

# Tumor mikrokörnyezeti tényezők vizsgálata organoid modellekkel

Doktori értekezés

**Soós András Áron**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Wiener Zoltán, PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Enyedi Ágnes, DSc, tudományos tanácsadó  
Dr. Tárnok Krisztián, PhD, egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Tordai Attila, MD, DSc, tanszékvezető egyetemi tanár

Tagok: Dr. Vellainé Takács Krisztina, PhD, egyetemi docens  
Dr. Mayer Balázs, PhD, tudományos főmunkatárs

Budapest  
2023.

## **Tartalomjegyzék**

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	8
1.1. A Wnt jelátviteli útvonal és Wnt mikroniche.....	8
1.2. A BCL-2 apoptotikus útvonal jelentősége tumorokban.....	11
1.3. A RAS jelátviteli út jelentősége tumorokban.....	11
1.4. Az organoid technológia.....	13
1.5. A pancreas duktális adenokarcinóma jellemzői.....	15
1.6. A colorectális karcinóma jellemzői.....	17
1.7. A tumor mikrokörnyezet.....	21
1.7.1. A tumor asszociált fibroblasztok.....	22
1.7.2. Az extracelluláris vezikulák.....	25
2. Célkitűzések.....	28
3. Módszerek.....	29
3.1 A kísérletekhez szükséges engedélyek.....	29
3.2. Humán PDAC organoid kultúrák.....	29
3.3. Humán CRC organoid kultúrák.....	30
3.4. Humán PDAC fibroblaszt kultúrák.....	31
3.5. Humán CRC és normál colon fibroblaszt kultúrák.....	31
3.6. Extracelluláris vezikula mérés NTA módszerrel.....	33
3.7. Immuncitokémia.....	33
3.8. Paraffinba ágyazott szövetek immunfestése.....	35
3.9. Áramlási citometria és sejt szortolás.....	35
3.10. ELISA.....	35
3.11. RNS izolálás és mRNS mérés.....	36

3.12. Szekvenálás .....	37
3.13. Életképességi teszt.....	38
3.14. Bioinformatikai és statisztikai elemzések.....	38
4. Eredmények.....	39
4.1. A Wnt szekréció nem befolyásolja az extracelluláris vezikula kibocsátást és a sejtosztódást PDAC-ben.....	39
4.2. CD142-t magasan expresszáló stromális sejtek megtalálhatók CRC-ben.....	41
4.3. A CD142 stimulációja fibroblasztokon nem befolyásolja a CRC organoidokat kokultúrában.....	44
4.4. A TGFβ a CD142 <sup>magas</sup> fibroblasztok felhalmozódását okozza, melyek kevert myCAF és iCAF tulajdonságokkal rendelkeznek .....	45
4.5. A CD142 <sup>magas</sup> fibroblasztok HGF szekréció révén serkentik a CRC organoidok osztódását .....	47
4.6. Új kombinációs terápiák szinergisztikusan hatnak a beteg-eredetű CRC organoidokon.....	49
4.7. A HSP90i hatására csökken a CD142 <sup>magas</sup> fibroblasztok aránya.....	52
5. Megbeszélés .....	55
5.1. A Wnt mikroniche vizsgálata PDAC-ben .....	55
5.2. A fibroblaszt heterogenitás vizsgálata CRC-ben.....	56
6. Következtetések.....	60
7. Összefoglalás.....	61
7.1. Summary.....	62
8. Irodalomjegyzék .....	63
9. Saját publikációk jegyzéke .....	86
9.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények .....	86
9.2. Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények .....	86
10. Köszönetnyilvánítás .....	88

## **Rövidítések jegyzéke**

2D: kétdimenziós

3D: háromdimenziós

5FU: 5-fluorouracil

$\alpha$ SMA:  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -simaizom aktin) / alfa 2 aktin

ACTA2:  $\alpha$ -simaizom aktin / alfa 2 aktin

APC: adenomatosis polyposis coli tumor szupresszor

AREG: amphiregulin

ARID1A: adenine-thymine rich interaction domain 1A (adenin-timin gazdag interakciós domén 1A)

BCLi: BCL-xL inhibitor A-1155463

BSA: bovine serum albumine (szarvasmarha szérum albumin)

BTC:  $\beta$ -cellulin

CAF: cancer associated fibroblast (tumor asszociált fibroblaszt)

CCL: C-C motif chemokine ligand (C-C motívum kemokin ligand)

CDH1: cadherin 1 / E-cadherin

CDKN2A: ciklin dependens kináz inhibitor 2A

cDNS: complementary DNS (komplement DNS)

CK1: kazein kináz 1

CM: conditioned medium (kondicionált médium)

CMS: consensus molecular subtypes (konszenzus molekuláris altípusok)

COL1A1: I-típusú kollagén, alfa 1

CRC: colorectal cancer (vastag- és végbél daganat)

CSF3: colony stimulating factor 3 (kolónia stimuláló faktor 3)

CTGF: connective tissue growth factor (kötőszöveti növekedési faktor)

CV: coefficient of variation (variációs koefficiens)

CXCL: C-X-C motif chemokine ligand (C-X-C motívum kemokin ligand)

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-diamidino-2-fenilindol)

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

DMSO: dimethyl sulfoxide (dimetil-szulfoxid)

DNS: deoxiribonukleinsav  
DVL: dishevelled fehérje  
ECM: extracelluláris mátrix  
EDTA: ethylene-diamine-tetraacetic acid (etilén-diamid-tetraecetsav)  
EGF: epidermal growth factor (epidermális növekedési faktor)  
EGFR: epidermal growth factor receptor (epidermális növekedési faktor receptor)  
EMT: epithelial-mesenchymal transition (epiteliális-mezenchimális átmenet)  
EpCAM: epithelial cell adhesion molecule (epiteliális sejt adhéziós molekula)  
EREG: epiregulin  
EV: extracelluláris vezikula  
FAP: fibroblast activation protein (fibroblaszt aktivációs fehérje)  
FBS: foetal bovine serum (magzati borjú savó)  
FGF: fibroblast growth factor (fibroblaszt növekedési faktor)  
FSP1: fibroblast specific protein-1 (fibroblaszt specifikus fehérje-1)  
FVIIa: aktív VII-alvadási faktor  
FZD: frizzled receptor  
GAP: GTPase-activating protein (GTPáz aktiváló protein)  
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz)  
GDP: guanosine-diphosphate (guanozin-difoszfát)  
GEF: guanine-nucleotide exchange factor (guanin nukleotid kicserélő faktor)  
GSK3 $\beta$ : glikogén szintáz kináz 3 $\beta$   
GTP: guanosine-triphosphate (guanozin-trifoszfát)  
HBEGF: heparin binding EGF-like growth factor (heparin kötő EGF-szerű növekedési faktor)  
HGF: hepatocyte growth factor (hepatocita növekedési faktor)  
HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyltransferase (hipoxantin foszforibozil-transzferáz)  
HSP90: heat shock protein-90 (hősokk fehérje-90)  
HSP90i: HSP90 inhibitor PU-H71  
iCAF: inflammatorikus (gyulladásos) CAF  
IFN $\gamma$ : interferon- $\gamma$   
IGF: insulin-like growth factor (inzulinszerű növekedési faktor)

IL: interleukin

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

LGR5: leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 (leucin gazdag ismétlődéseket tartalmazó G fehérje kapcsolt receptor 5)

LRP5/6: low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6 (kis sűrűségű lipoprotein receptorhoz kapcsolt fehérje 5 és 6)

LUM: lumican

MAPK: mitogén aktivált protein kináz

MEK: mitogén aktivált protein kináz kináz (=MAP2K, p42/44)

MEKi: MEK inhibitor Trametinib

mRNS: messenger RNS (hírvivő RNS)

miRNS: mikro RNS

MMP: mátrix metalloproteináz

MVB: multivesicular body (multivezikuláris test)

myCAF: myofibroblaszt-szerű CAF

NCF: normál colon fibroblaszt

NTA: nanoparticle tracking analysis (nanopartikulum detektáló vizsgálat)

PAR: proteáz-aktivált receptor

PBS: phosphate-buffered saline (foszfát pufferes só oldat)

PCR: polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)

PDAC: pancreatic ductal adenocarcinoma (hasnyálmirigy duktális adenokarcinóma)

PDGF: platelet-derived growth factor (vérlemezke eredetű növekedési faktor)

PDPN: podoplanin

PFA: paraformaldehid

PI3K: phosphoinositide 3-kinase (foszfatidilinozitol 3-kináz)

PORCN: porcupine

PTK7: protein-tyrosine pseudokinase 7 (protein tirozin pszeudokináz 7)

RNF43: ring finger protein 43 (gyűrűsujj fehérje 43)

RNS: ribonukleinsav

RREB1: RAS responsive element binding protein 1 (RAS-érzékeny elemet kötő fehérje 1)

RT-qPCR: reverse transcription quantitative PCR (reverz transzkripció kvantitatív PCR)

SFRP1/2: secreted frizzled-related protein 1/2 (szekretált frizzled-receptor kapcsolatos fehérje 1/2)

SOX: sex determining region Y (SRY)-box transcription factor (SRY-box transzkripció faktor)

TCF/LEF: T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor family (T-sejt faktor faktor/limfoid enhanszer faktor család)

TGF $\alpha$ / $\beta$ : transforming growth factor alpha/beta (transzformáló növekedési faktor  $\alpha$ / $\beta$ )

TGFBR2: transforming growth factor beta receptor 2 (transzformáló növekedési faktor  $\beta$  receptor 2)

TKR: tirozin kináz receptor

TME: tumor microenvironment (tumor mikrokönyezet)

TNF $\alpha$ : tumor nekrozis faktor- $\alpha$

TP53: tumor protein 53 gén

VEGFA: vascular endothelial growth factor-A (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor-A)

VIM: vimentin

Wls: Wntless/Evi

ZNRF3: zinc and ring finger protein 3 (cink és gyűrűsujj fehérje 3)

## 1. Bevezetés

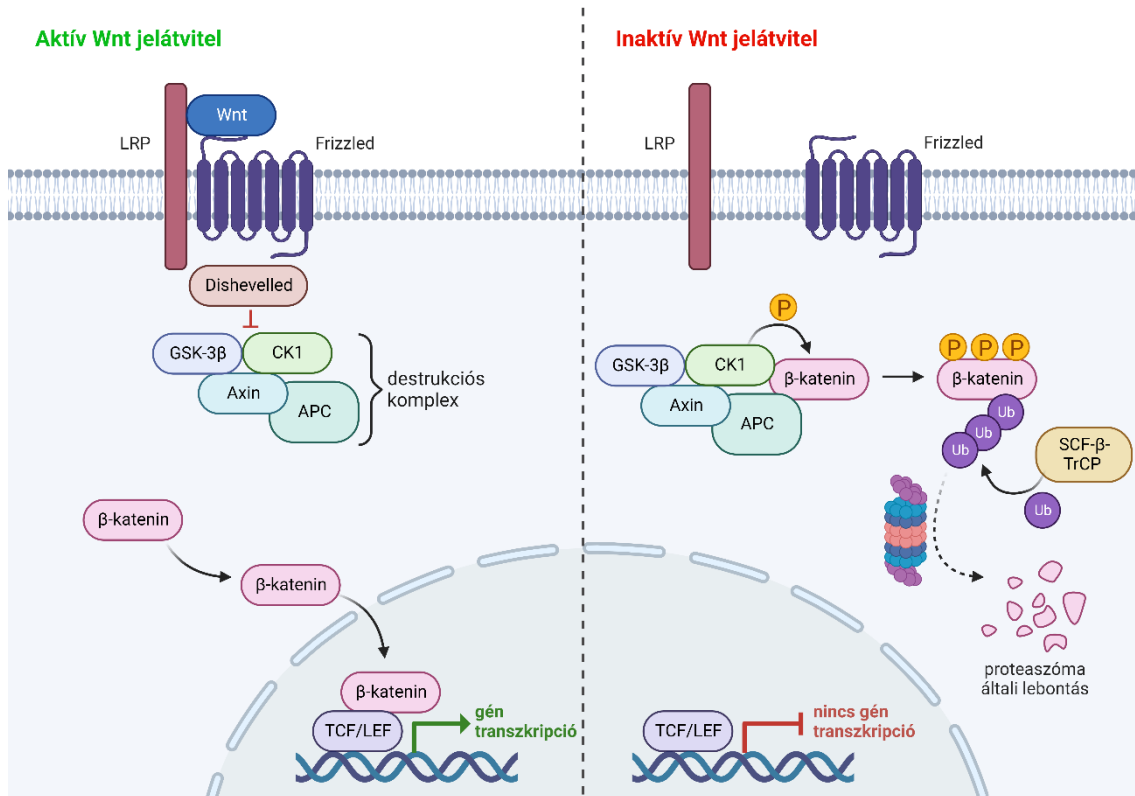
### 1.1. A Wnt jelátviteli útvonal és Wnt mikroniche

A Wnt jelátviteli útvonal egy evolúciósan igen konzervált szignál transzdukciós út a gerinces élőlényekben. Számos fejlődési folyamatban szerepet játszik: a sejtek polaritásának kialakításában, a sejtek differenciálódásában, a sejtosztódásban és migrációban, valamint a szöveti regenerációban. Ugyanakkor a karcinogenezisben is fontos szerepe van a Wnt jelátvitelnek és mikroniche-nek több tumortípus esetén is (lásd a következő fejezetekben). Három Wnt szignalizációs útvonal létezik: a kanonikus Wnt/ $\beta$ -katenin út, a nem kanonikus planáris sejt polaritás út és a nem kanonikus Wnt/kalcium útvonal. Onkogenezisben a kanonikus Wnt/ $\beta$ -katenin útvonal a leggyakrabban érintett: a mutációk által aktivált szignalizációs útvonal külső Wnt ligandok nélkül is fenntartja a tumorsejtek osztódását, összejt fenotípusát. Mivel a tumorigenezisben a Wnt/ $\beta$ -katenin útvonal érintett, ezért a továbbiakban ezt részletezem [1,2].

A Wnt ligandok az FZD (Frizzled) receptoron és a ko-receptor LRP5 vagy LRP6-on (low-density lipoprotein receptor-related protein 5 vagy 6) keresztül hatnak. Az így kialakult aktív trimer komplex a membránhoz köti a citoplazmatikus DVL (Dishevelled) effektor fehérjét. Ezután a membránkött DVL a citoplazmában található ún. destruktív fehérje komplexet képes kötni, így a  $\beta$ -katenin nem bontódik le a destruktív komplex által. A destruktív komplex komponensei többek között az APC, AXIN1, GSK3 $\beta$ , CK1 fehérjék. A destruktív komplex inaktivációja következtében a  $\beta$ -katenin felhalmozódik a citoplazmában, majd a sejtmagba jutva a TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor) transzkripciós faktorhoz köt, miközben leszorítja a Groucho/TLE represszort, és így a Wnt célgének (pl. AXIN2, LGR5, MYC) expresszióját fokozza. Wnt ligand hiányában, amikor a Wnt útvonal inaktív, a destruktív komplex kináz enzimei foszforilálják a  $\beta$ -katenint. A foszforilált  $\beta$ -katenint ubiquitinálhatja az SCF- $\beta$ -TrCP E3 ubiquitin ligáz, így végül a proteaszómák által lebontódik (**1. ábra**). A Wnt/ $\beta$ -katenin útvonal negatív visszacsatolással történő szabályozása az RNF43 (ring finger protein 43) és ZNRF3 (zinc and ring finger protein 3) fehérjék révén valósul meg. E két membránfehérje ubiquitinálni képes az FZD receptort, s az így megjelölt receptor

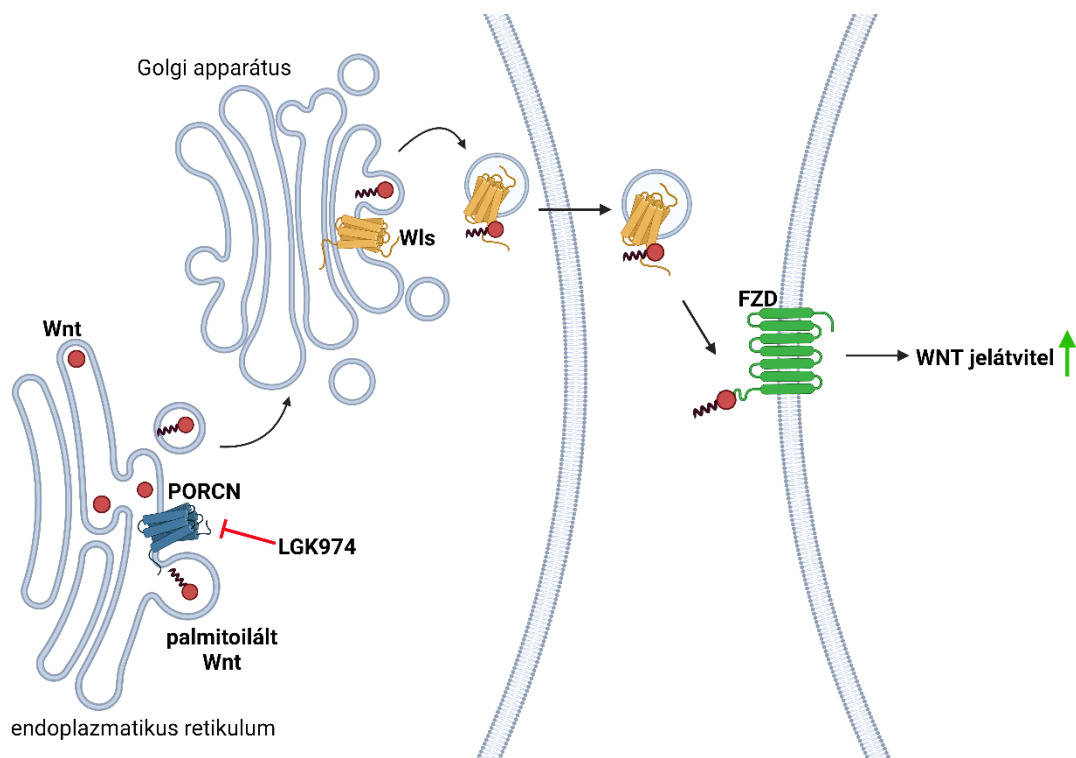


lizoszómáisan lebontódik. Továbbá az RNF43 képes fokozni a destrukciós komplex aktivitását, így gátolva a  $\beta$ -katenin sejtmagi lokalizációját [3–5].



**1. ábra.** A Wnt jelátviteli út aktív és inaktív állapotban, valamint az útvonal egyes komponensei (a szerző saját ábrája).

A Wnt ligandok 40 kDa-os, ciszteinben gazdag fehérjék. Szekréciójukhoz egy zsírsavval, a palmitoleinsavval történő módosításuk, azaz palmitoilálásuk szükséges. Ezt a folyamatot minden Wnt fehérjén a porcupine (PORCN) palmitoil-transzferáz végzi. Ezért a Wnt szekréció gátlása a PORCN-en keresztül széleskörűen alkalmazott módszer, például az LGK974 inhibitorral. E poszttranszlációs módosítás szükséges az FZD receptorhoz való kapcsolódáshoz, valamint a hidrofób karakter kialakításához, ugyanis a Wnt fehérjék szekréciós vezikulákon, illetve exoszómákon utaznak a célsejtig. E membrán partikulumokhoz való kapcsolódást szabályozzák a Wls (Wntless/Evi) fehérjék az által, hogy a Wnt-ek palmitoilált formáját képesek kötni (**2. ábra**). Másik módja a jelátvitelnek, hogy direkt sejt-sejt kapcsolat révén valósul meg a Wnt ligand és FZD receptor kapcsolat juxtakrin módon [6–9].



**2. ábra.** A Wnt ligandok szekréciója és a folyamat egyes lépései, komponensei (a szerző saját ábrája).

Tumorokban a fokozott Wnt/ $\beta$ -katenin aktivitás több útvonalon is megvalósulhat. A destruktív komplex komponenseinek (*APC*, *AXIN1*) génjében figyelhetők meg inaktiváló mutációk, vagy a  $\beta$ -katenin génjében (*CTNNB1*) aktiváló mutációk. Ezekben az esetekben Wnt-független tumorokról beszélhetünk. Végül a harmadik lehetőség, amikor az FZD receptor szabályozásában figyelhető meg hiba. Ebben az esetben az *RNF43* vagy *ZNRF3* funkcióvesztéses mutációt szenved és a negatív visszacsatolási szabályozás megszűnik. Ilyenkor Wnt ligandra nézve hiperszenzitív, Wnt-függő tumor növekedés tapasztalható. Leggyakrabban az *APC* mutációt vastag- és végbél daganatokban (esetek kétharmadában), de melanómás, endometrium karcinómás és gyomor adenokarcinómás páciensekben is megfigyelhető (esetek 10-15%-a). A  $\beta$ -katenin génjében (*CTNNB1*) leggyakrabban a hepatocelluláris és endometrium daganatok egynegyedében találunk mutációt, ugyanakkor a colorectális daganatok 5%-ában is megfigyelhető. Az *RNF43* mutációja az endometrium és gyomor daganatok 10-15%-ban található meg, míg PDAC-ben és CRC-ben 5-8%-os gyakorisággal figyelhető meg. A *ZNRF3* leginkább adenokortikális karcinómákban (esetek 20%-a) szenved mutációt, míg

az *AXIN1* és *AXIN2* ritkán, az esetek 5-8%-ában mutálódik CRC-ben, hepatocelluláris és endometrium daganatban [3,10].

## 1.2. A BCL-2 apoptotikus útvonal jelentősége tumorokban

Az apoptózis, avagy programozott sejthalál nélkülözhetetlen biológiai folyamat a szövetek homeosztázisához. Két apoptotikus útvonal ismert: a külső, halál ligandok által indukált és a belső, mitokondriális útvonal. Ezt a belső útvonalat szabályozzák a mitokondriumokban a BCL-2 fehérjecsald anti-apoptotikus és pro-apoptotikus tagjai. A különböző apoptotikus jelek (pl. toxin, vírus, szabad gyökök, citokinek, hormonok) hatására komplexet képeznek a mitokondrium külső membránján, aminek következtében a citokróm-c kikerül a citoplazmába. Ez a folyamat, az apoptozóma, más néven kaszpáz aktiváló komplex kialakulását serkenti, mely a kaszpáz kaszkádot indítja be [11,12].

A BCL-2 anti-apoptotikus fehérje túlzott expressziója figyelhető meg számos daganatban, mely által csökken a tumorsejtek apoptózisa, sőt a tumorelles szerekekkel szemben is jóval ellenállóbbak lesznek [13–15]. Az anti-apoptotikus BCL-2 homológjai a BCL-xL, MCL-1, BCL-W és BCL-B [16], míg a fehérjecsald pro-apoptotikus tagjai a BAK, BAX, BOK, BID, BIM, BAD [17,18]. Tehát a BCL-2 fehérjecsald bizonyos tagjainak célzott terápiája több tumor típus esetén is lehetséges, illetve vizsgálat alatt áll [11,19].

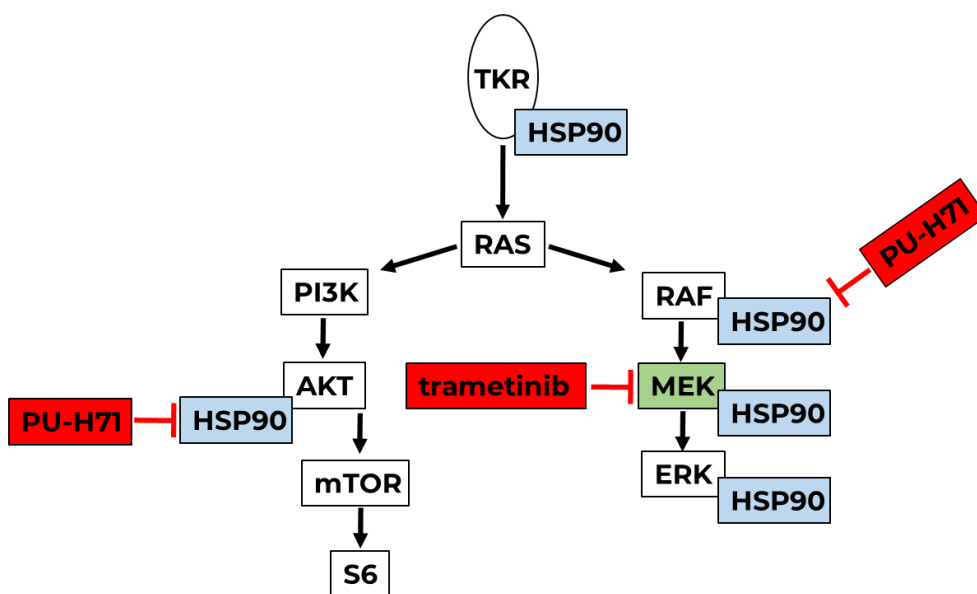
## 1.3. A RAS jelátviteli út jelentősége tumorokban

Számos jelátviteli út szabályozza a sejtek osztódását, túlélését és apoptózisát. Egyik ilyen a TKR (tirozin-kináz receptor) – RAS jelátviteli út (**3. ábra**), melynek komponensei PDAC-ben és CRC-ben is gyakran mutációval rendelkeznek. A TKR-ok jellemzően extracelluláris ligand-kötő egységből, transzmembrán doménből és intracelluláris tirozin kinázt tartalmazó egységből állnak. Miután a ligand (pl. növekedési faktorok) bekötődött, a TKR-ok dimerizálódnak és az intracelluláris egység autofoszfórilálódik, majd aktiválja az intracelluláris RAS fehérjét [20].

A RAS protoonkogének (HRAS, NRAS, KRAS) központi elemei e jelátvitelnek és guanozin nukleotidok hasítására képesek. Inaktív állapotban GDP-t (guanozin-

difoszfát), aktivált állapotban GTP-t (guanozin-trifoszfát) kötnek a RAS fehérjék. Aktiválásukat a GEF (guanine-nucleotide exchange factor) szabályozza, míg az inaktiválást a RAS saját GTPáz aktivitása és a GAP (GTPáz aktiváló protein) fehérje szabályozza. A RAS mutációval rendelkező tumorsejtekben ez a ciklus nem megfelelően működik, így a RAS által indukált jelátvitel folyamatosan aktív [21,22].

A RAS – MAPK (mitogén aktivált protein kináz) jelátviteli út következő elemei a RAF szerin-treonin kinázok (ARAF, BRAF, CRAF), melyek közül a BRAF szenved leggyakrabban mutációt daganatokban [23]. A RAS által foszforilált RAF az útvonal következő tagját, a MEK-et képes foszforilálni. A MEK egy kettős specificitású kináz, minthogy tirozint és szerin/treonint is képes foszforilálni. Következő lépésben az ERK aktiválódik foszforiláció révén, s közvetíti a mitogén jelet a sejtmagba [24]. A RAS – MAPK útvonal elemeinek szelektív gátlása intenzív kutatás alatt áll számos tumortípusban. Ugyanakkor az egyes gátlószerek ellen kialakuló rezisztencia komoly problémát jelent [25–27].



**3. ábra.** A RAS jelátviteli út sematikus ábrája és két gátlószere (trametinib, PU-H71), melyeket kísérleteinkben használtunk (a szerző saját ábrája).

A RAS képes egy másik útvonalat, a PI3K/AKT útvonalat is aktiválni, mely a sejtciklus szabályozásában és az apoptózis elkerülésében játszik fontos szerepet. Ez részben a BCL-2 géncsalád transzkripciójának a szabályzásával valósul meg [11]. A RAS

által aktivált PI3K az útvonal további elemeit, az AKT, mTOR és az S6 fehérjéket képes aktiválni [28]. Az AKT-tal komplexet alkot a HSP90 (hősokk fehérje 90) dajkafehérje és stabilizálja, mely nélkülözhetetlen a kináz funkciójának fenntartásához. Továbbá a HSP90 a MAPK útvonal valamennyi tagját és a TKR-okat is stabilizálja, kölcsönhat velük. Ezért a HSP90 szelektív gátlása potenciális tumorellenes terápiaként [27,29–32].

#### **1.4. Az organoid technológia**

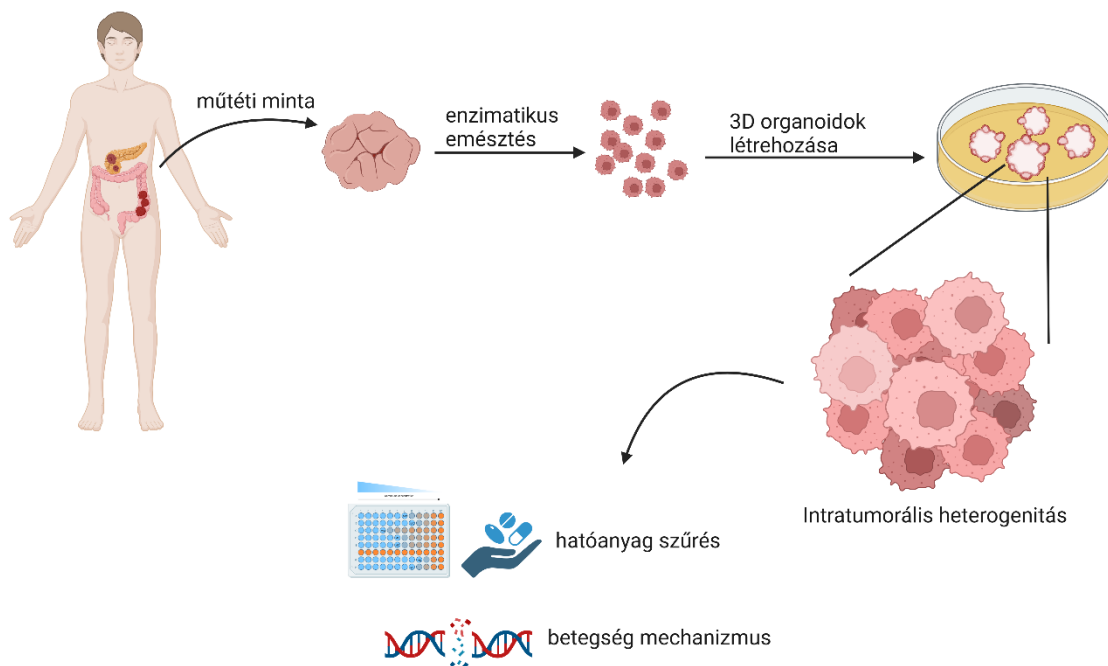
Az elmúlt évtizedekben a 3D organoid technológia hatalmas fejlődésen ment keresztül, az egyik legkorszerűbb szövettenyésztési eljárásnak tekinthető. Az organoidok – más hagyományos sejtenyésztési módszerekhez képest – megtartják az egészséges és beteg szövetek, szervek *in vivo* tulajdonságait, funkcióit, valamint önszerveződők. Ezért a fejlődéstan, őssejtbiológia, regeneratív orvostudomány és a tumorbiológia kedvelt modelljei. Már számos egészséges és beteg szövetből hoztak létre organoidokat és készítettek biobankokat. A legtöbb epiteliális organoid az adott szövet funkcionális részeit tartalmazza és nem tartalmaz mezenchimális, stromális, immun és ideg sejteket [33–36].

