

# Tumor mikrokörnyezeti tényezők vizsgálata organoid modellekkel

Doktori tézisek

**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.

## **1. Bevezetés**

### **A Wnt jelátviteli útvonal**

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. 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.

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 palmitoilált formáját a Wnt-eknek képesek kötni.

### **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 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.

A BCL-2 anti-apoptotikus fehérje túlzott expressziója figyelhető meg számos daganatban, mely által csökken a tumorsejtek apoptózisa, sőt a tumorelles szerekkel szemben is jóval ellenállóbbak lesznek. Az anti-apoptotikus BCL-2 homológjai a BCL-xL, MCL-1, BCL-W és BCL-B. Tehát a BCL-2 fehérjecsalád bizonyos tagjainak célzott terápiája több tumor típus esetén is lehetséges, illetve vizsgálat alatt áll.

### **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, melynek komponensei pancreas duktális adenokarcinómában (PDAC) és colorectális karcinómában (CRC) is gyakran mutációval rendelkeznek. A HSP90 (hősokk fehérje 90) dajkafehérje a RAS útvonal valamennyi tagját és a TKR-okat is stabilizálja, kölcsönhat velük. Ezért a HSP90 szelektív gátlása potenciális tumorelles terápiaként

### **Az organoid technológia**

A tumorok nagymértékű genetikai és sejtes heterogenitást mutatnak az egyes betegek közt és az adott betegen belül is. Ennek a modellezésére az organoid technológia a jelenleg elérhető legjobb módszer. Mivel az epiteliális organoidok jól reprezentálják az egyes betegek daganatainak tulajdonságait és heterogenitását, ígéretes eszközei a személyre szabott gyógyszertervezésnek és a gyógyszerkutatásnak is.

### **A pancreas duktális adenokarcinóma**

Noha a hasnyálmirigyrák csupán a tizenkettedik leggyakoribb daganattípus, a betegek átlagos 5-éves túlélési rátája mindössze 10% körüli, mely a legrosszabb az összes tumor típust tekintve, s így a hetedik leggyakoribb oka a rosszindulatú elváltozásból származó halálásoknak.

Érdekes mód, a Wnt/ $\beta$ -katenin jelátviteli útvonal elemei (pl. APC, AXIN2) elenyésző esetben hordoznak mutációt PDAC-ben. Ennek ellenére

megfigyelték, hogy a PDAC tumorigenezise során függetlenedik 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.

## **A colorectális karcinóma**

A vastag- és végbél daganat (CRC) a harmadik leggyakrabban diagnosztizált daganatos megbetegedés és a második legfőbb tumoros elváltozásból adódó halálozási ok világszerte.

Egy új CRC besorolási rendszer a daganat molekuláris profiljára, génexpressziós mintázatára épül, mely a CMS (consensus molecular subtypes) klasszifikáció és eszerint négy csoport különíthető el. A CMS4 a mezenchimális altípus, mely a legagresszívebb CRC altípusnak tekinthető. Az ebbe a csoportba tartozó betegeknek a legalacsonyabb az átlagos túlélési valószínűsége. Ennek hátterében többek között a jelentős stromális infiltráció (pl. fibroblasztok) és a nagyfokú epiteliális-mezenchimális átmenet (EMT) áll. CMS4-re jellemző az emelkedett TGF $\beta$  szignalizáció, az extracelluláris mátrix átalakítás és az angiogenezis.

## **A tumormikrokörnyezet**

A tumor mikrokörnyezet (TME), avagy tumor mikroniche magában foglalja mindazon komponenseket a daganatban, melyek nem daganatos sejtek. 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)

## **A tumor asszociált fibroblasztok**

A tumor asszociált fibroblasztok (CAF) nem egységes sejtféleségek, 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 gyulladáshoz citokineket szekretáló inflammatorikus CAF-ok (iCAF).

