentősen befolyásolja a proliferáció intenzitását.

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

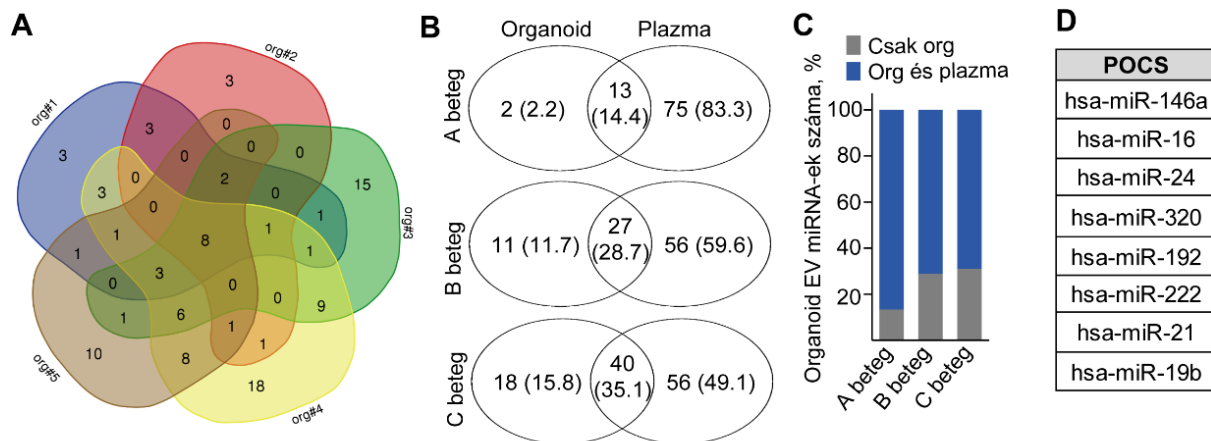
Mivel a daganatból származó EV-k védetten és koncentráltan szállítják daganatspecifikus cargo-jukat a testnedvekben, így ígéretes lehetőséget rejtenek a daganatok korai felismerésében [167, 168]. PDAC-ben és más tumoros megbetegedésekben nehéz *in vivo* elemezni az EV kibocsátást és cargo-t, továbbá az EV-k biomarkerként való lehetséges felhasználását és *in vivo* szerepük megértését PDAC-ben és más hasnyálmirigy betegségekben nagymértékben akadályozza a megfelelő modellek hiánya.

Az sEV izolálás legelterjedtebb hagyományos módszere a differenciális centrifugálás/ultracentrifugálás [169]. A vér azonban nagy mennyiségben tartalmaz lipoproteineket és egyéb molekuláris komplexeket, amelyek az EV-kkel együtt tisztítódnak [5], és ezáltal EV-hez nem kapcsolódó molekulák is kimutatásra kerülhetnek. Számos tanulmány alkalmazta ezt a módszert a vérben keringő EV-k PDAC-ben történő elemzéséhez, és az eredmények között nagyfokú eltérés tapasztalható. 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.

Átfedő miRNS-ek azonosítása

Öt PDAC betegből származó organoid vonalból végeztük el az EV-k miRNS profiljának azonosítását TaqMan low-density array-vel. Valamennyi organoid vonal független volt a külső EGF aktivitástól, nem igényelt noggint, és csak mutáns *TP53* allélt hordozott. Annak érdekében, hogy a lehető legtöbb EV-t izoláljunk, anti-CD63 és anti-CD81 bevonatú gyöngyök keverékét használtuk. A Matrigel-eredetű sejt nélküli felülúszóban (kontroll minta) kimutatott miRNS-eket kivettük a további adatelemzésből. Amikor az EV miRNS-eket jelenlétük (Ct < 42), vagy hiányuk alapján elemeztük a mintákban, több miRNS-t találtunk, amelyek jelen voltak az egyes beteg eredetű organoid vonalokból származó EV-kben, és nyolc miRNS átfedett az összes organoid vonal között (69A. ábra). Ezután páronként összehasonlítottuk a PDAC organoidokból származó EV-k miRNS profilját az adott beteg vérplazmájából anti-CD81 és anti-CD63 bevonatú gyöngyökkel izolált EV-k cargo-jával. A minták (organoidok és plazma) tehát ugyanattól a betegtől származtak. Mivel az organoid tenyészet felülúszói és a vérplazma különböző mintatípusokat képviselnek, ahol a Ct értékek közvetlen összehasonlítása nem informatív, ezért úgy döntöttünk, hogy a miRNS-eket a jelenlétük, vagy hiányuk alapján értékeljük a mintákban. A Matrigel kontrollban jelenlévő miRNS-eket eltávolítottuk az elemzésből. Nagyobb számú plazmából származó EV miRNS-t észleltünk, mint az EV miRNS-ek száma volt ugyanabból a betegből származó PDAC organoid felülúszóban (69B. ábra). Ezen kívül az organoid EV-kben jelen lévő miRNS-ek 75,6 + 9,7%-a (átlag + SD) megtalálható volt a megfelelő PDAC vér EV-kben is (69C. ábra és nem mutatott adatok). 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 (69D. ábra). 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.

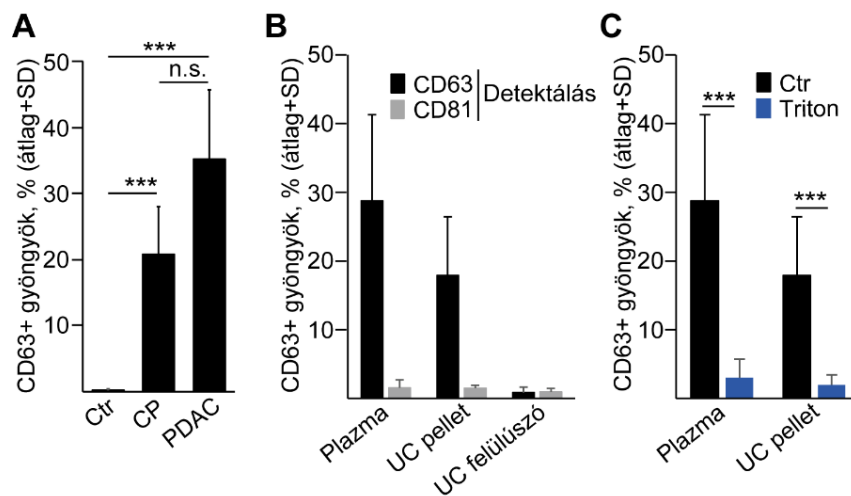


69. ábra. A PDAC organoid vonalakból származó EV miRNS-ek szűrése egy közös miRNS készletet azonosít. (A) Az egyes PDAC organoid vonalokban kimutatott miRNS-ek számából készített Venn-diagram. A < 42 Ct értéket pozitív tekintettük. A kondicionált médium mintákat azonos sejtszámú tenyészetekből izoláltuk. (B-C) PDAC organoid és vérplazma eredetű EV-k miRNS profiljának összehasonlítása három beteg esetében. A zárójelben lévő számok az organoid és/vagy plazma EV-kben kimutatott miRNS-ek százalékos arányát jelzik. Az organoid eredetű EV miRNS-ek többsége a plazma EV-ben is jelen volt (C). (D) A POCS miRNS csoport tagjai.

Mind a PDAC-ben, mind a CP-ben szenvedő betegeknél emelkedett a CD63+ EV-k száma a vérplazmában

Mivel a normál humán hasnyálmirigyszövethez korlátozott a hozzáférés, a POCS PDAC specifikus részhalmozásának 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-ekkel. Először megvizsgáltuk az EV-k mennyiségének különbségeit PDAC vagy CP betegek, illetve kontroll donorok plazmájából származó mintákban. Amikor az anti-CD63-mal bevont gyöngyöket a nagyobb EV-k centrifugálással történt eltávolítása utáni plazmában inkubáltuk, és a gyöngyökhöz kötött EV-eket anti-CD63-mal és áramlási citometriával mutattuk ki, a pozitív gyöngyök százalékos arányának növekedését figyeltük meg a CP és PDAC mintákban a kontrollokhöz képest. Ezzel szemben nem találtunk szignifikáns különbséget a CP és a PDAC csoportok között (70A. ábra). Az anti-CD63-mal bevont gyöngyök által megkötött EV-k kimutathatók voltak anti-CD63-mal, de anti-CD81-gyel nem, ami arra utal, hogy ezek az EV-k csak CD63-ra voltak pozitívak (70B. ábra). Ezen kívül a pozitív gyöngyök százalékos aránya lecsökkent, amikor ultracentrifugálást követően az EV mentes felülúszóban inkubáltuk őket, vagy ha Triton X-100-at adtunk hozzá az antitest után, mely az EV-k membránját lizálja (70B-C. ábra). Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy anti-CD63 bevonatú gyöngyök és anti-CD63 detektáló antitestek használatakor az EV-eket mérjük, és nem az esetleges szabad

CD63 fehérjét/fehérjekomplexet a plazmában. Összességében elmondható, hogy a gyors és szemikvantitatív gyöngy alapú módszerrel és áramlási citometriával kimutatott CD63+ EV-k megnövekedett száma nem specifikus a PDAC-ra.

