

Az extracelluláris vezikulák szerepe a tumor-sztróma közti kommunikációban kolorektális tumorokban

Doktori tézisek

Szvicsek Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Wiener Zoltán, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Tárnok Krisztián, Ph.D., egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

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

Tagok: Dr. Mayer Balázs, Ph. D., tudományos főmunkatárs
Dr. Lippai Mónika, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2020.

1. Bevezetés

A vastag- és végbéltumor (CRC) az egyik leggyakoribb oka a daganatos eredetű, halállal végződő betegségeknek. Az esetek túlnyomó többségében a betegség az adenoma-karcinoma útvonalon alakul ki, mely során a bélhám epithél sejtjeinek megváltozik a működése, a bélhamban abnormális sejtszaporulat (polip, adenoma) jelenik meg. Ennek a megváltozott működésnek a hátterében a betegek legnagyobb részében a mutáción átesett *adenomatous polyposis coli* (APC) gén áll, mely a CRC tumorigenezisének egy korai lépése.

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) membránnal körülvett struktúrák, melyek biológiailag fontos molekulákat szállítanak a sejtek között, így az intercelluláris kommunikáció egy új formájának tekinthetjük őket. A tumoros szövet sejteji több extracelluláris vezikulát termelnek a normál sejtekhez képest, azonban ennek a jelenségnek az okai még nem teljesen tisztázottak. Mivel az EV-k felszínén vagy a belsejükben a kibocsátó sejtre specifikus molekulák találhatóak, így nagyon ígéretes eszközök a korai tumordiagnosztika fejlődéséhez.

A tumoros mikrokörnyezet fontos alkotói a tumorasszociált fibroblasztok (CAF-ok), melyek aktivált állapotban különböző extracelluláris mátrix elemek (kollagén) és molekulák (TGF β) termelésével hozzájárulnak a tumorprogresszióhoz. A CAF-októl megkülönböztethetjük a tumoros szövetből távolabb elhelyezkedő peritumorális fibroblasztokat (PTF), melyeket a szakirodalom gyakran a CAF-ok nem aktivált kontrolljaként említ, hasonlóan a kereskedelmi forgalomban kapható normál fibroblasztokhoz (NCF). A tumoros szövetben a fibroblasztok egyik fő aktivátora a TGF β .

2. Célkitűzések

PhD munkám során elsődleges célom a CRC sejtek és a sztrómális fibroblasztok közti extracelluláris vezikulákon (EV) keresztül megvalósuló kommunikáció tanulmányozása volt.

Ehhez a következő kérdésekre kerestünk válaszokat:

1. Az organoid technológia alkalmas-e a CRC sejtek EV termelésének vizsgálatára?
2. Milyen tényezők befolyásolják a CRC sejtek EV termelését?
3. A CRC sejtek által kibocsátott EV-k hatással vannak-e a colon fibroblasztokra, és ha igen, milyen hatással?
4. A colon fibroblasztok által kibocsátott EV-k hatással vannak-e a CRC sejtekre, és ha igen, milyen hatással?
5. A betegeredetű CRC organoid vonalak által kibocsátott EV-k tartalma között van-e eltérés?
6. A colon fibroblasztok aktiváltsági foka befolyásolja-e az EV termelést, a kibocsátott EV-k tartalmát?

3. Módszerek

A sejtkultúrák fenntartása

A munkánk során HCT116, SW620, SW1222 kolon sejtvonalat, ATCC-1459 humán kolon fibroblasztot, illetve kontrollként Thp1 sejtvonalat használtunk. A sejteket DMEM médiumban tartottuk (DMEM high glucose, 10% FBS). EV izolálás előtt a sejteket EV-mentes FBS-t tartalmazó médiumban, vagy nem teljes CRC organoid médiumban tartottuk.

Humán organoid kultúrák létrehozása

A szövetmintát feldaraboltuk, a szövetdarabokra emésztő puffert tettünk. Az emésztett mintából elkülönítettük a kriptákat és a sejteket tartalmazó felülúszót (FU-t), sorozatos centrifugálással elválasztottuk a kriptákat tartalmazó frakciót a minta többi részétől. Az egysejtes frakciót a későbbiekben felhasználtuk fibroblasztok izolálására, ahogy az *a betegekből származó fibroblasztok izolálása* bekezdésben is olvasható. Az izolált kriptákat ezután növekedési faktor csökkentett és fenolvörös-mentes Matrigel-be ágyaztuk, a mintákra humán organoid médiumot (HOM) tettünk. Néhány kísérlet az organoidokat nem Matrigel-be ágyaztuk, hanem 24 lyukú szuszpenziós lemezen HOM-ban tartottuk. A hipoxiás kísérleteket AnaeroGen 5,5L-es zsákok segítségével végeztük.