Egy-sejt RNS szekvenálással négy fibroblaszt populációt tudtak elkülöníteni normál bél szövetben. Az S2 fibroblaszt populáció a bél epitél kriptáinak közelében található: elsősorban Wnt ligandokat és CD142-t (szöveti faktor) expresszálnak jelentős mértékben. Fő funkciójuk az epitél őssejt niche fenntartása. Gyulladásos bélbetegségben e négy fibroblaszt alpopuláció aránya megváltozott, s a podoplanint (PDPN), gyulladásos citokineket termelő S4 populáció aránya nőtt meg. Ugyanakkor ezeknek a stromális fibroblaszt populációknak a jelenléte CRC szövetben még nem ismert. Minthogy az S2 fibroblaszt populáció egészséges szövetre, az S4 gyulladásos szövetre jellemző, ez felveti a kérdést, hogy megfeleltethetőek-e a myCAF és iCAF fibroblaszt szubpopulációknak.

### **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 kommunikációban is jelentősek. Számos biológiailag fontos molekulát (pl. RNS-ek, fehérjék) képesek szállítani védett módon, ugyanakkor a felszínükön is képesek különböző molekulákat hordozni.

## **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 gyulladással járó bélbetegségben. Vizsgáltuk, hogy CRC-ben is megtalálható-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**

#### **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, 580-5/2021/EÜIG, 51323-4/2015/EKU) és a betegek írásos hozzájárulásával történt.

#### **Humán PDAC organoid kultúrák**

A PDAC organoidokat növekedési faktor csökkentett, fenolvörös mentes Matrigel 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, gastrin (10 nM), HEPES (10 mM), 1% glutamin, N-acetil-cisztein (1 mM), humán R-Spondin1 (500 ng/ml), A83-01 (0,5  $\mu$ M), Rho kináz inhibitor Y-27632 (10  $\mu$ M).

#### **Humán CRC organoid kultúrák**

A CRC organoidokat növekedési faktor csökkentett, fenolvörös mentes Matrigelben tenyésztettük teljes CRC organoid médiumban. A teljes CRC organoid médium az alábbiakat tartalmazta: DMEM/F12 médiumban 1% antibiotikum/antimikotikum mix, 1% penicillin/streptomycin, B27 kiegészítő, HEPES (10 mM), 1% glutamin, N-acetil-cisztein (1 mM), nikotinamid (10 mM), A83-01 (0,5  $\mu$ M), SB202190-monohydrochloride (10  $\mu$ M), EGF (50 ng/ml), Rho kináz inhibitor Y-27632 (10  $\mu$ M).

#### **Humán PDAC fibroblaszt kultúrák**

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

## **Humán CRC és normál colon fibroblaszt kultúrák**

A CRC beteg-eredetű fibroblasztokat és a humán normál colon fibroblaszt sejtvonalat (CCD-18Co) CRC fibroblaszt médiumban tartottuk: DMEM high glucose, 1% glutamin, 10% FBS, 1% antibiotikum/antimikotikum mix.

## **Extracelluláris vezikula mérés NTA módszerrel**

Az organoidok felülúszójából differenciál centrifugálással 16 °C-on (300 g 5 perc, 2000 g 20 perc, 12500 g 20 perc) eltávolítottuk a sejttörmeléket, apoptotikus testeket és nagy EV-eket. Az így nyert felülúszóban található kisebb EV-eket 10-szeres PBS hígítással mértük Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) módszerrel.

## **Immuncitokémia**

Az organoidokat vagy fibroblasztokat 8 kamrás Falcon Culture Slide tárgylemezeken tenyésztettük. 4% PFA-val 30 percig fixáltuk a sejteket. Majd 0,2% BSA, 5% FBS, 0,3% Triton X-100 PBS-ben tartalmú pufferben blokkoltuk és permeabilizáltuk a sejteket. Ez után blokkoló pufferbe oldott elsődleges ellenanyaggal, majd másodlagos antitesttel inkubáltuk a mintákat. Végül DAPI DNS festék tartalmú médiummal fedtük le a tárgylemezeket. A mintákat konfokális mikroszkóppal fotóztuk és az ImageJ szoftverrel értékeltük.