Organoidok őssejtekből keletkezhetnek: pluripotens őssejtekből, melyek vagy embrionális őssejtek vagy indukált pluripotens őssejtek. Másik lehetőség, hogy multipotens felnőtt szöveti őssejtekből származnak. Tenyésztésükhöz és az őssejt funkció fenntartásához nélkülözhetetlen a szövetspecifikus mikrokönyezet, avagy niche létrehozása, mely elsősorban növekedési faktorokat és morfogéneket jelent (pl. EGF, Wnt). Továbbá az organoidok növesztéséhez szükséges az extracelluláris mátrix (ECM) főbb komponenseit (pl. laminin, kollagének) tartalmazó 3D-s gél (pl. Matrigel). Ez nem csupán mechanikus váz, hanem a sejtek sejtkapcsoló struktúráik segítségével az ECM fehérjékhez kötődnek, mely befolyásolhatja az egyes sejtek fenotípusát, valamint a sejt-sejt kölcsönhatásokat [37,38].

A tumorok nagymértékű genetikai és sejtes heterogenitást mutatnak az egyes betegek közt és az adott betegen belül is. Ennek modellezésére az organoid technológia a jelenleg elérhető legjobb módszer [39–42]. Az egyik legfontosabb példa a tumorok heterogenitására a tumorőssejtek és differenciált tumorsejtek egyidejű jelenléte a daganatokban. Colon adenómában és CRC-ben az LGR5 egy széleskörűen elfogadott

tumorössejt marker [43,44]. Ugyanakkor számos más molekulát is ajánlottak, mint tumorössejt marker CRC-ben és más daganatokban is: CD44 [45–47], CD24 [47], CD133 [48,49], CD9 [50], PTK7 [51]. E markerekkel jellemzett sejtek általános tulajdonsága a nagyfokú metasztatikus képesség, intenzív osztódás, kemorezisztencia, EMT-re való hajlam és agresszív fenotípus.

Mivel az organoidok jól reprezentálják az egyes betegek daganatainak tulajdonságait és heterogenitását, ígéretes eszközei a személyre szabott gyógyszertervezésnek és a gyógyszerkutatásnak is. Valamint számos más betegség mechanizmusainak pontosabb megismeréséhez is kiváló modellrendszert biztosít az organoid technológia [52–54] (4. ábra).



**4. ábra.** A beteg eredetű organoidok előállításának és egyes felhasználási lehetőségei (a szerző saját ábrája).

Az onkobiológiai kutatások fontos területe a tumor mikro környezet szerepének pontosabb megismerése a tumor progresszióban és gyógyszerrezisztenciában. Ennek vizsgálatára és modellezésére is kitűnő eszköz az organoid technológia. Az organoidokat

lehetséges különböző stromális sejtekkel (pl. fibroblasztok, immunsejtek, endotél sejtek) együtt tenyészteni, úgynevezett kokultúrában [55].

Összességében megállapítható, hogy az organoid modellrendszer egy igen széleskörűen felhasználható technológia az orvostudományi kutatások és a személyre szabott orvoslás területén. Az egyedi gén-hatóanyag kölcsönhatásban, a személyre szabott terápia kiválasztásában, a prognózis felállításban, de a preklinikai terápiai szerek tesztelésében is jól hasznosíthatók [56].

## **1.5. A pancreas duktális adenokarcinóma jellemzői**

A hasnyálmirigy, avagy pancreas, összetett felépítésű, endokrin és exokrin részeket tartalmazó mirigy, melynek jóval nagyobb tömegét (90%-át) az exokrin állomány teszi ki. Az endokrin Langerhans-sziget sejtek ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -, PP-sejtek) peptid hormonokat (glükagon, inzulin, szomatosztatin, pancreatikus polipeptid) termelnek, melyek elsősorban a glükóz anyagcsere szabályozásában játszanak szerepet, valamint az exokrin pancreas szabályozzák. Az exokrin pancreas funkcionális alapegységei a tubulo-alveolaris acinusok, melyek az emésztőenzim tartalmú pancreasnedvet termelik. Az acinusok lumenéből a faágszerűen elágazó kivezető járatok, avagy duktusok vezetik el a pancreasnedvet, mely végül a duodenumba ürül. A duktális hámsejteknek fontos szerepe van a pancreasnedv előállításában is: a szekréció nagyobb részét képező kationokat (pl.  $K^+$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ) és anionokat (pl.  $HCO_3^-$ ,  $Cl^-$ ,  $SO_4^-$ ,  $HPO_4^-$ ) tartalmazó folyadékot termelik. E duktális epitél sejtekből alakulhat ki a pancreas duktális adenokarcinóma (PDAC), mely a hasnyálmirigy leggyakoribb tumoros elváltozása. A hasnyálmirigy daganatos esetek 85-90%-ában PDAC-t diagnosztizálnak. Emellett a ritkább, exokrin hasnyálmirigy daganatok közé tartozik az acináris sejtes karcinóma, az invazív karcinómával társult intraduktális papilláris-mucinózus neoplázia és malignus cisztikus daganatok. Ritka esetekben neuroendokrin tumorok is kialakulhatnak a pancreasban, melyek lehetnek funkcionáló, azaz hormontermelő tumorok és nem funkcionáló tumorok is. Továbbá ismertek kevert pancreas daganatok, melyek egyszerre endokrin és exokrin eredetűek is lehetnek [57–59].

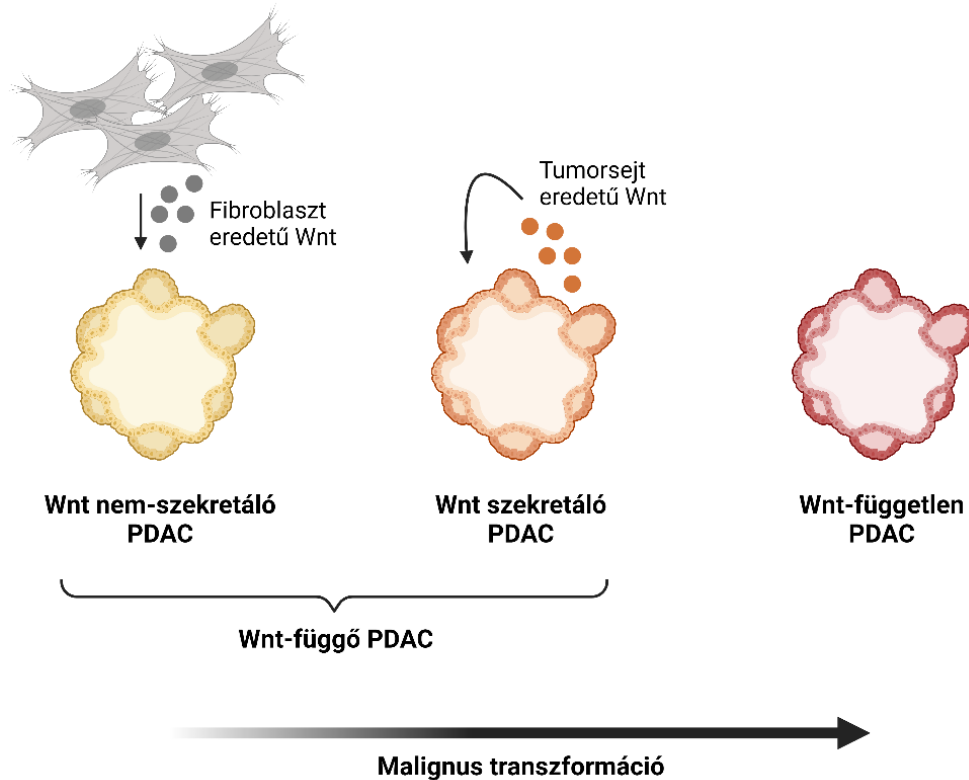
Noha a hasnyálmirigy-rák csupán a tizenkettedik leggyakoribb daganattípus, a betegek átlagos 5-éves túlélési rátája mindössze 10% körüli, mely a legrosszabb az összes

tumortípust tekintve, s így a hetedik leggyakoribb oka a rosszindulatú elváltozásból származó halálozásoknak [60]. Ennek háttérében a korai tünetek hiánya, így a késői diagnózis áll. Továbbá a hasnyálmirigy daganatos betegek mindössze 10-20%-a műthető, valamint nincs igazán megfelelő korszerű kezelési stratégia sem. A klinikumban elsősorban a FOLFOXIRI-t (5-fluorouracil, folinsav, oxaliplatin, irinotecan) és a gemcitabint alkalmazzák adjuváns kezelésként. Ugyanakkor tovább súlyosbítja a helyzetet, hogy a használt kemoterápiás és sugárterápiás kezelésekkel szemben is igen ellenállóak a tumorsejtek [61,62]. Egy *in vivo* széles skálájú gyógyszer szűrési vizsgálatban a HSP90 (hősokk fehérje 90) inhibitor PU-H71 és MEK (mitogén aktivált protein kináz kináz, MAP2K) inhibitor trametinib szinergisztikus hatást mutatott PDAC egér modellben. A vizsgálatban jelentősen nőtt a túlélés és számottevő toxicitás sem volt megfigyelhető, ezért ez a preklinikai eredmény ígéretes és releváns kiindulópontja lehet további klinikai vizsgálatoknak, valamint más daganattípusok esetén való alkalmazhatóságnak [27].

A PDAC agresszív lefolyása, a betegek alacsony túlélése és a hatékony terápia hiánya a betegek közti és az egy betegen belüli daganat heterogén genetikai háttérének, ezáltal heterogén fenotípusának is nagyban köszönhető. A leggyakoribb és klinikailag legjelentősebb szomatikus mutációk a *KRAS* (93%), *TP53* (72%), *CDKN2A* (30%), *SMAD4* (32%), *GNAS* (8%), *RNF43* (7%), *ARID1A* (6%), *TGFBR2* (5%), *RREB1* (5%) és *PBRM1* (4%) génekben figyelhetők meg. Mutációs szempontból egy érdekes ritka csoport a vad típusú *KRAS*-sal rendelkező PDAC-k. Ezekben az esetekben gyakoriak a *KRAS* által mediált RAS-MAPK jelátviteli útvonal egyéb tagjaiban (pl. *BRAF*) a mutációk, valamint különböző csírasejtes mutációk (pl. *BRCA2*, *ATM*, *PALB2*) [63]. Érdekes módon, a Wnt/ $\beta$ -katenin jelátviteli útvonal elemei (pl. *APC*, *AXIN2*) elenyésző esetben hordoznak mutációt PDAC-ben, noha egyes daganatokban (pl. vastag- és végbél daganatok) a mutációik kulcstényezői a tumor indukálásának. Ennek ellenére megfigyelték, hogy a PDAC tumorigenezis során függetlenednek a tumorsejtek a külső Wnt ligandoktól, melyek nélkülözhetetlenek az egészséges hasnyálmirigy működéséhez, valamint a PDAC korai stádiumaiban. Ezek a Wnt fehérjék származhatnak a mezenchimális stromális sejtekből, de az epitél tumorsejtek is képesek autokrin módon Wnt ligandokat szekretálni maguk számára (**5. ábra**). Végül ennek a Wnt-független



fenotípusnak a kialakulása összefügg a mutációk felhalmozódásával, leginkább a *TP53* inaktíváló mutációival [64].



**5. ábra.** A PDAC organoidok Wnt-niche függésének változása a tumorigenezis során (a szerző saját ábrája).

## 1.6. A colorectális karcinóma jellemzői

A vastag- és végbél az emésztőrendszer utolsó szakasza, melynek fő funkciója a víz és a benne oldott anyagok, elektrolitok visszaszívása, valamint az emészthetetlen anyagok eltávolítása [65]. A colon epitéliumában bemélyedések figyelhetők meg, melyek a colon kripták. Ezeknek a kriptáknak az alján található az őssejtek, melyek a colon lumenét borító epitél sejteket pótolják [66].

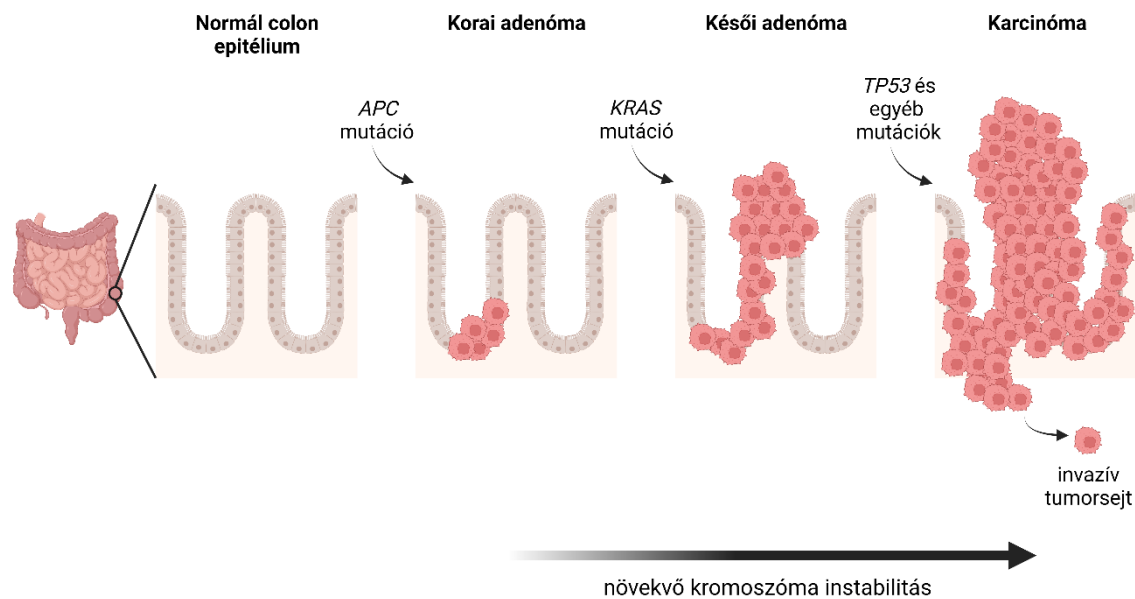
A vastag- és végbél daganat (CRC) a harmadik leggyakrabban diagnosztizált daganatos megbetegedés és a második legfőbb tumoros elváltozásból adódó halálozási ok világszerte [67]. Ennek hátterében a korai specifikus tünetek hiánya áll, ezért gyakran

már előrehaladott stádiumban diagnosztizálják a betegeket, amikor a túlélési valószínűség már jóval alacsonyabb [68].

A vastagbél három egységre tagolható a tumor anatómiai helyzete alapján: proximális colon, disztális colon és rectum. A proximális colon magában foglalja a vakbelet, a felszálló- és haránt vastagbelet, míg a disztális colon a leszálló vastagbelet és a szigmabelet tartalmazza. A proximális colon daganataira jellemzőbb a mikroszatellita instabilitás, a CpG-sziget metilátor fenotípus és a *BRAF* mutáció, míg a disztális colon tumorjaiban gyakrabban figyelhető meg a kromoszóma instabilitás. Az örökletes CRC-eket tekintve a nonpolyposis vastagbélrák (HNPCC, Lynch szindróma) a proximális colonban jellemzőbb, a familiáris adenomatosis polyposis (FAP) eredetű CRC a disztális colonban fordul elő gyakrabban [69,70].

A CRC kialakulása három útvonalon keresztül történhet meg, mely csoportosítás a genetikai okok mellett a szövettani megjelenést is nagyban figyelembe veszi. A klasszikus, adenóma-karcinóma útvonal magyarázza a sporadikus CRC-k 85-90%-át. A bél hámsejtjei eleinte kis adenómákat fejlesztenek, majd azok növekedve a mutációk felhalmozódásával karcinómává válnak. Erre az útvonalra jellemző a kromoszóma instabilitás, mely mikroszatellita stabil CRC-t eredményez. A kromoszóma instabil fenotípusú CRC-re jellemző első mutációs esemény leggyakrabban a Wnt-útvonal tagjának, az *APC*-nek az inaktivációja, majd a *KRAS* aktiváló mutáció és végül a *TP53* funkcióvesztéses mutáció. Ezt a klasszikus, hierarchikus CRC tumorigenezist írja le a Vogelstein modell (**6. ábra**). Második útvonal a fogazott neoplázia útvonal, mely a sporadikus CRC-k 10-15%-ában játszik szerepet. Ebben az esetben a colon normál epitél sejtjein eleinte hyperplasticus polypok alakulnak ki, majd szesszilis fogazott adenóma, végül rosszindulatú tumor alakul ki. Ezt az útvonalat leggyakrabban *KRAS* vagy *BRAF* aktiváló mutáció indukálja, majd jellemzővé válik a tumorszupresszor gének (pl. *MLH1*, *MINT1*, *MINT2*, *MINT3*) magas metiláltsága, azaz CpG-sziget metilátor fenotípus mutatnak ezek a CRC-k. Ebben az esetben mikroszatellita stabil és instabil tumor is kialakulhat, attól függően, hogy mely géneket érint az epigenetikai csendesítés. A mikroszatellita instabilitás a hibás DNS javítás miatt alakul ki, melynek hátterében a hibajavító (mismatch repair) gének inaktivációja áll. A hibajavító gének inaktivációja csírvonal mutációk következtében is kialakulhat és ez örökítő CRC-ben, Lynch szindrómában is megfigyelhető. Végül a harmadik útvonal a gyulladássos útvonal, mely

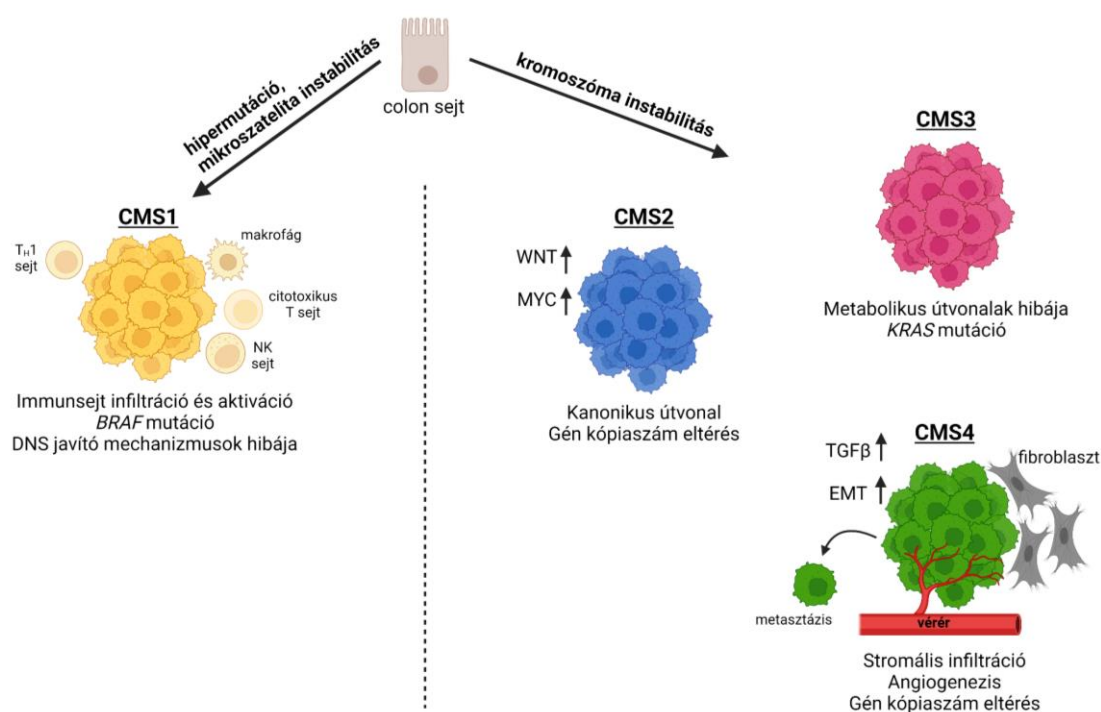
az összes CRC kevesebb, mint 2%-át magyarázza. A gyulladássos bélbetegségben (Crohn-betegség és colitis ulcerosa) kialakuló krónikus gyulladás következtében diszpláziák alakulnak ki a bélhámban, melyek egyre kiterjedtebbek lesznek az epitéliumban, végül kialakul a tumor [69–74].



**6. ábra.** A klasszikus, hierarchikus CRC tumorigenezis, melyet az úgynevezett Vogelstein modell ír le. A CRC tumorigenezis adenóma-karcinóma útvonalaként is ismert (a szerző saját ábrája).

Egy újabb CRC besorolási rendszer a daganat molekuláris profiljára, géneexpressziós mintázatára épül, mely a CMS (consensus molecular subtypes) klasszifikáció és eszerint négy csoport különíthető el (**7. ábra**). Fontos megjegyezni, hogy ez a klasszifikációs rendszer elsősorban a kutatás-fejlesztésben használatos, még nem terjedt el a klinikumban, noha a hatékonyabb célzott terápiás stratégiákhoz ez elengedhetetlen lenne. A CMS1-re jellemző az immunsejtek nagyfokú infiltrációja és a mikroszatellita instabilitás. Azaz CMS1-ben a DNS mismatch repair gének nagymértékben mutációt szenvednek, emiatt a CMS1 tumorok hipermutáltak. Továbbá, CMS1-ben a *BRAF* mutáció kiemelkedően gyakori. A CMS2 tekinthető a kanonikus, klasszikus típusnak, melyre jellemző az *APC* mutációval jellemzett fokozott Wnt jelátvitel és a *MYC* jel aktivációja, mely a Wnt út vonal egyik célgénje. CMS3-ban a metabolikus út vonalak szenvednek szabályozási zavart, elsősorban a szénhidrát és zsírsav

oxidáció. Valamint CMS3-ra különösen jellemző a *KRAS* mutáció és alacsony a CpG-sziget metiláltság a többi altípushoz viszonyítva. A CMS4 a mezenchimális altípus, mely a legagresszívabb CRC altípusnak tekinthető. Az ebbe a csoportba tartozó betegeknek a legalacsonyabb az átlagos túlélési valószínűsége. Ennek háttérében többek között a jelentős stromális infiltráció (pl. fibroblasztok) és a nagyfokú epiteliális-mezenchimális átmenet (EMT) áll. CMS4-re jellemző az emelkedett TGFβ szignalizáció, az extracelluláris mátrix átalakítás és az angiogenezis. Végül kis gyakorisággal megfigyelhetők olyan CRC tumorok is, melyek kevert CMS fenotípust mutatnak és olyanok is, amelyek semmilyen CMS csoportba nem besorolhatók [75,76].



**7. ábra.** A CRC CMS klasszifikációs rendszer és az egyes csoportok jellemzői (a szerző saját ábrája).

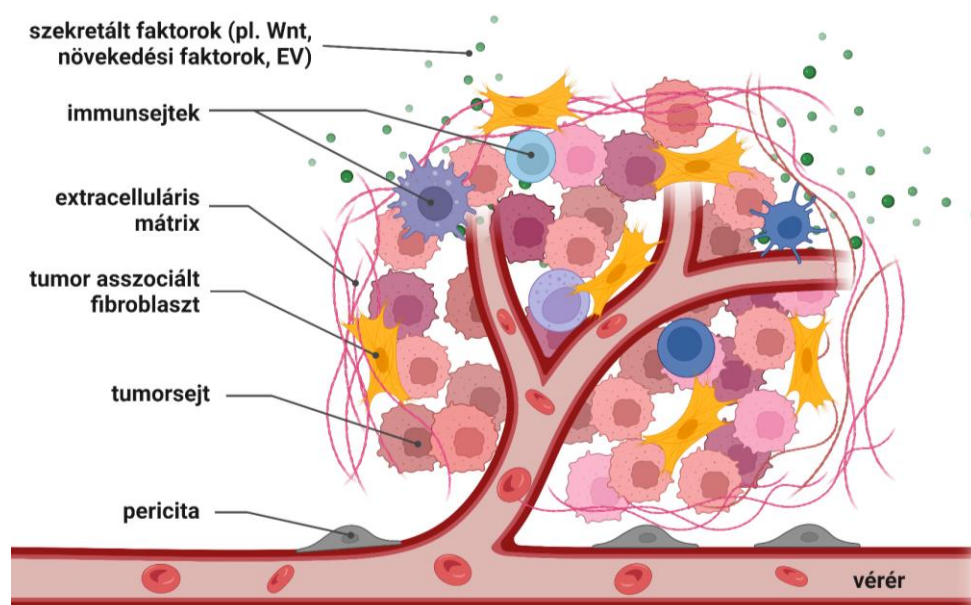
Noha a CRC esetek 70-80%-ában sebészi úton eltávolítható a tumor, mégis a műtött betegek közel felében kiújul a daganat és/vagy metasztázis alakul ki. A CRC betegek számára az 5-fluorouracil (5FU) kemoterápiát alkalmazzák folinsavval kiegészítve (leucovorin), melyet oxaliplatinnal és/vagy irinotecan-nal kombinálnak (FOLFOX, FOLFIRI, FOLFOXIRI) előrehaladott, metasztatikus CRC esetekben, de a gyógyszerrezisztencia így is komoly problémát jelent [77,78]. Ennek megoldására

molekulárisan célzott kiegészítő kezeléseket használnak (pl. EGFR inhibitor cetuximab), de ezek csak a tumor genetikai tesztelése után alkalmazhatók és további célzott terápiás stratégiákra van szükség [79].

Néhány éve új terápiás célpontokat találtak CRC-ben. A CRC őssejtek túléléséhez és az adenóma-karcinóma átmenet során szükséges a BCL-2 családba tartozó BCL-xL antiapoptotikus fehérje. Ezért a BCL-xL szelektív gátlása az A-1155463 inhibitorral ígéretes organoid modell rendszerben [19]. Másik ígéretes célpont a BET (bromodomain fehérje) gátló (+)-JQ1 epigenetikai inhibitor, melyet egy organoidon alapuló gyógyszer-szűrési vizsgálatban fedeztek fel [80]. Ugyanakkor ennek a két inhibitornak a kombinációjában, más kemoterápiákkal való alkalmazásáról még nincs irodalmi adat.

## 1.7. A tumor mikrokörnyezet

A tumor mikrokörnyezet (TME), avagy tumor mikroniche magába foglalja mindazon komponenseket a daganatban, melyek nem rosszindulatú tumoros sejtek, és ez egy igen komplex része a tumoroknak. Ide tartoznak a stromális sejtek (pl. fibroblasztok, endotél sejtek, immunsejtek), az extracelluláris mátrix (ECM) alkotóelemei (pl. laminin, kollagén), és az itt található különböző molekulák, növekedési faktorok (pl. Wnt, EGF) és szubcelluláris komponensek (pl. extracelluláris vezikulák) (8. ábra).



8. ábra. A tumor mikrokörnyezet és az egyes összetevői (a szerző saját ábrája).

A tumorsejtek és a TME közt zajló kölcsönös interakciók elengedhetetlenek a daganatok evolúciója szempontjából: növelik a tumorsejtek heterogenitását, elősegítik a klonális evolúcióját, a multidrog rezisztenciát és az áttétképzést [81–83].

A következő alfejezetekben olyan TME tényezőket részletezek, melyeket munkám során részletesen vizsgáltam a fent említett daganat típusokban.

### **1.7.1. A tumor asszociált fibroblasztok**

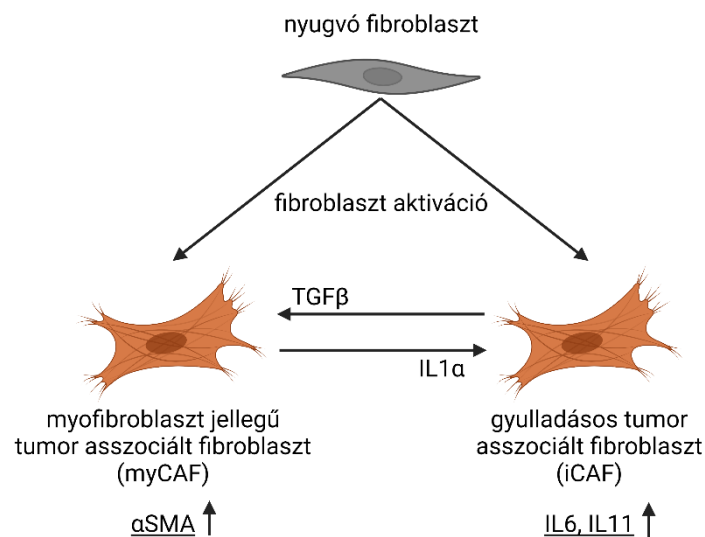
A tumor asszociált fibroblasztok (CAF) a TME igen jelentős sejtjei, melyek különféle növekedési faktorokat, gyulladásos citokineket, és ECM fehérjéket szekretálnak, ezzel segítve a tumor progressziót. A CAF-ok mezenchimális eredetűek, viszont a daganaton belül eltérő fenotípussal rendelkezhetnek. Heterogenitásukkal összefügg, hogy tökéletes, minden CAF-ra jellemző markert nem találtak még. Ugyanakkor többségükben megfigyelhető az  $\alpha$ SMA ( $\alpha$ -simaizom aktin), VIM (vimentin), FSP1 (fibroblaszt specifikus fehérje-1), FAP (fibroblaszt aktivációs fehérje) expresszió, ezért ezeket fibroblaszt markereknek (is) tekinti a szakirodalom [84,85].