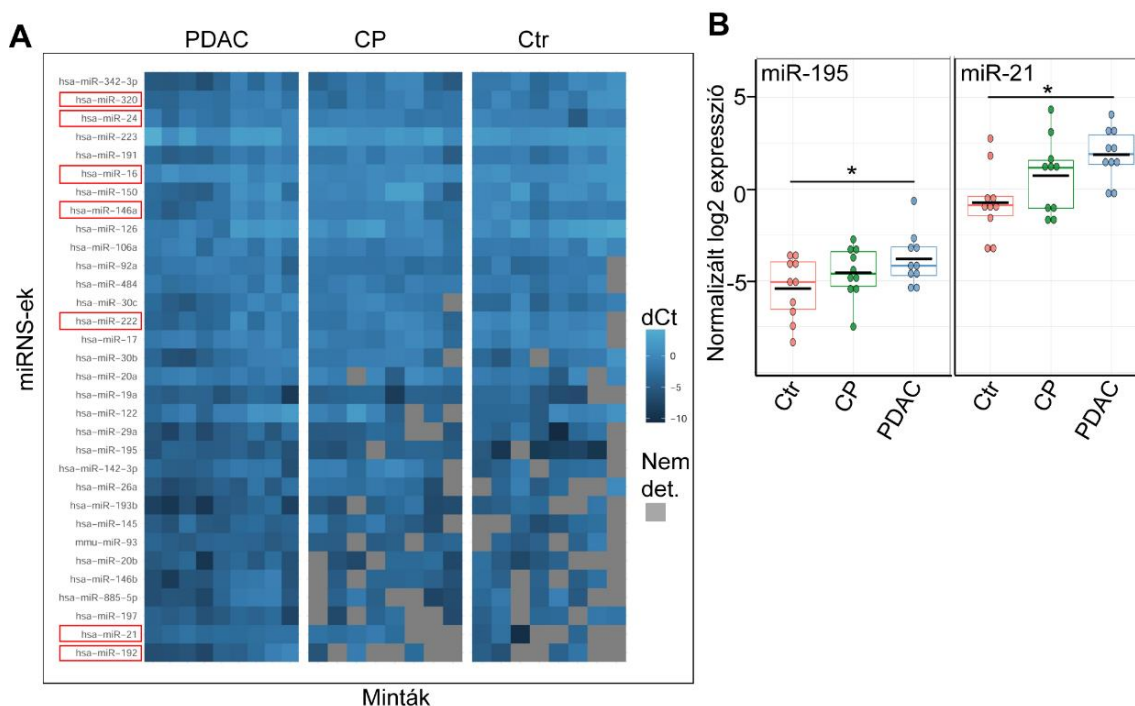


70. ábra. A PDAC vérplazma több EV-t tartalmaz, mint a CP betegek, vagy kontroll személyek mintái. (A) A CD63+ gyöngyök százalékos aránya az adott betegcsoportok plazmamintáiban való inkubálás után, áramlási citometriával kimutatva (n=8–11). CP: krónikus pancreatitis, Ctr egészséges kontroll személyek. A kísérletekben azonos mennyiségű vért alkalmaztunk. (B) Az anti-CD63-mal bevont pozitív gyöngyök százalékos aránya PDAC vérplazmában vagy ultracentrifugált (UC) plazmaminták pelletjében/felülúszójában inkubálás után, anti-CD63-mal vagy anti-CD81-gyel detektálva (áramlási citometria, n=4). (C) Anti-CD63-mal bevont és anti-CD63-mal detektált pozitív gyöngyök százalékos aránya 0,05%-os Triton X-100-zal (Triton) történő inkubálás előtt (Ctr) vagy után (n=4). ANOVA és Tukey post hoc teszt (A) vagy t-teszt (C), ***p<0,005.

A PDAC és CP betegek vérből származó EV-k miRNS profilja jelentősen átfed egymással

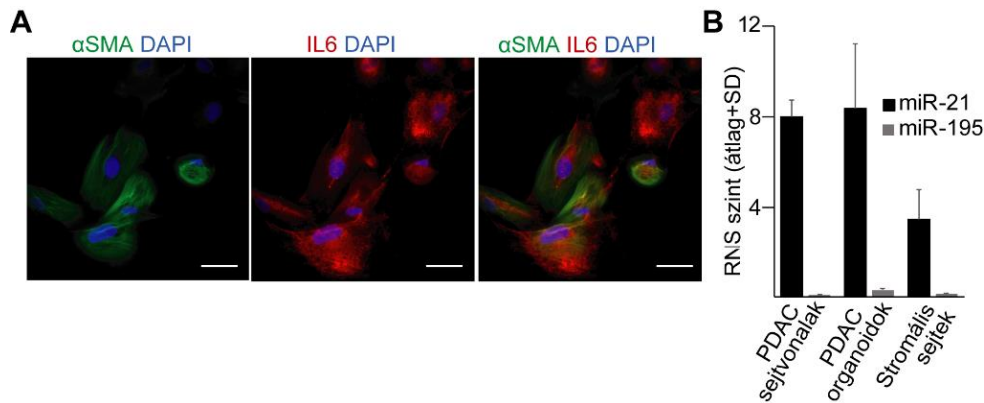
Ezután összehasonlítottuk az anti-CD63 és anti-CD81 bevonatú gyöngyökkel izolált EV-k miRNS-profilját PDAC-ben szenvedő betegek, CP betegek és kontrollok vérből low-density miRNA array-vel. A kiindulási minták EV mennyiségének eltérése miatti miRNS különbségek kizárására a miRNS szinteket miR-19b-re normalizáltuk, melyet két algoritmus is a minták közötti legstabilabb szinttel jellemezhető miRNS-nek talált. Kiválasztottuk azon miRNS-eket, melyek valamennyi PDAC plazmamintából izolált EV preparátumban jelen voltak, és összehasonlítottuk a normalizált szintjeiket a CP és a kontroll vér 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 (71A. ábra). Kimutattunk két miRNS-t, amelyek szignifikánsan feldúsultak a PDAC plazma EV preparátumokban (miR-195 és miR-21) a kontroll mintákhoz képest (71B. ábra), azonban egyik sem különbözött a PDAC és CP vér EV-k összehasonlításakor (71B. ábra). 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.



71. ábra. A PDAC vér EV-kben nagyobb mennyiségben jelen lévő miRNS-ek nem specifikusak erre a betegségre. (A) A PDAC plazma EV minták (PDAC) normalizált miRNS szintjeinek összehasonlítása a CP és a kontroll személyekkel. A szürke négyzetek olyan miRNS-eket jelölnek, amelyek nem voltak detektálhatók a mintákban ($Ct > 42$). A POCS készlet miRNS-eit piros színnel jelöltük. Az adatokat miR-19b-re normalizáltuk, így ez a miRNS nem látható az ábrán. (B) Az EV minták normalizált miR-21 és miR-195 szintjei. Kruskal–Wallis és Dunn teszt (B), $*p < 0,05$

A miR-195 nem mutatható ki a PDAC tumorsejtekből vagy fibroblasztokból származó EV-kben
Ezt követően arra voltunk kíváncsiak, hogy a miR-195 és miR-21 tartalmú EV-k származhatnak-e PDAC tumorsejtekből és/vagy sztrómasejtekből. Ennek vizsgálatára PDAC daganatokból származó sztrómasejteket tenyésztettünk. Ahogy várható volt, ezek a sejtek fibroblaszt fenotípust mutattak, és megerősítettük a CAF markerek jelenlétét (72A. ábra) [62]. Mind PDAC sejtvonalból, mind PDAC organoidokból származó EV-kben is detektáltuk a miR-21-et, a miR-195 azonban nem volt kimutatható (72B. ábra). Hasonlóképpen, a miR-195-öt nem detektáltuk a CAF-okban sem (72B. ábra), ami felveti annak a lehetőségét, hogy a PDAC betegek vérében megfigyelhető EV miR-195 nem a tumor/sztróma sejtekből származik.