## **Paraffinba ágyazott szövetek immunfestése**

PFA-val fixált és paraffinba ágyazott tumorszöveteket deparaffinizáltuk és rehidratáltuk leszálló alkoholsorral. A metszeteket lúgos Tris-EDTA pufferben (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,05% Tween-20 desztillált vízben, pH=9,0) forraltuk. Mosás után blokkoltuk a metszeteket, majd elsődleges és másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk a metszeteket. A mintákat DAPI DNS festék tartalmú médiummal fedtük le.



## **Áramlási citometria és sejt szortolás**

Az organoidokból vagy sejtekből egysejt-szuspenziót 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. 10000 eseményt mértünk le a Cytoflex áramlási citométerrel vagy a sejtpopulációkat Sony sejtiszorterrel válogattuk szét.

## **ELISA**

A szortolt CD142<sup>alacsony</sup> és CD142<sup>magas</sup> fibroblasztokat 2 napig növesztettük, majd elvontuk az FBS-t és további 3 napig tenyésztettük őket. A sejttörmelékét centrifugálással eltávolítottuk a kondicionált médiumból és a HGF (hepatocita növekedési faktor) mennyiséget detektáltuk ELISA-val.

## **RNS izolálás és mRNS mérés**

A sejt- és organoid tenyészetekből Qiazol lízis pufferrel készítettünk mintát az RNS izoláláshoz, majd a miRNEasy Micro Kit-tel izoláltuk a teljes RNS-t. 150 ng teljes RNS felhasználásával cDNS-t készítettünk a SensiFAST cDNA Synthesis Kit-tel. A kvantitatív PCR mérésekhez a SensiFAST SYBR Hi-ROX Kit-et használtuk.

## **Életképességi teszt**

Az élő sejtek mennyiségének meghatározásához a lumineszcencia alapú CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay-t használtuk. 5000 organoid sejtet vagy fibroblasztot tettünk 6 µl 3D mátrixba és 4 napig növesztettük őket, majd 6 napig kezeltük őket a különböző inhibitorokkal és kemoterápiás szerekkel: Trametinib, PU-H71, A-1155463 és JQ1, 5-fluorouracil és irinotecan. A gyógyszer kölcsönhatások (szinergizmus és antagonizmus) a Chou-Talalay módszerrel, a CompuSyn szoftverrel lettek meghatározva.

## Bioinformatikai és statisztikai elemzések

CD142 (F3), valamint PDPN (podoplanin) intenzitást és a pozitív sejtek mennyiségét a Human Protein Atlas adatbázisban elemeztük CRC esetében. A statisztikai analízisek a Microsoft Excell, 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.

## **4. Eredmények**

### **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, bél adenoma organoidokban, normál bronchiális, tüdő adenokarcinóma és egészséges hasnyálmirigy organoidokban is. 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

Érdekes módon, az összes PDAC organoidunk életképes volt a külső Wnt3a fehérje nélkül, sőt egységesen expresszálták a PORCN enzimet, mely nélkülözhetetlen a Wnt fehérjék szekréciójához. Továbbá PDAC organoidjaink egységes Wnt expressziós profillal rendelkeznek, mely nagyban különbözik a stromális fibroblasztok Wnt expressziós profiljától. Mindezek arra engednek következtetni, hogy a PDAC organoidok képesek Wnt mikroniche-t fenntartani saját maguk számára. A Wnt szekréció gátlást (PORCN inhibitor LGK974) követően szignifikánsan csökkent a Wnt célgének (*AXIN2*, *LGR5*, *TROY*) expressziója a PDAC organoidokban. Ugyanakkor az LGK974 hatására nem tapasztaltunk csökkenést az osztódó sejtek arányában, sem növekedést az apoptotikus sejtek arányában. Továbbá a Wnt szekréciójának gátlása nem volt hatással az EV kibocsátás intenzitására, sem az EV-k méretére.