A fibroblasztok nyugvó sejtek szerte a testben, melyek aktiválttá válnak a sebgyógyulási reakcióban és hegesevést okoznak. Daganatokban is hasonló molekuláris folyamatok zajlanak le, de ebben az esetben krónikus sebgyógyulás, fibrózis tapasztalható. Emiatt alakul ki tumorokban az úgynevezett dezmozplasztikus reakció [86,87]. Ennek a folyamatnak stimulálói különböző növekedési faktorok, főképp a TGF $\beta$ , de emellett a PDGF és az FGF is [88–91].

A CAF-ok számos mechanizmus révén pozitív szabályozói a tumorigenezisnek. A CAF-ok elősegítik a tumor növekedését, részben például az angiogenezis serkentésével, mely szekretált CXCL12 és endotél progenitor sejtek toborzásával valósul meg [92]. A CAF-ok képesek különböző ECM degradáló mátrix metalloproteinázokat (MMP) termelni, ezzel a tumorsejtek inváziós képességét segítik elő [93]. A tumorossejt niche-nek a fenntartásában is szerepet játszanak a CAF-ok. Különféle szekretált faktorok révén (periostin, HGF, Wnt ligandok) indukálják a Wnt aktivitást az ossejt fenotípusú tumorsejtekben [94,95]. A daganat áttétképzését, a metasztatikus kolonizációt is nagyban segítik a CAF-ok. Különböző daganatokban számos molekuláris mechanizmust detektáltak már. A tenascin-C és a VEGFA mediátorai emlődaganat tüdő

metasztázisainak [96]. CRC-ben az IL11 elősegítette a tumorsejtek kolonizációját, míg egy másik vizsgálatban a szekretált stanniocalcin-1 játszott szerepet a CRC sejtek tüdőben való hatékony megtapadásában [91,97].

A CAF-ok nem egységes sejttípus, számos CAF alpopulációt azonosítottak már különböző daganatokban. PDAC-ben két csoport figyelhető meg: az  $\alpha$ SMA-t magasan expresszáló, elsősorban ECM komponenseket termelő myofibroblaszt-szerű CAF-ok (myCAF) és a gyulladásos citokineket szekretáló inflammatorikus CAF-ok (iCAF). Az iCAF irányba való polarizációt tumor-eredetű IL1 $\alpha$  indukálja, míg a myCAF fenotípus irányába való eltolódást a tumor által szekretált TGF $\beta$  serkenti [98,99] (9. ábra).

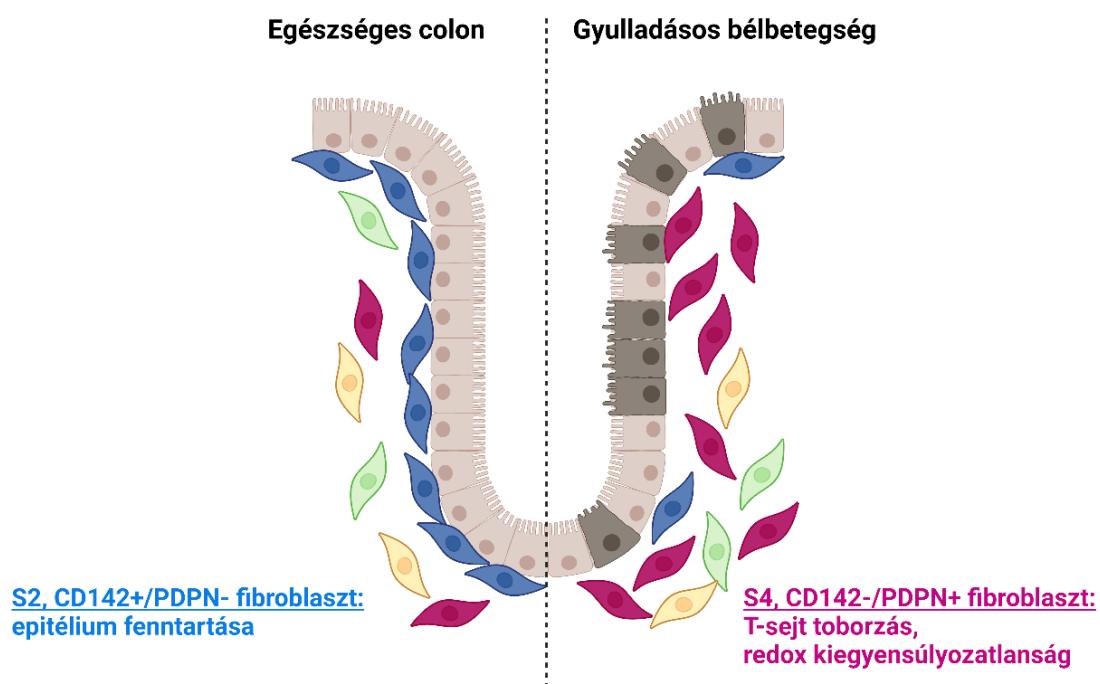


**9. ábra.** A PDAC-ben megfigyelhető két CAF alpopuláció és polarizációjuk (a szerző saját ábrája).

CRC-ben is megtalálható e két CAF populáció, ugyanakkor ebben a szövetben a kanonikus Wnt szignalizáció játszik szerepet a myCAF fenotípus megjelenésében, szemben az iCAF fenotípussal. Ebben a modellben az iCAF-ok EMT gének expresszióját indukálták, míg a myCAF-ok visszafordították ezt a génexpressziós változást [100]. CRC szövetminták egységt RNS szekvenálásával CAF-A és CAF-B populációkat detektáltak. A CAF-B csoport megfeleltethető a myCAF-oknak a génexpressziós profiljuk alapján, míg a CAF-A populációban a myofibroblaszt markerek csökkent kifejeződése volt mérhető [101]. Egy másik vizsgálat során adhéziós/sebgyógyulási és perivaszkuláris csoportokba sorolták a CRC eredetű CAF-okat. Az adhéziós/sebgyógyulási CAF

populáció tovább klasszifikálható egyéb alpopulációra, többek között myCAF-okra a kollagén expresszió alapján és iCAF-okra a kemokin expresszió alapján [102]. Egy 2021-es tanulmányban egy SOX2 és SFRP1/2-t magasan expresszáló CAF populációt írtak le CRC-ben, melyek a Wnt/ $\beta$ -katenin útvonalon keresztül segítik a tumorprogressziót [103]. Annak ellenére, hogy a CAF-ok kritikus jelentőségűek a tumorprogresszióban, csoportosításuk még nem teljesen megoldott CRC-ben.

Egysejt RNS szekvenálással négy fibroblaszt populációt tudtak elkülöníteni normál bélszövetben. Az S2 fibroblasztok a bél epitél kriptáinak közelében találhatóak: elsősorban Wnt ligandokat, SOX6-ot és CD142-t (F3, tromboplasztin, szöveti faktor) expresszálnak jelentős mértékben. Fő funkciójuk az epitél őssejtek niche-jének fenntartása és differenciálódásuk szabályozása. Gyulladásos bélbetegségben e négy fibroblaszt alpopuláció aránya megváltozott, s a podoplanint (PDPN), gyulladásos citokineket (pl. IL33), immunsejt modulátorokat (pl. CCL19, CCL21) termelő S4 populáció aránya nőtt meg (**10. ábra**).



**10. ábra.** Egészséges és gyulladásos colonból izolált két legfőbb fibroblaszt populáció és tulajdonságaik (a szerző saját ábrája).

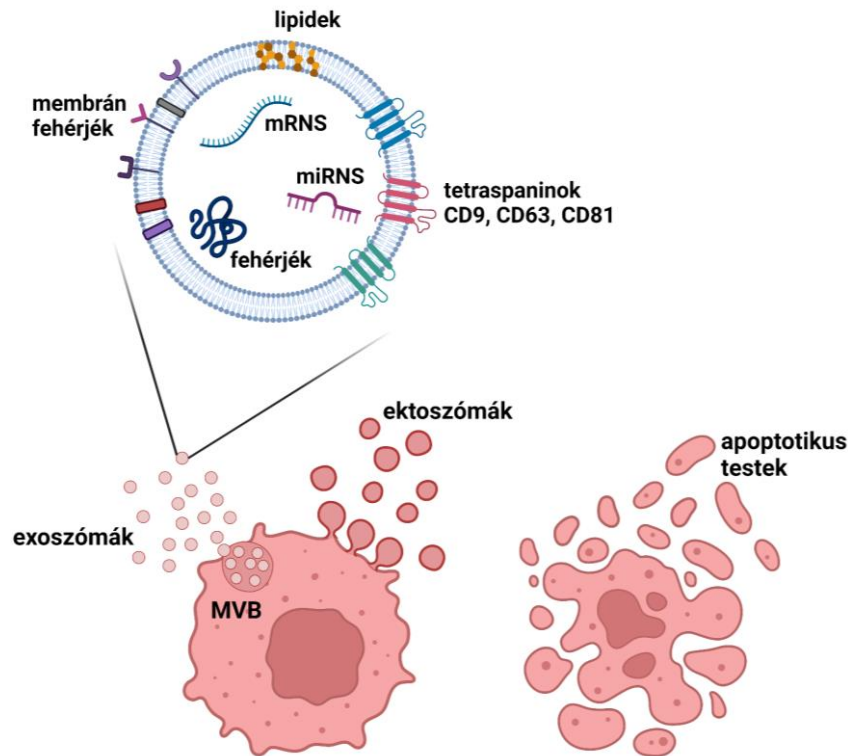


Ugyanakkor ezeknek a stromális fibroblaszt populációknak a jelenléte CRC szövetben még nem ismert [104]. Minthogy az S2 fibroblaszt populáció egészséges szövetre, az S4 csoport gyulladáshoz szövetre jellemző, ez felveti a kérdést, hogy megfeleltethetők-e a myCAF és iCAF fibroblaszt alpopulációknak.

### 1.7.2. Az extracelluláris vezikulák

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) foszfolipid kettős membránnal határolt partikulumok, melyek az intercelluláris kommunikáció egyik módjának tekinthetők, így a tumor-stroma közti kapcsolatban is jelentősek. Az első EV megfigyelések és leírások az 1960-as évekből származnak [105,106]. Számos biológiailag fontos molekulát (pl. RNS-ek, fehérjék) képesek szállítani védett módon, ugyanakkor a felszínükön is képesek különböző molekulákat hordozni (pl. DNS, fehérjék) [107–111]. Az EV kibocsátás minden élőlényre jellemző, az élet mindhárom doménjében megfigyelhető: eukariótákban, prokariótákban és archeákban is [112].

Az EV-k számos szempontból, kémiai tartalmuk, funkciójuk és biogenezisük alapján igen heterogének. Keletkezésüket tekintve két fő csoport figyelhető meg. Az exoszómák endoszómális eredetűek, a multivezikuláris testnek (MVB) vagy az amphiszómának (hibrid organelum, mely az MVB és autofagoszóma egyesülésével keletkezik) a sejtmembránnal való egyesülése révén jutnak az extracelluláris térbe. A másik útvonal a plazmamembránról lefüződő EV biogenezis, és az így képződő EV-eket összefoglalóan ektoszómákként említi a szakirodalom. Ugyanakkor pontos molekuláris markerek nem ismertek a két keletkezési útvonal elkülönítésére, ezért elsősorban fizikai és kémiai tulajdonságok alapján jellemzik az egyes EV csoportokat [113,114]. Egyik lehetőség a méret és eredet szerinti csoportosítás: exoszómák (30-100 nm, MVB eredetű), ektoszómák (100-1000 nm, plazmamembrán eredetű) és apoptotikus testek (1-5  $\mu\text{m}$ ) [115]. Az endoszómális eredetű EV-k potenciális markerei a CD63, CD81 és CD9 tetraspanin transzmembrán fehérjék, melyek az MVB-ben feldúsulnak, ugyanakkor ezek csak az exoszómák egy alpopulációját jelölik [116] (**11. ábra**).



**11. ábra.** Az extracelluláris vezikulák három klasszikus csoportja és az exoszómák által szállított jelentősebb molekulák (a szerző saját ábrája).

Mivel a gyakorlatban nehéz az EV-ket eredetük alapján elkülöníteni, ezért elsősorban méret szerint csoportosítjuk őket a kísérletekben: kis EV (small EV, sEV) és nagy EV (large EV, lEV) a differenciál centrifugálás és ultracentrifugálás során kapott üledékek alapján [114,117].

Nagy érdeklődés övezi az EV-k tumorfejlődésben betöltött szerepét. Számos tanulmány bizonyítja, hogy az EV kibocsátás mértéke megemelkedik tumorsejtekben a nem malignus sejtekhez viszonyítva. Ennek hátterében az EV biogenezisben és a vezikuláris transzportban fontos molekulák megváltozott expresszióját és működését sejtik [118–120]. Az EV-k igen fontosak a tumor és a stroma közti kommunikációban, de a tumorsejtek közti kommunikációban is jelentős funkciójuk van [121]. A tumorsejt eredetű EV-k képesek a stromális fibroblasztokat aktiválni és úgy befolyásolni, hogy azok kialakítsák a tumorprogresszióhoz megfelelő tumor mikrokoznyezetet és segítsék az EMT-t és a metasztázis képzést [122,123]. Továbbá a tumorsejt eredetű EV-k befolyásolhatják a tumor mikrokoznyezetben az endotél sejteket, ezzel növelve az angiogenezist [124]. A tumorsejt eredetű EV-k a tumor ellenes immunitás gátlásában is

fontosak. Az antitumor CD8<sup>+</sup> effektor T sejtek proliferációját képesek csökkenteni és apoptózist indukálni, valamint a regulátoros T sejtek expanzióját elősegíteni [125,126]. Egy másik mechanizmus, amikor a tumorsejt eredetű EV-k a stromában található makrofágokat a tumor asszociált M2-típus felé polarizálják [127–129].

EV-ken keresztül a tumorok fejlődéséhez, növekedéséhez kulcsfontosságú molekulák, növekedési faktorok, receptor fehérjék is képesek szállítódni. Ilyenek többek között az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR), vagy az amphiregulin (AREG). Ezek az EV-k tumorsejt és stromális sejt eredetűek egyaránt lehetnek [130–132]. Az EV-k további jelentősége a tumor mikro környezetben a kemorezisztencia kialakításában van. Egyes tumorsejtek képesek EV-ken keresztül ATP-kötő kazetta (ABC) transzporter fehérjéket cserélni, melyek segítségével eltávolíthatják a tumorelles vegyületeket a sejten kívüli térbe [133,134]. Ugyanakkor az EV-ken keresztül a tumorsejtek a kemoterápiás szereket is eliminálhatják [135,136]. Végül az EV-k változatos miRNS tartalma is különböző módon képes kemorezisztenciát kialakítani számos tumortípusban [137].

A EV kutatás egyik legnagyobb hajtóereje az EV-k biomarkerként való alkalmazása, mivel a kibocsátó sejtre jellemző molekuláris mintázatot szállíthat védett módon és koncentráltan. További nagy előnyük, hogy különböző testfolyadékokból (pl. vér, vizelet, nyál, gerincvelői folyadék, anyatej, ondó) izolálhatók, így kevésbé invazív és könnyen nyerhető folyadék biopsziás módszerek tekinthetők. Ugyanakkor számos nehézség vár megoldásra: a tumor eredetű EV-k elválasztása az egészséges szövetből származó EV-ktől, vagy a megfelelő mennyiségű és tisztaságú EV izolálása [138,139]. Másik fontos motivációja az EV kutatásnak az EV-k, valamint a liposzómák terápiás eszközként való felhasználása. Segítségükkel bizonyos sejtek elvileg specifikusan célozhatók, tartalmuk pedig módosítható különböző terápiás molekulákkal, ugyanakkor ezen a téren is további kutatások nélkülözhetetlenek [140,141].

## **2. Célkitűzések**

PhD munkám során két, népegészségügyileg kiemelkedő jelentőséggel rendelkező tumortípusra, a CRC-re és a PDAC-ra fókuszáltam, és különböző tumor mikrokörnyezeti tényezők funkcionális jelentőségét vizsgáltam a tumorprogresszióban beteg eredetű organoid modellekkel.

Ehhez az alábbi célokat tűztem ki:

1. Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján colorectális adenómában és tüdő adenokarcinómában a Wnt mikroniche-t kialakító, Wnt szekretáló sejtek aránya kapcsolatban áll az EV kibocsátás intenzitásával, valamint a proliferáló sejtek számával. Arra kerestük a választ, hogy ez a jelenség PDAC-ben is megfigyelhető-e.
2. Egy tanulmány négy stromális fibroblaszt populációt azonosított egészséges bél szövetben, melyek aránya megváltozott gyulladásos bélbetegségben. Vizsgáltuk, hogy CRC-ben is megtalálhatók-e ezek a fibroblaszt populációk.
3. Továbbá arra kerestük a választ, hogy ezek a különböző fibroblasztok hogyan befolyásolják a tumorigenezist, illetve ennek mi lehet a molekuláris mechanizmusa.
4. Elemeztük, hogy a fibroblaszt alpopulációk mennyire érzékenyek potenciális új kombinációs terápiákra a CRC organoidokhoz viszonyítva, mely hatóanyagokat korábban sikeresen alkalmaztak más modellrendszerekben.
5. Emellett a használt kombinációs terápiás szerek kölcsönhatását is elemeztük a beteg eredetű CRC organoidokon és fibroblasztokon.

### **3. Módszerek**

#### **3.1 A kísérletekhez szükséges engedélyek**

A humán eredetű műtéti szövetminták felhasználása az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT-TUKEB) engedélyével (No 52614-4/2013/EKU, 51323-4/2015/EKU, 580-5/2021/EÜIG) és a betegek írásos hozzájárulásával történt.

#### **3.2. Humán PDAC organoid kultúrák**

A humán PDAC organoidok létrehozását korábban publikált módszerek alapján végeztük [142]. A műtét során eltávolított tumorszövet darabokat néhány milliméteres darabokra vágtuk, majd kétszer PBS-sel mostuk. Ezután kollagenáz II (5 mg/ml, GIBCO) és 0,4% DNáz I (Sigma) tartalmú teljes PDAC organoid médiumban (lásd később) emésztettük 3 óráig 37°C-on, 30 percenkénti rázás mellett. Az emésztés után ismét kétszer PBS-sel mostuk a sejteket, majd a centrifugálással nyert sejt pelletet növekedési faktor csökkentett, fenolvörös mentes Matrigel (Corning) cseppekben tenyésztettük teljes PDAC organoid médiumban. A teljes PDAC organoid médium az alábbiakat tartalmazta: DMEM/F12 médiumban 2% antibiotikum/antimikotikum mix, B27 és N2 kiegészítő (Gibco), gastrin (10 nM, Sigma), HEPES (10 mM, Sigma), 1% glutamin (Sigma), N-acetil-cisztein (1 mM, Sigma), humán R-Spondin1 (500 ng/ml, R&D Systems), A83-01 (TGF $\beta$  receptor gátló, 0,5  $\mu$ M, Tocris), Rho kináz inhibitor Y-27632 (anoikis gátlása, 10  $\mu$ M, Sigma). Egyes kísérletekben további faktorokkal, inhibitorokkal egészítettük ki a teljes PDAC organoid médiumot: egér Wnt3a (100 ng/ml, Peprotech), PORCN inhibitor (Wnt szekréció gátló) LGK974 (250 nM, Tocris).

A PDAC organoidok passzálására minden 7-10. napon volt szükség. Ekkor mechanikusan lettek egymástól elválasztva kisebb sejtcsoportok, majd centrifugálás után újra Matrigel-ben tenyésztettük őket. A PDAC organoidok jellemzői az **1. táblázatban** láthatóak.

**1. táblázat.** A PDAC organoidok tulajdonságai, mutációik (csak a leggyakoribb „hotspot” mutációkat vizsgáltuk: KRAS 12-61. kodon, TP53 DNS-kötő domén). A nutlin-3 érzékenység két mutáns TP53 allél hiányát jelzi (vagyis legalább egy vad típusú allél jelenlétét).

Organoid	EGF nélkül túlél	Nutlin-3 jelenlétében túlél	KRAS mutáció	TP53 mutáció	Beteg életkora	Beteg neme
PDAC org #1	igen	igen	3' UTR	S96P	52	nő
PDAC org #2	igen	igen	nem detektált	R248Q	63	nő
PDAC org #3	igen	igen	nem detektált	nem detektált	68	nő

### 3.3. Humán CRC organoid kultúrák

A humán CRC organoidok létrehozását korábban publikált módszerek alapján végeztük [143]. A műtét során eltávolított tumor szövet darabokat néhány milliméteres darabokra vágtuk, majd kétszer PBS-sel mostuk. Ezután kollagenáz II (5 mg/ml, GIBCO) és 0,4% DNáz I (Sigma), 125 µg/ml diszpáz II (Invitrogen), 20% FBS (Gibco), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen), DMEM high glucose tartalmú emésztő médiumban emésztettük 60 percig 37°C-on, 15 percenkénti rázás mellett. Az emésztés után ismét kétszer PBS-sel mostuk a sejteket, majd a sorozatos centrifugálással nyert, bél kriptákban és sejtsomókban gazdag pelletet növekedési faktor csökkentett, fenolvörös mentes Matrigel (Corning) cseppekben tenyésztettük teljes CRC organoid médiumban. A teljes CRC organoid médium az alábbiakat tartalmazta: DMEM/F12 médiumban 1% antibiotikum/antimikotikum mix, 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen), B27 kiegészítő (Gibco), HEPES (10 mM, Sigma), 1% glutamin (Sigma), N-acetil-cisztein (1 mM, Sigma), nikotinamid (10 mM, Merck), A83-01 (0,5 µM, Tocris), SB202190-monohydrochloride (p38 gátló, 10 µM, Sigma), EGF (50 ng/ml, Peprtech), Rho kináz inhibitor Y-27632 (10 µM, Sigma).

A CRC organoidok passzálására minden 7-10. napon volt szükség. Ekkor mechanikusan lettek egymástól elválasztva kisebb sejtsoportok, majd centrifugálás után újra Matrigel-ben tenyésztettük őket. Egyes kísérletekben az organoidok 5 nM aktív VII-alvadási faktorról (FVIIa) (Invitrogen), 50 ng/ml HGF-fel, 50 ng/ml IL6-tal (Peprtech), fibroblaszt-kondicionált médiummal, vagy anti-HGF ellenanyaggal (5 µg/ml, R&D

Systems) blokkolt fibroblaszt-kondicionált médiummal voltak kezelve négy napig. A CRC organoidok jellemzői a **2. táblázatban** láthatóak.

**2. táblázat.** *A CRC organoidok tulajdonságai, mutációik (csak a leggyakoribb „hotspot” mutációkat vizsgáltuk, KRAS 12-61. kodon, TP53 DNS-kötő domén). A nutlin-3 szenzitivitás legalább egy vad típusú allél jelenlétét jelzi.*

Organoid	EGF nélkül túlél	Nutlin-3 jelenlétében túlél	KRAS mutáció	TP53 mutáció	Beteg életkora	Beteg neme
CRC org #1	nem	igen	nem detektált	V274A	63	nő
CRC org #2	nem	igen	nem detektált	V274A	74	férfi
CRC org #3	nem	igen	nem detektált	V274A	75	férfi
CRC org #4	nem	nem	nem detektált	nem detektált	74	férfi

### 3.4. Humán PDAC fibroblaszt kultúrák

A PDAC organoidok növesztése során a tenyésztőedény aljára vándorolt stromális fibroblaszt sejteket a 3D PDAC organoidok passzálása után Tryple-lel (Gibco) átpasszáltuk, és PDAC fibroblaszt médiumban tenyésztettük 2D-ben. A PDAC fibroblaszt médium az alábbiakat tartalmazta: DMEM high glucose, 1% glutamin (Sigma), 5% FBS (Gibco), 1% antibiotikum/antimikotikum mix.

### 3.5. Humán CRC és normál colon fibroblaszt kultúrák

A műtét során eltávolított tumor szövet (**3. táblázat**) darabokat néhány milliméteres darabokra vágtuk, majd kétszer PBS-sel mostuk. Ezután kollagenáz II (5 mg/ml, GIBCO) és 0,4% DNáz I (Sigma), 125 µg/ml diszpáz II (Invitrogen), 20% FBS (Gibco), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen), DMEM high glucose tartalmú emésztő médiumban emésztettük 60 percig 37°C-on, 15 percenkénti rázás mellett. Az emésztés után ismét kétszer PBS-sel mostuk a sejteket, majd a sorozatos centrifugálással nyert, egysejt gazdag pelletet CRC fibroblaszt médiumban tenyésztettük 2D-ben. A CRC

fibroblaszt médium az alábbiakat tartalmazta: DMEM high glucose, 1% glutamin (Sigma), 10% FBS (Gibco), 1% antibiotikum/antimikotikum mix.

A humán normál colon fibroblaszt sejtvonalat (CCD-18Co, ATCC) is CRC fibroblaszt médiumban tartottuk. Az ELISA kísérletekhez és a kondicionált médium gyűjtéshez a fibroblasztok FBS-mentes médiumban voltak tartva 3 napig, miután háromszor PBS-sel mostuk őket. Egyes kísérletekben a fibroblasztok 5 nM aktív VII-alvadási faktorral (FVIIa) (Invitrogen), 10 ng/ml TGF $\beta$ -val (Peprotech) vagy 5 ng/ml IL1 $\alpha$ -val (Peprotech) voltak kezelve négy napig szérum-mentes médiumban.

**3. táblázat.** A CRC-CAF sejt kultúrák alapításához bevont betegek klinikai adatai.

CAF	Nem	Életkor	Tumor	Differenciáltság	Stádium
CRC-CAF 1	nő	39	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T3N2bM1a
CRC-CAF 2	nő	37	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T3N1aM0
CRC-CAF 3	nő	67	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T3N0M0
CRC-CAF 4	nő	56	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T3N1aM0
CRC-CAF 5	férfi	66	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T3N0M0
CRC-CAF 6	férfi	68	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T3N0M0
CRC-CAF 7	nő	55	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T3N0M0
CRC-CAF 8	férfi	71	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T3N1bM0
CRC-CAF 9	nő	79	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T4bN0M0
CRC-CAF 10	férfi	77	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T3N0M0
CRC-CAF 11	férfi	57	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T3N1bM0
CRC-CAF 12	nő	81	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T3N1bM0
CRC-CAF 13	nő	47	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T4aN1aM0
CRC-CAF 14	nő	56	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T3N1bM0
CRC-CAF 15	férfi	70	Rectalis adenokarcinóma	Grade 2	T3N0M0



CRC-CAF 16	nő	65	Colon adenokarcinóma	Grade 3	T3N0M0
CRC-CAF 17	férfi	62	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T3N0M0
CRC-CAF 18	férfi	82	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T1N0M0
CRC-CAF 19	nő	70	Colon adenokarcinóma	Grade 3	T3N0M0
CRC-CAF 20	nő	69	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T3N1bM0
CRC-CAF 21	nő	46	Colon adenokarcinóma	Grade 2	T4bN1cM0

### 3.6. Extracelluláris vezikula mérés NTA módszerrel

Az extracelluláris vezikulákkal (EV) történő kísérletekben az International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) irányelveit követtük [114]. Az organoidokat a mérés előtt 2 napig kezeltük, majd a felülúszójukból differenciál centrifugálással 16 °C-on (300 g 5 perc, 2000 g 20 perc, 12500 g 20 perc) eltávolítottuk a sejttörmelék, apoptotikus testeket és nagy EV-eket. Az így nyert felülúszóban található kisebb EV-eket 10-szeres PBS (0,1 µm-es szűrővel szűrt) hígítással mértük. Kontrollként üres médiumból is mérést végeztünk, melyet a mintákkal megegyezően kezeltünk. Az EV-k mennyiségét és méreteloszlását a ZetaView Z-NTA (Particle Metrix) műszerrel mértük Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) módszerrel. Az összes mérésben 11 pozíciót vizsgáltunk az alábbi beállításokkal: 25 °C, auto expose, gain 28,8, offset 0, shutter 100, sensitivity 80. Az elemzést a ZetaView Analyze 8.05.10. szoftverrel végeztük. Az organoidok sejtszámát a felülúszó eltávolítása után Bürker-kamrában megszámoltuk, és a mért eredményeket minden esetben sejtszámra normalizáltuk.

### 3.7. Immuncitokémia

Az organoidokat vagy fibroblasztokat 8 kamrás Falcon Culture Slide (BD Biosciences) tárgylemezeken tenyésztettük. A médium eltávolítása és PBS mosás után 4% PFA-val 30 percig fixáltuk a sejteket. A fixálószer PBS-es kimosása után blokkoló pufferrel (0,2% BSA, 5% FBS, 0,3% Triton X-100 PBS-ben) blokkoltuk és permeabilizáltuk az organoidokat 2 óráig szobahőn. Ezután blokkoló pufferben oldott

elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk a mintákat éjjelen át 4 °C-on (az antitestek listája a **4. táblázatban** található). Második nap az elsődleges ellenanyagot mosó pufferrel (0,3% Triton X-100, 4% NaCl PBS-ben) eltávolítottuk, majd fluorokrómmal konjugált másodlagos ellenanyaggal (**4. táblázat**) inkubáltuk az organoidokat vagy a fibroblasztokat 2 óráig szobahőn. A másodlagos antitesteket is blokkoló pufferben oldottuk. A másodlagos antitestet szintén mosó pufferrel távolítottuk el, majd DAPI DNS festék tartalmú médiummal (ProLong Diamond antifade mountant containing DAPI, Thermo Fisher) fedtük le a mintákat. A mintákat konfokális mikroszkóppal (Leica TCS SP8) fotóztuk és az ImageJ szoftverrel értékeltük.