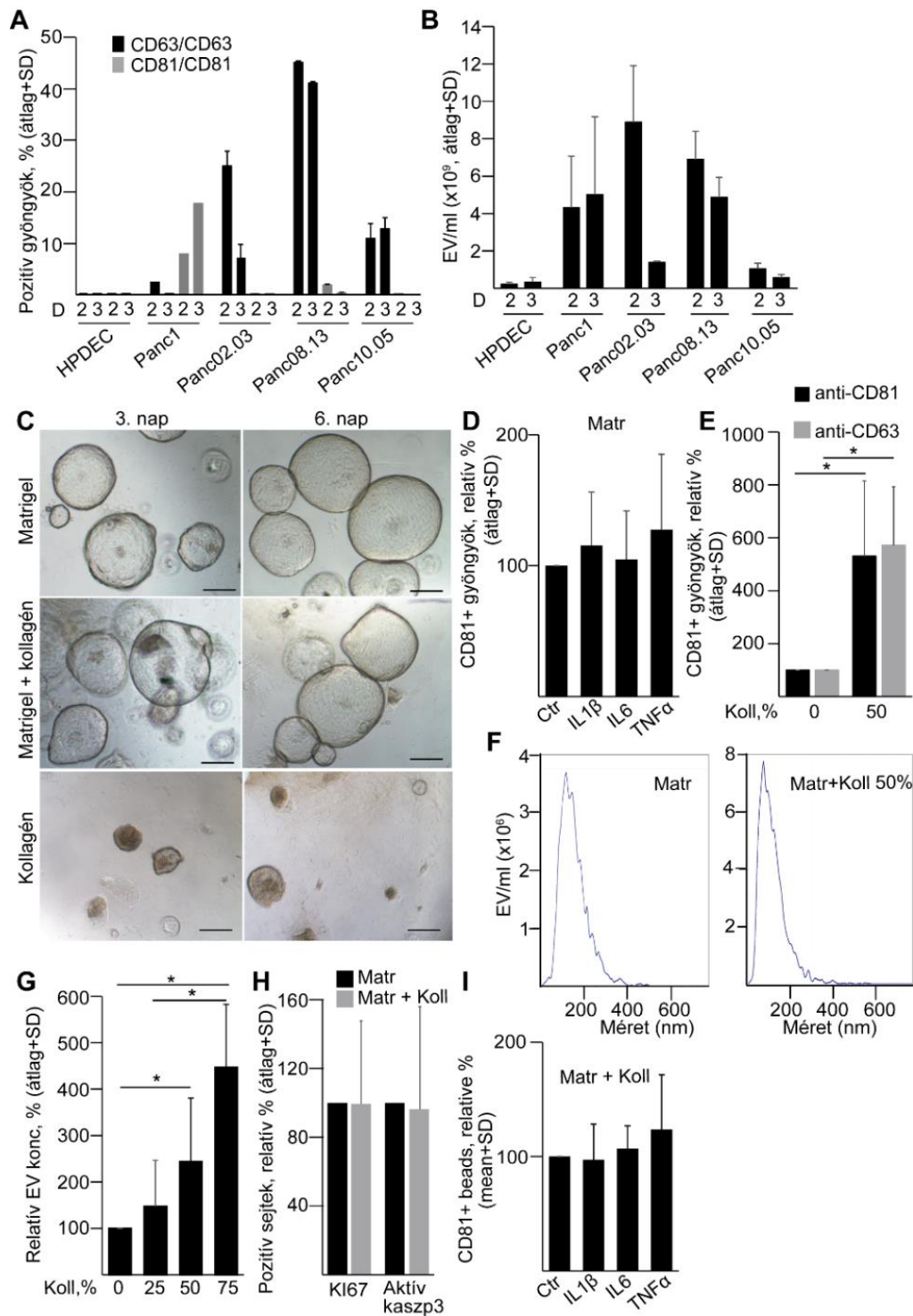
72. ábra. Mind a PDAC tumorsejtek, mind a sztróma sejtek által kibocsátott EV-k tartalmaznak miR-21-et. (A) PDAC mintákból származó sejtenyészetek immunfestése különböző fibroblaszt markerekre (IL6, α SMA). Méretarány: 10 μ m. (B) Panc10.05 sejtekből, PDAC organoidokból és stromális fibroblasztokból izolált EV-k miR-21 és miR-195 szintjei (n=5).

Magasabb EV mennyiség mérhető hasnyálmirigy duktális organoidok kollagén tenyészetében

A PDAC sejtvonalak nagyobb mennyiségű EV-t produkáltak mind a klasszikus 2D, mind pedig 3D Matrigel tenyészetekben, mint a kontroll immortalizált duktális sejtvonal (Fig73A-B. ábra). Emellett nem csak a PDAC, hanem a CP betegek vérplazmamintái is magasabb EV szintet mutattak a kontrollokhoz képest (70A. ábra). 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 a dolgozatban már korábban bemutatott egér hasnyálmirigy duktális organoid modellt használtuk, 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 [170]. Így a CP-ben is ismert szerepet játszó tényezőkre fókuszáltunk, mint a kollagén, IL6, TNF α és IL1 β [171, 172]. A hasnyálmirigy duktális organoidokban kiterjedt sejtpusztulást detektáltunk, amikor tiszta kollagén I-ben tenyésztettük őket (73C. ábra). Az IL6, TNF α vagy IL1 β nem befolyásolta a minták EV mennyiségét Matrigel-ben (73D. ábra). A kollagén-I hozzáadása Matrigelhez azonban megnövelte az EV szintet a duktális organoidok kondicionált médiumában (73E. ábra). Emellett összefüggést találtunk a növekvő kollagénkoncentráció és az EV szám között (73F-G. ábra). Kísérleteinkben az adatok sejtszámra történt normalizálása kizárta azt a lehetőséget, hogy az észlelt EV mennyiségek közötti különbségeket a sejtszám eltérései okozták. Nem találtunk továbbá szignifikáns változást az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek és a proliferáló KI67+ sejtek százalékos arányában, ha 50% kollagént adtunk a Matrigelhez (73H. ábra). Az IL6, a TNF α vagy az IL1 β

sem eredményezett jelentős változást az EV felszabadulásban, amikor az organoidokat kollagén/Matrigelben tenyésztettük (73I. ábra). Összességében adataink bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy nem csak a mutációk, hanem a sejtes mikrokörnyezet kritikus változásai is az EV-szint növekedéséhez vezethetnek a hasnyálmirigy duktális sejtek esetében, mely magyarázatul szolgálhat a CD63+ EV-k megnövekedett mennyiségére, amelyet nem csak PDAC-ben, hanem CP betegek vérmintáiban is észleltünk.



73. ábra. Egér hasnyálmirigy duktális organoidok kollagén I tenyészteteiben magasabb EV szint mutatható ki, mint Matrigel-ben. (A) A jelzett sejtvonalak CD63+/CD81+ EV szekrécioja ellenanyaggal bevont gyöngyökkel és áramlási citometriával mérve (10^6 sejtre normalizálva). A „D” utáni számok 2D vagy 3D kultúrákat jelentenek. A HPDEC immortalizált normál duktális sejtvonal, a többi felhasznált sejtvonal PDAC eredetű. (B) Az EV kibocsátás kvantifikálása 2D és 3D tenyészetekből ($n=4$, az adatok 10^6 sejtre vannak normalizálva). (C) Matrigel-ben, Matrigel-ben és kollagén I-ben (50-50%) vagy kollagén I-ben tenyésztett organoidok morfológiája 3 és 6 nappal passzálás után. Méretarány: 100 μm . (D) A CD81+ gyöngyök relatív százalékos aránya a jelzett kezelések után ($n=4-5$). A tenyészeteket 3 napig kezeltük, majd 2 napig gyűjtöttük az EV-eket. (E) CD81+ gyöngyök Matrigel-ben tenyésztett organoidok kondicionált médiumából kollagén hiányában (0%) vagy 50% kollagén jelenlétében. A pozitív gyöngyöket vagy anti-CD81, vagy anti-CD63 ellenanyaggal detektáltuk. (F-G) Reprerzentatív NTA képek (F) és relatív EV koncentrációk (G) organoid tenyészetek felülúszóiból mérve különböző kollagéntartalom mellett ($n=7$). Az adatokat sejt számra normalizáltuk, majd a Matrigel kontrollt mindig 100%-nak vettük. (H) A KI67+ proliferáló és aktív kaszpáz-3 + apoptotikus organoid sejtek relatív százalékos aránya Matrigel-ben kollagén I nélkül vagy 50% kollagén I jelenlétében ($n=3$). (I) Az 50% Matrigel/50% kollagénben tenyésztett organoidok kondicionált médiumában inkubált, anti-CD81-gyel fedett pozitív gyöngyök relatív százalékos aránya ($n=5$). Párosított t tesztet (D, E, H, I) vagy egyutas ANOVA és Tukey post hoc tesztet (G) alkalmaztunk. * $p < 0,05$