Apc-mutáns egér organoidok létrehozása

A normál kriptákat C57Bl/6J vagy UBI-GFP egerekből származó bélszövetből izoláltuk. Az izolálás során a vékonybelet darabokra vágtuk,

alapos PBS-ses mosás után a szövetdarabokat EDTA-ban inkubáltuk. Az emésztést követően centrifugálással elkülönítettük a kriptákat a sejtektől, majd a kriptákat Matrigel-be ágyasztuk. Az így elindított kultúrákat vékonybél organoid médiumban tartottuk (SIM).

Az általunk használt eger *Apc* sgRNS szekvenciát, amit korábban már publikáltak (sgRNS4, [Schwank, 2013]), lentiCRISPR v2-be klónoztuk a BsmBI restrikciós helyekre az Addgene felhasználói útmutatójának megfelelően. Az *Apc* mutáns organoidokat a korábban már publikált [Sato, 2009], általunk kissé módosított protokoll alapján hoztuk létre.

Kollagén-alapú organoid kultúrák

Az organoidokat eltávolítottuk a Matrigel-mátrixból, majd I-es típusú kollagénbe ágyasztuk, és a kultúrákat HOM-ban tenyésztettük. Az organoidok kollagén mátrixból való eltávolításához a cseppeket kollagenáz II-vel kezeltük.

A betegekből származó fibroblasztok izolálása

A peritumorális (PTF) és tumor asszociált fibroblasztok (CAF) izolálása során a betegeredetű szövetet úgy jártunk el, ahogy az a *humán organoid kultúrák létrehozása* fejezetben ismertetésre került. A sejteket tartalmazó felülszót 5 percig 300g-vel centrifugáltuk, majd a sejteket tartalmazó pelletet petricsészébe tettük és a kultúrákat DMEM-ben tartottuk (DMEM high glucose, 10% FBS). Másnap a nem letapadó sejteket eltávolítottuk a tenyészetből.

Ellenanyaggal fedett gyöngyökkel történő EV izolálás

Két nappal az EV izolálás előtt a sejtekről a használt médiumot friss, EV-mentes FBS-t tartalmazó, vagy FBS mentes tápra cseréltük. Izoláláskor a felülúszóból differenciál centrifugálással (300g 5 perc, 2000g 20 perc) eltávolítottuk a sejtörmeléket és a nagyobb méretű EV-eket, elsősorban apoptotikus testeket. Az izolálás lépéseit kontrollként üres EV-mentes médiummal is elvégeztük. A centrifugálások után kapott felülúszóhoz anti-CD63, illetve anti-CD81 ellenanyaggal konjugált mágneses gyöngyöt adtunk. A gyöngyöket előzőleg 0,1%-os BSA-val blokkoltuk, majd a mintákat 4°C-os hűtőben éjszakán át forgatón inkubáltuk. A sejt felülúszó leszívása után a tenyészedényekben maradt sejteket minden esetben megszámláltuk tripánkék festést alkalmazva, az áramlási citometriával (FACS) kapott eredményeket erre a sejtszámra normalizáltuk.

Egér eredetű EV detektálás anti-CD81 ellenanyaggal burkolt mágneses gyöngyökkel

Az anti-CD81 ellenanyagot mágneses gyöngyökhöz kötöttük, a FACS mérést megelőzően ezt az anti-CD81 fedett gyöngyöt adtuk a sejt felülúszóhoz, majd az inkubálás másnapján a mintákhoz PE konjugált anti-CD81 ellenanyagot adtunk. A pozitív EV-eket áramlási citométerrel detektáltuk.