**4. táblázat.** *A kísérleteink során használt ellenanyagok*

Ellenanyag	Gyártó	Katalógus szám
humán CD142-PE	BioLegend	365204
humán CD44-PE	BD Pharmingen	555479
humán podoplanin-APC	BioLegend	337022
humán aktív kaszpáz-3	R&D Systems	AF835
humán CD142	BioLegend	365202
humán foszfo-p42/44	Cell Signaling	9101
humán foszfo-S6	Cell Signaling	2211
humán HGF	R&D Systems	AF-294-NA
humán KI67	Abcam	ab16667
humán KI67	Invitrogen	14-5699-82
humán lumican	Abcam	ab168348
humán PORCN	Abcam	ab105543
humán vimentin	R&D Systems	MAB2105
humán $\alpha$ SMA	Sigma	A5228
egér IgG Alexa 488	Invitrogen	A21202
egér IgG Alexa 568	Invitrogen	A10037
nyúl IgG Alexa 488	Invitrogen	A21206
nyúl IgG Alexa 568	Invitrogen	A11011
nyúl IgG Alexa 750	Invitrogen	A21039
patkány IgG Alexa 568	Invitrogen	A11077

### 3.8. Paraffinba ágyazott szövetek immunfestése

PFA-val fixált és paraffinba ágyazott metszeteket deparaffinizáltuk xilollal és rehidratáltuk leszálló alkoholsorral. A metszeteket lúgos Tris-EDTA pufferben (10 mM Tris, 1mM EDTA, 0,05% Tween-20 desztillált vízben, pH=9,0) forraltuk 15 percig, majd 20 percig szobahőn hagytuk kihűlni. Mosás után blokkoló pufferrel blokkoltuk a metszeteket, majd éjen át 4 °C-on az elsődleges ellenanyaggal, aztán 2 óráig szobahőn a fluorokrómmal konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk a metszeteket. A metszeteket DAPI DNS festék tartalmú médiummal (ProLong Diamond antifade mountant containing DAPI, Thermo Fisher) fedtük le. A mintákat konfokális mikroszkóppal (Leica TCS SP8) fotóztuk és az ImageJ szoftverrel értékeltük. A használt ellenanyagok a **4. táblázatban** találhatóak.

### 3.9. Áramlási citometria és sejt szortolás

Az organoidokból vagy fibroblaszt sejtekből TrypLE-lel egysejt-szuszpenziót hoztunk létre, majd FACS pufferben (1 mM EDTA, 25 mM HEPES, 1% BSA PBS-ben) szuszpendáltuk a sejteket. A sejteket elsődleges antitesttel, majd másodlagos antitesttel jelöltük 20 percig 4 °C-on FACS pufferben. 10000 eseményt mértünk a Cytoflex (Beckman Coulter) áramlási citométerrel, vagy a sejtpopulációkat Sony SH800S sejtszorterrel válogattuk szét. Az egyes kísérletekben mindig egyenlő mennyiségű szortolt sejtet használtunk. A használt ellenanyagok a **4. táblázatban** találhatóak.

### 3.10. ELISA

A szortolt CD142<sup>alacsony</sup> és CD142<sup>magas</sup> fibroblasztokat (100 000 sejt/lyuk, 48-lyukú lemez) 2 napig növesztettük, majd elvontuk az FBS-t és további 3 napig tenyésztettük őket. A sejttermelékét centrifugálással eltávolítottuk a kondicionált médiumból (300 g, 5 perc) és a HGF (hepatocita növekedési faktor) mennyiséget detektáltuk ELISA-val (Bio-Techne, DHG00B) a gyártó utasításai szerint. Az optikai denzitást HiPo MPP-96 Microplate Photometer-rel (Biosan) detektáltuk.

### 3.11. RNS izolálás és mRNS mérés

A sejt- és organoid tenyészetekből Qiazol lízis pufferrel (Qiagen) készítettünk mintát az RNS izoláláshoz, majd a miRNEasy Micro Kit-tel (Qiagen) a gyártó utasításai szerint izoláltuk a teljes RNS-t. Az RNS koncentrációt NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) készülékkel mértük meg. 150 ng teljes RNS felhasználásával cDNS-t készítettünk SensiFAST cDNA Synthesis Kit-tel (Bioline) a gyártó utasításai szerint. A kvantitatív PCR mérésekhez a SensiFAST SYBR no-ROX Kit-et (Bioline) használtuk, a primerek az **5. táblázatban** találhatóak. A génexpressziós méréseket BioRad CFX384 Touch real-time PCR gépen végeztük (384-lyukú lemez, 5 µl/lyuk). Az eredményeket az alábbi képlettel számoltuk ki: relatív génexpresszió =  $2^{-\Delta Ct}$  ( $\Delta Ct = C_{t\text{vizsgált gén}} - C_{t\text{housekeeping gén}}$ ). Housekeeping génként (háztartási gén) a *HPRT1* és *GAPDH* gént használtuk. Amennyiben a Ct érték (ciklus szám) nagyobb volt, mint 36, úgy az adott gént nem expresszálnak vettük. A heatmap ábránál a  $\Delta Ct$  értékeken z-score normalizációt végeztünk és ezt ábráztuk ([www.heatmapper.ca](http://www.heatmapper.ca)).

**5. táblázat.** *A kísérleteink során használt primerek.*

Gén	Primer 1	Primer 2
ACTA2	CTGACCCTGAAGTACCCGAT	GTCATTTTCTCCCGGTTGGC
AREG	CCTACTCTGGGAAGCGTGAA	AGTAGTCATAGTCGGCTCCC
AXIN2	CTGGCTATGTCTTTGCACCA	CTTCACACTGCGATGCATTT
BTC	ACTGCATCAAAGGGAGATGC	CATGTGCAGACACCGATGA
CDH1	GGATGTGCTGGATGTGAATG	AGCCAGTTGGCAGTGTCTCT
COL1A1	AACGATGGTGCTAAGGGTGA	CCATCTTTGCCAGGAGAGCC
CTGF	CGAAGCTGACCTGGAAGAGA	CCGTCGGTACATACTCCACA
CXCL1	GTCCGTGGCCACTGAACT	TTCCGCCATTCTTGAGTG
CSF3	GGACACTCTCTGGGCATCC	CAGCTGCAGTGTGTCCAAG
EGF	CAGATCTCGATGGTGTGGGA	CCTCCATCATAATCACAGGAGC
EPCAM	CTGGCCGTAAACTGCTTTGT	CATCATTGTTCTGGAGGGCC
EREG	TCCATCTTCTACAGGCAGTCC	TGCACTGTCCATGCAAACAA
FAP	GGAAATGAGCTTCTCGTCC	GGTGGATCTCCTGGTCTTTG

GAPDH	GGGTGTGAACCATGAGAAGT	CAGTGATGGCATGGACTGTG
HBEGF	TTATCCTCCAAGCCACAAGC	CCCATGACACCTCTCTCCAT
HGF	CAAGCAATCCAGAGGTACGC	TGGTGTCTGATGATCCCAGC
HPRT1	TGAGGATTTGGAAAGGGTGT	TCCCCTGTTGACTGGTCATT
IL11	GACAAATTCCCAGCTGACGG	CGCAGGTAGGACAGTAGGT
IL6	ATTCCAAAGATGTAGCCGCC	AGTGCCTCTTTGCTGCTTTC
KRAS-seq	CCCAGGTGCGGGAGAGA	AACAGTCTGCATGGAGCAGG
LGR5	AGTGCTGTGCATTTGGAGTG	AGGGCTTTCAGGTCTTCCTC
TGFA	CCTGCCTAGTCTGCGTCTTT	CCAACACAATACCCAGAGCG
TP53-seq	TGAAGCTCCCAGAATGCCAG	CTTCAGGTGGCTGGAGTGAG
TROY	GATGCACAGTGTGTGACGTG	CATGTCTTGAAAGCCGACAA
VEGFA	AAGGAGGAGGGCAGAATCAT	CACACAGGATGGCTTGAAGA
WNT10a	ACTCGCAACAAGATCCCCTA	TAAGCGGTGCAGCTTCCTAC
WNT11	CAGGATCCCAAGCCAATAAA	TATCGGGTCTTGAGGTCAGC
WNT4	ACAGTCGTTTGTGGATGTGC	CCAGCACGTCTTTACCTCAC
WNT5a	CAAGGGCTCCTACGAGAGTG	CTTCTCCTTCAGGGCATCAC
WNT5b	TTTGGGAGAGTCATGCAGAT	TAGCCGTACTCCACGTTGTC
WNT7b	TCAACGAGTGCCAGTACCAG	CAGTTGCTCAGGTTCCCTTG

### 3.12. Szekvenálás

A cDNS-ből Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher) kittel amplifikáltuk a *KRAS* és *TP53* gén egy szakaszát az **5. táblázatban** található primerekkel, az anellációs hőmérséklet 65 °C volt. A megfelelő PCR terméket 2% agaróz gélből izoláltuk Gel Purification Kit-tel (Macherey-Nagel). A szekvenálás Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer készülékkel (Life Technologies) történt a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben, Dr. Bödör Csaba laborjában. Az adatokat a Chromas 2.6 szoftverrel (Technelysium Pty Ltd) elemeztük és az organoidok mutációi az **1. és 2. táblázatban** láthatók.

### 3.13. Életképességi teszt

Az élő sejtek mennyiségének meghatározásához a lumineszcencia alapú CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay-t (Promega) használtuk a gyártó utasításai szerint 96-lukú lemezen és Fluoroskan FL (Thermo Fisher Scientific) eszközzel detektáltuk a lumineszcenciát. 5000 organoid sejtet és/vagy 5000 fibroblasztot tettünk 6 µl 3D mátrixba és 4 napig növesztettük őket, majd 6 napig kezeltük különböző inhibitorokkal és kemoterápiás szerekkel: Trametinib (GSK1120212), PU-H71, A-1155463, (+)-JQ1 (Selleck Chemicals), 5-fluorouracil (Tocris) és irinotecan (MedChemExpress). Az összes vegyületet DMSO-ban oldottuk. A relatív életképességet az alábbi képlettel számoltuk ki: életképesség % = (adott kezelés értéke – átlagos pozitív kontroll) / (átlagos oldószer kontroll – átlagos pozitív kontroll) × 100. Oldószer kontrollként DMSO-t, pozitív kontrollként 5 µM staurosporint használtunk (MedChemExpress) [54].

Az IC50 értékeket (fél maximális gátló koncentráció) az AAT Bioquest IC50 calculator (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>) online programmal határoztuk meg. A hatóanyag kölcsönhatásokat (szinergizmus és antagonizmus) a Chou-Talalay módszerrel, a CompuSyn szoftverrel (<https://www.combosyn.com/>) vizsgáltuk, melyben szinergizmus: CI<0,75, antagonizmus: CI>1,25 (CI: kombinációs index) [27,144,145].

### 3.14. Bioinformatikai és statisztikai elemzések

CD142 (F3), valamint PDPN (podoplanin) intenzitást és a pozitív sejtek mennyiségét a Human Protein Atlas adatbázisban (<https://www.proteinatlas.org/>) elemeztük CRC esetében.

A statisztikai analízisek a Microsoft Excel, IBM SPSS v25 és GraphPad Prism szoftverek segítségével történtek. Az adatok statisztikai értékeléséhez Mann-Whitney U-tesztet, párosított és párosítatlan t-próbát, valamint ANOVA-t Tukey post-hoc teszttel használtunk \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,005 értékekkel. Nem szignifikánsnak tekintettük az eredményt p>0,05 esetében. Átlag+SD-t, a box plot-okon a mediánt, a 25- és 75-percentiliseket ábrázoltuk. Normál colon fibroblasztok esetén a mintaelemszám (n) technikai párhuzamosokat jelöl, a beteg eredetű CAF-ok esetén a mintaelemszám biológiai párhuzamosokat jelent.

## **4. Eredmények**

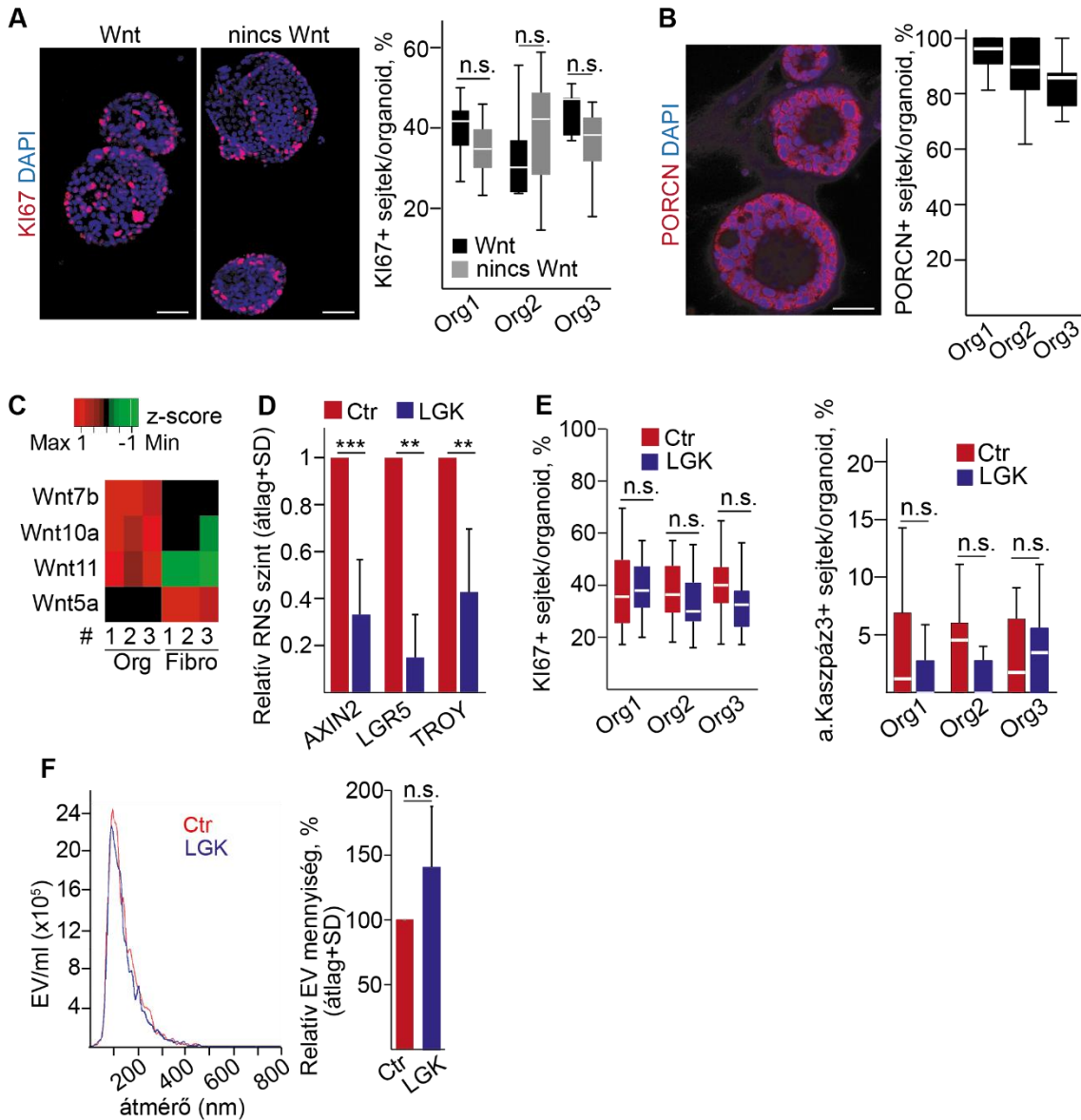
### **4.1. A Wnt szekréció nem befolyásolja az extracelluláris vezikula kibocsátást és a sejtosztódást PDAC-ben**

Korábban kutatócsoportunk azt találta, hogy a Wnt fehérjét szekretáló sejtek aránya korrelál az EV kibocsátás mennyiségével egészséges intesztinális organoidokban és bél adenóma organoidokban [146]. Valamint ugyanilyen kapcsolatot figyeltünk meg normál egér bronchiális, tüdő adenokarcinóma és egészséges egér hasnyálmirigy organoidokban is [147]. Ezért kíváncsiak voltunk, hogy ez szövet specifikus, vagy más tumorokban is megfigyelhető jelenség. Vizsgálatainkban az egyik legagresszívebb tumortípusra fókuszáltunk, a pancreas duktális adenokarcinómára (PDAC), mely progressziója során függetlenné válhat a külső Wnt szignáltól [64].

Annak eldöntésére, hogy PDAC organoidjaink Wnt-függőek vagy függetlenek, a kanonikus Wnt3a tartalmú és Wnt3a nélküli médiumban tenyésztettük őket. Érdekes módon az összes organoidunk életképes volt külső Wnt3a fehérje nélkül is, sőt egységesen expresszálták a PORCN enzimet, mely nélkülözhetetlen a Wnt fehérjék szekréciójához (**12.A-B ábra**). Továbbá PDAC organoidjaink egységes Wnt génexpressziós profillal rendelkeznek (*Wnt7a*, *Wnt10a*, *Wnt11*), mely nagyban különbözik a stromális PDAC fibroblasztok Wnt génexpressziós profiljától (*Wnt5a*) (**12.C ábra**). Mindezek arra engednek következtetni, hogy a PDAC organoidok képesek Wnt ligandokat előállítani saját maguk számára. Ennek bizonyítására a Wnt szekréciót gátló LGK974-gyel kezeltük organoidjainkat. Ahogy vártuk, a kezelést követően szignifikánsan csökkent az *AXIN2*, *LGR5* és *TROY* Wnt célgének expressziója a PDAC organoidokban (**12.D ábra**), tehát a PDAC organoidok képesek maguk számára létrehozni a Wnt mikroniche-t. Ugyanakkor az LGK974 hatására nem tapasztaltunk csökkenést a KI67+ osztódó sejtek arányában, sem növekedést az aktív kaszpáz-3 pozitív apoptotikus sejtek arányában (**12.E ábra**).

Továbbá a Wnt szekréciójának gátlása nem volt hatással sem az EV kibocsátás intenzitására, sem pedig az EV-k méretére, az EV-k méreteloszlásának és koncentrációjának meghatározására általánosan elfogadott NTA mérések alapján (**12.F ábra**). Eredményeink alapján megállapítható, hogy noha a Wnt fehérjék kritikus

jelentőségűek a sejtosztódásban egészséges hasnyálmirigy dukális organoidokban [142,147], ez a jelenség a tumorigenezis során nem megfigyelhető.



**12. ábra. A Wnt aktivitás nincs kapcsolatban a sejtosztódással és az EV kibocsátással humán PDAC organoidokban.** **A)** Immunfestés a KI67 osztódási markerre és a konfokális mikroszkóppal készített képek kvantifikálása (az egyes organoidok osztódási rátájából származó adatok). A reprezentatív kép a PDAC organoid #1-et mutatja. A kísérletekben rekombináns Wnt3a-t használtunk (Mann-Whitney U-teszt). **B)** Immunfestés a PORCN enzimre és a konfokális mikroszkóppal készített képek kvantifikálása (az egyes organoidokból származó adatok). **C)** A PDAC organoidok és fibroblasztok Wnt expressziós profilja (RT-qPCR, n=3). Az adatok a HPRT1 housekeeping génre normalizáltak és z-score transzformáltak. A vörös és zöld színek a magas és alacsony RNS expressziót mutatják, a fekete szín az RNS hiányára utal ( $36 < C_t$ ). **D)** Az AXIN2, LGR5, TROY RNS szintjének változása LGK974 kezelés hatására (változás

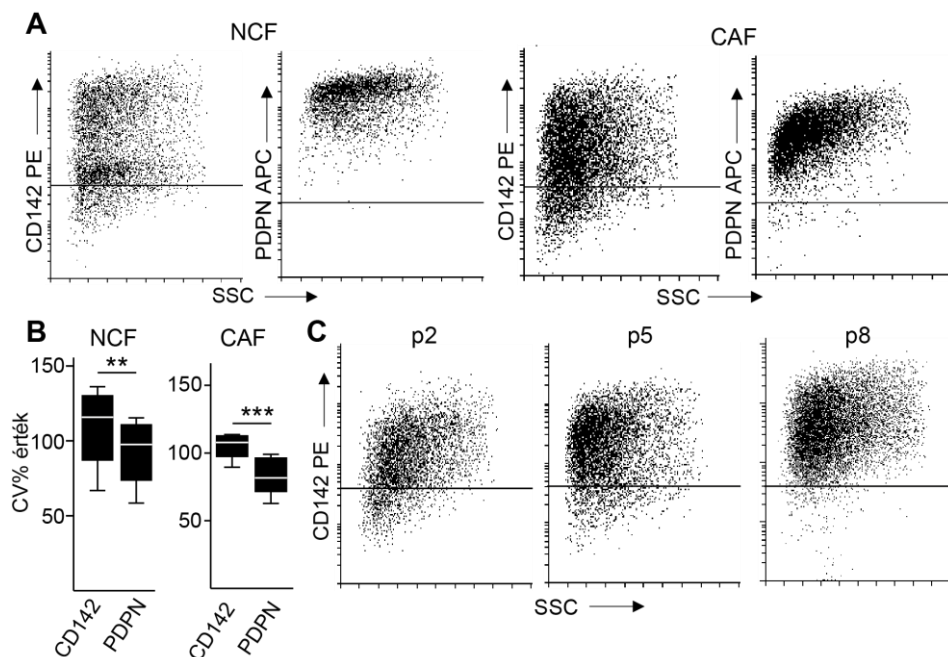




esetében CAF és CRC organoid vonalakban (RT-qPCR, GAPDH háztartási génhez normalizálva). C)  $\alpha$ SMA immunfestés CRC beteg eredetű CAF sejtkultúrákra. A sejtek nagy része pozitív volt a vizsgált fehérjére. A DAPI festés a sejtmagokat jelöli (konfokális mikroszkópia, méretarány: 40  $\mu$ m).

Hogy teszteljük ennek a két markernek a jelenlétét CRC-ben, először a Protein Atlas adatbázist elemeztük. A tumorsejtek jellemzően csak alacsony vagy közepes CD142 és PDPN expressziót mutattak (13.A ábra). Azért, hogy ennek a két molekulának a stromális expresszióját vizsgáljuk, CAF-okat izoláltunk CRC betegek tumorszövetéből. Ezek a sejtkultúrák a mezenchimális ACTA2 (az  $\alpha$ -simaizom aktin  $\alpha$ SMA fehérjét kódolja) és FAP expresszióval rendelkeztek, így megerősítettük, hogy az izolált sejtek valóban fibroblasztok (13.B-C ábra). Továbbá nem detektáltuk az epiteliális marker CDH1 és EpCAM expresszióját a beteg-eredetű CAF sejtenyészetekben (13.B ábra).

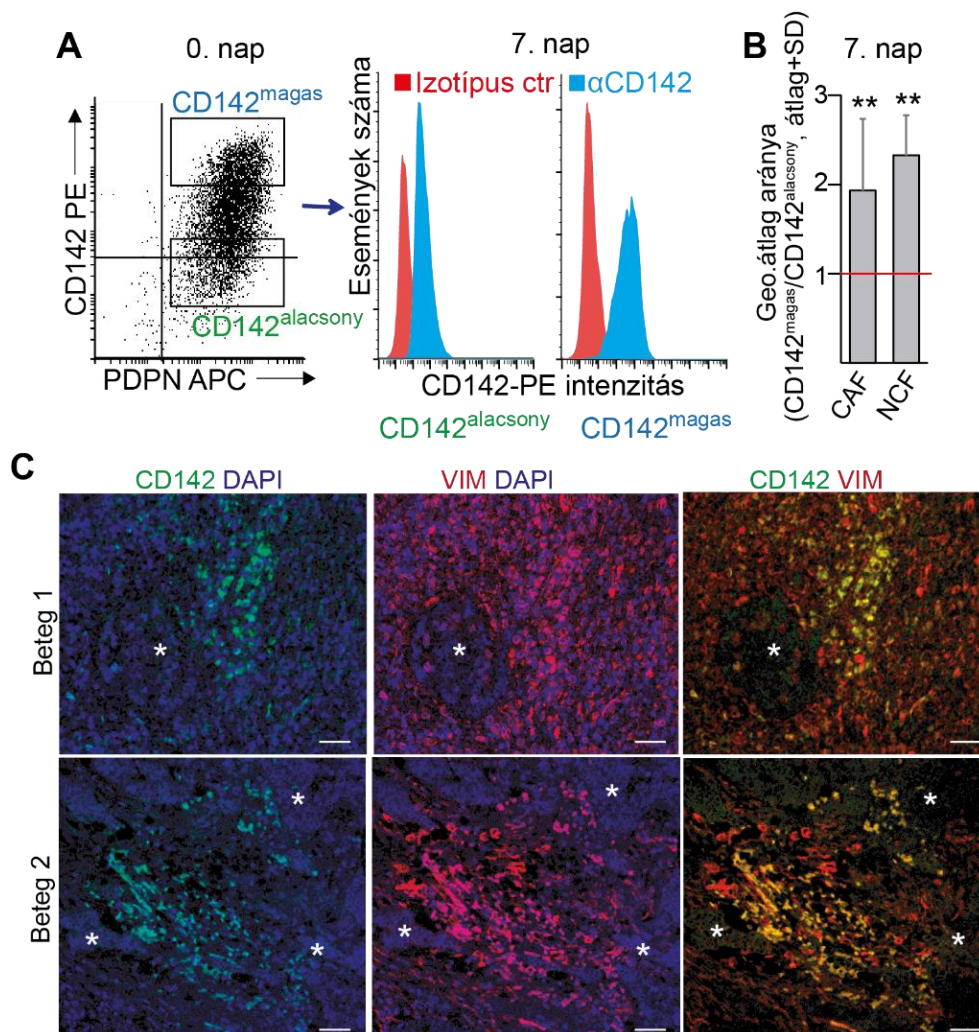
Áramlási citometriával igazoltuk a CD142 és PDPN jelenlétét a CAF-okon és kereskedelmi forgalomban elérhető normál colon fibroblasztokon (NCF) (14.A ábra), viszont a CD142-re nagyobb heterogenitást tapasztaltunk a PDPN-hez viszonyítva (14.B ábra). Sőt, a CD142 heterogenitás megmaradt a CAF-ok tenyésztése, többszöri passzálása során is (14.C ábra). Ezért további kísérleteinkben a CD142-re fókuszáltunk.



**14. ábra. A fibroblasztok heterogenitást mutatnak CD142-re.** A) CD142 és PDPN fehérje expresszió NCF és CAF kultúrákban. A horizontális vonalak az izotípus kontroll fluoreszcencia intenzitását jelölik (representatív áramlási citometria ábrák). B)

Variációs koefficiens (CV) a CD142 és PDPN geometriai átlagára áramlási citometriás mérésekből (CAF:  $n=8$ , NCF:  $n=4$ ). C) Reprezentatív áramlási citometriás képek CAF kultúrák CD142 expressziójáról, az izolálást követő különböző időpontokban ( $p$ : passzázs szám). Mann-Whitney U-teszt (B)  $**p<0,01$ ;  $***p<0,005$

A szortolt CD142<sup>alacsony</sup> és CD142<sup>magas</sup> fenotípus különbség megmaradt 7 nap tenyésztés után is mind a CAF-okban, mind pedig normal fibroblasztokban (NCF) (15.A-B ábra), tehát ez a két fibroblaszt populáció fenotípusosan stabilnak bizonyult. A CD142 *in vivo* stromális heterogenitását igazolva, CRC beteg-eredetű tumorszövet metszeteket vizsgáltunk és CD142+ stromális sejteket figyeltünk meg, ugyanakkor a tumorsejtek negatívak voltak erre a markerre (15.C ábra). Az eltérő stromális CD142 expresszió tehát különböző funkcióval rendelkező fibroblaszt szubpopulációkat jelölhet CRC-ben.

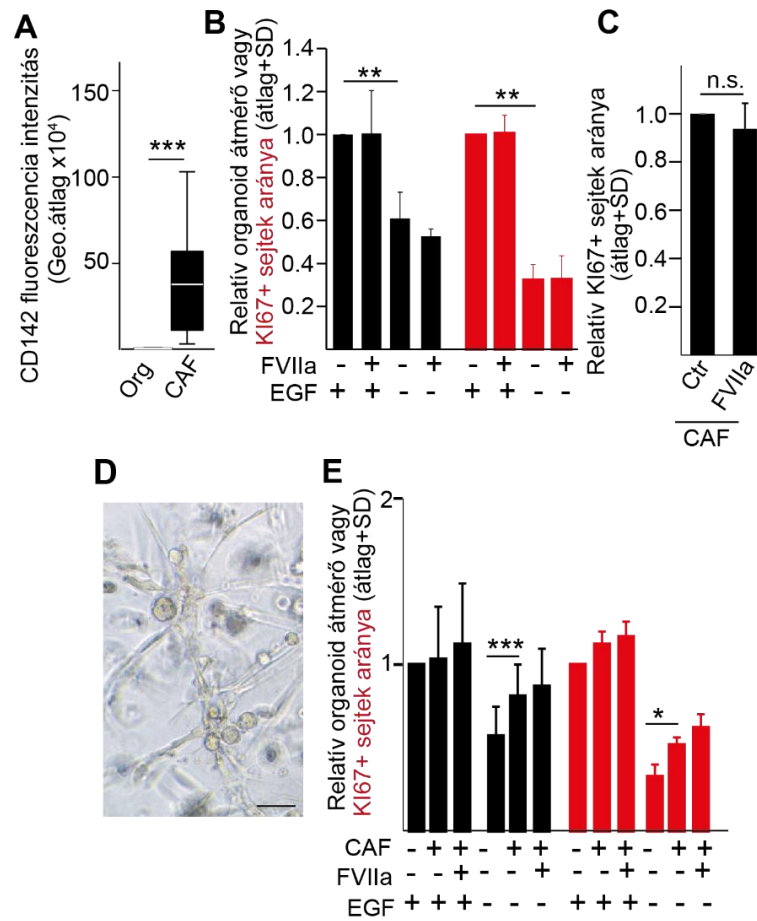


15. ábra. A CD142-re szortolt fibroblasztok stabil fenotípust mutatnak. A) Szortolási stratégia CD142-re (bal panel) és a CD142 detektálása a szortolt sejteken 7 nap

tenyésztés után (áramlási citometria). **B**) CD142 fluoreszcencia intenzitás geometriai átlagának aránya szortolt CAF és NFC vonalaktól, 7 nap tenyésztés után (áramlási citometria, CAF: n=11, NFC: n=3). A piros vízszintes vonal a különbség hiányát jelöli a két populáció közt (arány=1). **C**) CD142 és a mezenchimális marker vimentin (VIM) detektálása CRC beteg eredetű szöveti metszeten (konfokális mikroszkópia, méretarány: 100  $\mu$ m). A csillagok a VIM negatív tumorfészkeket jelölik. Párosított t-próba (B)  $**p<0,01$

### 4.3. A CD142 stimulációja fibroblasztokon nem befolyásolja a CRC organoidokat kokultúrában

Epiteliális CRC organoidjaink nagyon alacsony CD142 expresszióval rendelkeznek (**16.A ábra**), mely a Protein Atlas adatbázis elemzésével nyert eredményekkel párhuzamban van.