Megbeszélés: tudomásunk szerint ez volt az első olyan vizsgálat, amely PDAC betegekből származó organoidokat használt az EV-k elemzéséhez. A betegekből származó EV-k közötti nagy eltérések ellenére azonosítottunk egy átfedő miRNS halmazt. Mivel az organoidok megtartják a kiindulási szövet sejt heterogenitását, az eltérő tumoros sejtpopulációk jelenléte meghatározhatja az EV-k cargo-ját, ami nagy különbségeket eredményezhet a betegek között.

Melo S és munkatársai az EV-kötött glipikán-1-ről leírták, hogy a PDAC korai stádiumában felhasználható specifikus biomarker [173]. Más tanulmányok azonban nem erősítették meg ezt a következtetést [174, 175], minden bizonnyal más EV izolációs módszerek vagy cargo elemzési szempontok alkalmazása miatt. Más közleményekkel ellentétben mi anti-CD63-mal és anti-CD81-gyel bevont gyöngyöket használtunk. Meglepő módon a miR-21 és a miR-195 nagyobb mennyiségben volt jelen a PDAC EV preparátumokban, mint a kontrollokban, bár nem találtunk különbséget a CP mintákhoz képest. Ez egyértelműen rávilágít arra, hogy a hasnyálmirigy-tumor EV biomarkereinek keresésekor CP mintákat is be kell vonni a kutatásba.

A PDAC vérplazmára jellemző cargo-jú EV-eket nem csak a PDAC tumorsejtek, hanem más sejtek, például a tumorszövet sztrómasejtjei is kiválaszthatják. Mivel az organoidok csak epiteliális eredetű sejteket, például daganatsejteket tartalmaznak, sztrómasejteket azonban nem, így kiváló modellt biztosítanak annak eldöntésére, hogy a vér mely EV miRNS-ei nem tumorsejt eredetűek. Míg a miR-21 mind a PDAC organoid eredetű, mind a vér EV-kben jelen volt, a miR-195-öt nem tudtuk kimutatni az organoid vagy PDAC sejtvonalból származó EV-kben. Ez arra utalhat, hogy a miR-195-öt tartalmazó keringő EV-k nem daganatsejtekből származnak. Ezt az elképzelést Li és munkatársai is alátámasztották, akik a miR-195-öt a CAF-

ok által kiválasztott EV-kben mutatták ki cholangiocarcinomában [176]. Azonban az emelkedett miR-195 szintet a fibroblaszt eredetű EV-kben sem tudtuk kimutatni, ami arra utal, hogy kísérleti rendszerünkben az EV-kbe csomagolt miR-195 nem tumorsejt, vagy sztróma fibroblaszt eredetű.

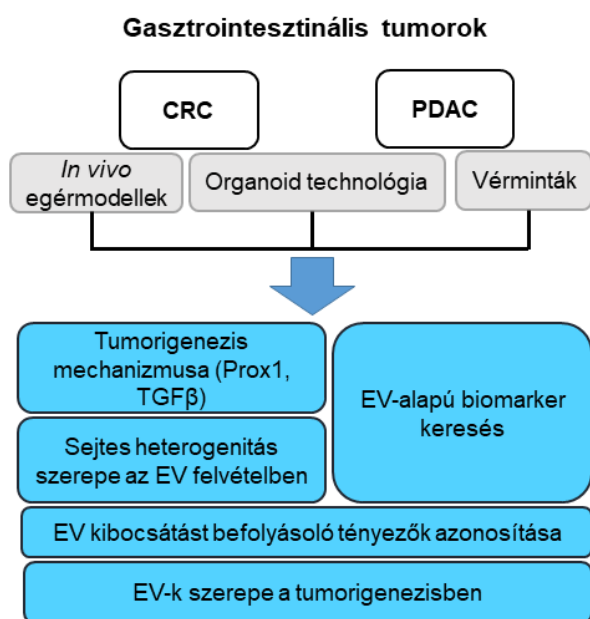
Organoidok segítségével azonosítottuk az I-es típusú kollagén felhalmozódását, mint a hasnyálmirigy duktális sejtekből kikerülő emelkedett EV mennyiség egy lehetséges tényezőjét. Ez nemcsak PDAC-ben, hanem CP betegekben is magasabb CD63+ vérplazma EV szinthez vezethet. A PDAC-hoz hasonlóan a CP-t többnyire dezmozoplázia és ECM átrendeződés kíséri, a fibronectin, az I-es és V-ös típusú kollagén mennyiségi növekedésével [177]. Egy publikáció továbbá széleskörű változást azonosított az ECM-ben CP betegekben [170]. Eredményeinkkel összhangban egy tanulmány kimutatta, hogy a CD43+ sejtek nagyobb mennyiségben bocsátanak ki EV-t, ha I-es típusú kollagénen tenyésztik őket [178].

Összességében elmondhatjuk, hogy a miR-21 és a miR-195 nagyobb mennyiségben van jelen a PDAC vérplazma EV mintáiban a kontrollokhöz képest, bár ezek a miRNS-ek nem specifikusak a PDAC-ra. Organoidok segítségével kimutattuk az átfedést a PDAC sejtekből származó és a keringő EV-k miRNS cargo-ja között. 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 CP és PDAC vérminták emelkedett EV szintjére. Adataink tehát arra utalnak, hogy a betegekben származó organoidok rendkívül releváns eszközt jelentenek az EV-k cargo-jának és sejt eredetének vizsgálatához a biomarkerkutatásban. Továbbá 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. Összefoglalás és kitekintés

6.1 A dolgozat legfőbb új eredményeinek összefoglalása

A dolgozatban egérmmodellek és az organoid technológia felhasználásával két, a gasztrointesztinális rendszert érintő, és kiemelt figyelmet érdemlő tumortípus, a CRC és a PDAC kialakulásában, valamint progressziójában fontos tényezőket vizsgáltuk. Az organoid technológiát az elsők között alkalmaztuk mind a nemzetközi tudományos életben, mind pedig Magyarországon (74. ábra).



74. ábra. A dolgozat vizsgálatának összefoglaló ábrája

A legfőbb új eredmények:

- 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 bélhambal ellentétben- összejtaktivitást mutat intestinális adenomákban/CRC-ben *Apc*-mutáns modellekben. Kimutattuk továbbá, hogy a *Prox1* deléciója csökkentette az *Lgr5*+ adenoma és a CRC összejtpopulációk méretét, valamint az összejtaktivitást. Adataink szerint az *Apc* mutáció következtében kialakuló magas Wnt aktivitás a *Prox1* expresszióját indukálja, és a *Prox1*+/*Lgr5*+ sejtek függetlenné válnak a normál bélhám összejt niche-ben fontos 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 epitelsejtekben megjelenő alacsony szintű gyulladásoz fenotípust átalakítja tumorgátlóból a tumor növekedését serkentő folyamattá.

- A TGF β apoptotikus hatása az egyik fő szelektációs mechanizmus a CRC progressziója során. Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a TGF β a Bim pro-apoptotikus fehérjén keresztül fejti ki apoptotikus hatását, melyben az őssejt aktivitással rendelkező Lgr5+ adenóma 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 adenómasejtek szenzitivitását, a KRas onkogén részleges rezisztenciát biztosít a TGF β által kiváltott apoptózissal szemben. Emellett 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 intestinális 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 szecernálnak, 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+ őssejtjeiben bekövetkező mutációk a CRC tumorigenezis kiindulópontjainak tekinthetők. Az őssejtek egy speciális mikro környezetben, az őssejt niche-ben található. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a fibroblasztok, melyek az intestinális kripták körüli egyik legfontosabb sejt típus, az EGF családba tartozó amfiregulint tartalmazó EV-eket bocsátanak ki, melyeknek közvetlen hatásuk van az Lgr5+ őssejtek proliferációjára.