EV izolálás RNS analízisekhez

A sejt- vagy organoid felülúszót a gyűjtés után sorozat centrifugáltuk majd a kis méretű EV-eket ultracentrifugálással izoláltuk. A miRNS detektáláshoz az ultracentrifugálással szeparált EV-eket vagy anti-CD63/81 ellenanyaggal fedett

gyöngyökkel izolált EV-eket használtuk. Alternatív megoldásként az EV-eredetű RNS-t ExoRNEasy Serum/Plasma Starter Kit segítségével izoláltuk.

qNano mérések

A sejtenyészetek/organoidok médiumában az EV-eket 48 órán át gyűjtöttük, a felülúszót differenciál centrifugáltuk, majd a felülúszót qNano-val elemeztük.

NTA mérések

A fibroblasztokat 48 órán át FBS-mentes médiumban tenyésztettük, az összegyűjtött médiumot sorozat centrifugáltunk, majd az FU-val dolgoztunk tovább. A mintákból partikulum méreteloszlást és koncentrációt mértünk ZetaView Z-NTA műszer segítségével.

EV-k proteomikai analízise

Organoid eredetű FU mellett organoid-mentes Matrigel cseppeken tartott HOM-ot használtunk, amit szintén ultracentrifugáltunk. Az EV pelletet vízben vettük fel, majd a fehérjéket többször ismételt fagyasztási-olvasztási ciklussal, szonikálással, emésztéssel tártuk fel, a korábban már publikált módszer alapján [Osteikoetxea, 2018]. A fehérje koncentrációt Micro BCA Protein Assay Kit segítségével mértük meg. Azokat a fehérjéket, melyek a Matrigel kontroll mintákban is megtalálhatóak voltak, eltávolítottuk az organoid mintákból származó listáról, az így módosított listákkal folytattuk a proteomikai elemzést.

Liposzómák elkészítése és karakterizálása

A kísérletek során felhasznált liposzómák átlag átmérője 105 nm volt (a liposzómák elkészítése és jellemzése együttműködés keretében valósult meg dr. Varga Zoltánnal, Természettudományi Kutatóközpont).

TaqMan low density miRNA array

A normál kolon fibroblasztokat (NCF) TGF β hozzáadásával vagy anélkül tenyésztettük, 4 nap kezelést követően a minták részecske koncentrációját sorozatos centrifugálás után NTA-val mértük. A mintákat anti-CD63 és anti-CD81 ellenanyaggal konjugált mágneses gyöngyökkel inkubáltuk, majd az izolált EV-eket Qiazol-lal lizáltuk. A teljes RNS-t a kis méretű RNS-ekkel együtt miRNeasy Micro Kit segítségével izoláltuk, a teljes RNS-t Megaplex RT primerekkel visszaírtunk, Megaplex PreAmp Primerek segítségével felamplifikáltunk, végül TaqMan™ Array Human MicroRNA Card v2.0 felhasználásával vizsgáltuk. Az Array kártyákat ABI 7900HT műszerrel mértük le. Háttérként sejtmentes lyukakról származó médiumból származó izolátumot is mértünk.

RNS izolálás és RNS mérések

Az RNS-t RNeasy Micro Kittel, a totál RNS-t (kis méretű RNS-ekkel) pedig miRNeasy Micro Kittel izoláltuk. Néhány kísérletben az EV-eredetű miRNS-eket ExoRNeasy Serum/Plasma Starter Kittel nyertük ki. Az RNS koncentráció meghatározására NanoDrop készüléket használtunk.

A miRNS-sel végzett kísérletekhez az RNS-t TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kittel írtuk át. A PCR reakciókat TaqMan® Fast

Advanced Master Mix és TaqMan® Advanced miRNA Assays segítségével végeztük el.

Az mRNS mérésekhez RNS-t izoláltunk az organoidokból, illetve a fibroblasztokból, majd az izolátumból teljes RNS-t cDNS-sé SensiFast™ cDNA Synthesis Kit segítségével írtuk át. A kvantitatív polimeráz láncreakciós méréseket SensiFAST™ SYBR Hi-ROX Kit segítségével végeztük SybrGreen detektálási módszerrel. A mérést Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR gépen végeztük.

Szekvenálás

A cDNS-t a Phusion High Fidelity DNA Polymerase-zal amplifikáltuk fel, a DNS-t ezután 2%-os agaróz gélből izoláltuk, Gel Purification Kit segítségével tisztítottuk, majd a forward primer felhasználásával Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer műszerrel megszekvenálták a Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében. Az adatokat a Chromas 2.6 program segítségével elemeztük.