### **CD142-t magasan expresszáló stromális sejtek megtalálhatók CRC-ben**

Vizsgálataink többi részében a második legtöbb halálózással jellemezhető tumortípusra, a CRC-re, illetve mikrokoznyezetére koncentráltunk. A tumor-asszociált fibroblasztok (CAF) heterogenitása kritikus jelentőségű a CRC progressziójában, valamint a CD142 és PDPN két fibroblaszt szubpopulációt jelölhet CRC-ben. Azért, hogy teszteljük ennek a két markernek a jelenlétét CRC-ben, először a Protein Atlas adatbázist

elemztük. A tumorsejtek csak alacsony vagy közepes CD142 és PDPN expressziót mutattak. Azért, hogy ennek a két molekulának a stromális expresszióját vizsgáljuk, CAF-okat izoláltunk CRC betegek tumorszövetéből. Ezek a sejt kultúrák  $\alpha$ SMA-t expresszáltak, így megerősítettük, hogy az izolált sejtek valóban fibroblasztok. Továbbá nem detektáltuk az epiteliális marker *CDH1* és *EpCAM* expresszióját a betegeredetű CAF sejtenyészetekben.

Áramlási citometriával igazoltuk a CD142 és PDPN jelenlétét a CRC CAF-okon, és normál colon fibroblasztokon (NCF). viszont a CD142-re nagyobb heterogenitást tapasztaltunk a PDPN-hez viszonyítva. Ezért további kísérleteinkben a CD142-re fókuszáltunk. A szortolt CD142<sup>alacsony</sup> és CD142<sup>magas</sup> fenotípus különbség megmaradt 7 nap tenyésztés után is a CAF-okban, valamint az NCF-ekben. A CD142 stromális heterogenitását igazolva, CRC beteg-eredetű tumor szövet metszeteket vizsgáltunk és CD142+ stromális sejteket, ugyanakkor a tumorsejtek negatívak voltak erre a markerre.

### **A CD142 stimulációja fibroblasztokon nem befolyásolja a CRC organoidokat kokultúrában**

CRC organoidjaink nagyon alacsony CD142 expresszióval rendelkeznek. Minthogy CRC organoidjaink EGF függők, amikor elvontuk az EGF-et a médiumukból, az organoidok átmérője és az osztódó sejtek aránya szignifikánsan lecsökkent. 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. Továbbá, az FVIIa a fibroblasztok osztódását sem befolyásolta.

Amikor a CRC organoidokat a fibroblasztokkal együtt tenyésztettük kokultúrában, a CAF-ok növelték az organoidok átmérőjét és az osztódó sejtek számát, de csak EGF hiányában. Az FVIIa jelenléte kokultúrában sem befolyásolta az organoidok osztódását, függetlenül az EGF jelenlététől.

## **A TGFβ a CD142<sup>magas</sup> fibroblasztok felhalmozódását okozza, melyek kevert myCAF és iCAF tulajdonságokkal rendelkeznek**

A TGFβ az egyik legfőbb fibroblaszt aktivátor molekula CRC-ben. Az NCF-ek heterogenitást mutattak CD142-re és a TGFβ hatására megemelkedett a CD142<sup>magas</sup> populáció aránya. Hasonlóképpen, a TGFβ hatására megemelkedett a CD142<sup>magas</sup> sejt populáció aránya CRC beteg-eredetű CAF sejt kultúrákban is.

Mivel az egészséges colonra jellemző a CD142+ fibroblasztok jelenléte, ez felveti annak a lehetőségét, hogy inkább myCAF funkcióval rendelkező fibroblasztokat jelölnek a CD142<sup>magas</sup> CAF-ok. Bár a szortolt CD142<sup>magas</sup> CAF-ok magasabb szinten expresszálják 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. 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.