- Bizonyítottuk, 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 PSIS gének közé tartozó, 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 sztrómasejtek 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 felszabadulást/hozzáférhetőséget a hasnyálmirigy duktális sejtekből.

6.2 Kitekintés

A dolgozat két kiemelt fontosságú gasztrointesztinális tumorról, a CRC-vel és a PDAC-vel foglalkozik, és az organoid technológia központi szerepet játszik a tudományos kérdések megválaszolásában. A CRC magas incidenciája miatt kiemelkedő népegészségügyi problémát jelent, a betegség heterogenitása miatt azonban kialakulásában többféle mechanizmus is szerepet játszik. A Vogelstein modell szerint az Apc mellett/után a KRas, illetve a p53 mutációk felelősek a progresszióért. Mára azonban kiderült, hogy a betegek jelentős részében alternatív útvonalak központi fontossággal bírnak a CRC kialakulásában és fejlődésében. A heterogenitás ellenére a legújabb, génexpressziós mintázaton alapuló CRC klasszifikáció négy nagyobb betegcsoportot eredményezett, melyek közül a CMS4 csoportra különösen jellemző a fibroblasztok nagy száma, az EMT, a rossz prognózis és a kezelési lehetőségek hiánya. Sajnos

azonban nem állnak megfelelő egérmodellek rendelkezésre a CMS4 vizsgálatára, a legjobban használható állatmodell az Akt túlexpresszáltatásán és a p53 delécióján alapul [179]. Így a CRC altípusok kialakulásának megértésére jelenleg az egyik használható rendszer az organoid modell, amely bár csak epiteliális eredetű sejteket tartalmaz, kokultúrákban vizsgálhatók a tumorsejteknek más sejtípusokkal (pl. immunsejtek, fibroblasztok) való kölcsönhatásai is.

Az elsők között alkalmaztam az organoid technológiát Magyarországon, mely mára széleskörűen elterjedtté vált a nemzetközi tudományos irodalomban. Az organoidok egyik jövőbeli felhasználási lehetősége a személyre szabott medicina területén a betegekre specifikus kezelések kiválasztása lehet, amellyel kapcsolatban munkacsoportunk is tesztel új hatóanyag-kombinációkat CRC-ben. Bár a dolgozat az intesztinális, CRC, hasnyálmirigy duktális és PDAC organoidokkal kapcsolatos adatainkat tartalmazza, laboratóriumunkban beállítottuk és alkalmaztuk már a bronchiális, valamint tüdőrák eredetű organoid tenyésztést is, és terveink között szerepel további tumortípusok bevonása.

Az organoidok egy másik jelentős alkalmazási lehetősége a biomarker-kutatás. A dolgozatban bemutatott, PDAC-re fókuszáló, organoidokat, sejtvonalakat és vérmintákat is bevonó komplex megközelítés jó támpontot adhat további tumortípusok esetében is biomarkerek azonosítására. Jövőbeli terveink között szerepel, hogy más hasnyálmirigy betegségek esetében is találjunk olyan molekulákat, melyekkel a malignitási potenciál megjósolható. Ehhez egy fontos lehetőség az EV-k felhasználása, melyek a tumorsejt-eredetű molekulákat nagy koncentrációban tartalmazzák, és védetten szállítják a testnedvekben, így bízható diagnosztikai markerek lehetnek. Ugyanakkor az EV-n alapuló tanulmányok gyakran egymásnak ellentmondó eredményre jutnak, mely részben az eltérő és nem standard EV izolációs és detektálási módszereknek, a kísérleti körülmények által jelentősen befolyásolt EV cargo-nak köszönhető. PDAC organoidokon végzett vizsgálataink során mi is azt tapasztaltuk, hogy az egyes organoid vonalak által kibocsátott EV-k cargo-ja jelentősen eltért egymástól. Bár néhány tanulmány már megjelent az EV-k klinikai célú tisztításáról [165], valamint specifikus molekulákkal való feltöltési lehetőségéről [166], a szélesebb körű alkalmazásukhoz a vizsgálati lehetőségek további fejlesztésére van szükség, melyben az organoid technológia is fontos szerephez juthat.

7. 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, Högström 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 AA, 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 AA, 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 AA, 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 AA, 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

8. Egyéb saját közlemények

Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R,.....**Wiener Z**,..... 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):1535750. eCollection 2018.

Lupsa N, Érsek B, Horváth A, Bencsik A, Lajkó E, Silló P, Oszvald Á, **Wiener Z**, Reményi P, Mikala G, Masszi T, Buzás EI, Pósz Z. Skin-homing CD8+ T cells preferentially express GPI-anchored peptidase inhibitor 16, an inhibitor of cathepsin K. *Eur J Immunol*. 2018;48(12):1944-1957

Osteikoetxea X, Benke M, Rodriguez M, Pálóczi K, Sódar BW, Szvicsek Z, Szabó-Taylor K, Vukman KV, Kittel Á, **Wiener Z**, Vékey K, Harsányi L, Szűcs Á, Turiák L, Buzás EI. Detection and proteomic characterization of extracellular vesicles in human pancreatic juice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;499(1):37-43.

Németh A, Orgovan N, Sódar BW, Osteikoetxea X, Pálóczi K, Szabó-Taylor KÉ, Vukman KV, Kittel Á, Turiák L, **Wiener Z**, Tóth S, Drahos L, Vékey K, Horvath R, Buzás EI. Antibiotic-induced release of small extracellular vesicles (exosomes) with surface-associated DNA. *Sci Rep*. 2017;7(1):8202.

Sódar BW, Kittel Á, Pálóczi K, Vukman KV, Osteikoetxea X, Szabó-Taylor K, Németh A, Sperlággh B, Baranyai T, Giricz Z, **Wiener Z**, Turiák L, Drahos L, Pállinger É, Vékey K, Ferdinandy P, Falus A, Buzás EI. Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. *Sci Rep*. 2016;6:24316.

Kivelä R, Salmela I, Nguyen YH, Petrova TV, Koistinen HA, **Wiener Z**, Alitalo K. The transcription factor Prox1 is essential for satellite cell differentiation and muscle fibre-type regulation. *Nat Commun*. 2016;7:13124

Szmolka A, **Wiener Z**, Matulova ME, Varmuzova K, Rychlik I. Gene Expression Profiles of Chicken Embryo Fibroblasts in Response to Salmonella Enteritidis Infection. *PLoS One*. 2015;10(6):e0127708. eCollection 2015.

Tamminen K, Balboa D, Toivonen S, Pakarinen MP, **Wiener Z**, Alitalo K, Otonkoski T. Intestinal Commitment and Maturation of Human Pluripotent Stem Cells Is Independent of Exogenous FGF4 and R-spondin1. *PLoS One*. 2015;10(7):e0134551. eCollection 2015.

Gilicze AB, **Wiener Z**, Tóth S, Buzás E, Pállinger É, Falcone FH, Falus A. Myeloid-derived microRNAs, miR-223, miR27a, and miR-652, are dominant players in myeloid regulation. *Biomed Res Int*. 2014;2014:870267. Review.