**16. ábra.** Az FVIIa-nak nincs hatása sem a CRC organoidokon, sem pedig a fibroblasztokon. A) CD142 sejtfelszíni fehérje mennyisége (geometriai átlag) CRC



organoid sejteken és CAF-okon (áramlási citometria, CAF: n=12, CRC organoid: n=8, négy organoid vonal kétszer mérve). **B**) Organoidok relatív átmérője és a KI67+ osztódó CRC organoid sejtek aránya EGF és/vagy FVIIa jelenlétében vagy hiányában (eredmények a kontrollhoz viszonyítva, EGF tartalmú médium, FVIIa nélkül, n=4). **C**) A sejtosztódás intenzitása CAF kultúrákban FVIIa jelenlétében vagy hiányában (n=5). **D**) Fénymikroszkópos kép CRC organoid és CAF kokultúráról (méretarány: 20  $\mu$ m). **E**) Relatív organoid átmérő és KI67+ CRC organoid sejtek aránya EGF, FVIIa, CAF-ok jelenlétében és/vagy hiányában (n=4). Mann-Whitney U-teszt (A), párosított t-próba (C), ANOVA (B, E) n.s.:  $p > 0,05$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$

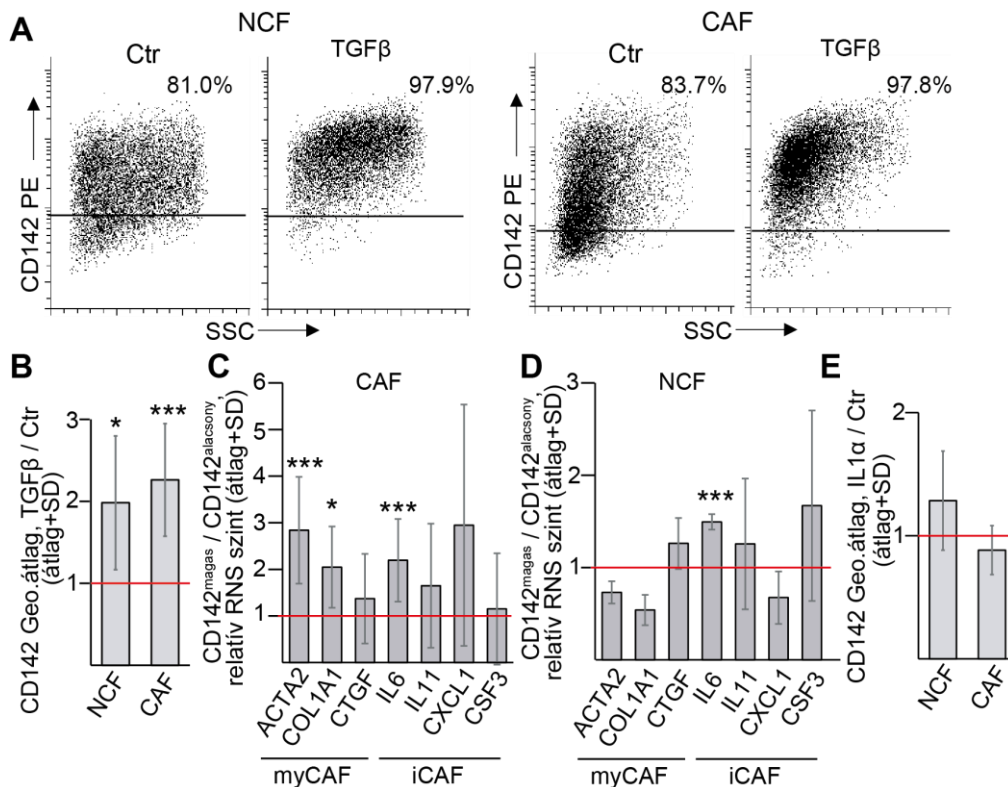
Mint ahogy CRC organoidjaink EGF függők, amikor elvontuk az EGF-et a médiumból, az organoidok átmérője és a KI67+ osztódó sejtek aránya szignifikánsan lecsökkent (**16.B ábra**). Amikor a CD142 ligandjával, aktív VII-es faktorról (FVIIa) kezeltük az organoidokat, nem tapasztaltunk változást az organoidok átmérőjében és a KI67+ osztódó sejtek arányában, EGF hiányában és jelenlétében sem (**16.B ábra**). Továbbá az FVIIa a CAF-ok osztódását sem befolyásolta (**16.C ábra**).

Amikor a CRC organoidokat a fibroblasztokkal együtt tenyésztettük kokultúrában (**16.D ábra**), a CAF-ok növelték az organoidok átmérőjét és a KI67+ osztódó sejtek számát, de csak EGF hiányában (**16.E ábra**). Ezen eredmények alapján a fibroblasztok növekedési faktorok révén fejthetik ki hatásukat. Az FVIIa jelenléte kokultúrában sem befolyásolta az organoidok osztódását, növekedését függetlenül az EGF jelenlététől (**16.E ábra**). Összességében elmondható, hogy az FVIIa-val indukált CAF-ok nem befolyásolják eltérően a CRC sejtek proliferációját. Noha az FVIIa hatásos lehet a CAF-okon más faktorok vagy sejtípusok jelenlétével együtt, ezek az eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy a CD142 csak markere egy specifikus fibroblaszt populációnak.

#### **4.4. A TGF $\beta$ a CD142<sup>magas</sup> fibroblasztok felhalmozódását okozza, melyek kevert myCAF és iCAF tulajdonságokkal rendelkeznek**

A TGF $\beta$  az egyik legfőbb fibroblaszt aktivátor molekula CRC-ben [91]. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatában bizonyította, hogy a TGF $\beta$  megemeli különböző gének expresszióját (*ACTA2*, *FAP*, *IL11*, *IL6*, *HBEGF*) CAF-okban és NCF-ekben, melyek a fibroblaszt aktivációval kapcsolatban állnak [131]. Ezért teszteltük, hogy a

TGF $\beta$  befolyásolja-e a CD142 expresszióját, melynek során először NCF-eket kezeltünk TGF $\beta$ -val. Az NCF-ek heterogenitást mutattak CD142-re és TGF $\beta$  hatására megemelkedett a CD142<sup>magas</sup> populáció aránya (**17.A-B ábra**). Hasonlóképpen, TGF $\beta$  kezelésre növekedett a CD142<sup>magas</sup> sejt populáció aránya CRC beteg-eredetű CAF sejtkultúrákban is (**17.A-B ábra**). Tehát feltételezhetően a CD142 egy aktivált fibroblaszt populációt jelöl CRC-ben.



**17. ábra.** A CD142<sup>magas</sup> fibroblasztok kevert myCAF és iCAF fenotípussal rendelkeznek. A) Reprezentatív áramlási citometriás ábrák kezeletlen és TGF $\beta$ -val kezelt NCF-ekről és CAF-okról. B) CD142 fluoreszcencia intenzitás (geometriai átlag) aránya TGF $\beta$  kezelt és kezeletlen NCF és CAF vonalakkól (CAF: n=11, NCF: n=7). A piros vízszintes vonal a különbség hiányát jelöli a két csoport közt (arány=1). C-D) A jelölt gének RNS szintjének összehasonlítása frissen szortolt CD142<sup>magas</sup> és CD142<sup>alacsony</sup> CAF-okból (C) és NCF-ekből (D). Az RNS szintek a GAPDH háztartási génhez lettek normalizálva és a normalizált RNS szintek arányát ábrázoltuk (CAF: n=5-7, NCF: n=3). E) A CD142 fehérje szintjének (geometriai átlag) aránya IL1 $\alpha$ -val kezelt és kezeletlen CAF és NCF kultúrák esetében (CAF: n=11, NCF: n=4). Párosított t-próba (B-E) \* $p$ <0,05; \*\*\* $p$ <0,005

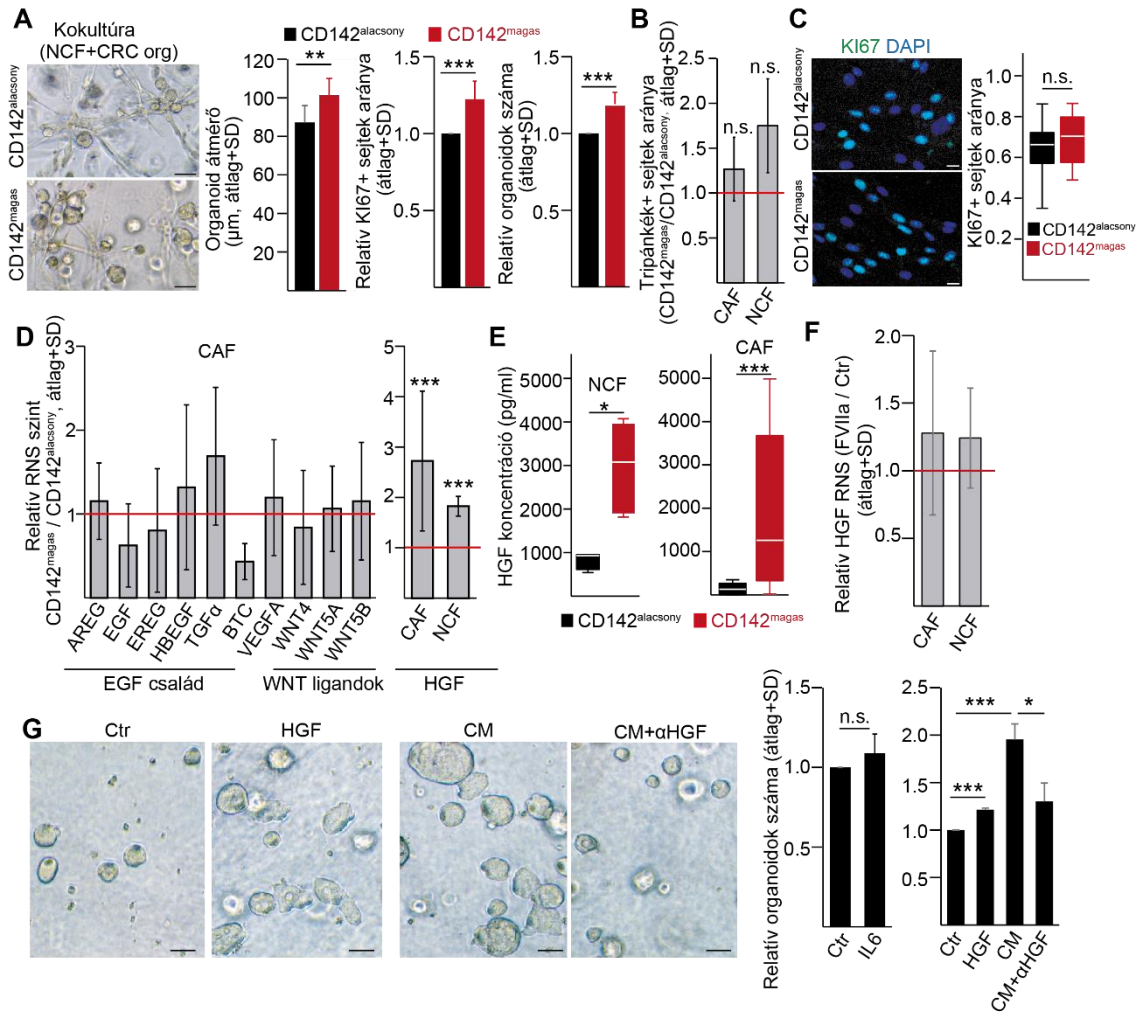
Mivel az egészséges colonra jellemző a CD142+ fibroblasztok jelenléte, melyek az epiteliális őssejteknek formálnak mikrokörnyezetet [104], ez felveti annak a

lehetőségét, hogy inkább myCAF funkcióval rendelkező fibroblasztokat jelölnek a CD142<sup>magas</sup> CAF-ok, mint iCAF-okat. Bár a szortolt CD142<sup>magas</sup> CAF-ok magasabb szinten expresszálták a myCAF-okra jellemző *ACTA2*-t és *COL1A1*-et a CD142<sup>alacsony</sup> CAF-okhoz képest, de nem találtunk különbséget a *CTGF* expresszióban, mely szintén myCAF marker. Továbbá a CD142<sup>magas</sup> CAF-okban magasabb *IL6* RNS szintet mértünk a CD142<sup>alacsony</sup> CAF-okhoz viszonyítva, viszont a többi iCAF marker (*IL11*, *CSF3*, *CXCL1*) nem mutatott szignifikáns eltérést (**17.C ábra**). Ezen eredmények azt támasztják alá, hogy az eltérő CD142 expresszió alapján nem különíthető el sem tisztán myCAF, sem tisztán iCAF fenotípus. Hasonlóan a CRC beteg-eredetű CAF-okhoz, a CD142<sup>magas</sup> normál colon fibroblasztok csak a magasabb *IL6* expresszióban különböztek a CD142<sup>alacsony</sup> NCF-ektől (**17.D ábra**).

Az IL1 $\alpha$  az iCAF irányba való polarizációt indukálja PDAC-ben [99]. Érdekes módon sem a CAF-ok, sem az NCF-ek esetében nem befolyásolta a CD142 expressziót az IL1 $\alpha$  kezelés (**17.E ábra**). Mindezen eredmények azt jelzik, hogy a CD142<sup>magas</sup> fibroblasztok kevert myCAF és iCAF tulajdonságokkal rendelkeznek, és aktivált állapotban vannak. A TGF $\beta$  továbbá kiszelektálja ezt a populációt és/vagy a CD142<sup>alacsony</sup> fibroblasztokban megemeli a CD142 fehérjeszintet.

#### **4.5. A CD142<sup>magas</sup> fibroblasztok HGF szekréció révén serkentik a CRC organoidok osztódását**

Annak érdekében, hogy vizsgálhassuk a két fibroblaszt populáció hatását a CRC organoidokon, CD142<sup>magas</sup> és CD142<sup>alacsony</sup> NCF-eket szortoltunk és modellként a CRC organoidokkal kokultúrában tenyésztettük őket. A CD142<sup>magas</sup> fibroblasztok megemelték a CRC organoidok KI67<sup>+</sup> osztódó sejtjeinek arányát, az organoidok átmérőjét és az organoid formálási hatékonyságot a CD142<sup>alacsony</sup> fibroblasztokhoz viszonyítva (**18.A ábra**). Fontos megjegyezni, hogy nem találtunk különbséget az életképes sejtek arányában a CD142<sup>magas</sup> és CD142<sup>alacsony</sup> NCF és CAF populációk közt (**18.B ábra**), valamint a CD142<sup>magas</sup> és CD142<sup>alacsony</sup> CAF-ok nem különböztek a KI67<sup>+</sup> proliferáló sejtek arányában sem (**18.C ábra**). Tehát az eltérő CD142 szinttel jellemezhető fibroblasztok eltérő mértékben segítik a CRC organoidok osztódását és kolóniaképzési hatékonyságát.



**18. ábra.** A *CD142<sup>magas</sup>* fibroblasztok HGF szekréció révén növelik a CRC sejtek osztódási intenzitását. **A)** A CRC organoidok átmérője, relatív KI67+ organoid sejtek aránya és relatív organoid kolóniák száma kokultúrában *CD142* szortolt NCF-ekkel ( $n=8$ ; négy organoid vonal kétszer tesztelve). Az eredmények értékelése a kokultúrák indítása után 7 nappal történt. A bal panel reprezentatív fénymikroszkópos képeket mutat (méretarány:  $100\ \mu\text{m}$ ) **B)** Tripánkék életképességi festés szortolt fibroblasztokon (relatív arány, CAF:  $n=7$ , NCF:  $n=4$ ) és **C)** KI67 immuncitokémia szortolt CAF-okon a 7. napon ( $n=7$ , reprezentatív konfokális mikroszkóppal készült képek és kvantifikálás, méretarány:  $40\ \mu\text{m}$ ). **D)** A jelölt gének RNS szintjének aránya *CD142<sup>magas</sup>* és *CD142<sup>alacsony</sup>* CAF-ok közt (bal panel,  $n=3-6$ ) és a HGF RNS szintjének aránya *CD142* szortolt CAF-ok és NCF-ek esetén (jobb panel, CAF:  $n=10$ , NCF:  $n=3$ ). Az RNS mennyiségek a GAPDH génhez lettek normalizálva és a normalizált RNS szinteket ábrázoltuk. A vörös vízszintes vonal a különbség hiányát jelöli a két populáció közt (arány=1). **E)** A HGF fehérje mennyisége *CD142<sup>magas</sup>* és *CD142<sup>alacsony</sup>* fibroblasztok kondicionált médiumában (ELISA; CAF:  $n=12$ , NCF:  $n=6$ ). **F)** Relatív HGF RNS szint FVIIa kezelt fibroblasztokban. A GAPDH génhez normalizált, majd kezeletlen fibroblasztokhoz (vörös vízszintes vonal) viszonyított adatok (RT-qPCR,  $n=4$ ). **G)** Relatív kolóniaformálási hatékonyság a jelölt kezelések hatására. A kontroll EGF mentes médium ( $n=4$ , négy organoid vonal, reprezentatív fénymikroszkópos képek és kvantifikáció, méretarány:  $100\ \mu\text{m}$ ). Párosítatlan *t*-próba (A



bal diagram), párosított *t*-próba (A középső és jobb diagram, B, D, F), Mann-Whitney U-teszt (C, E), ANOVA (G) *n.s.*:  $p > 0,05$ ;  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,005$

Ezután ennek a jelenségnek a hátterében lévő molekuláris mechanizmusra voltunk kíváncsiak. Ezért számos növekedési faktor és Wnt ligand génjének az RNS szintjét mértük, melyek CAF-ok általi szekréciója ismert (**18.D ábra**). Noha a FVIIa nem befolyásolta a *HGF* RNS szintjét sem CAF-okban, sem NCF-ekben (**18.F ábra**), szignifikáns különbséget találtunk a CD142<sup>magas</sup> és CD142<sup>alacsony</sup> NCF-ek és CAF-ok *HGF* génexpressziójában (**18.D ábra**), melyet fehérje szinten is igazoltunk (**18.E ábra**).

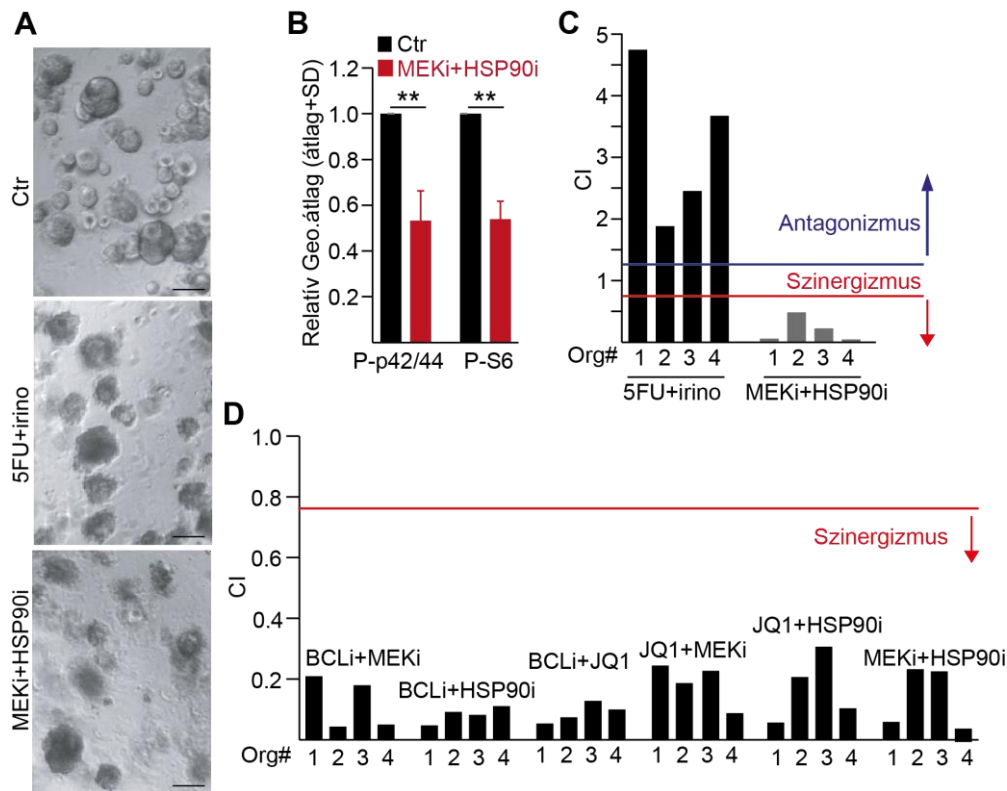
Végül a *HGF* jelentőségét validálva, rekombináns *HGF*-fel kezeltük az organoidokat, melynek hatására nőtt az organoid formálási hatékonyság, szemben az IL6-tal, mely szintén másik fibroblaszt eredetű molekula (**18.G ábra**). Ezen felül a *HGF*-et antitesttel blokkolva a fibroblaszt-eredetű kondicionált médiumban (CM) csökkent az újonnan kialakult CRC organoidok száma (**18.G ábra**). Tehát kísérleteink alapján a CD142<sup>magas</sup> fibroblasztok általi nagyobb *HGF* szekréció hozzájárul az e két fibroblaszt populáció között megfigyelhető eltérő tumor inicializációs képességhez.

#### **4.6. Új kombinációs terápiák szinergisztikusan hatnak a beteg-eredetű CRC organoidokon**

Mivel a fibroblasztok kritikus jelentőségű mikrokörnyezetet biztosítanak az összejt funkciójú CRC sejtek számára [94,148], ezeknek a niche sejteknek a terápiás célzása előnyös lehet. Azért, hogy vizsgálhassuk a CD142<sup>magas</sup> és CD142<sup>alacsony</sup> fibroblasztok választát a különböző terápiás szerekre, először a CRC organoidokat teszteltük új kombinációs terápiákra. A MEK1/2 inhibitor Trametinib (MEKi) és a HSP90 inhibitor PU-H71 (HSP90i) kombináció korábban hatékonynak bizonyult *in vivo* egér PDAC modellben, súlyos mellékhatások nélkül [27]. Kíváncsiak voltunk e két vegyületnek a hatékonyságára CRC-ben, ezért organoidjainkat MEKi és HSP90i-vel kezeltük. Az ERK1/2 (p42/44) és az mTOR útvonalban szereplő riboszómális S6 fehérje csökkent foszforilációját detektáltuk a kombinációs kezelés hatására (**19.B ábra**), mely a hatóanyagok hatékonyságát jelzi a CRC organoidokban, minthogy a megcélzott molekuláktól „downstream” található fehérjék [27]. Ellentétben a CRC betegek

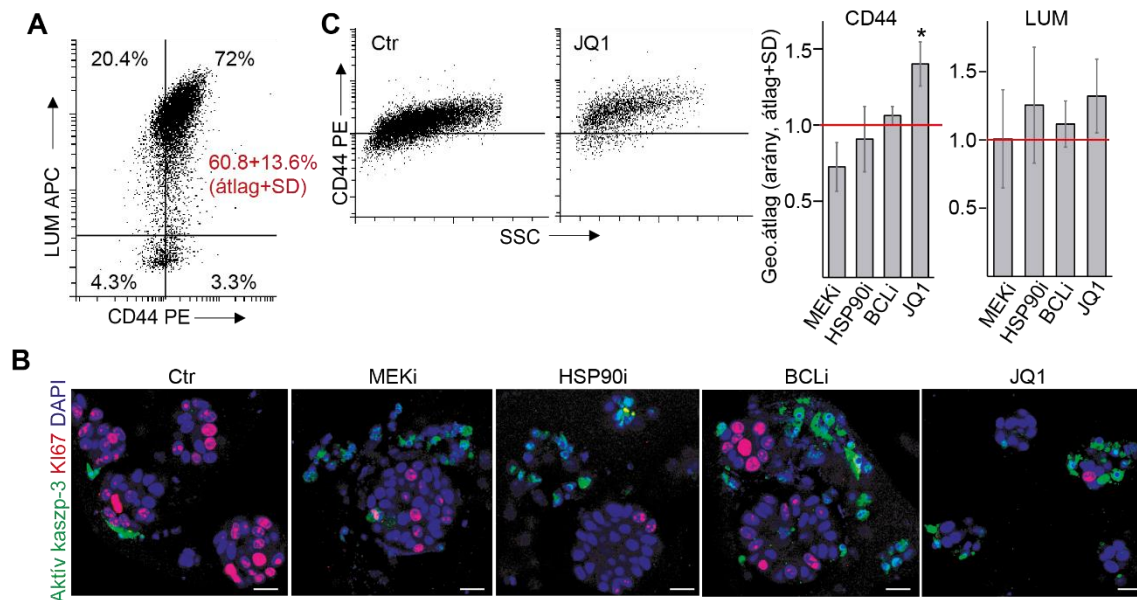
kezelésében használt hagyományos 5-fluorouracil (5FU) és irinotecan (irino) kemoterápiás szerekekkel, melyek kombinációban kísérleteinkben antagonisztikusan hatottak, a MEKi és HSP90i szinergisztikus (azaz egymás hatását erősítő) kombinációban viselkedett az összes tesztelt CRC organoid vonalon (**19.A ábra, 19.C ábra, 6. táblázat**).

Frissen publikált kutatások szerint a bromodomén epigenetikai inhibitor JQ1 és a BCL-xL inhibitor (BCLi) hatékonyan és szelektíven pusztítja a CRC organoidokat, szemben az egészséges colon organoidokkal [19,80], ezért kísérleteinkbe bevontuk e két gátlószert is. Érdekes módon a BCLi szinergisztikusan hatott a JQ1-gyel, MEKi-vel és HSP90i-vel való kombinációban is (**19.D ábra**). Hasonlóképpen, a JQ1 is szinergisztikusan viselkedett az összes inhibitorral való kombinációban (**19.D ábra és 6. táblázat**).



**19. ábra. Kombinációs terápiák szinergizmusa CRC organoidokon.** **A)** Reprezentatív fénymikroszkópos képek a CRC organoidokról a jelölt kezelések jelenlétében. A kombinációs terápiák IC50 koncentrációban alkalmazva. (méretarány: 100  $\mu$ m). **B)** Foszfo-S6 és foszfo-p42/p44 relatív szintje CRC organoid sejtekben MEKi+HSP90i hatására (n=4, négy organoid vonal). **C-D)** Szinergisztikus vagy antagonisztikus hatás a jelölt kombinációs terápiák alkalmazásakor (CI: kombinációs index). Szinergizmus: CI<0,75 (vörös vonal), antagonizmus: CI>1,25 (kék vonal). Párosított t-próba, \*\*p<0,01

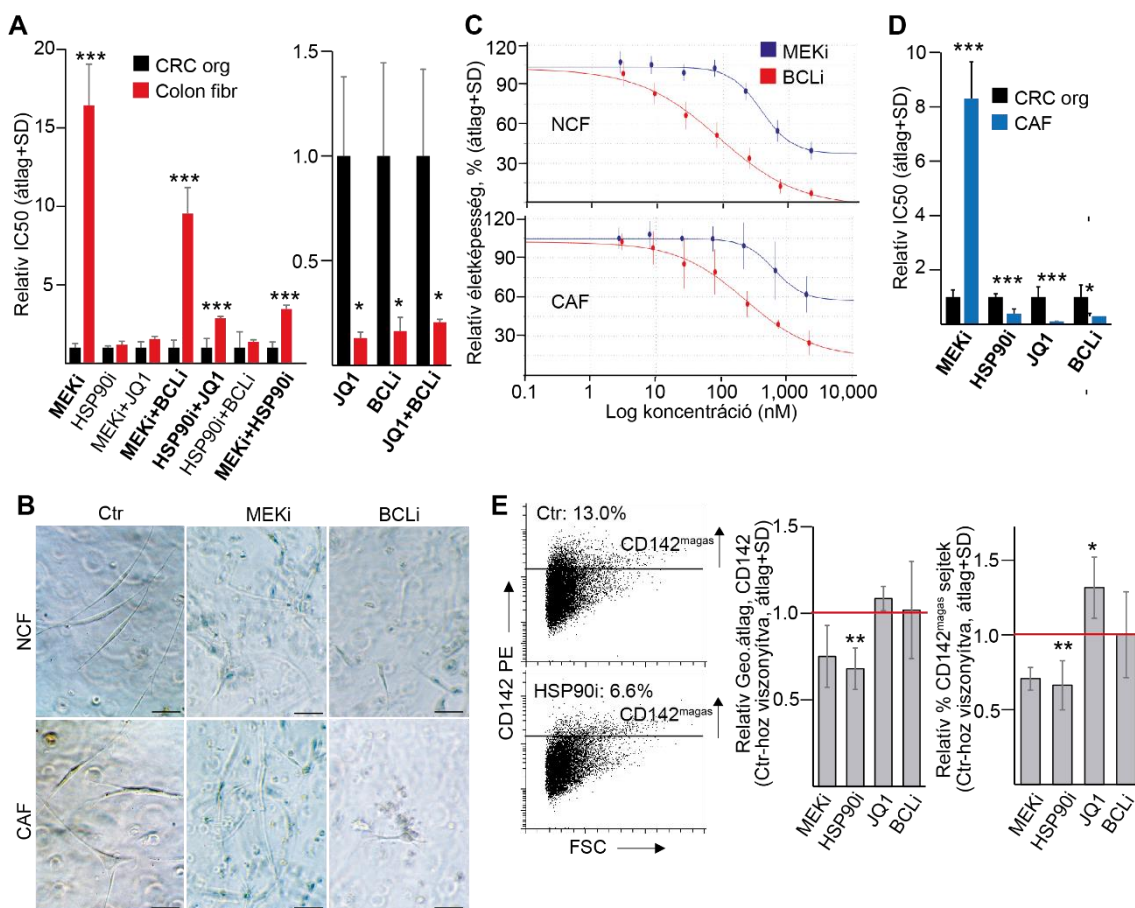
A CD44 egy agresszív, összejt fenotípussal rendelkező CRC tumorsejt populációt jelöl [45], a lumican (LUM) pedig egy mezenchimális marker, mely magas szinten expresszálódik CRC-ben kollagén felhalmozódás és az EMT során [149]. Meglepő módon a CD44<sup>+</sup> organoid sejtek nagy százaléka pozitívást mutatott LUM-ra is (20.A ábra), mely feltételezhetően egy plasztikus sejtállapotot jelez EMT-ben [150]. Következő lépésként az organoidokat az egyes vegyületek IC50 koncentrációjával kezeltük (6. táblázat), ahol a sejteknek csak egy része él túl, ezzel biztosítva a minták összehasonlíthatóságát (20.B ábra). Egyik kezelés sem befolyásolta a CRC organoidok LUM fehérje expresszió intenzitását (20.C ábra), viszont meglepő módon a JQ1 hatására a CD44 szintje megnőtt (20.C ábra). Tehát a JQ1 kezelés az agresszív CD44<sup>magas</sup> fenotípus irányába való eltolódást eredményezi a túlélő CRC sejtekben.