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

A CD142<sup>magas</sup> fibroblasztok megemelték a CRC organoidok KI67+ osztódó sejtjeinek arányát, átmérőjét és az organoid formálási hatékonyságot a CD142<sup>alacsony</sup> fibroblasztokhoz viszonyítva. 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. Valamint a CD142<sup>magas</sup> és CD142<sup>alacsony</sup> CAF-ok nem különböztek a KI67+ proliferáló sejtek arányában sem.

Ezután ennek a jelenségnek a hátterében lévő molekuláris mechanizmusra voltunk kíváncsiak. Ezért számos növekedési faktor és Wnt ligand génjének az RNS szintjét mértük a szortolt fibroblasztokban. Noha az FVIIa nem befolyásolta a HGF RNS szintjét, szignifikánsan magasabb HGF expressziót találtunk a CD142<sup>magas</sup> NCF-ek és CAF-okban a CD142<sup>alacsony</sup> fibroblasztokhoz képest és ezt a különbséget fehérje szinten is igazoltunk.

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

Mivel a fibroblasztok kritikus jelentőségű mikrokörnyezetet biztosítanak az őssejt funkciójú CRC sejtek számára, 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. Ellenben a hagyományos 5-fluorouracil (5FU) és irinotecan kemoterápiás szerekekkel, melyek kombinációban antagonisztikusan hatottak, a MEKi (MEK1/2 inhibitor Trametinib) és HSP90i (HSP90 inhibitor PU-H71) szinergisztikusan viselkedtek (azaz egymás hatását erősítő) kombinációban az összes tesztelt CRC organoid vonalon.

A BCLi (BCL-xL inhibitor A-1155463) hatékonyan csökkentette a CRC organoidok életképességét. Érdekes módon a BCLi szinergisztikusan hatott a JQ1-gyel (bromodomén epigenetikai inhibitor), MEKi-vel és HSP90i-vel való kombinációban is. Hasonlóképpen, a JQ1 is szinergisztikusan hatott az összes inhibitorral való kombinációban.

A CD44 egy agresszív, őssejt fenotípussal rendelkező CRC tumorsejt populációt jelöl, a lumican (LUM) pedig egy mezenchimális marker, mely túlexpresszálódik CRC-ben az EMT során. Meglepő módon a CD44+ organoid sejtek nagy százaléka LUM+ is. Az organoidokat az egyes szerek IC50 koncentrációjával kezeltük, ahol a sejtek csak egy része él túl. Egyik kezelés sem befolyásolta a CRC organoidok LUM expresszió intenzitását, viszont JQ1 hatására a CD44 szintje megnőtt.

### **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 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. Figyelemre méltó, hogy a MEKi még a legnagyobb dózisban sem pusztította el a fibroblasztokat. Eredményeinket CAF-okon is megerősítettük az egyszeres kezelésekre.

Amikor a fibroblasztokat az egyes terápiás szerek IC50 koncentrációjával kezeltük, a CD142<sup>magas</sup> fibroblaszt populáció csökkenését tapasztaltuk a HSP90i-re, viszont sem a BCLi, sem a JQ1, sem a MEKi hatására nem detektáltunk változást a CD142 szintjében.

## **5. Következtetések**

A tumor mikrokörnyezet központi szerepet játszik a tumorsejtek közötti heterogenitás kialakításában, így például az őssejt 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 szekréció 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 szekréció gátlásának hatására.

A CRC fibroblasztokon a CD142-t vizsgáltuk, melyet egészséges és gyulladással 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 CD142magas fibroblasztok magasabb HGF szekréciója 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 CD142magas fibroblasztok aránya, az epigenetikai inhibitor JQ1 pedig kiszelektálta az agresszív fenotípussal jellemezhető CD44magas/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.



## **6. Saját publikációk jegyzéke**

### **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**

### **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**