- Holopainen T, López-Alpuche V, Zheng W, Heljasvaara R, Jones D, He Y, Tvorogov D, D'Amico G, **Wiener Z**, Andersson LC, Pihlajaniemi T, Min W, Alitalo K. Deletion of the endothelial Bmx tyrosine kinase decreases tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res.* 2012;72(14):3512-21.
- Molnár V, Érsek B, **Wiener Z**, Tömböl Z, Szabó PM, Igaz P, Falus A. MicroRNA-132 targets HB-EGF upon IgE-mediated activation in murine and human mast cells. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(5):793-808.
- Szabó PM, **Wiener Z**, Tömböl Z, Kovács A, Pócza P, Horányi J, Kulka J, Riesz P, Tóth M, Patócs A, Gaillard RC, Falus A, Rác K, Igaz P. Differences in the expression of histamine-related genes and proteins in normal human adrenal cortex and adrenocortical tumors. *Virchows Arch.* 2009;455(2):133-42
- Tölgyesi G, Molnár V, Semsei AF, Kiszél P, Ungvári I, Pócza P, **Wiener Z**, Komlósi ZI, Kunos L, Gálffy G, Losonczy G, Seres I, Falus A, Szalai C. Gene expression profiling of experimental asthma reveals a possible role of paraoxonase-1 in the disease. *Int Immunol.* 2009;21(8):967-75.
- Tömböl Z, Szabó PM, Molnár V, **Wiener Z**, Tölgyesi G, Horányi J, Riesz P, Reismann P, Patócs A, Likó I, Gaillard RC, Falus A, Rác K, Igaz P. Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. *Endocr Relat Cancer.* 2009;16(3):895-906.
- György B, Tóthfalusi L, Nagy G, Pásztói M, Géher P, Lörinc Z, Polgár A, Rojkovich B, Ujfalussy I, Poór G, Pócza P, **Wiener Z**, Misják P, Koncz A, Falus A, Buzás EI. Natural autoantibodies reactive with glycosaminoglycans in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(5):R110.
- Wiener Z**, Pócza P, Rác M, Nagy G, Tolgyesi G, Molnar V, Jaeger J, Buzas E, Gorbe E, Papp Z, Rigo J, Falus A. IL-18 induces a marked gene expression profile change and increased Ccl1 (I-319) production in mouse mucosal mast cell homologs. *Int Immunol.* 2008;20(12):1565-73.
- Pos Z, **Wiener Z**, Pócza P, Rác M, Toth S, Darvas Z, Molnar V, Hegyesi H, Falus A. Histamine suppresses fibulin-5 and insulin-like growth factor-II receptor expression in melanoma. *Cancer Res.* 2008;68(6):1997-2005.
- Molnár V, Tamási V, Bakos B, **Wiener Z**, Falus A. Changes in miRNA expression in solid tumors: an miRNA profiling in melanomas. *Semin Cancer Biol.* 2008;18(2):111-22. Review.
- Gilicze A, Kohalmi B, Pócza P, Keszei M, Jaeger J, Gorbe E, Papp Z, Toth S, Falus A, **Wiener Z**. HtrA1 is a novel mast cell serine protease of mice and men. *Mol Immunol.* 2007;44(11):2961-8
- Wiener Z**, Kohalmi B, Pócza P, Jaeger J, Tolgyesi G, Toth S, Gorbe E, Papp Z, Falus A. TIM-3 is expressed in melanoma cells and is upregulated in TGF-beta stimulated mast cells. *J Invest Dermatol.* 2007;127(4):906-14.
- Igaz P, **Wiener Z**, Szabó P, Falus A, Gaillard RC, Horányi J, Rác K, Tulassay Z. Functional genomics approaches for the study of sporadic adrenal tumor pathogenesis: clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;101(2-3):87-96. Review.

Wiener Z, Falus A, Toth S. IL-9 increases the expression of several cytokines in activated mast cells, while the IL-9-induced IL-9 production is inhibited in mast cells of histamine-free transgenic mice. *Cytokine*. 2004;26(3):122-31.

Wiener Z, Ontsouka EC, Jakob S, Torgler R, Falus A, Mueller C, Brunner T. Synergistic induction of the Fas (CD95) ligand promoter by Max and NFkappaB in human non-small lung cancer cells. *Exp Cell Res*. 2004;299(1):227-35.

Wiener Z, Andrásfalvy M, Pállinger E, Kovács P, Szalai C, Erdei A, Tóth S, Nagy A, Falus A. Bone marrow-derived mast cell differentiation is strongly reduced in histidine decarboxylase knockout, histamine-free mice. *Int Immunol*. 2002;14(4):381-7

9. 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, és ahol a molekuláris biológiába mélyebb bevezetést kaptam. Szakmai életem egy meghatározó periódusa köthető a Helsinkiben eltöltött posztdoktori évekhez, ahol Prof. Kari Alitalo munkacsoportjában rengeteg lehetőséget kaptam új módszerek kipróbálására, együttműködések kialakítására kiváló kutatókkal, és a szakmai érdeklődésem kibontakoztatására. Köszönet neki ezért az izgalmas periódusért, az élvonalbeli első- és társszerzős munkákért. Hálás vagyok Jenny Högström és Ville Hyvonen PhD hallgatónak, akikkel együtt dolgozhattam Helsinkiben.

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, és idejükből áldoztak a mintavételek megtervezésére és lebonyolítására.

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.

10. Irodalomjegyzék

1. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996;87:159-170.
2. Kowal J, Arras G, Colombo M et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:E968-977.
3. Buzas EI, Gyorgy B, Nagy G et al. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10:356-364.
4. Karimi N, Cvjetkovic A, Jang SC et al. Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after separation from lipoproteins. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75:2873-2886.
5. Sodar BW, Kittel A, Paloczi K et al. Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. *Sci Rep*. 2016;6:24316.
6. Kowal J, Tkach M, Thery C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol*. 2014;29:116-125.
7. Thery C, Witwer KW, Aikawa E et al. 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;7:1535750.
8. Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68:2667-2688.
9. Bebelman MP, Smit MJ, Pegtel DM et al. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol Ther*. 2018;188:1-11.
10. Gudbergsson JM, Johnsen KB, Skov MN et al. Systematic review of factors influencing extracellular vesicle yield from cell cultures. *Cytotechnology*. 2016;68:579-592.
11. 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.
12. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61:759-767.
13. Dutta D, Heo I, Clevers H. Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. *Trends Mol Med*. 2017;23:393-410.
14. Xu H, Lyu X, Yi M et al. Organoid technology and applications in cancer research. *J Hematol Oncol*. 2018;11:116.
15. Boj SF, Hwang CI, Baker LA et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell*. 2015;160:324-338.
16. 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.
17. Sato T, Stange DE, Ferrante M et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*. 2011;141:1762-1772.
18. Huch M, Dorrell C, Boj SF et al. In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature*. 2013;494:247-250.
19. 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.
20. 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.

21. Schuijers J, Clevers H. Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *EMBO J.* 2012;31:2685-2696.
22. de Lau W, Peng WC, Gros P et al. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev.* 2014;28:305-316.
23. 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.
24. Li L, Tang P, Li S et al. Notch signaling pathway networks in cancer metastasis: a new target for cancer therapy. *Med Oncol.* 2017;34:180.
25. Bray SJ. Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17:722-735.
26. Makinen MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology.* 2007;50:131-150.
27. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE et al. Cancer genome landscapes. *Science.* 2013;339:1546-1558.
28. 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.
29. 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.
30. Levy DB, Smith KJ, Beazer-Barclay Y et al. Inactivation of both APC alleles in human and mouse tumors. *Cancer Res.* 1994;54:5953-5958.
31. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487:330-337.
32. Juarez M, Egoavil C, Rodriguez-Soler M et al. KRAS and BRAF somatic mutations in colonic polyps and the risk of metachronous neoplasia. *PLoS One.* 2017;12:e0184937.
33. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a001008.
34. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138:2073-2087 e2073.
35. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell.* 2008;134:215-230.
36. 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.
37. Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llargo A et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2015.
38. Massague J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:169-178.
39. Guinney J, Dienstmann R, Wang X et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21:1350-1356.
40. Fessler E, Drost J, van Hooff SR et al. TGFbeta signaling directs serrated adenomas to the mesenchymal colorectal cancer subtype. *EMBO Mol Med.* 2016;8:745-760.
41. Sampieri K, Fodde R. Cancer stem cells and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2012;22:187-193.
42. Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE et al. Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science.* 2012;337:730-735.
43. 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.

44. Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S et al. Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells. *Nature*. 2017;545:187-192.
45. Merlos-Suarez A, Barriga FM, Jung P et al. The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell*. 2011;8:511-524.
46. 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.
47. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007;445:111-115.
48. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007;445:106-110.
49. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:10158-10163.
50. Snippert HJ, van Es JH, van den Born M et al. Prominin-1/CD133 marks stem cells and early progenitors in mouse small intestine. *Gastroenterology*. 2009;136:2187-2194 e2181.
51. Zeilstra J, Joosten SP, van Andel H et al. Stem cell CD44v isoforms promote intestinal cancer formation in Apc(min) mice downstream of Wnt signaling. *Oncogene*. 2014;33:665-670.
52. Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:13427-13432.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. Ruckert MT, de Andrade PV, Santos VS et al. Protein tyrosine phosphatases: promising targets in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76:2571-2592.
57. 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.
58. Wang VM, Ferreira RMM, Almagro J et al. CD9 identifies pancreatic cancer stem cells and modulates glutamine metabolism to fuel tumour growth. *Nat Cell Biol*. 2019;21:1425-1435.
59. Li C, Heidt DG, Dalerba P et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. 2007;67:1030-1037.
60. Banerjee S, Nomura A, Sangwan V et al. CD133+ tumor initiating cells in a syngenic murine model of pancreatic cancer respond to Minnelide. *Clin Cancer Res*. 2014;20:2388-2399.
61. Lan L, Evan T, Li H et al. GREM1 is required to maintain cellular heterogeneity in pancreatic cancer. *Nature*. 2022;607:163-168.
62. Ohlund D, Handly-Santana A, Biffi G et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med*. 2017;214:579-596.
63. Biffi G, Oni TE, Spielman B et al. IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGFbeta to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2019;9:282-301.