**20. ábra.** A CD44<sup>magas</sup> agresszív tumorsejt populáció feldúsul JQ1 hatására. **A)** A CD44 és a LUM szintje CRC organoid sejtekben (áramlási citometria). A piros számok a dupla pozitív sejtek százalékát jelzik a négy organoid vonalban (n=4). **B)** Immuncitokémia a jelölt fehérjékre (konfokális mikroszkópia, méretarány 20 µm). Az organoidokat az egyes inhibitorok IC50 koncentrációjával kezeltük. **C)** Az egyes kezelések hatása az organoid sejtek CD44 és LUM szintjére. Reprezentatív áramlási citometriás ábra (bal panel) és a geometriai átlag kvantitatív elemzése (jobb panel, n=4-8). Párosított t-próba, \*p<0,05

#### 4.7. A HSP90i hatására csökken a CD142<sup>magas</sup> fibroblasztok aránya

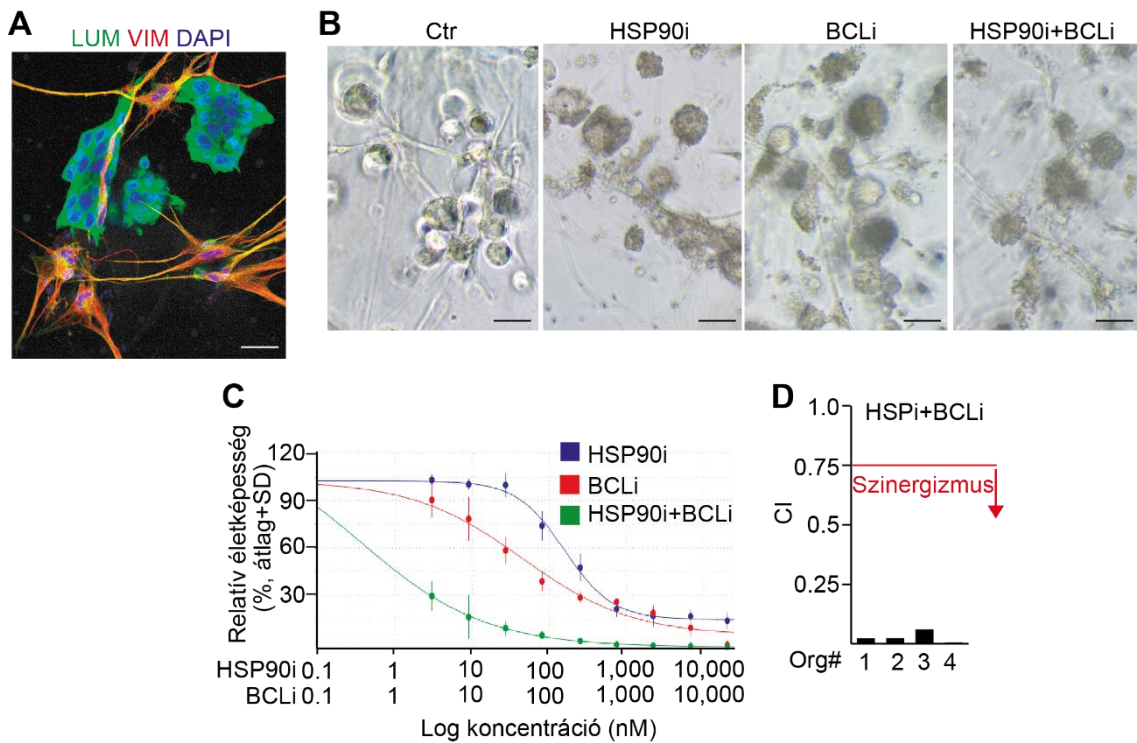
Miután a CRC organoidok kemoszenzitivitását meghatároztuk az egyes hatóanyagokra, a fibroblasztok érzékenységét is vizsgáltuk. A fibroblasztok (CAF és NCF) életképesek voltak Matrigelben az általunk használt tenyésztési körülmények között (**21.B ábra**). A normál colon fibroblasztok nagyobb rezisztenciát mutattak a MEKi, MEKi+HSPi, MEKi+BCLi, HSP90i+JQ1 kezelésekkel szemben, viszont jóval érzékenyebbek voltak a BCLi, JQ1 és BCLi+JQ1-re a CRC organoidokhoz viszonyítva (**21.A-B ábra, 6. táblázat**). Figyelemre méltó, hogy a MEKi-nak még nagy dózisban sem volt teljes a hatása sem NCF-ek, sem pedig CAF-ok esetében (**21.C ábra**). Eredményeinket CAF-okon is megerősítettük az egyszeres kezelésekre (**21.B ábra, 21.D ábra, 6. táblázat**).



**21. ábra.** A HSP90i csökkenti a CD142<sup>magas</sup> fibroblasztok arányát. A) A CRC organoidok és NCF-ek relatív IC50 értékei a használt vegyületekre. Mindegyik kezelés esetén az organoidok átlag IC50 értékét vettük egynek az összehasonlításhoz (CRC

organoid:  $n=4$ , NCF:  $n=3$ ). **B)** Az NCF-ek és CAF-ok életképessége 3D Matrigel kultúrában és a jelzett hatóanyagok IC50 koncentrációjú jelenlétében (reprezentatív fénymikroszkópos képek, méretarány: 20  $\mu\text{m}$ ). **C)** NCF-ek és CAF-ok életképességi görbéi növekvő koncentrációjú BCLi-re és MEKi-re. **D)** A CRC organoidok ( $n=4$ ) és CAF-ok ( $n=4$ ) relatív IC50 értékei a jelzett inhibitorokra. **E)** Relatív CD142 mennyiség és a CD142<sup>magas</sup> NCF-ek relatív százalékos aránya (áramlási citometria,  $n=4$ ) a kezeltlen (vörös vonal) sejtekhez viszonyítva. Párosítatlan  $t$ -próba (A, D), párosított  $t$ -próba (E) \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,005$

Amikor az NCF-eket az egyes vegyületek IC50 koncentrációjával kezeltük, a CD142<sup>magas</sup> fibroblaszt populáció méretének csökkenését tapasztaltuk a HSP90i-re, viszont sem a BCLi, sem a JQ1, sem pedig a MEKi hatására nem detektáltunk változást a CD142 szintjében (**21.E ábra**). Összességében elmondható, hogy a JQ1 kiszelektálja a CD44<sup>magas</sup>/LUM+ CRC sejtpopulációt és a MEKi nem hatékony a fibroblasztokon, mint fontos tumor niche sejteken. Mivel a CRC organoidok és fibroblasztok érzékenyek a BCLi-re és a HSP90i negatívan szelektálja a tumorprogressziót támogató CD142<sup>magas</sup> fibroblasztokat, ez a szinergisztikus kombináció hatékonyan pusztíthatja a tumorsejteket és stromális fibroblasztokat is CRC-ben.



**22. ábra.** A HSP90i+BCLi kombináció kokultúrákban is szinergisztikusan hat. A) Immuncitokémia NCF és CRC organoid kokultúráról (konfokális mikroszkóp,



méretarány: 40  $\mu\text{m}$ ). **B)** Reprezentatív fénymikroszkópos képek kokultúrákról (NCF és CRC organoid) a jelzett IC50 koncentrációjú kezelések során (méretarány: 100  $\mu\text{m}$ ). **C)** Életképességi görbe kokultúrákból HSP90i-re, BCLi-re és kombinációjukra. **D)** A HSP90i+BCLi szinergisztikus hatása NCF és CRC organoid kokultúrákban (CI: kombinációs index, szinergizmus:  $CI < 0,75$ ).

Annak bizonyítására, hogy a fibroblasztok és a CRC sejtek kölcsönhatása nem befolyásolja a HSP90i+BCLi kombináció hatékonyságát, NCF és CRC organoid kokultúrákat hoztunk létre (**22.A-B ábra**). A kombinációs kezelés jelentősen csökkentette a sejtek életképességét a HSP90i és BCLi szimpla kezelésekhez viszonyítva (**22.B-C ábra**) és erős szinergizmust figyeltünk meg a HSP90i és BCLi közt kokultúrákban is (**22.D ábra**). Ezen eredményeink tehát tovább erősítik, hogy a HSP90i+BCLi kombináció hatékonyan célozhatja a CRC tumorsejteket és a stromális fibroblasztokat is.

**6. táblázat.** A kísérletekben használt hatóanyagok IC50 értékei a CRC organoidokra, CAF-okra és NCF-ekre

Vegyületek (nM)	Org1	Org2	Org3	Org4	CAF1	CAF2	CAF3	CAF4	NCF		
<b>MEKi</b>	19	18	14	28	193	188	151	127	309	397	273
<b>HSP90i</b>	306	349	402	302	53	225	132	119	380	503	326
<b>JQ1</b>	669	1196	1824	2050	134	202	146	131	203	130	227
<b>BCLi</b>	1336	2565	738	1344	451	689	358	328	237	128	368

Vegyületek (nM)	Org1	Org2	Org3	Org4	NCF		
<b>MEKi+JQ1</b>	131	274	180	100	305	255	237
<b>MEKi+BCLi</b>	36	70	71	140	860	571	832
<b>HSP90i+JQ1</b>	196	691	194	770	1271	1372	1364
<b>HSP90i+BCLi</b>	54	280	68	793	356	453	417
<b>MEKi+HSP90i</b>	33	72	71	104	258	253	218
<b>JQ1+BCLi</b>	193	138	72	257	35	36	31
<b>5FU</b>	18073	23603	47720	36287	-	-	-
<b>Irinotecan</b>	649	486	554	1025	-	-	-
<b>5FU+Irinotecan</b>	104340	102170	79700	152560	-	-	-

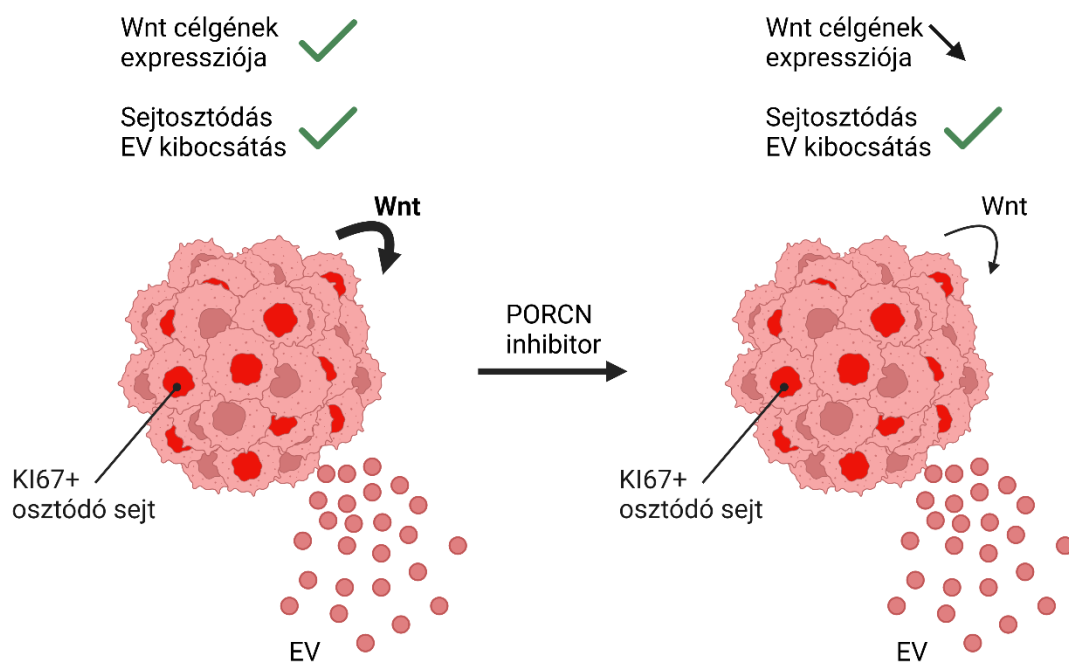
## 5. Megbeszélés

### 5.1. A Wnt mikroniche vizsgálata PDAC-ben

A legtöbb organoid fenntartásához nélkülözhetetlenek az endogén módon termelt vagy az exogén módon a tenyésztő folyadékhoz hozzáadott Wnt fehérjék [151]. Így a Wnt útvonal nem csak a morfogenezisben és a sejttípusok differenciálódásában fontos, hanem a tumor mikroniche, mikroörményzet kialakításához is elengedhetetlen. Vizsgálatainkban először a PDAC-re koncentráltunk, mely egy rendkívül rossz túléléssel jellemezhető tumortípus.

Bizonyítottuk, hogy szemben más daganat- és szövettípusokkal [146,147], PDAC-ben a Wnt jelátvitel gátlása nem eredményez EV kibocsátás csökkenést, valamint sem az osztódó, sem az apoptotikus sejtek aránya nem változott, noha a Wnt célgének expressziója csökkent (**23. ábra**). Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a Wnt útvonal aktivációja indirekt módon, a sejtosztódás által indukálja az EV kibocsátást. Ezzel megegyezően a fokozott sejtosztódás jellemző a tumorokban, melyek általánosan több EV-t is termelnek, mint az egészséges szövetek. Továbbá az emelkedett EV szekréció magyarázható a fokozott MVB-plazmamembrán fúzióval [120].

Egy vizsgálatban genetikailag módosított *TP53* és *CDKN2A* mutáns PDAC organoidok Wnt hiányában is képesek voltak túlélni és osztódni. Ez arra enged következtetni, hogy ezek a genetikai eltérések segítenek a PDAC tumorsejteknek elkerülni a Wnt megvonásból eredő szenescenciát és apoptózist [64]. Ezzel összhangban az általunk alapított Wnt-független PDAC organoidok is mind *TP53* mutációt hordoznak. Érdekes módon *TP53* mutáns tüdő adenokarcinóma organoidok nem egységesen tartalmaznak PORCN+ Wnt szekretáló sejteket, és a Wnt szekréció/aktivitás gátlása sejtosztódás és EV kibocsátás csökkenéshez vezetett [147]. Noha mindkét tumor organoid modell *TP53* mutációt hordoz, a két tumortípus mutációs profilja csak részben fed át [63,152]. Ezért feltételezzük, hogy a PDAC organoidok olyan mutációkkal is rendelkeznek, ami miatt a Wnt aktivitás és a sejtproliferáció nem kapcsolt az EV kibocsátással.



**23. ábra.** A Wnt aktivitás nincs kapcsolatban a sejtosztódással és az EV kibocsátással PDAC organoidokban.

## 5.2. A fibroblaszt heterogenitás vizsgálata CRC-ben

További kísérleteinkben az egyik leggyakoribb, ezért egészségügyi szempontból kiemelkedő tumorról, a CRC-ről foglalkoztunk. Beteg eredetű organoid és stromális fibroblaszt kokultúrák alkalmazásával egy daganatot támogató fibroblaszt populációt azonosítottunk CRC-ben, mely magas CD142 expresszióval rendelkezik. Bizonyítottuk, hogy ennek a jelenségnek a hátterében a CD142<sup>alacsony</sup> és CD142<sup>magas</sup> CAF-ok eltérő HGF szekréciója áll és a nagyobb HGF mennyiség megemeli az osztódó sejtek arányát CRC organoidokban. Igazoltuk továbbá, hogy a bromodomén epigenetikai inhibitor JQ1 kiszelektálja a CD44<sup>magas</sup>/LUM+ CRC sejt populációt, a HSP90 inhibitor hatására pedig csökken a CD142<sup>magas</sup> fibroblasztok aránya. Minthogy az organoidok és fibroblasztok is érzékenyek a BCL-xL inhibitorra, a BCLi+HSP90i szinergisztikus kombináció hatékony lehet CRC-ben. Ezért *in vivo* modellben érdemes lenne vizsgálataink ellenőrzése és eredményeink remélhetőleg további preklinikai kutatások alapját képezhetik.

Gyulladásal járó betegségekben a CD142 expressziója megemelkedhet számos citokin, például interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), tumor nekrosis faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), IL6, IL1 $\beta$ , IL33



hatására különböző sejttípusokban [153–157]. A mi rendszerünkben a TGF $\beta$ , mint fő fibroblaszt aktiváló faktor megemelte a fibroblasztok CD142 expresszióját, mely jelenséget humán tüdő fibroblasztokban is megfigyeltek már [158]. Fontos megjegyezni, hogy CRC-ben a fokozott TGF $\beta$  jelátvitel rossz prognózissal és fokozott metasztatikus potenciállal társul [159–161]. Továbbá CD142<sup>magas</sup> emlő adipocita progenitor sejtek nagyfokú miofibroblaszt irányba való differenciálódási kapacitással bírnak TGF $\beta$  jelenlétében [162]. Ugyanakkor az IL1 $\alpha$ , mely PDAC-ben az iCAF irányba való eltolódást eredményezi [99], nem befolyásolta a CRC fibroblasztok CD142 szintjét.

A CD142 állandó expressziót mutat a szubendoteliális szövetekben és az adventitiában, ahol hemosztatikus réteggént, a véralvadásban játszik szerepet a véralvadási kaskád tagjaként. Normál embrionális tüdő fibroblasztokban a CD142 FVIIa általi aktivációja a CCN1 mátrixfehérje fokozott expresszióját váltotta ki. A CCN1 az endotél sejtek  $\alpha\beta$ 3-integrinjeinek ligandjaként szolgál, mely integrin adhéziós receptorként működik, valamint számos sejtes folyamatot szabályoz, mint sejtadhézió, migráció és metasztázis képzés [163]. A CD142-FVIIa jelátvitel PDGF-en (vérlémezke eredetű növekedési faktor) keresztül fokozza a sejt migrációt egészséges dermális fibroblasztokban [164]. A CD142-FVIIa által stimulált proteáz aktivált receptorok (PAR) képesek különböző tirozin-kináz receptorokat is aktiválni, például az EGF-receptort keratinocitákban, PDGF-receptor $\beta$ -t monocitákban, endotél sejtekben és fibroblasztokban, valamint az IGF1-receptort emlőtumor sejtekben [165–167]. Ezek ellenére, amikor fibroblasztjainkat FVIIa-val kezeltük, nem találtunk hatást kísérleteinkben. Ez arra enged következtetni, hogy a CD142 csak markerként szolgál egy CRC fibroblaszt populáció esetében. Mindemellett nem zárható ki, hogy a CD142 aktivációja a CRC CAF-okon valamely más faktor jelenlétével együtt nyilvánul csak meg, illetve a teljes *in vivo* tumor mikroökönyezet szükséges hozzá.

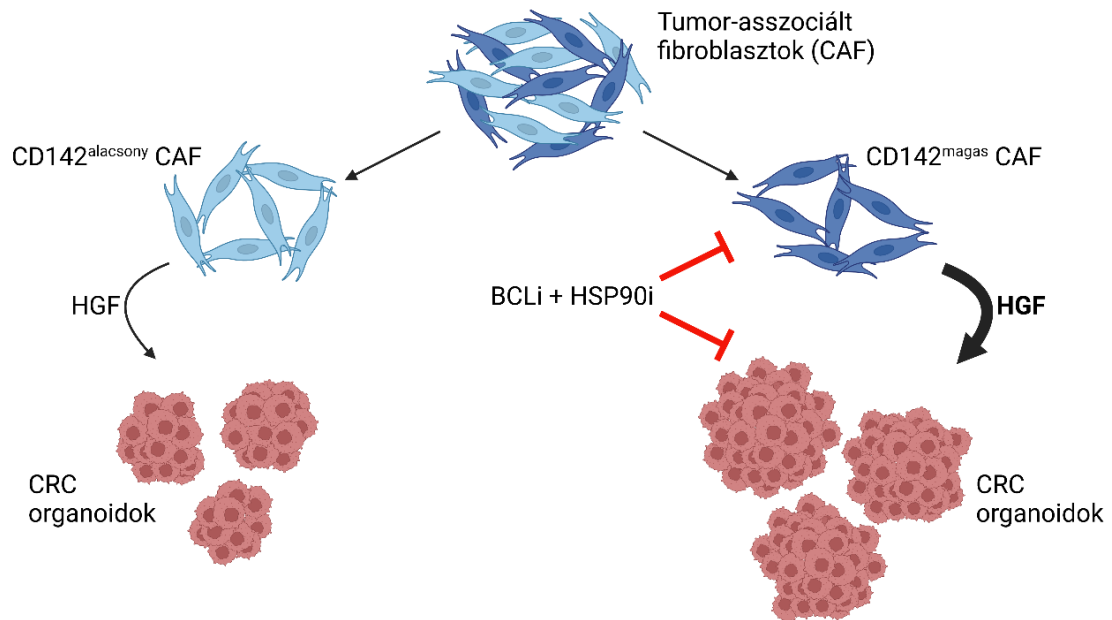
Korábbi tanulmányok bizonyították, hogy a CAF-ok különböző, az EGF családba tartozó molekulák forrásai, és közülük némely EV-ken keresztül szállítódik a tumor mikroökönyezetben [108,168]. Noha az EGF család tagjainak expressziójában nem találtunk különbséget a CD142<sup>alacsony</sup> és CD142<sup>magas</sup> fibroblaszt populációk között, a CD142<sup>magas</sup> CAF-ok több HGF-et termeltek, mely központi jelentőségű az organoidok osztódásához. Eredményeinkkel párhuzamban, a CAF-ok feldúsulása rossz prognózist eredményez CRC-ben, és a CAF-ok által szekretált molekulák, mint például a HGF,

niche-t biztosítanak az agresszív, őssejt fenotípussal rendelkező tumorsejteknek [94]. A HGF/c-Met, mely a HGF receptora, számos olyan jelátviteli utat aktivál (RAS, PI3K vagy Wnt/ $\beta$ -katenin), melyek a tumorsejtek osztódását serkentik [169]. Mindemellett a CAF-eredetű HGF számos tumortípusban pozitív serkentője a tumor progressziónak [170–172], melyek alátámasztják az eltérő HGF szekréciónak fontosságát a tumor-stroma kommunikációban.

A sejtes plaszticitás a humán daganatok központi tulajdonsága [150]. Az organoidok az epitheliális tumorok egyik jelenlegi legjobb *in vitro* modelljének tekinthetők. Ugyanakkor egy friss publikáció az *in vivo* szövetek szélesebb spektrumú sejtes plaszticitásáról számolt be az organoidokkal összehasonlítva [173]. Érdekes módon egy CD44<sup>+</sup>/LUM<sup>+</sup> sejtpopulációt figyeltünk meg CRC organoidokban, mely populáció egy agresszív, köztes EMT állapotot képviselhet [174], és ennek a sejtpopulációnak a részletesebb jellemzésére világítja rá a figyelmet.

A MEKi és HSP90i egy szinergisztikus kombinációs célzott terápiának bizonyult PDAC egér modellben és súlyos toxicitás sem volt megfigyelhető [27]. Kísérleteinkben bizonyítottuk *in vitro*, hogy CRC-ben is hasonlóan hatékony lehet. Ramesh és munkatársai bizonyították, hogy az egészséges colon epithel sejtek a BCL-2 anti-apoptotikus fehérjétől függenek, a tumorigenezis során azonban már az adenóma stádiumtól kezdve inkább a BCL-xL anti-apoptotikus fehérje szerepe válik fontossá. Ezért a BCL-xL gátlása potenciális terápiás stratégia lehet CRC-ben [19]. Mindemellett az epigenetikai inhibitor JQ1 jóval hatékonyabbnak bizonyult CRC organoidokon, mint egészséges colon epitheliális organoidokon [80]. Érdekes módon a JQ1 és HSP90i kombinációt sikeresen alkalmazták *in vitro* akut mieloid leukémiában [175]. Noha a MEKi és JQ1-et már használták kombinációban beteg eredetű CRC organoidokon [176], tudomásunk szerint mi vagyunk az elsők, akik igazoltuk, hogy a vizsgált vegyületek hatékonyak kombinációban és szinergisztikusak CRC organoid rendszerben. Minthogy i) a JQ1 kisselektálja a CD44<sup>magas</sup>/LUM<sup>+</sup> CRC sejtpopulációt, ii) a MEKi kevésbé hatékony a fibroblasztokon, iii) a CRC organoidok és fibroblasztok is érzékenyek a BCLi-re, valamint iv) a HSP90i negatívan szelektálja a tumorprogressziót segítő CD142<sup>magas</sup> fibroblasztokat, a szinergisztikus BCLi+HSP90i hatékony kombináció lehet mind a tumorsejtekre, mind pedig a fibroblasztokra CRC-ben (**24. ábra**). Ezért további *in vivo*

preklinikai vizsgálatokra alkalmasnak tartjuk a vizsgált vegyületeket/kombinációkat, és reményeink szerint eredményeink további kutatások alapját képezhetik.



**24. ábra.** A *BCLi*+*HSP90i* hatékony kombinációs terápia lehet, mely a CRC sejteket és a tumorigenezist serkentő *CD142<sup>magas</sup>* CAF-okat is célozza.

## **6. Következtetések**

A tumor mikrokörnyezet központi szerepet játszik a tumorsejtek közötti heterogenitás kialakításában, így például az összejt fenotípussal jellemezhető tumorsejt-populáció fennmaradásában is. Így kívánatos lenne mind a tumorsejtek, mind a mikrokörnyezet komponenseinek a terápiás célzása, melyhez a mikrokörnyezet megértése nélkülözhetetlen. Vizsgálatainkban ezért két fontos tumortípus, a PDAC és a CRC mikrokörnyezetének különböző elemeit tanulmányoztuk.

Munkám során a Wnt mikroniche szerepéről kaptunk pontosabb képet PDAC-ben. Noha colon adenómában és tüdő adenokarcinómában a Wnt szelekció intenzitása kapcsolatban áll a proliferáló sejtek arányával és az EV kibocsátás mértékével, ilyen kapcsolat nem figyelhető meg PDAC-ben annak ellenére, hogy a Wnt célgének expressziója csökkent a Wnt szelekció gátlásának hatására.

A CRC fibroblasztokon a CD142-t vizsgáltuk, melyet egészséges és gyulladós colon stromájából írtak le. A CRC fibroblasztok nagymértékű heterogenitást mutattak CD142-re, és a TGF $\beta$  kezelés növelte a CAF-ok CD142 expresszióját. A CD142-t magasan expresszáló fibroblasztok kevert iCAF és myCAF fenotípust mutattak, fokozták a CRC organoidok osztódását és az új organoidok kialakulását a CD142-t alacsonyan expresszáló fibroblasztokhoz viszonyítva. Ennek a jelenségnek a hátterében a CD142<sup>magas</sup> fibroblasztok magasabb HGF szelekciója áll.

A MEK inhibitor trametinib-re a CRC fibroblasztok magas fokú rezisztenciát mutattak, viszont a BCL-xL inhibitorra a fibroblasztok és a CRC organoidok is érzékenyek voltak. Továbbá a HSP90 inhibitor hatására csökkent a tumorprogressziót segítő CD142<sup>magas</sup> fibroblasztok aránya, az epigenetikai inhibitor JQ1 pedig kisselektálta az agresszív fenotípussal jellemezhető CD44<sup>magas</sup>/LUM+ CRC organoid sejtpopulációt. Mindemellett az összes vizsgált kombináció szinergisztikusan hatott a CRC organoidokon, azaz a kombinációs hatása két hatóanyagnak nagyobb, mint külön-külön hatásaiknak az összege. Ezért a BCLi+HSP90i potenciális kombinációs terápia lehet CRC-ben, minthogy hatékonyan pusztítja a tumorsejteket és a fibroblasztokat is.

## 7. Összefoglalás

A tumor mikro környezetben játszódó folyamatok, illetve a stroma egyes komponensei, sejtei nagyban befolyásolják a daganatos betegségek progresszióját és prognózisát. Az extracelluláris vezikulák (EV) a sejtek közti kommunikáció egyik módjának tekinthetők, mivel biológiailag fontos molekulákat képesek szállítani. A stromát nagyrészt tumor asszociált fibroblasztok (CAF) teszik ki, melyek niche-t biztosítanak a tumorprogresszióhoz különböző szekretált faktorok révén, ezért terápiás célzásuk előnyös lehet. A beteg eredetű organoidok megtartják a kiindulási szövet genetikai és sejtes jellemzőit és heterogenitását, ezért a humán tumorok egyik legjobb *in vitro* vizsgálati eszközének tekinthetők, sőt a tumor mikro környezet modellezésére is alkalmasak.