Transzmissziós elektronmikroszkópia

Az ultracentrifugálás utáni pelletet PBS-ben felfuszpendáltuk, majd a mintát hártáival bevont rácsos gridre szárítottuk. Az EV-eket ezután a rácsra fixáltuk 4% glutáraldehiddel, 2%-os foszfowolframsavval festettük, majd transzmissziós elektronmikroszkóppal (MORGAGNI 268D) képeket készítettünk a mintákról (együtműködés dr. Varga Zoltánnal, Természettudományi Kutatóközpont).

Wound-healing vizsgálat

A konfluens normál kolon fibroblaszt tenyészetekbe pipettaheggyel egy egyenes csíkot karcoltunk, majd EV izolálás után EV-mentes vagy EV-gazdag médiummal kezeltük a sejteket. A tenyészetekről képeket készítettünk különböző időpontokban Nikon Diaphot mikroszkóppal. A sejtmentes területek méretét ImageJ szoftverrel mértük le. Néhány kísérlet során EV izolálás előtt az organoidokat 2 napon keresztül hipoxiás körülmények között tartottuk.

Immuncitokémia

Az immuncitokémiához használt sejteket 4 vagy 8 kamrás Falcon CulturSlide tárgylemezen tenyésztettük. A sejteket fixálás után blokkoló és permeabilizáló pufferben tartottuk, majd a mintákat elsődleges ellenanyagban inkubáltuk (nyúl anti-Ki67, nyúl anti-IL6, egér anti-E-cadherin, egér anti- α SMA patkány anti-vimentin). Másnap a felesleges ellenanyagot kimostuk a mintákból, rátettük a mintákra a másodlagos ellenanyagokat (anti-nyúl és anti-egér Alexa Fluor 488, anti-egér és anti-patkány Alexa Fluor 568). Inkubálás után a mintákat mosópufferben mostuk, majd DAPI-t tartalmazó fedőmédiumot tettünk rájuk. A mintákat konfokális mikroszkóppal (Zeiss LSM800) vizsgáltuk.

Szeneszencia vizsgálat

A szeneszencia meghatározása a szeneszencia-asszociált- β -galaktozidáz (SA- β -Gal) aktivitásának kimutatásával történt. A reakció után a mintákat látható fényű inverz mikroszkóppal vizsgáltuk.

Microarray analízis

Az RNS minőségét Bioanalyzer Pico Chip segítségével határoztuk meg, és Agilent 4 x 44 K humán teljes genom expressziós microarray-el elemeztük. Az adatok kiértékeléséhez Feature Extraction Software 12.0.3.1-et használtunk, Chipster-be importáltuk (www.chipster.csc.fi), majd standard Agilent one-color normalizációs módszert végeztünk.

GSEA és túlélési analízisek

A génexpressziós adatsort bevittük a Gene Set Enrichment Analysis szoftverbe (<http://www.broadinstitute.org/gsea>) és az elemzést az alapértelmezett beállításokkal futtattuk le, és gén permutációt alkalmaztunk. A kegg.v3.1.symbols génsor módosított változatát használtuk a Wnt target gének, bél őssejt specifikus gének, és exoszóma specifikus gének hozzáadásával. Az exoszóma biogenezis géncsoportot publikált adatok alapján készítettük, és olyan géneket választottunk, melyeknek bizonyítottan szerepük van a MVB (multivesicular body, multivezikuláris test) biogenezisben és az exoszóma szekrécióban.

A túlélési analízishez a GSE17537 és a GSE14333 géncsoportokat használtuk, melyek a betegek túlélési adatait is tartalmazzák.

Statisztikai módszerek

A statisztikai elemzésekhez GraphPad Prism és SPSS szoftvereket használtunk. Az adatok kiértékelése során párosított vagy párosítatlan t-próbát, egyutas ANOVA és Tukey post-hoc tesztet alkalmaztunk * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, szignifikancia szintekkel.

4. Eredmények

A kutatómunka első lépéseként megvizsgáltuk különböző CRC sejtvonalak EV termelését 3D Matrigel mátrixban, ahol a sejtek szferoidkat hoztak létre. Megfigyeltük, hogy a sejtek felülúszójából detektálni lehetett CD63+ EV-ket az ellenanyaggal fedett gyöngy alapú módszerrel mind 2D, mind 3D tenyésztési körülmények között, azonban 3D mátrix esetén a nagyobb EV-kre jellemző Annexin V+ eseményeket nem tudtuk kimutatni a felülúszóból. Ez arra utalhat, hogy a nagyobb méretű EV-k a Matrigel mátrixból nem tudnak kiszabadulni.

A CRC sejtek EV termelésének vizsgálatához organoid technológiát használtunk, mely során CRC-ben szenvedő betegektől származó szövetekből 3D tenyészeteket hoztunk létre Matrigel-ben. Fontos, hogy az összes betegeredetű organoid vonalunk termelt CD63+ és CD81+ EV-ket. A kísérleteink során használt organoid kultúrák folyamatosan aktív Wnt és mutáns p53 jelátviteli útvonallal rendelkeztek, de a KRAS útvonal nem volt mutáns. Bizonyítottuk, hogy a CRC organoid eredetű EV-k tartalmaznak miRNS-eket, azonban az EV izolálási módszer nagyban befolyásolja a detektálási profilt 3D organoidból származó EV-k esetében, és nagy a variancia az egyes minták között is. A legkisebb háttér az ellenanyaggal fedett gyöngy alapú módszer esetén volt megfigyelhető, így ez tekinthető a legspecifikusabb eljárásnak az EV-k miRNS tartalmának vizsgálatához. Elemeztük a 3D organoid eredetű EV-k fehérjetartalmát is, és az eredmények alapján az azonosított fehérjéknek csak a 45%-a volt jelen mindegyik minta esetén, ami arra utal, hogy nagy a variancia a különböző betegeredetű organoid vonalak által termelt EV-k tartalma között.

A CRC sejtek EV termelését befolyásoló körülmények vizsgálata során kimutattuk, hogy a CRC kialakulásában kritikus ECM fehérje, a kollagén I serkenti a CRC organoidok EV termelését. Széles körben elfogadott tény, hogy a tumoros sejtek EV termelése intenzívebb a normál szövethez képest. Ennek az oka, hogy ez köthető-e valamilyen mutációhoz, azonban még nem ismert. Mivel a CRC sejtek a tumorigenezisnek egy késői szakaszát reprezentálják, és számos mutációt hordoznak, a kísérletek során egy jól meghatározott, egységes genetikai háttérrel rendelkező egértörzset használtunk. *Apc* mutációt hoztunk létre vad típusú (wild type – WT) vékonybél organoidokban CRISPR-Cas9 rendszerrel, majd kisselektáltuk az *Apc* mutáns organoidokat. Mivel ezek az organoidok a bélben az adenoma szakaszt képviselik, így a Wnt-agonista R-Spondin-1 külső hozzáadása nélkül végeztük el a szelektálást. A WT organoidok erősen függenek az R-Spondin-1-től, így annak a médiumból való megvonását csak az *Apc* mutációt hordozó organoidok élik túl. Érdekes módon az organoidok által kibocsátott CD81+ EV-k mennyisége az *Apc* mutációt követően jelentősen megemelkedett. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) segítségével teszteltük, hogy vajon a mutációt követően az EV-k kialakulásában (exoszóma biogenezis) szerepet játszó gének megváltozott expressziója felelős-e a megemelkedett EV-termelésért. Az *Apc* mutációt hordozó mintákban azonban az exoszóma biogenezis génkészlet nem mutatott pozitív feldúsulást. Annak kiderítésére, hogy a Wnt-út vonal aktiválása vezet-e megemelkedett EV termeléshez, vad típusú intesztinális organoidokat kezeltünk Wnt3a-val, vagy a GSK-3 gátló CHIR99021-gyel, melyek a WNT-út vonal ismert aktivátorai. Az *Apc* mutációhoz hasonlóan a Wnt3a és a CHIR99021 kezelés is megemelte a Ki67+ osztódó sejtek számát, és csökkentette a Mucin-2+ kehelysejtek

arányát. Ezzel párhuzamosan igazoltuk, hogy a kezelések hatására alacsonyabb lett a *Mucin-2* és az enterocita marker *Alpi* gének RNS szintje, és megemelkedett a Wnt-target őssejt marker *Lgr5* gén RNS szintje. Fontos, hogy az *Apc* mutációhoz hasonlóan a Wnt3a és a CHIR99021 kezelés hatására is jelentősen megemelkedett az organoidok EV-termelése, miközben az aktív kaszpáz-3 + sejtek száma nem változott. Ez alapján az *Apc* mutáció a Wnt jelátviteli útvonal serkentésén keresztül emeli meg a CRC sejtek EV termelését.