64. Driehuis E, van Hoeck A, Moore K et al. Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow personalized drug screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019.
65. 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.
66. 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.
67. Harvey NL, Srinivasan RS, Dillard ME et al. Lymphatic vascular defects promoted by Prox1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity. *Nat Genet*. 2005;37:1072-1081.
68. Elyada E, Pribluda A, Goldstein RE et al. CK1alpha ablation highlights a critical role for p53 in invasiveness control. *Nature*. 2011;470:409-413.
69. Srinivasan RS, Dillard ME, Lagutin OV et al. Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature. *Genes Dev*. 2007;21:2422-2432.
70. van de Wetering M, Francies HE, Francis JM et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell*. 2015;161:933-945.
71. Inokuchi J, Lau A, Tyson DR et al. Loss of annexin A1 disrupts normal prostate glandular structure by inducing autocrine IL-6 signaling. *Carcinogenesis*. 2009;30:1082-1088.
72. Kovacs AF, Lang O, Turiak L et al. The impact of circulating preeclampsia-associated extracellular vesicles on the migratory activity and phenotype of THP-1 monocytic cells. *Sci Rep*. 2018;8:5426.
73. Battle E, Henderson JT, Beghtel H et al. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell*. 2002;111:251-263.
74. Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev*. 2005;19:877-890.
75. Sansom OJ, Reed KR, van de Wetering M et al. Cyclin D1 is not an immediate target of beta-catenin following Apc loss in the intestine. *J Biol Chem*. 2005;280:28463-28467.
76. de Sousa EMF, Colak S, Buikhuisen J et al. Methylation of cancer-stem-cell-associated Wnt target genes predicts poor prognosis in colorectal cancer patients. *Cell Stem Cell*. 2011;9:476-485.
77. Bazigou E, Lyons OT, Smith A et al. Genes regulating lymphangiogenesis control venous valve formation and maintenance in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:2984-2992.
78. Van der Flier LG, Sabates-Bellver J, Oving I et al. The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology*. 2007;132:628-632.
79. Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL et al. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:3722-3727.
80. Ashley N, Yeung TM, Bodmer WF. Stem cell differentiation and lumen formation in colorectal cancer cell lines and primary tumors. *Cancer Res*. 2013;73:5798-5809.
81. Maschler S, Gebeshuber CA, Wiedemann EM et al. Annexin A1 attenuates EMT and metastatic potential in breast cancer. *EMBO Mol Med*. 2010;2:401-414.
82. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med*. 2013;19:619-625.
83. Ehrlicher AJ, Nakamura F, Hartwig JH et al. Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A. *Nature*. 2011;478:260-263.

84. Zhou AX, Hartwig JH, Akyurek LM. Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell Biol.* 2010;20:113-123.
85. Kim HA, Koo BK, Cho JH et al. Notch1 counteracts WNT/beta-catenin signaling through chromatin modification in colorectal cancer. *J Clin Invest.* 2012;122:3248-3259.
86. Sato K, Tsuchihara K, Fujii S et al. Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Res.* 2007;67:9677-9684.
87. Cristante E, McArthur S, Mauro C et al. Identification of an essential endogenous regulator of blood-brain barrier integrity, and its pathological and therapeutic implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:832-841.
88. Surrel F, Jemel I, Boilard E et al. Group X phospholipase A2 stimulates the proliferation of colon cancer cells by producing various lipid mediators. *Mol Pharmacol.* 2009;76:778-790.
89. Zheng X, Zhou AX, Rouhi P et al. Hypoxia-induced and calpain-dependent cleavage of filamin A regulates the hypoxic response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:2560-2565.
90. Hu YL, DeLay M, Jahangiri A et al. Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. *Cancer Res.* 2012;72:1773-1783.
91. Ragusa S, Cheng J, Ivanov KI et al. PROX1 promotes metabolic adaptation and fuels outgrowth of Wnt(high) metastatic colon cancer cells. *Cell Rep.* 2014;8:1957-1973.
92. Munoz NM, Upton M, Rojas A et al. Transforming growth factor beta receptor type II inactivation induces the malignant transformation of intestinal neoplasms initiated by Apc mutation. *Cancer Res.* 2006;66:9837-9844.
93. Zeng Q, Phukan S, Xu Y et al. Tgfbr1 haploinsufficiency is a potent modifier of colorectal cancer development. *Cancer Res.* 2009;69:678-686.
94. Moustakas A, Heldin CH. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development.* 2009;136:3699-3714.
95. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 2007;26:1324-1337.
96. Labi V, Grespi F, Baumgartner F et al. Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy? *Cell Death Differ.* 2008;15:977-987.
97. Janssen KP, Alberici P, Fsihi H et al. APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology.* 2006;131:1096-1109.
98. Nakao A, Afrakhte M, Moren A et al. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature.* 1997;389:631-635.
99. Ley R, Balmanno K, Hadfield K et al. Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem.* 2003;278:18811-18816.
100. Brunner AM, Marquardt H, Malacko AR et al. Site-directed mutagenesis of cysteine residues in the pro region of the transforming growth factor beta 1 precursor. Expression and characterization of mutant proteins. *J Biol Chem.* 1989;264:13660-13664.
101. Dandapat A, Hu CP, Li D et al. Overexpression of TGFbeta1 by adeno-associated virus type-2 vector protects myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Gene Ther.* 2008;15:415-423.
102. Heldin CH, Landstrom M, Moustakas A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21:166-176.
103. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:479-507.

104. Parsons R, Myeroff LL, Liu B et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1995;55:5548-5550.
105. Takaku K, Oshima M, Miyoshi H et al. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell.* 1998;92:645-656.
106. Gong Y, Somwar R, Politi K et al. Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas. *PLoS Med.* 2007;4:e294.
107. Costa DB, Halmos B, Kumar A et al. BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med.* 2007;4:1669-1679; discussion 1680.
108. Cragg MS, Kuroda J, Puthalakath H et al. Gefitinib-induced killing of NSCLC cell lines expressing mutant EGFR requires BIM and can be enhanced by BH3 mimetics. *PLoS Med.* 2007;4:1681-1689; discussion 1690.
109. Faber AC, Corcoran RB, Ebi H et al. BIM expression in treatment-naive cancers predicts responsiveness to kinase inhibitors. *Cancer Discov.* 2011;1:352-365.
110. Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med.* 2012;18:521-528.
111. Billard C. BH3 mimetics: status of the field and new developments. *Mol Cancer Ther.* 2013;12:1691-1700.
112. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol.* 2010;12:19-30; sup pp 11-13.
113. Drost J, van Jaarsveld RH, Ponsioen B et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature.* 2015;521:43-47.
114. Matano M, Date S, Shimokawa M et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med.* 2015;21:256-262.
115. Vellinga TT, den Uil S, Rinkes IH et al. Collagen-rich stroma in aggressive colon tumors induces mesenchymal gene expression and tumor cell invasion. *Oncogene.* 2016;35:5263-5271.
116. Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer.* 2018;18:407-418.
117. Fujii M, Shimokawa M, Date S et al. A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis. *Cell Stem Cell.* 2016;18:827-838.
118. Zomer A, Maynard C, Verweij FJ et al. In Vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell.* 2015;161:1046-1057.
119. Koliopanos A, Friess H, Kleeff J et al. Heparanase expression in primary and metastatic pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2001;61:4655-4659.
120. Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res.* 2006;66:4795-4801.
121. Dou Y, Cha DJ, Franklin JL et al. Circular RNAs are down-regulated in KRAS mutant colon cancer cells and can be transferred to exosomes. *Sci Rep.* 2016;6:37982.
122. Cha DJ, Franklin JL, Dou Y et al. KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes. *Elife.* 2015;4:e07197.
123. Komekado H, Yamamoto H, Chiba T et al. Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. *Genes Cells.* 2007;12:521-534.

124. Catalano V, Di Franco S, Iovino F et al. CD133 as a target for colon cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16:259-267.
125. Golubkov VS, Prigozhina NL, Zhang Y et al. Protein-tyrosine pseudokinase 7 (PTK7) directs cancer cell motility and metastasis. *J Biol Chem*. 2014;289:24238-24249.
126. Zoller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer*. 2011;11:254-267.
127. Gallo A, Tandon M, Alevizos I et al. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One*. 2012;7:e30679.
128. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y et al. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:402.
129. Carter JV, Galbraith NJ, Yang D et al. Blood-based microRNAs as biomarkers for the diagnosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2017;116:762-774.
130. Sun Y, Sukumaran P, Varma A et al. Cholesterol-induced activation of TRPM7 regulates cell proliferation, migration, and viability of human prostate cells. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843:1839-1850.
131. Huang B, Song BL, Xu C. Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat Metab*. 2020;2:132-141.
132. Zettler ME, Prociuk MA, Austria JA et al. OxLDL stimulates cell proliferation through a general induction of cell cycle proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H644-653.
133. Farin HF, Karthaus WR, Kujala P et al. Paneth cell extrusion and release of antimicrobial products is directly controlled by immune cell-derived IFN-gamma. *J Exp Med*. 2014;211:1393-1405.
134. Tuysuz N, van Bloois L, van den Brink S et al. Lipid-mediated Wnt protein stabilization enables serum-free culture of human organ stem cells. *Nat Commun*. 2017;8:14578.
135. Yin X, Farin HF, van Es JH et al. Niche-independent high-purity cultures of Lgr5+ intestinal stem cells and their progeny. *Nat Methods*. 2014;11:106-112.
136. Farin HF, Jordens I, Mosa MH et al. Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. *Nature*. 2016;530:340-343.
137. Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K et al. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol*. 2012;14:1036-1045.
138. Martin-Medina A, Lehmann M, Burgy O et al. Increased Extracellular Vesicles Mediate WNT-5A Signaling in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018.
139. Gross JC, Zelarayan LC. The Mingle-Mangle of Wnt Signaling and Extracellular Vesicles: Functional Implications for Heart Research. *Front Cardiovasc Med*. 2018;5:10.
140. Dzialo E, Rudnik M, Koning RI et al. WNT3a and WNT5a Transported by Exosomes Activate WNT Signaling Pathways in Human Cardiac Fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 2019;20.
141. Kaiser K, Gyllborg D, Prochazka J et al. WNT5A is transported via lipoprotein particles in the cerebrospinal fluid to regulate hindbrain morphogenesis. *Nat Commun*. 2019;10:1498.
142. Saha S, Aranda E, Hayakawa Y et al. Macrophage-derived extracellular vesicle-packaged WNTs rescue intestinal stem cells and enhance survival after radiation injury. *Nat Commun*. 2016;7:13096.
143. Singh AB, Harris RC. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal*. 2005;17:1183-1193.

144. Berasain C, Avila MA. Amphiregulin. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;28:31-41.
145. Higginbotham JN, Demory Beckler M, Gephart JD et al. Amphiregulin exosomes increase cancer cell invasion. *Curr Biol.* 2011;21:779-786.
146. Kinchen J, Chen HH, Parikh K et al. Structural Remodeling of the Human Colonic Mesenchyme in Inflammatory Bowel Disease. *Cell.* 2018;175:372-386 e317.
147. Sastre D, Baiocchi J, de Souza Lima IM et al. Focused screening reveals functional effects of microRNAs differentially expressed in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2019;19:1239.
148. Shao Q, Xu J, Deng R et al. SNHG 6 promotes the progression of Colon and Rectal adenocarcinoma via miR-101-3p and Wnt/beta-catenin signaling pathway. *BMC Gastroenterol.* 2019;19:163.
149. Savardashtaki A, Shabaninejad Z, Movahedpour A et al. miRNAs derived from cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer. *Epigenomics.* 2019;11:1627-1645.
150. Hu JL, Wang W, Lan XL et al. CAFs secreted exosomes promote metastasis and chemotherapy resistance by enhancing cell stemness and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Mol Cancer.* 2019;18:91.
151. Rojas JM, Alejo A, Martin V et al. Viral pathogen-induced mechanisms to antagonize mammalian interferon (IFN) signaling pathway. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78:1423-1444.
152. 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.
153. Weston S, Czieso S, White IJ et al. A membrane topology model for human interferon inducible transmembrane protein 1. *PLoS One.* 2014;9:e104341.
154. Smith S, Weston S, Kellam P et al. IFITM proteins-cellular inhibitors of viral entry. *Curr Opin Virol.* 2014;4:71-77.
155. Bailey CC, Zhong G, Huang IC et al. IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense. *Annu Rev Virol.* 2014;1:261-283.
156. Haraszti RA, Didiot MC, Sapp E et al. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J Extracell Vesicles.* 2016;5:32570.
157. Liang R, Li X, Zhu X. Deciphering the Roles of IFITM1 in Tumors. *Mol Diagn Ther.* 2020;24:433-441.
158. Sari IN, Yang YG, Phi LT et al. Interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1) is required for the progression of colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016;7:86039-86050.
159. Lickert H, Cox B, Wehrle C et al. Dissecting Wnt/beta-catenin signaling during gastrulation using RNA interference in mouse embryos. *Development.* 2005;132:2599-2609.
160. Andreu P, Colnot S, Godard C et al. Identification of the IFITM family as a new molecular marker in human colorectal tumors. *Cancer Res.* 2006;66:1949-1955.
161. Everitt AR, Clare S, Pertel T et al. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. *Nature.* 2012;484:519-523.
162. Savidis G, Perreira JM, Portmann JM et al. The IFITMs Inhibit Zika Virus Replication. *Cell Rep.* 2016;15:2323-2330.
163. Chesarino NM, Compton AA, McMichael TM et al. IFITM3 requires an amphipathic helix for antiviral activity. *EMBO Rep.* 2017;18:1740-1751.
164. Li K, Markosyan RM, Zheng YM et al. IFITM proteins restrict viral membrane hemifusion. *PLoS Pathog.* 2013;9:e1003124.

165. Mendt M, Kamerkar S, Sugimoto H et al. Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer. *JCI Insight*. 2018;3.
166. Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H et al. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*. 2017;546:498-503.
167. Li C, Xu X. Biological functions and clinical applications of exosomal non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76:4203-4219.
168. Chen R, Xu X, Qian Z et al. The biological functions and clinical applications of exosomes in lung cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76:4613-4633.
169. Nuzhat Z, Kinhal V, Sharma S et al. Tumour-derived exosomes as a signature of pancreatic cancer - liquid biopsies as indicators of tumour progression. *Oncotarget*. 2017;8:17279-17291.
170. Tian C, Clauser KR, Ohlund D et al. 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;116:19609-19618.
171. Lesina M, Wormann SM, Neuhofer P et al. Interleukin-6 in inflammatory and malignant diseases of the pancreas. *Semin Immunol*. 2014;26:80-87.
172. Mews P, Phillips P, Fahmy R et al. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *Gut*. 2002;50:535-541.
173. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015;523:177-182.
174. Lucien F, Lac V, Billadeau DD et al. Glypican-1 and glycoprotein 2 bearing extracellular vesicles do not discern pancreatic cancer from benign pancreatic diseases. *Oncotarget*. 2019;10:1045-1055.
175. Lai X, Wang M, McElyea SD et al. A microRNA signature in circulating exosomes is superior to exosomal glypican-1 levels for diagnosing pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 2017;393:86-93.
176. Li L, Piontek K, Ishida M et al. Extracellular vesicles carry microRNA-195 to intrahepatic cholangiocarcinoma and improve survival in a rat model. *Hepatology*. 2017;65:501-514.
177. Pandol S, Edderkaoui M, Gukovsky I et al. Desmoplasia of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7:S44-47.
178. McNeill B, Ostojic A, Rayner KJ et al. Collagen biomaterial stimulates the production of extracellular vesicles containing microRNA-21 and enhances the proangiogenic function of CD34(+) cells. *FASEB J*. 2019;33:4166-4177.
179. Varga J, Nicolas A, Petrocelli V et al. AKT-dependent NOTCH3 activation drives tumor progression in a model of mesenchymal colorectal cancer. *J Exp Med*. 2020;217.