Munkám során két magas mortalitású tumortípusra fókuszáltam. A pancreas duktális adenokarcinóma (PDAC) Wnt mikroniche és EV kibocsátás közti kapcsolatot vizsgáltam, colorectális karcinómában (CRC) pedig a fibroblaszt heterogenitás szerepét a tumorigenezisben.

PDAC-ben a Wnt aktivitás nincs kapcsolatban a sejtproliferációval és az EV kibocsátással, ellenben más tumortípusokkal, mely az EV szekréció eltérő mechanizmusára enged következtetni különböző daganatokban. Ezen ismeretek fontosak lehetnek az EV-alapú diagnosztikai eljárások fejlesztéséhez.

A CRC fibroblasztok heterogének CD142-re, és a CD142<sup>magas</sup> fibroblasztok növelték a CRC organoidok osztódását és organoid formálási hatékonyságát, melynek hátterében a megemelkedett HGF szekréció áll a CD142<sup>alacsony</sup> CAF-okhoz viszonyítva.

Az epigenetikai inhibitor JQ1 pozitívan szelektálja az agresszív fenotípusú CD44<sup>magas</sup>/LUM+ CRC sejteket, a MEK inhibitor nem pusztítja hatékonyan a fibroblasztokat, a HSP90 inhibitor viszont csökkenti a tumor progressziót segítő CD142<sup>magas</sup> CAF-ok arányát, valamint a BCL-xL inhibitorra érzékenyek a fibroblasztok és CRC tumorsejtek egyaránt. Ezért a BCLi+HSP90i kombinációs szinergisztikus terápia potenciálisan fontos lehet CRC betegek számára, s további *in vivo* preklinikai vizsgálatokra érdemes.

## 7.1. Summary

Complex processes and cells of the tumor microenvironment are critical in the progression and the prognosis of cancers. Extracellular vesicles (EV) are a special way of intercellular communication since they carry biologically active molecules. Cancer associated fibroblasts (CAF) are the most abundant cells in the tumor stroma and they provide a niche for tumor progression by secreted factors, thus, therapeutic targeting of CAFs may be beneficial. Patient-derived organoids maintain genetic and cellular heterogeneity of tissues, therefore, they are one of the best *in vitro* models of cancers, moreover, organoids are appropriate for investigating tumor microenvironment.

In my work, I focused on two cancer types with high mortality. I studied the relationship between the Wnt microniche and EV release in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Furthermore, I focused on the role of fibroblast heterogeneity in the tumorigenesis of colorectal cancer (CRC).

We found that Wnt activity is uncoupled from cell proliferation and EV release in PDAC, in contrast to CRC and lung adenocarcinoma. These results suggest distinct mechanisms of EV secretion in various cancers and it may be important in developing EV-based diagnostic tools.

CRC fibroblasts showed heterogeneity for CD142. CD142<sup>high</sup> fibroblasts increased the proliferation intensity of CRC organoids, and also the organoid forming efficiency compared to CD142<sup>low</sup> fibroblasts. We observed a higher HGF secretion from CD142<sup>high</sup> fibroblasts, which provide the molecular mechanism of this phenomenon.

The epigenetic inhibitor JQ1 enriched for the CD44<sup>high</sup>/LUM+ CRC organoid cells known to have a more aggressive phenotype. CAFs were resistant to the MEK inhibitor, however, the HSP90 inhibitor decreased the percentage of CD142<sup>high</sup> cells in fibroblast cultures. In addition, both CRC organoids and CAFs were sensitive to BCL-xL inhibitor. Thus, the BCLi+HSP90i synergistic combination may be effective to target both tumor promoting CAFs and CRC cells. Based on these findings, we suggest them for further *in vivo* preclinical trials.

## **8. Irodalomjegyzék**

1. NUSSE R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res.* 2005 Jan;15(1):28–32.
2. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* 2008 Apr 27;4(2):68–75.
3. Bugter JM, Fenderico N, Maurice MM. Mutations and mechanisms of WNT pathway tumour suppressors in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2021 Jan 23;21(1):5–21.
4. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 2005 Apr 14;434(7035):843–50.
5. Daniels DL, Weis WI.  $\beta$ -catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol.* 2005 Apr 13;12(4):364–71.
6. Nusse R, Clevers H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell.* 2017 Jun;169(6):985–99.
7. Rios-Esteves J, Resh MD. Stearoyl CoA Desaturase Is Required to Produce Active, Lipid-Modified Wnt Proteins. *Cell Rep.* 2013 Sep;4(6):1072–81.
8. Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol.* 2012 Oct 16;14(10):1036–45.
9. Farin HF, Jordens I, Mosa MH, Basak O, Korving J, Tauriello DVF, de Punder K, Angers S, Peters PJ, Maurice MM, Clevers H. Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. *Nature.* 2016 Feb 10;530(7590):340–3.
10. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discov.* 2012 May 1;2(5):401–4.
11. Wu H, Medeiros LJ, Young KH. Apoptosis signaling and BCL-2 pathways provide opportunities for novel targeted therapeutic strategies in hematologic malignances. *Blood Rev.* 2018 Jan;32(1):8–28.
12. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun 25;35(4):495–516.

13. Beroukhim R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, Barretina J, Boehm JS, Dobson J, Urashima M, Mc Henry KT, Pinchback RM, Ligon AH, Cho YJ, Haery L, Greulich H, Reich M, Winckler W, Lawrence MS, Weir BA, Tanaka KE, Chiang DY, Bass AJ, Loo A, Hoffman C, Prensner J, Liefeld T, Gao Q, Yecies D, Signoretti S, Maher E, Kaye FJ, Sasaki H, Tepper JE, Fletcher JA, Tabernero J, Baselga J, Tsao MS, Demichelis F, Rubin MA, Janne PA, Daly MJ, Nucera C, Levine RL, Ebert BL, Gabriel S, Rustgi AK, Antonescu CR, Ladanyi M, Letai A, Garraway LA, Loda M, Beer DG, True LD, Okamoto A, Pomeroy SL, Singer S, Golub TR, Lander ES, Getz G, Sellers WR, Meyerson M. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 2010 Feb;463(7283):899–905.
14. Strasser A, Harris AW, Cory S. bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell*. 1991 Nov;67(5):889–99.
15. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ. bcl-2-Immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*. 1989 Apr;57(1):79–88.
16. Inohara N, Gourley TS, Carrio R, Muñiz M, Merino J, Garcia I, Koseki T, Hu Y, Chen S, Núñez G. Diva, a Bcl-2 Homologue that Binds Directly to Apaf-1 and Induces BH3-independent Cell Death. *J Biol Chem*. 1998 Dec;273(49):32479–86.
17. Monaghan P, Robertson D, Amos TA, Dyer MJ, Mason DY, Greaves MF. Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem*. 1992 Dec 5;40(12):1819–25.
18. Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC, Raff MC. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature*. 1993 Jan;361(6410):365–9.
19. Ramesh P, Lannagan TRM, Jackstadt R, Atencia Taboada L, Lansu N, Wirapati P, van Hooff SR, Dekker D, Pritchard J, Kirov AB, van Neerven SM, Tejpar S, Kops GJPL, Sansom OJ, Medema JP. BCL-XL is crucial for progression through the adenoma-to-carcinoma sequence of colorectal cancer. *Cell Death Differ*. 2021 Dec 11;28(12):3282–96.
20. Carlomagno F, Chiariello M. Growth factor transduction pathways: paradigm of anti-neoplastic targeted therapy. *J Mol Med*. 2014 Jul 8;92(7):723–33.



21. Reuter CWM, Morgan MA, Bergmann L. Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood*. 2000 Sep 1;96(5):1655–69.
22. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun 1;3(6):459–65.
23. Cargnello M, Roux PP. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011 Mar;75(1):50–83.
24. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001 Mar;410(6824):37–40.
25. Song Y, Bi Z, Liu Y, Qin F, Wei Y, Wei X. Targeting RAS–RAF–MEK–ERK signaling pathway in human cancer: Current status in clinical trials. *Genes Dis*. 2023 Jan;10(1):76–88.
26. Degirmenci U, Wang M, Hu J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells*. 2020 Jan 13;9(1):198.
27. Grbovic-Huezo O, Pitter KL, Lecomte N, Saglimbeni J, Askan G, Holm M, Melchor JP, Chandwani R, Joshi S, Haglund C, Iacobuzio-Donahue CA, Chiosis G, Tammela T, Leach SD. Unbiased in vivo preclinical evaluation of anticancer drugs identifies effective therapy for the treatment of pancreatic adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(48).
28. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*. 2003 Mar 1;17(3):590–603.
29. Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tsiachlis P, Rosen N. Akt Forms an Intracellular Complex with Heat Shock Protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and Is Destabilized by Inhibitors of Hsp90 Function. *J Biol Chem*. 2002 Oct;277(42):39858–66.
30. Kim HJ, Gong MK, Yoon CY, Kang J, Yun M, Cho NH, Rha SY, Choi YD. Synergistic Antitumor Effects of Combined Treatment with HSP90 Inhibitor and PI3K/mTOR Dual Inhibitor in Cisplatin-Resistant Human Bladder Cancer Cells. *Yonsei Med J*. 2020;61(7):587.

31. Bedin M, Gaben AM, Saucier C, Mester J. Geldanamycin, an inhibitor of the chaperone activity of HSP90, induces MAPK-independent cell cycle arrest. *Int J Cancer*. 2004 May 1;109(5):643–52.
32. De Mattos-Arruda L, Cortes J. Breast cancer and HSP90 inhibitors: Is there a role beyond the HER2-positive subtype? *The Breast*. 2012 Aug;21(4):604–7.
33. Fujii M, Sato T. Somatic cell-derived organoids as prototypes of human epithelial tissues and diseases. *Nat Mater*. 2021 Feb 17;20(2):156–69.
34. Artegiani B, Clevers H. Use and application of 3D-organoid technology. *Hum Mol Genet*. 2018 Aug 1;27(R2):R99–107.
35. Tuveson D, Clevers H. Cancer modeling meets human organoid technology. *Science (80- )*. 2019 Jun 7;364(6444):952–5.
36. Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat Cell Biol*. 2016 Mar 25;18(3):246–54.
37. Dutta D, Heo I, Clevers H. Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. *Trends Mol Med*. 2017 May;23(5):393–410.
38. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science (80- )*. 2014 Jul 18;345(6194).
39. Xu H, Lyu X, Yi M, Zhao W, Song Y, Wu K. Organoid technology and applications in cancer research. *J Hematol Oncol*. 2018 Dec 15;11(1):116.
40. Bleijs M, Wetering M, Clevers H, Drost J. Xenograft and organoid model systems in cancer research. *EMBO J*. 2019 Aug 8;38(15).
41. 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 Nov 5;78(21–22):7009–24.
42. 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 Feb 16;23(4):2180.
43. Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE, van den Born M, van Es JH, van de Wetering M, Clevers H. Lineage Tracing Reveals Lgr5 + Stem Cell Activity in Mouse Intestinal Adenomas. *Science (80- )*. 2012 Aug 10;337(6095):730–5.

44. Cortina C, Turon G, Stork D, Hernando-Momblona X, Sevillano M, Aguilera M, Tosi S, Merlos-Suárez A, Stephan-Otto Attolini C, Sancho E, Batlle E. A genome editing approach to study cancer stem cells in human tumors. *EMBO Mol Med*. 2017 Jul 3;9(7):869–79.
45. Todaro M, Francipane MG, Medema JP, Stassi G. Colon Cancer Stem Cells: Promise of Targeted Therapy. *Gastroenterology*. 2010 May;138(6):2151–62.
46. Ghatak S, Hascall VC, Markwald RR, Misra S. FOLFOX Therapy Induces Feedback Upregulation of CD44v6 through YB-1 to Maintain Stemness in Colon Initiating Cells. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 13;22(2):753.
47. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancer Res*. 2007 Feb 1;67(3):1030–7.
48. Catalano V, Di Franco S, Iovino F, Dieli F, Stassi G, Todaro M. CD133 as a target for colon cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2012 Mar 3;16(3):259–67.
49. Banerjee S, Nomura A, Sangwan V, Chugh R, Dudeja V, Vickers SM, Saluja A. CD133+ tumor initiating cells in a syngenic murine model of pancreatic cancer respond to minnelide. *Clin Cancer Res*. 2014;
50. Wang VMY, Ferreira RMM, Almagro J, Evan T, Legrave N, Zaw Thin M, Frith D, Carvalho J, Barry DJ, Snijders AP, Herbert E, Nye EL, MacRae JI, Behrens A. CD9 identifies pancreatic cancer stem cells and modulates glutamine metabolism to fuel tumour growth. *Nat Cell Biol*. 2019;
51. Golubkov VS, Prigozhina NL, Zhang Y, Stoletov K, Lewis JD, Schwartz PE, Hoffman RM, Strongin AY. Protein-tyrosine Pseudokinase 7 (PTK7) Directs Cancer Cell Motility and Metastasis. *J Biol Chem*. 2014 Aug;289(35):24238–49.
52. Van De Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A, Van Houdt W, Van Gorp J, Taylor-Weiner A, Kester L, McLaren-Douglas A, Blokker J, Jaksani S, Bartfeld S, Volckman R, Van Sluis P, Li VSW, Seepo S, Sekhar P, Peadarallu C, Cibulskis K, Carter SL, McKenna A, Lawrence MS, Lichtenstein L, Stewart C, Koster J, Versteeg R, Van Oudenaarden A, Saez-Rodriguez J, Vries RGJ, Getz G, Wessels L, Stratton MR, McDermott U, Meyerson M, Garnett MJ, Clevers H. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell*. 2015;

53. Kim S, Park JW, Seo H, Kim M, Park J, Kim G, Lee JO, Shin Y, Bae JM, Koo B, Jeong S, Ku J. Multifocal Organoid Capturing of Colon Cancer Reveals Pervasive Intratumoral Heterogenous Drug Responses. *Adv Sci*. 2022 Feb 17;9(5):2103360.
54. Driehuis E, Kretzschmar K, Clevers H. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications. *Nat Protoc*. 2020 Oct 14;15(10):3380–409.
55. Devarasetty M, Forsythe SD, Shelkey E, Soker S. In Vitro Modeling of the Tumor Microenvironment in Tumor Organoids. *Tissue Eng Regen Med*. 2020 Dec 12;17(6):759–71.
56. Aboulkheyr Es H, Montazeri L, Aref AR, Vosough M, Baharvand H. Personalized Cancer Medicine: An Organoid Approach. *Trends Biotechnol*. 2018 Apr;36(4):358–71.
57. Pandiri AR. Overview of Exocrine Pancreatic Pathobiology. *Toxicol Pathol*. 2014 Jan 3;42(1):207–16.
58. Karpińska M, Czauderna M. Pancreas—Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals' Organism. *Front Physiol*. 2022 Mar 30;13.
59. de Braud F, Cascinu S, Gatta G. Cancer of pancreas. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004 May;50(2):147–55.
60. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022 Jan 12;72(1):7–33.
61. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol*. 2019;10(1):10–27.
62. Thota R, Maitra A, Berlin JD. Preclinical Rationale for the Phase III Trials in Metastatic Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2017 Feb;46(2):143–50.
63. Raphael BJ, Hruban RH, Aguirre AJ, Moffitt RA, Yeh JJ, Stewart C, Robertson AG, Cherniack AD, Gupta M, Getz G, Gabriel SB, Meyerson M, Cibulskis C, Fei SS, Hinoue T, Shen H, Laird PW, Ling S, Lu Y, Mills GB, Akbani R, Loher P, Londin ER, Rigoutsos I, Telonis AG, Gibb EA, Goldenberg A, Mezlini AM, Hoadley KA, Collisson E, Lander E, Murray BA, Hess J, Rosenberg M, Bergelson L, Zhang H, Cho J, Tiao G, Kim J, Livitz D, Leshchiner I, Reardon B, Van Allen E, Kamburov A, Beroukhi R, Saksena G, Schumacher SE, Noble MS, Heiman DI, Gehlenborg N, Kim J, Lawrence MS, Adsay V, Petersen G, Klimstra D,

Bardeesy N, Leiserson MDM, Bowlby R, Kasaian K, Birol I, Mungall KL, Sadeghi S, Weinstein JN, Spellman PT, Liu Y, Amundadottir LT, Tepper J, Singhi AD, Dhir R, Paul D, Smyrk T, Zhang L, Kim P, Bowen J, Frick J, Gastier-Foster JM, Gerken M, Lau K, Leraas KM, Lichtenberg TM, Ramirez NC, Renkel J, Sherman M, Wise L, Yena P, Zmuda E, Shih J, Ally A, Balasundaram M, Carlsen R, Chu A, Chuah E, Clarke A, Dhalla N, Holt RA, Jones SJM, Lee D, Ma Y, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall AJ, Schein JE, Sipahimalani P, Tam A, Thiessen N, Tse K, Wong T, Brooks D, Auman JT, Balu S, Bodenheimer T, Hayes DN, Hoyle AP, Jefferys SR, Jones CD, Meng S, Mieczkowski PA, Mose LE, Perou CM, Perou AH, Roach J, Shi Y, Simons J V., Skelly T, Soloway MG, Tan D, Veluvolu U, Parker JS, Wilkerson MD, Korkut A, Senbabaoglu Y, Burch P, McWilliams R, Chaffee K, Oberg A, Zhang W, Gingras MC, Wheeler DA, Xi L, Albert M, Bartlett J, Sekhon H, Stephen Y, Howard Z, Judy M, Breggia A, Shroff RT, Chudamani S, Liu J, Lolla L, Naresh R, Pihl T, Sun Q, Wan Y, Wu Y, Jennifer S, Roggin K, Becker KF, Behera M, Bennett J, Boice L, Burks E, Carlotti Junior CG, Chabot J, Pretti da Cunha Tirapelli D, Sebastião dos Santos J, Dubina M, Eschbacher J, Huang M, Huelsenbeck-Dill L, Jenkins R, Karpov A, Kemp R, Lyadov V, Maithel S, Manikhas G, Montgomery E, Noushmehr H, Osunkoya A, Owonikoko T, Paklina O, Potapova O, Ramalingam S, Rathmell WK, Rieger-Christ K, Saller C, Setdikova G, Shabunin A, Sica G, Su T, Sullivan T, Swanson P, Tarvin K, Tavobilov M, Thorne LB, Urbanski S, Voronina O, Wang T, Crain D, Curley E, Gardner J, Mallery D, Morris S, Paulauskis J, Penny R, Shelton C, Shelton T, Janssen KP, Bathe O, Bahary N, Slotta-Huspenina J, Johns A, Hibshoosh H, Hwang RF, Sepulveda A, Radenbaugh A, Baylin SB, Berrios M, Bootwalla MS, Holbrook A, Lai PH, Maglinte DT, Mahurkar S, Triche TJ, Van Den Berg DJ, Weisenberger DJ, Chin L, Kucherlapati R, Kucherlapati M, Pantazi A, Park P, Saksena G, Voet D, Lin P, Frazer S, Defreitas T, Meier S, Chin L, Kwon SY, Kim YH, Park SJ, Han SS, Kim SH, Kim H, Furth E, Tempero M, Sander C, Biankin A, Chang D, Bailey P, Gill A, Kench J, Grimmond S, Johns A, Cancer Genome Initiative (APGI AP, Postier R, Zuna R, Sicotte H, Demchok JA, Ferguson ML, Hutter CM, Mills Shaw KR, Sheth M, Sofia HJ, Tarnuzzer R, Wang Z, Yang L, Zhang J (Julia), Felau I, Zenklusen JC. Integrated Genomic Characterization of

- Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 2017;
64. Seino T, Kawasaki S, Shimokawa M, Tamagawa H, Toshimitsu K, Fujii M, Ohta Y, Matano M, Nanki K, Kawasaki K, Takahashi S, Sugimoto S, Iwasaki E, Takagi J, Itoi T, Kitago M, Kitagawa Y, Kanai T, Sato T. Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. *Cell Stem Cell*. 2018 Mar;22(3):454-467.e6.
  65. Irving MH, Catchpole B. ABC of colorectal diseases. Anatomy and physiology of the colon, rectum, and anus. *BMJ*. 1992 Apr 25;304(6834):1106–8.
  66. Baker AM, Cereser B, Melton S, Fletcher AG, Rodriguez-Justo M, Tadrous PJ, Humphries A, Elia G, McDonald SAC, Wright NA, Simons BD, Jansen M, Graham TA. Quantification of Crypt and Stem Cell Evolution in the Normal and Neoplastic Human Colon. *Cell Rep*. 2014 Aug;8(4):940–7.
  67. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May 4;71(3):209–49.
  68. Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol*. 2021 Oct;14(10):101174.
  69. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Dec 27;16(12):713–32.
  70. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet*. 2019 Oct;394(10207):1467–80.
  71. Ogino S, Goel A. Molecular Classification and Correlates in Colorectal Cancer. *J Mol Diagnostics*. 2008 Jan;10(1):13–27.
  72. Grady WM, Carethers JM. Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008 Oct;135(4):1079–99.
  73. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Smits AMM, Bos JL. Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *N Engl J Med*. 1988 Sep;319(9):525–32.
  74. Mäkinen MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology*. 2007 Jan;50(1):131–50.

75. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, De Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa .E Melo F, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernardis R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;
76. Menter DG, Davis JS, Broom BM, Overman MJ, Morris J, Kopetz S. Back to the Colorectal Cancer Consensus Molecular Subtype Future. *Curr Gastroenterol Rep*. 2019 Feb;21(2):5.
77. Souglakos J, Androulakis N, Syrigos K, Polyzos A, Ziras N, Athanasiadis A, Kakolyris S, Tsousis S, Kouroussis C, Vamvakas L, Kalykaki A, Samonis G, Mavroudis D, Georgoulas V. FOLFOXIRI (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) vs FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) as first-line treatment in metastatic colorectal cancer (MCC): a multicentre randomised phase III trial from the Hellenic Oncolog. *Br J Cancer*. 2006 Mar 28;94(6):798–805.
78. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, Crinò L, Benedetti G, Evangelista W, Fanchini L, Cortesi E, Picone V, Vitello S, Chiara S, Granetto C, Porcile G, Fioretto L, Orlandini C, Andreuccetti M, Masi G. Phase III Trial of Infusional Fluorouracil, Leucovorin, Oxaliplatin, and Irinotecan (FOLFOXIRI) Compared With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan (FOLFIRI) As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: The Gruppo Oncologico Nor. *J Clin Oncol*. 2007 May 1;25(13):1670–6.
79. Schütte M, Risch T, Abdavi-Azar N, Boehnke K, Schumacher D, Keil M, Yildiriman R, Jandrasits C, Borodina T, Amstislavskiy V, Worth CL, Schweiger C, Liebs S, Lange M, Warnatz HJ, Butcher LM, Barrett JE, Sultan M, Wierling C, Golob-Schwarzl N, Lax S, Uranitsch S, Becker M, Welte Y, Regan JL, Silvestrov M, Kehler I, Fusi A, Kessler T, Herwig R, Landegren U, Wienke D, Nilsson M, Velasco JA, Garin-Chesa P, Reinhard C, Beck S, Schäfer R, Regenbrecht CRA, Henderson D, Lange B, Haybaeck J, Keilholz U, Hoffmann J, Lehrach H, Yaspo

- ML. Molecular dissection of colorectal cancer in pre-clinical models identifies biomarkers predicting sensitivity to EGFR inhibitors. *Nat Commun.* 2017;
80. Toshimitsu K, Takano A, Fujii M, Togasaki K, Matano M, Takahashi S, Kanai T, Sato T. Organoid screening reveals epigenetic vulnerabilities in human colorectal cancer. *Nat Chem Biol.* 2022 Jun 10;18(6):605–14.
  81. Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Ebrahimi-Kalan A, Jaymand M, Kolahian S, Javaheri T, Zare P. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal.* 2020 Dec 7;18(1):59.
  82. Poltavets V, Kochetkova M, Pitson SM, Samuel MS. The Role of the Extracellular Matrix and Its Molecular and Cellular Regulators in Cancer Cell Plasticity. *Front Oncol.* 2018 Oct 9;8.
  83. Sullivan R, Maresh G, Zhang X, Salomon C, Hooper J, Margolin D, Li L. The Emerging Roles of Extracellular Vesicles As Communication Vehicles within the Tumor Microenvironment and Beyond. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017 Aug 8;8.
  84. Biffi G, Tuveson DA. Diversity and Biology of Cancer-Associated Fibroblasts. *Physiol Rev.* 2021 Jan 1;101(1):147–76.
  85. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016 Sep 23;16(9):582–98.
  86. Flier JS, Underhill LH, Dvorak HF. Tumors: Wounds That Do Not Heal. *N Engl J Med.* 1986 Dec 25;315(26):1650–9.
  87. Ribatti D, Tamma R. A revisited concept. Tumors: Wounds that do not heal. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018 Aug;128:65–9.
  88. Ottaviano AJ, Sun L, Ananthanarayanan V, Munshi HG. Extracellular Matrix–Mediated Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase Expression in Pancreatic Ductal Cells Is Regulated by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1. *Cancer Res.* 2006 Jul 15;66(14):7032–40.
  89. Shao ZM, Nguyen M, Barsky SH. Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. *Oncogene.* 2000 Sep 7;19(38):4337–45.
  90. Strutz F, Zeisberg M, Hemmerlein B, Sattler B, Hummel K, Becker V, Müller GA. Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis



- and may mediate autocrine fibroblast proliferation. *Kidney Int.* 2000 Apr;57(4):1521–38.
91. Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DVF, Iglesias M, Céspedes MV, Sevillano M, Nadal C, Jung P, Zhang XHFHF, Byrom D, Riera A, Rossell D, Mangués R, Massagué J, Sancho E, Batlle E. Dependency of Colorectal Cancer on a TGF- $\beta$ -Driven Program in Stromal Cells for Metastasis Initiation. *Cancer Cell.* 2012 Nov;22(5):571–84.
  92. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. *Cell.* 2005 May;121(3):335–48.
  93. Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. PAR1 Is a Matrix Metalloprotease-1 Receptor that Promotes Invasion and Tumorigenesis of Breast Cancer Cells. *Cell.* 2005 Feb;120(3):303–13.
  94. Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, Tuynman JB, Todaro M, Merz C, Rodermond H, Sprick MR, Kemper K, Richel DJ, Stassi G, Medema JP. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol.* 2010 May 25;12(5):468–76.
  95. Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E, Peng H, Lehr HA, Delaloye JF, Huelsken J. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature.* 2012 Jan 7;481(7379):85–9.
  96. O’Connell JT, Sugimoto H, Cooke VG, MacDonald BA, Mehta AI, LeBleu VS, Dewar R, Rocha RM, Brentani RR, Resnick MB, Neilson EG, Zeisberg M, Kalluri R. VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4 + stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc Natl Acad Sci.* 2011 Sep 20;108(38):16002–7.
  97. Peña C, Céspedes MV, Lindh MB, Kiflemariam S, Mezheyski A, Edqvist PH, Hägglöf C, Birgisson H, Bojmar L, Jirström K, Sandström P, Olsson E, Veerla S, Gallardo A, Sjöblom T, Chang ACM, Reddel RR, Mangués R, Augsten M, Östman A. STC1 Expression By Cancer-Associated Fibroblasts Drives Metastasis of Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 2013 Feb 15;73(4):1287–97.
  98. Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvisé M,

- Corbo V, Oni TE, Hearn SA, Lee EJ, Chio IIC, Hwang CI, Tiriack H, Baker LA, Engle DD, Feig C, Kultti A, Egeblad M, Fearon DT, Crawford JM, Clevers H, Park Y, Tuveson DA. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med*. 2017 Mar 6;214(3):579–96.
99. Biffi G, Oni TE, Spielman B, Hao Y, Elyada E, Park Y, Preall J, Tuveson DA. IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGF $\beta$  to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2019 Feb;9(2):282–301.
100. Mosa MH, Michels BE, Menche C, Nicolas AM, Darvishi T, Greten FR, Farin HF. A Wnt-Induced Phenotypic Switch in Cancer-Associated Fibroblasts Inhibits EMT in Colorectal Cancer. *Cancer Res*. 2020;
101. Li H, Courtois ET, Sengupta D, Tan Y, Chen KH, Goh JLL, Kong SL, Chua C, Hon LK, Tan WS, Wong M, Choi PJ, Wee LJK, Hillmer AM, Tan IB, Robson P, Prabhakar S. Reference component analysis of single-cell transcriptomes elucidates cellular heterogeneity in human colorectal tumors. *Nat Genet*. 2017 May 20;49(5):708–18.
102. Khaliq AM, Erdogan C, Kurt Z, Turgut SS, Grunvald MW, Rand T, Khare S, Borgia JA, Hayden DM, Pappas SG, Govekar HR, Kam AE, Reiser J, Turaga K, Radovich M, Zang Y, Qiu Y, Liu Y, Fishel ML, Turk A, Gupta V, Al-Sabti R, Subramanian J, Kuzel TM, Sadanandam A, Waldron L, Hussain A, Saleem M, El-Rayes B, Salahudeen AA, Masood A. Refining colorectal cancer classification and clinical stratification through a single-cell atlas. *Genome Biol*. 2022 Dec 11;23(1):113.
103. Kasashima H, Duran A, Martinez-Ordoñez A, Nakanishi Y, Kinoshita H, Linares JF, Reina-Campos M, Kudo Y, L’Hermitte A, Yashiro M, Ohira M, Bao F, Tauriello DVF, Batlle E, Diaz-Meco MT, Moscat J. Stromal SOX2 Upregulation Promotes Tumorigenesis through the Generation of a SFRP1/2-Expressing Cancer-Associated Fibroblast Population. *Dev Cell*. 2021 Jan;56(1):95-110.e10.
104. Kinchen J, Chen HH, Parikh K, Antanaviciute A, Jagielowicz M, Fawcner-Corbett D, Ashley N, Cubitt L, Mellado-Gomez E, Attar M, Sharma E, Wills Q, Bowden R, Richter FC, Ahern D, Puri KD, Henault J, Gervais F, Koohy H, Simmons A. Structural Remodeling of the Human Colonic Mesenchyme in Inflammatory