Ismert tény, hogy a tumoros szövetben a fibroblasztok mennyisége negatív korrelációt mutat a betegség kimenetelével, így megvizsgáltunk több kolon fibroblaszt vonalat is. Miután az adataink azt mutatták, hogy számos faktor serkenti az EV termelést adenoma és CRC sejtek esetében, kíváncsiak voltunk, hogy milyen faktorok vannak hatással a fibroblasztok EV termelésére. A vizsgálatok során sejtbankból származó normál kolon fibroblaszt mellett CRC betegekől származó tumorasszociált (CAF) és a tumoros szöcettől távolabb elhelyezkedő peritumorális (PTF) fibroblasztokat is használtunk. Mivel a fibroblasztok a tumoros szövetben tumorasszociált fibroblasztként aktivált állapotban vannak, így kíváncsiak voltunk, hogy ez az aktiváltsági fok befolyásolja-e a sejtek EV termelését. A normál fibroblasztokat TGF β -val kezeltük, majd immuncitokémiai és génexpressziós analízissel ellenőriztük, hogy a sejtek aktiválódtak-e. A kezelést követően a fibroblasztokban lecsökkent az osztódó sejtek száma, ami szakirodalmi adatok alapján a TGF β általi aktiváció következménye, illetve megemelkedett a fibroblaszt aktivációs marker α SMA expressziós szintje. Ezt a qPCR vizsgálat is alátámasztotta, hiszen a kezelést követően megemelkedett a fibroblaszt aktivációval kapcsolatos gének expressziója. A TGF β kezelés után nem

tapasztaltunk változást a CD81+ vagy CD63+ EV kibocsátásában. Hasonlóképp a Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), az EV-k mennyiségi mérésére széleskörben alkalmazott módszer sem mutatott eltérést a partikulumok mennyiségében és azok méretbeli eloszlásában a kezelést követően. Ezek alapján a normál fibroblasztok aktiváltsága nincs hatással az EV termelésük intenzitására. Érdekes módon azonban a normál colon fibroblasztok TGF β általi aktiválása módosította a fibroblaszt eredetű EV-k miRNS cargoját. Taqman advanced miRNS Array-t alkalmazva 377 miRNS-t vizsgálva 209 miRNS-t detektáltunk a minták közül legalább az egyikben, és négy olyan miRNS-t (hsa-miR-101, 382, 424, 642), ami csak a TGF β -kezelt mintákban volt jelen.

Megvizsgáltuk, hogy a fibroblasztok aktiváltsági foka milyen hatással van a migrációs képességükre, így TGF β kezelést követően wound healing assay-t végeztünk a sejtekkel. Érdekes módon a normál fibroblasztok esetén a sejteknek a kezelést követően lecsökkent a migrációs képessége, lassabban zárult a seb, azonban ezt a jelenséget a PTF és CAF minták esetében nem tapasztaltuk.

Ezt követően az organoid rendszert felhasználtuk arra, hogy megvizsgáljuk az EV-k szerepét a tumor-sztróma kommunikációban. Az ATCC1459 humán colon fibroblasztokat 3D CRC organoid felülúszóból készített EV-gazdag, illetve EV-mentes médiummal kezeltük, majd microarray vizsgálatot végeztünk. Érdekes módon a CRC-eredetű EV-knek nem volt jelentős hatása a fibroblasztok transzkripciós profiljára. A CRC organoid eredetű EV-k kedvezőtlen körülmények között (hipoxia) sem serkentették a fibroblasztok motilitását sebgyógyulási vizsgálat során. Következő lépésként normoxiás és hipoxiás körülmények között tenyésztett

humán kolon fibroblasztok médiumából izoláltunk EV-eket, majd ezeket CRC organoid-eredetű sejtekhez adtuk. Érdekes módon csak abban az esetben figyeltük meg nagyobb számú új organoid növekedését, amikor hipoxiás körülmények között tenyésztett fibroblasztok médiumából izolált EV-kkel történt a kezelés, ezt a hatást azonban nem tapasztaltuk az EV-mentes médiummal történő kezelés esetében. Fontos, hogy a kísérleteket kontrollként elvégeztük akut monocytás leukémia páciens eredetű THP1 sejtvonal médiumából izolált EV-kkel és liposzómákkal is, melyek esetében nem tapasztaltunk hatást az organoidok növekedésére nézve. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy az organoidok kolónia kialakító képességének serkentése a hipoxiás fibroblaszt eredetű EV-khez köthető.

Összességében bizonyítottuk, hogy a CRC sejtek és a sztrómális fibroblasztok között EV-ken keresztüli kommunikáció is megvalósul a tumoros szövetben.

5. Következtetések

- Kimutattuk, hogy a kisebb EV-k detektálhatóak a 3D organoidok és szferoidok felülúszójában, azonban nagyobb EV-k nem tudják elhagyni a 3D mátrixot.
- Bizonyítottuk, hogy a betegeredetű CRC organoidok termelnek EV-eket, amiket vizsgálhatunk is a felülúszóban, így igazoltuk, hogy a Matrigel alapú 3D organoid technológia alkalmas az EV-k vizsgálatára CRC esetén.
- A CRC tumorigenezisében kritikus faktorok, mint például az *Apc* mutáció vagy a kollagén I felhalmozódás serkenti az EV kibocsátás

intenzitását tumor organoidokban. Továbbá, mivel az *APC* mutáció egy nagyon korai esemény a CRC tumorigenezise során, az adataink arra utalnak, hogy ez a megemelkedett EV-termelés már az adenoma stádiumban jelen van. Bizonyítottuk továbbá, hogy az *Apc* mutáció a Wnt jelátviteli útvonal serkentésén keresztül emeli meg a CRC sejtek EV termelését.

- Érdekes módon, bár a fibroblaszt eredetű EV-k serkentik a tumoros sejtek kolóniaképző képességét hipoxiában EGF-dependens CRC esetekben, ha külső EGF jelen van, az organoid eredetű EV-k nem eredményeztek jelentős változást a fibroblasztok aktiváltságában.
- A normál colon fibroblasztok TGF β általi aktiválása módosítja a fibroblaszt eredetű EV-k miRNS cargoját, a hsa-miR-101, 382, 424 és hsa-miR-642 miRNS-ek csak az aktivált normál fibroblaszt eredetű EV-kben jelennek meg.

Az eredményeink hangsúlyozzák az organoid technológia jelentőségét az EV-karakterizáló kutatásokban, illetve bizonyítják, hogy a CRC sejtek és a fibroblasztok között EV-ken keresztüli kommunikáció is zajlik a tumoros szövetben. Adataink értékes alapot adnak azoknak a kutatásoknak, melyek az EV-k diagnosztikai markerként, vagy terápiás gyógyszer célbajuttató eszközként való használatát célozzák.

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezéshez felhasznált közlemények:

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

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

CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 76: 12 pp. 2463-2476. (2019) IF: 6,496

2. Oszvald Ádám¹, **Szvicsek Zsuzsanna**¹, Pápai Márton, Kelemen Andrea, Varga Zoltán, Tölgyes Tamás, Dede Kristóf, Bursics Attila, Buzás Edit Irén, Wiener Zoltán

Fibroblast-derived extracellular vesicles induce colorectal cancer progression by transmitting amphiregulin

FRONTIERS IN CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY 8: Paper: 558, 15 p. (2020) IF: 5,201

¹Megosztott első szerzők

Az értekezéshez fel nem használt közlemények:

1. Oszvald Ádám, **Szvicsek Zsuzsanna**, Sándor Gyöngyvér Orsolya, Kelemen Andrea, Soós András Áron, Pálóczi Krisztina, Bursics Attila, Dede Kristóf, Tölgyes Tamás, Buzás Edit I, Zeöld Anikó, Wiener Zoltán.

Extracellular vesicles transmit epithelial growth factor activity in the intestinal stem cell niche

STEM CELLS 38: 2 pp. 291-300. (2020) IF: 6,022

2. Xabier Osteikoetxea, Benke Márton, Marta Rodriguez, Pálóczi Krisztina, W. Sódar Barbara, **Szvicsek Zsuzsanna**, Szabó-Taylor Katalin, V. Vukman Krisztina, Kittel Ágnes, Wiener Zoltán, Vékei Károly, Harsányi László, Szűcs Ákos, Turiák Lilla, Buzás Edit I.

Detection and proteomic characterization of extracellular vesicles in human pancreatic juice

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 499: 1 pp. 37-43.(2018) IF: 2,705

Összesített impakt faktor: **20,424**