- Bowel Disease. *Cell*. 2018 Oct;175(2):372-386.e17.
105. Wolf P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br J Haematol*. 1967 May;13(3):269–88.
  106. Anderson HC. VESICLES ASSOCIATED WITH CALCIFICATION IN THE MATRIX OF EPIPHYSEAL CARTILAGE. *J Cell Biol*. 1969 Apr 1;41(1):59–72.
  107. Zeöld A, Sándor GO, Kiss A, Soós AÁ, Tölgyes T, Bursics A, Szűcs Á, Harsányi L, Kittel Á, Gézsi A, Buzás EI, Wiener Z. Shared extracellular vesicle miRNA profiles of matched ductal pancreatic adenocarcinoma organoids and blood plasma samples show the power of organoid technology. *Cell Mol Life Sci*. 2021 Mar 25;78(6):3005–20.
  108. Oszvald Á, Szvicsek Z, Sándor GO, Kelemen A, Soós AÁ, Pálóczi K, Bursics A, Dede K, Tölgyes T, Buzás EI, Zeöld A, Wiener Z. Extracellular vesicles transmit epithelial growth factor activity in the intestinal stem cell niche. *Stem Cells*. 2020;38(2).
  109. Tóth EÁ, Turiák L, Visnovitz T, Cserép C, Mázló A, Sódar BW, Försönits AI, Petővári G, Sebestyén A, Komlósi Z, Drahos L, Kittel Á, Nagy G, Bácsi A, Dénes Á, Ghó YS, Szabó-Taylor KÉ, Buzás EI. Formation of a protein corona on the surface of extracellular vesicles in blood plasma. *J Extracell Vesicles*. 2021 Sep 14;10(11).
  110. Sódar BW, Kittel Á, Pálóczi K, Vukman K V, Osteikoetxea X, Szabó-Taylor K, Németh A, Sperlágh 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 Jul 18;6(1):24316.
  111. Németh A, Orgovan N, Sódar BW, Osteikoetxea X, Pálóczi K, Szabó-Taylor KÉ, Vukman K V., 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 Dec 15;7(1):8202.
  112. Toyofuku M, Nomura N, Eberl L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol*. 2019 Jan 5;17(1):13–24.
  113. Buzas EI. The roles of extracellular vesicles in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2022 Aug 4;

114. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach JM, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter AA, Bebawy M, Beckham C, Bedina Zavec A, Benmoussa A, Berardi AC, Bergese P, Bielska E, Blenkiron C, Bobis-Wozowicz S, Boilard E, Boireau W, Bongiovanni A, Borràs FE, Bosch S, Boulanger CM, Breakefield X, Breglio AM, Brennan MÁ, Brigstock DR, Brisson A, Broekman ML, Bromberg JF, Bryl-Górecka P, Buch S, Buck AH, Burger D, Busatto S, Buschmann D, Bussolati B, Buzás EI, Byrd JB, Camussi G, Carter DR, Caruso S, Chamley LW, Chang YT, Chen C, Chen S, Cheng L, Chin AR, Clayton A, Clerici SP, Cocks A, Cocucci E, Coffey RJ, Cordeiro-da-Silva A, Couch Y, Coumans FA, Coyle B, Crescitelli R, Criado MF, D'Souza-Schorey C, Das S, Datta Chaudhuri A, de Candia P, De Santana EF, De Wever O, del Portillo HA, Demaret T, Deville S, Devitt A, Dhondt B, Di Vizio D, Dieterich LC, Dolo V, Dominguez Rubio AP, Dominici M, Dourado MR, Driedonks TA, Duarte F V, Duncan HM, Eichenberger RM, Ekström K, EL Andaloussi S, Elie-Caille C, Erdbrügger U, Falcón-Pérez JM, Fatima F, Fish JE, Flores-Bellver M, Försönits A, Frelet-Barrand A, Fricke F, Fuhrmann G, Gabrielsson S, Gámez-Valero A, Gardiner C, Gärtner K, Gaudin R, Gho YS, Giebel B, Gilbert C, Gimona M, Giusti I, Goberdhan DC, Görgens A, Gorski SM, Greening DW, Gross JC, Gualerzi A, Gupta GN, Gustafson D, Handberg A, Haraszi RA, Harrison P, Hegyesi H, Hendrix A, Hill AF, Hochberg FH, Hoffmann KF, Holder B, Holthofer H, Hosseinkhani B, Hu G, Huang Y, Huber V, Hunt S, Ibrahim AGE, Ikezu T, Inal JM, Isin M, Ivanova A, Jackson HK, Jacobsen S, Jay SM, Jayachandran M, Jenster G, Jiang L, Johnson SM, Jones JC, Jong A, Jovanovic-Talisman T, Jung S, Kalluri R, Kano S ichi, Kaur S, Kawamura Y, Keller ET, Khamari D, Khomyakova E, Khvorova A, Kierulf P, Kim KP, Kislinger T, Klingeborn M, Klinke DJ, Kornek M, Kosanović MM, Kovács ÁF, Krämer-Albers EM, Krasemann S, Krause M, Kurochkin I V, Kusuma GD, Kuypers S, Laitinen S, Langevin SM, Languino LR, Lannigan J, Lässer C, Laurent LC, Lavieu G, Lázaro-Ibáñez E, Le Lay S, Lee MS, Lee YXF, Lemos DS, Lenassi M, Leszczynska A, Li IT, Liao K, Libregts SF, Ligeti E, Lim R, Lim SK, Linē A, Linnemannstöns K, Llorente A, Lombard CA, Lorenowicz MJ, Lörincz ÁM, Lötvall J, Lovett J, Lowry MC, Loyer X, Lu Q,

Lukomska B, Lunavat TR, Maas SL, Malhi H, Marcilla A, Mariani J, Mariscal J, Martens-Uzunova ES, Martin-Jaular L, Martinez MC, Martins VR, Mathieu M, Mathivanan S, Maugeri M, McGinnis LK, McVey MJ, Meckes DG, Meehan KL, Mertens I, Minciocchi VR, Möller A, Møller Jørgensen M, Morales-Kastresana A, Morhayim J, Mullier F, Muraca M, Musante L, Mussack V, Muth DC, Myburgh KH, Najrana T, Nawaz M, Nazarenko I, Nejsum P, Neri C, Neri T, Nieuwland R, Nimrichter L, Nolan JP, Nolte-'t Hoen EN, Noren Hooten N, O'Driscoll L, O'Grady T, O'Loughlen A, Ochiya T, Olivier M, Ortiz A, Ortiz LA, Osteikoetxea X, Østergaard O, Ostrowski M, Park J, Pegtel DM, Peinado H, Perut F, Pfaffl MW, Phinney DG, Pieters BC, Pink RC, Pisetsky DS, Pogge von Strandmann E, Polakovicova I, Poon IK, Powell BH, Prada I, Pulliam L, Quesenberry P, Radeghieri A, Raffai RL, Raimondo S, Rak J, Ramirez MI, Raposo G, Rayyan MS, Regev-Rudzki N, Ricklefs FL, Robbins PD, Roberts DD, Rodrigues SC, Rohde E, Rome S, Rouschop KM, Rughetti A, Russell AE, Saá P, Sahoo S, Salas-Huenuleo E, Sánchez C, Saugstad JA, Saul MJ, Schiffelers RM, Schneider R, Schøyen TH, Scott A, Shahaj E, Sharma S, Shatnyeva O, Shekari F, Shelke GV, Shetty AK, Shiba K, Siljander PRM, Silva AM, Skowronek A, Snyder OL, Soares RP, Sódar BW, Soekmadji C, Sotillo J, Stahl PD, Stoorvogel W, Stott SL, Strasser EF, Swift S, Tahara H, Tewari M, Timms K, Tiwari S, Tixeira R, Tkach M, Toh WS, Tomasini R, Torrecilhas AC, Tosar JP, Toxavidis V, Urbanelli L, Vader P, van Balkom BW, van der Grein SG, Van Deun J, van Herwijnen MJ, Van Keuren-Jensen K, van Niel G, van Royen ME, van Wijnen AJ, Vasconcelos MH, Vechetti IJ, Veit TD, Vella LJ, Velot É, Verweij FJ, Vestad B, Viñas JL, Visnovitz T, Vukman K V, Wahlgren J, Watson DC, Wauben MH, Weaver A, Webber JP, Weber V, Wehman AM, Weiss DJ, Welsh JA, Wendt S, Wheelock AM, Wiener Z, Witte L, Wolfram J, Xagorari A, Xander P, Xu J, Yan X, Yáñez-Mó M, Yin H, Yuana Y, Zappulli V, Zarubova J, Žekas V, Zhang J ye, Zhao Z, Zheng L, Zheutlin AR, Zickler AM, Zimmermann P, Zivkovic AM, Zocco D, Zuba-Surma EK. 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 Dec 1;7(1):1535750.

115. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger É, Pap E, Kittel Á, Nagy G, Falus A, Buzás EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Aug 11;68(16):2667–88.
116. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Théry C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci.* 2016 Feb 23;113(8).
117. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol.* 2019 Jan 2;21(1):9–17.
118. Morgan-Fisher M, Wewer UM, Yoneda A. Regulation of ROCK Activity in Cancer. *J Histochem Cytochem.* 2013 Mar 29;61(3):185–98.
119. Toyoshima M, Tanaka N, Aoki J, Tanaka Y, Murata K, Kyuuma M, Kobayashi H, Ishii N, Yaegashi N, Sugamura K. Inhibition of Tumor Growth and Metastasis by Depletion of Vesicular Sorting Protein Hrs: Its Regulatory Role on E-Cadherin and  $\beta$ -Catenin. *Cancer Res.* 2007 Jun 1;67(11):5162–71.
120. Bebelman MP, Smit MJ, Pegtel DM, Baglio SR. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology and Therapeutics.* 2018.
121. Jena BC, Mandal M. The emerging roles of exosomes in anti-cancer drug resistance and tumor progression: An insight towards tumor-microenvironment interaction. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer.* 2021.
122. Webber JP, Spary LK, Sanders AJ, Chowdhury R, Jiang WG, Steadman R, Wymant J, Jones AT, Kynaston H, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene.* 2015 Jan 15;34(3):290–302.
123. Fong MY, Zhou W, Liu L, Alontaga AY, Chandra M, Ashby J, Chow A, O'Connor STF, Li S, Chin AR, Somlo G, Palomares M, Li Z, Tremblay JR, Tsuyada A, Sun G, Reid MA, Wu X, Swiderski P, Ren X, Shi Y, Kong M, Zhong W, Chen Y, Wang SE. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat Cell Biol.* 2015 Feb 26;17(2):183–94.

124. Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS, Allison AC, Rak J. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci.* 2009 Mar 10;106(10):3794–9.
125. Wieckowski EU, Visus C, Szajnik M, Szczepanski MJ, Storkus WJ, Whiteside TL. Tumor-Derived Microvesicles Promote Regulatory T Cell Expansion and Induce Apoptosis in Tumor-Reactive Activated CD8 + T Lymphocytes. *J Immunol.* 2009 Sep 15;183(6):3720–30.
126. Clayton A, Mitchell JP, Court J, Mason MD, Tabi Z. Human Tumor-Derived Exosomes Selectively Impair Lymphocyte Responses to Interleukin-2. *Cancer Res.* 2007 Aug 1;67(15):7458–66.
127. Hsu YL, Hung JY, Chang WA, Jian SF, Lin YS, Pan YC, Wu CY, Kuo PL. Hypoxic Lung-Cancer-Derived Extracellular Vesicle MicroRNA-103a Increases the Oncogenic Effects of Macrophages by Targeting PTEN. *Mol Ther.* 2018 Feb;26(2):568–81.
128. Shinohara H, Kuranaga Y, Kumazaki M, Sugito N, Yoshikawa Y, Takai T, Taniguchi K, Ito Y, Akao Y. Regulated Polarization of Tumor-Associated Macrophages by miR-145 via Colorectal Cancer-Derived Extracellular Vesicles. *J Immunol.* 2017 Aug 15;199(4):1505–15.
129. Piao YJ, Kim HS, Hwang EH, Woo J, Zhang M, Moon WK. Breast cancer cell-derived exosomes and macrophage polarization are associated with lymph node metastasis. *Oncotarget.* 2018 Jan 26;9(7):7398–410.
130. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2008 May 20;10(5):619–24.
131. 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 Jul 7;8.
132. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008 Dec 16;10(12):1470–6.

133. Lv M meng, Zhu X ya, Chen W xian, Zhong S liang, Hu Q, Ma T fei, Zhang J, Chen L, Tang J hai, Zhao J hua. Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein. *Tumor Biol.* 2014 Nov;35(11):10773–9.
134. Goler-Baron V, Assaraf YG. Structure and Function of ABCG2-Rich Extracellular Vesicles Mediating Multidrug Resistance. Joly E, editor. *PLoS One.* 2011 Jan 24;6(1):e16007.
135. Safaei R, Larson BJ, Cheng TC, Gibson MA, Otani S, Naerdemann W, Howell SB. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2005 Oct 1;4(10):1595–604.
136. Koch R, Aung T, Vogel D, Chapuy B, Wenzel D, Becker S, Sinzig U, Venkataramani V, von Mach T, Jacob R, Truemper L, Wulf GG. Nuclear Trapping through Inhibition of Exosomal Export by Indomethacin Increases Cytostatic Efficacy of Doxorubicin and Pixantrone. *Clin Cancer Res.* 2016 Jan 15;22(2):395–404.
137. Guo Q ru, Wang H, Yan Y da, Liu Y, Su C yue, Chen H biao, Yan Y yan, Adhikari R, Wu Q, Zhang J ye. The Role of Exosomal microRNA in Cancer Drug Resistance. *Front Oncol.* 2020 Apr 7;10.
138. Urabe F, Kosaka N, Ito K, Kimura T, Egawa S, Ochiya T. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *Am J Physiol Physiol.* 2020 Jan 1;318(1):C29–39.
139. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013 Feb 18;200(4):373–83.
140. EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 May 15;12(5):347–57.
141. Large DE, Abdelmessih RG, Fink EA, Auguste DT. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021 Sep;176:113851.
142. Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio IIC, Engle DD, Corbo V, Jager M, Ponz-Sarvise M, Tiriach H, Spector MS, Gracanin A, Oni T, Yu KH, van Boxtel R, Huch



- M, Rivera KD, Wilson JP, Feigin ME, Öhlund D, Handly-Santana A, Ardito-Abraham CM, Ludwig M, Elyada E, Alagesan B, Biffi G, Yordanov GN, Delcuze B, Creighton B, Wright K, Park Y, Morsink FHM, Molenaar IQ, Borel Rinkes IH, Cuppen E, Hao Y, Jin Y, Nijman IJ, Iacobuzio-Donahue C, Leach SD, Pappin DJ, Hammell M, Klimstra DS, Basturk O, Hruban RH, Offerhaus GJ, Vries RGJ, Clevers H, Tuveson DA. Organoid Models of Human and Mouse Ductal Pancreatic Cancer. *Cell*. 2015 Jan;160(1–2):324–38.
143. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, van Es JH, van den Brink S, van Houdt WJ, Pronk A, van Gorp J, Siersema PD, Clevers H. Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett’s Epithelium. *Gastroenterology*. 2011 Nov;141(5):1762–72.
144. Chou TC. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol Rev*. 2006 Sep;58(3):621–81.
145. Chou TC. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Res*. 2010 Jan 15;70(2):440–6.
146. Szvicsek Z, Oszvald Á, Szabó L, Sándor GO, Kelemen A, Soós AÁ, Pálóczi K, Harsányi L, Tölgyes T, Dede K, Bursics A, Buzás EI, Zeöld A, Wiener Z. Extracellular vesicle release from intestinal organoids is modulated by Apc mutation and other colorectal cancer progression factors. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(12).
147. Sándor GO, Soós AÁ, Lőrincz P, Rojkó L, Harkó T, Bogyó L, Tölgyes T, Bursics A, Buzás EI, Moldvay J, Wiener Z. Wnt Activity and Cell Proliferation Are Coupled to Extracellular Vesicle Release in Multiple Organoid Models. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jun 24;9.
148. Lenos KJ, Miedema DM, Lodestijn SC, Nijman LE, van den Bosch T, Romero Ros X, Lourenço FC, Lecca MC, van der Heijden M, van Neerven SM, van Oort A, Leveille N, Adam RS, de Sousa E Melo F, Otten J, Veerman P, Hypolite G, Koens L, Lyons SK, Stassi G, Winton DJ, Medema JP, Morrissey E, Bijlsma MF, Vermeulen L. Stem cell functionality is microenvironmentally defined during tumour expansion and therapy response in colon cancer. *Nat Cell Biol*. 2018 Oct 3;20(10):1193–202.

149. Vellinga TT, den Uil S, Rinkes IHB, Marvin D, Ponsioen B, Alvarez-Varela A, Fatrai S, Scheele C, Zwijnenburg DA, Snippert H, Vermeulen L, Medema JP, Stockmann HB, Koster J, Fijneman RJA, de Rooij J, Kranenburg O. Collagen-rich stroma in aggressive colon tumors induces mesenchymal gene expression and tumor cell invasion. *Oncogene*. 2016 Oct 6;35(40):5263–71.
150. Torborg SR, Li Z, Chan JE, Tammela T. Cellular and molecular mechanisms of plasticity in cancer. *Trends in Cancer*. 2022 Sep;8(9):735–46.
151. Schutgens F, Clevers H. Human Organoids: Tools for Understanding Biology and Treating Diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2020 Jan 24;15(1):211–34.
152. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014 Jul 31;511(7511):543–50.
153. Bastarache JA, Sebag SC, Grove BS, Ware LB. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  act synergistically to up-regulate tissue factor in alveolar epithelial cells. *Exp Lung Res*. 2011 Sep 16;37(8):509–17.
154. Edén D, Siegbahn A, Mokhtari D. Tissue factor/factor VIIa signalling promotes cytokine-induced beta cell death and impairs glucose-stimulated insulin secretion from human pancreatic islets. *Diabetologia*. 2015 Nov 14;58(11):2563–72.
155. Steffel J, Akhmedov A, Greutert H, Lüscher TF, Tanner FC. Histamine Induces Tissue Factor Expression. *Circulation*. 2005 Jul 19;112(3):341–9.
156. Neumann FJ, Ott I, Marx N, Luther T, Kenngott S, Gawaz M, Kotzsch M, Schömig A. Effect of Human Recombinant Interleukin-6 and Interleukin-8 on Monocyte Procoagulant Activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Dec;17(12):3399–405.
157. Stojkovic S, Kaun C, Basilio J, Rauscher S, Hell L, Krychtiuk KA, Bonstingl C, de Martin R, Gröger M, Ay C, Holnthoner W, Eppel W, Neumayer C, Huk I, Huber K, Demyanets S, Wojta J. Tissue factor is induced by interleukin-33 in human endothelial cells: a new link between coagulation and inflammation. *Sci Rep*. 2016 May 4;6(1):25171.
158. Wygrecka M, Zakrzewicz D, Taborski B, Didiasova M, Kwapiszewska G, Preissner KT, Markart P. TGF- $\beta$ 1 Induces Tissue Factor Expression in Human Lung Fibroblasts in a PI3K/JNK/Akt-Dependent and AP-1-Dependent Manner. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 Nov;47(5):614–27.

159. Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llergo A, Espinet E, Hernando-Momblona X, Iglesias M, Sevillano M, Palomo-Ponce S, Tauriello DVF, Byrom D, Cortina C, Morral C, Barceló C, Tosi S, Riera A, Attolini CSO, Rossell D, Sancho E, Batlle E. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2015 Apr 23;47(4):320–9.
160. van den Berg YW, Osanto S, Reitsma PH, Versteeg HH. The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside. *Blood.* 2012 Jan 26;119(4):924–32.
161. Unruh D, Horbinski C. Beyond thrombosis: the impact of tissue factor signaling in cancer. *J Hematol Oncol.* 2020 Dec 14;13(1):93.
162. Peraldi P, Loubat A, Chignon-Sicard B, Dani C, Ladoux A. Identification of Human Breast Adipose Tissue Progenitors Displaying Distinct Differentiation Potentials and Interactions with Cancer Cells. *Biomedicines.* 2022 Aug 9;10(8):1928.
163. Pendurthi UR, Allen KE, Ezban M, Rao LVM. Factor VIIa and Thrombin Induce the Expression of Cyr61 and Connective Tissue Growth Factor, Extracellular Matrix Signaling Proteins That Could Act as Possible Downstream Mediators in Factor VIIa-Tissue Factor-induced Signal Transduction. *J Biol Chem.* 2000 May;275(19):14632–41.
164. Siegbahn A, Johnell M, Rorsman C, Ezban M, Heldin CH, Rönstrand L. Binding of factor VIIa to tissue factor on human fibroblasts leads to activation of phospholipase C and enhanced PDGF-BB-stimulated chemotaxis. *Blood.* 2000 Nov 15;96(10):3452–8.
165. Wiiger M, Prydz H. The epidermal growth factor receptor (EGFR) and proline rich tyrosine kinase 2 (PYK2) are involved in tissue factor dependent factor VIIa signalling in HaCaT cells. *Thromb Haemost.* 2004 Nov 29;92(07):13–22.
166. Siegbahn A, Johnell M, Nordin A, Åberg M, Velling T. TF/FVIIa Transactivate PDGFR $\beta$  to Regulate PDGF-BB-Induced Chemotaxis in Different Cell Types. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Jan;28(1):135–41.
167. Åberg M, Eriksson O, Mokhtari D, Siegbahn A. Tissue factor/factor VIIa induces cell survival and gene transcription by transactivation of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Thromb Haemost.* 2014 Nov 29;111(04):748–60.

168. Singh AB, Harris RC. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal*. 2005 Oct;17(10):1183–93.
169. Fu J, Su X, Li Z, Deng L, Liu X, Feng X, Peng J. HGF/c-MET pathway in cancer: from molecular characterization to clinical evidence. *Oncogene*. 2021 Jul 15;40(28):4625–51.
170. Saito S, Morishima K, Ui T, Hoshino H, Matsubara D, Ishikawa S, Aburatani H, Fukayama M, Hosoya Y, Sata N, Lefor AK, Yasuda Y, Niki T. The role of HGF/MET and FGF/FGFR in fibroblast-derived growth stimulation and lapatinib-resistance of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2015 Dec 25;15(1):82.
171. Ding X, Ji J, Jiang J, Cai Q, Wang C, Shi M, Yu Y, Zhu Z, Zhang J. HGF-mediated crosstalk between cancer-associated fibroblasts and MET-unamplified gastric cancer cells activates coordinated tumorigenesis and metastasis. *Cell Death Dis*. 2018 Aug 29;9(9):867.
172. Hu H, Piotrowska Z, Hare PJ, Chen H, Mulvey HE, Mayfield A, Noeen S, Kattermann K, Greenberg M, Williams A, Riley AK, Wilson JJ, Mao YQ, Huang RP, Banwait MK, Ho J, Crowther GS, Hariri LP, Heist RS, Kodack DP, Pinello L, Shaw AT, Mino-Kenudson M, Hata AN, Sequist L V., Benes CH, Niederst MJ, Engelman JA. Three subtypes of lung cancer fibroblasts define distinct therapeutic paradigms. *Cancer Cell*. 2021 Nov;39(11):1531-1547.e10.
173. Pitter KL, Grbovic-Huezo O, Joost S, Singhal A, Blum M, Wu K, Holm M, Ferrena A, Bhutkar A, Hudson A, Lecomte N, de Stanchina E, Chaligne R, Iacobuzio-Donahue CA, Pe'er D, Tammela T. Systematic comparison of pancreatic ductal adenocarcinoma models identifies a conserved highly plastic basal cell state. *Cancer Res*. 2022 Aug 11;
174. Simeonov KP, Byrns CN, Clark ML, Norgard RJ, Martin B, Stanger BZ, Shendure J, McKenna A, Lengner CJ. Single-cell lineage tracing of metastatic cancer reveals selection of hybrid EMT states. *Cancer Cell*. 2021 Aug;39(8):1150-1162.e9.
175. Saenz DT, Fiskus W, Manshour T, Rajapakshe K, Krieger S, Sun B, Mill CP, DiNardo C, Pemmaraju N, Kadia T, Parmar S, Sharma S, Coarfa C, Qiu P, Verstovsek S, Bhalla KN. BET protein bromodomain inhibitor-based combinations are highly active against post-myeloproliferative neoplasm

- secondary AML cells. *Leukemia*. 2017 Mar 28;31(3):678–87.
176. Wagner S, Vlachogiannis G, De Haven Brandon A, Valenti M, Box G, Jenkins L, Mancusi C, Self A, Manodoro F, Assiotis I, Robinson P, Chauhan R, Rust AG, Matthews N, Eason K, Khan K, Starling N, Cunningham D, Sadanandam A, Isacke CM, Kirkin V, Valeri N, Whittaker SR. Suppression of interferon gene expression overcomes resistance to MEK inhibition in KRAS-mutant colorectal cancer. *Oncogene*. 2019 Mar 23;38(10):1717–33.

## **9. Saját publikációk jegyzéke**

### **9.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények**

1. **András Áron Soós**, Andrea Kelemen, Adrián Orosz, Zsuzsanna Szvicsek, Tamás Tölgyes, Kristóf Dede, Attila Bursics, Zoltán Wiener  
*High CD142 level marks tumor-promoting fibroblasts with targeting potential in colorectal cancer*  
International Journal of Molecular Sciences (2023.), **IF: 5,6**
2. Gyöngyvér Orsolya Sándor, **András Áron Soós**, Péter Lőrincz, Livia Rojkó, Tünde Harkó, Levente Bogyó, Tamás Tölgyes, Attila Bursics, Edit Irén Buzás, Judit Moldvay, Zoltán Wiener  
*Wnt activity and cell proliferation are coupled to extracellular vesicle release in multiple organoid models*  
Frontiers in Cell and Developmental Biology (2021.), **IF: 6,081**

### **9.2. Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények**

1. Anikó Zeöld, Gyöngyvér Orsolya Sándor, Anna Kiss, **András Áron Soós**, Tamás Tölgyes, Attila Bursics, Ákos Szűcs, László Harsányi, Ágnes Kittel, András Gézsi, Edit Irén Buzás, Zoltán Wiener  
*Shared extracellular vesicle miRNA profiles of matched ductal pancreatic adenocarcinoma organoids and blood plasma samples show the power of organoid technology*  
Cellular and Molecular Life Sciences (2021.), **IF: 9,234**
2. Ádám Oszvald, Zsuzsanna Szvicsek, Gyöngyvér Orsolya Sándor, Andrea Kelemen, **András Áron Soós**, Krisztina Pálóczi, Attila Bursics, Kristóf Dede, Tamás Tölgyes, Edit Irén Buzás, Anikó Zeöld, Zoltán Wiener  
*Extracellular vesicles transmit epithelial growth factor activity in the intestinal stem cell niche*  
Stem Cells (2020.), **IF: 6,277**

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

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

Cellular and Molecular Life Sciences (2019.), **IF: 6,496**

## **10. Köszönetnyilvánítás**

Mindenek előtt szeretnék köszönetet mondani Dr. Wiener Zoltánnak, hogy elvállalta témavezetésemet, már MSc. TDK hallgatóként is, majd doktoranduszként. Köszönöm a rengeteg hasznos ötletet, tanácsot, észrevételt, rám áldozott időt és energiát, valamint a különféle szakmai trükköket, melyeknek későbbi pályafutásom során biztos jó hasznát veszem, és amik nélkül a disszertációm nem készülhetett volna el.

Köszönöm Prof. Buzás Edit Irénnek, hogy az általa igazgatott Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetben végezhettem PhD kutatásaimat.

Hálás köszönet a Molekuláris Onkobiológiai Kutatócsoport összes volt és jelenlegi tagjának, hogy bármiféle szakmai kérdéssel fordulhattam hozzájuk, továbbá, hogy a laboron kívül is a csapat tagja lehettem és köszönöm, hogy mindig jó volt a munkahelyen (is) együtt lenni.

Köszönöm Dr. Zeöld Anikónak a sok segítséget különösen a PhD első időszakában és a PDAC kísérletekben.

Köszönöm Dr. Kelemen Andreának, hogy a „CRC kemó szerelem-projekten” közösen dolgozhattunk, gondolkozhattunk és együtt építhettük az elsőszerzős cikkemet.

Köszönöm Dr. Sándor Gyöngyvér Orsolyának, hogy a cikkében társszerző lehettem és végül a PDAC kísérleteim egy teljes projekt része lehetett, valamint köszönöm az egér boncolás fortélyainak a megtanítását.

Köszönöm Dr. Szvicsek Zsuzsannának, hogy megtanított CRC fibroblasztokat izolálni és tenyészteni, majd mérései alapján foghattam bele a „CD142-fibroblaszt” kísérletekbe.

Köszönöm Dr. Oszvald-Haibach Ádámnak, hogy az alap labor technikák buktatóira felhívta a figyelmem és segített ezeknek a részleteiben.

Köszönöm Orosz Adrián TDK hallgatónak az értékes, precíz és kitartó munkáját, amivel hozzájárult kutatásaim előrehaladásához.

Köszönöm Dr. Tölgyes Tamásnak, Dr. Dede Kristófnak, Dr. Bursics Attilának, Dr. Szűcs Ákosnak és Dr. Harsányi Lászlónak, hogy kísérleteimhez biztosították a nélkülözhetetlen CRC és PDAC szövetmintákat.

Köszönöm a GSII minden munkatársának és az intézet többi PhD hallgatójának, akik bármi módon hozzájárultak doktorandusz éveim sikereihez, kísérleteihez, tapasztalataimhoz és vidámságához; különösen a „Hátsó padosor különítménynek”.



Végül, de nem utolsó sorban, végtelenül hálás vagyok családomnak és szeretteimnek, hogy mindig mellettem álltak, bátorítottak, támogattak és biztos háttérrel biztosítottak a PhD időszak alatt (is).

Vizsgálataim az alábbi pályázati támogatásokról valósultak meg:

OTKA 137554 és TKP2021-EGA-24 (Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal).