

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

Doktori értekezés

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

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1. A vastag- és végbél tumorok jellemzői, főbb kiváltó okai	6
2.1.1. A CRC kialakulásában szerepet játszó főbb jelátviteli útvonalak.....	9
2.1.2. Genetikai mutációk felhalmozódása.....	11
2.1.3. Örökletes vastag- és végbél daganat.....	12
2.1.4. Gyulladásos bélbetegségek és a CRC kapcsolata.....	13
2.1.5. A bél mikrobiom és a CRC kapcsolata.....	14
2.2. A sejtek közti kommunikáció új formája: az extracelluláris vezikulák.....	15
2.3. A tumoros mikrokörnyezet CRC-ben	17
2.3.1. Tumorasszociált fibroblasztok.....	17
2.4. A daganatkutatás sejtbiológiai eszközei	18
2.4.1. A 2D és 3D sejt- és szövettenyésztési modellek összehasonlítása.....	18
2.4.2. A CRC kutatásban használt sejtvonalak.....	20
2.4.3. A 3D szövettenyésztési technológia.....	20
3. Célkitűzések	22
4. Anyagok és módszerek.....	23
4.1. A sejt kultúrák fenntartása	23
4.2. <i>Apc</i> -mutáns egér organoidok létrehozása	23
4.3. Humán organoid kultúrák létrehozása	25
4.4. Kollagén-alapú organoid kultúrák	26
4.5. A betegekből származó fibroblasztok izolálása.....	26
4.6. Ellenanyaggal fedett gyöngyökkel történő EV izolálás.....	27

4.7.	Egér eredetű EV detektálás anti-CD81 ellenanyaggal burkolt mágneses gyöngyökkel.....	28
4.8.	EV-k detektálása FACS Calibur áramlási citométerrel	28
4.9.	qNano mérések	28
4.10.	NTA mérések	29
4.11.	EV-k proteomikai analízise.....	29
4.12.	Liposzómák elkészítése és karakterizálása	30
4.13.	EV izolálás RNS analízisekhez	30
4.14.	RNS izolálás és RNS mérések	30
4.15.	TaqMan low density miRNA array.....	31
4.16.	Microarray analízis.....	32
4.17.	Szekvenálás	32
4.18.	Transzmissziós elektronmikroszkópia	33
4.19.	Wound-healing vizsgálat.....	33
4.20.	Immuncitokémia.....	34
4.21.	Szenescencia vizsgálat.....	34
4.22.	GSEA és túlélési analízisek.....	35
4.23.	Statisztikai módszerek.....	36
5.	Eredmények.....	37
5.1.	A 3D CRC organoid kultúrák által termelt EV-k detektálhatóak a felülúszóban 37	
5.2.	Az organoid eredetű EV-k fehérjéket és miRNS-eket hordoznak	42
5.3.	A tumort támogató kollagén I ECM fehérje serkenti az organoidok EV termelését	44
5.4.	Az <i>Apc</i> mutáció serkenti a 3D organoidok EV termelését	46
5.5.	A fibroblasztok aktiváltsága nincs hatással az EV termelésük intenzitására... 51	
5.6.	A TGFβ-indukált fibroblaszt aktiválás módosítja az EV-k miRNS cargo-ját. 54	

5.7. A TGF β nincs hatással a CRC betegeredetű fibroblasztok EV-kibocsátására	55
5.8. A CRC organoidokból származó EV-knek nincs jelentős hatásuk a fibroblasztokra	58
5.9. Hipoxiás körülmények között a fibroblaszt eredetű EV-k növelik az organoidok számát	62
6. Megbeszélés	64
7. Következtetések	69
8. Összefoglalás	70
8.1. Summary	71
9. Irodalomjegyzék	72
10. Saját publikációk jegyzéke	87
11. Köszönetnyilvánítás	89
Függelék	90

1. Rövidítések jegyzéke

2D – 2 dimenziós

3D – 3 dimenziós

APC – Adenomatous polyposis coli

ATCC – American Tissue Culture Collection

BME – Basement membrane extract (bazális membrán kivonat)

CAF – Cancer associated fibroblast (daganat asszociált fibroblaszt)

CIMP – CpG island methylator phenotype (CpG sziget metilátor fenotípus)

CIN – Chromosomal instability (kromoszóma instabil)

CMS – Consensus molecular subtype (konszenzus molekuláris altípus)

CRC – Colorectal carcinoma (kolorektális karcinóma)

ECACC – European Collection of Authenticated Cell Cultures

ECM – Extracelluláris mátrix

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid (etilén-diamin-tetraecetsav)

EGF – Epidermal Growth Factor (epidermális növekedési faktor)

EV – Extracelluláris vezikula

FAP – Familial Adenomatous Polyposis

FAP – Fibroblast-activating protein (fibroblaszt aktivációs fehérje)

FBS – Fetal bovine serum (fötális borjúsavó)

FU – Felülúszó

Fzd – Frizzled (receptor)

GSEA – Gene set enrichment analysis

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HGF – Hepatocyte growth factor (hepatocita növekedési faktor)

HNPCC – Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer

HOM – Human organoid medium

IBD – Inflammatory bowel disease (gyulladásos bélbetegség)

IL-11 – Interleukin 11

LRP – Lipoprotein receptor-related protein

MGMT – O⁶-methylguanine DNA methyltransferase

MLH – MutL homolog

MMR – Mismatch repair

MSH – MutS homolog

MVB – Multivesicular body (multivezikuláris test)

NCF – Normal colon fibroblast (normál bél fibroblaszt)

PBS – Phosphate-buffered saline

PTF – Peritumoral Fibroblast (peritumorális fibroblaszt)

SIM – Small Intestine Medium (vékonybél organoid médium)

STD – Short tandem repeat (rövid tandem ismétlődés)

TEM – Transmission elektronmicroscopy (transzmissziós elektronmikroszkópia)

TGFβ – Transforming growth factor-β (transzformáló növekedési faktor béta)

TME – Tumor microenvironment (tumoros mikrokörnyezet)

WT – Wild type (vad típus)

αSMA – α-smooth muscle actin (α-simaizom aktin)

2. Irodalmi áttekintés

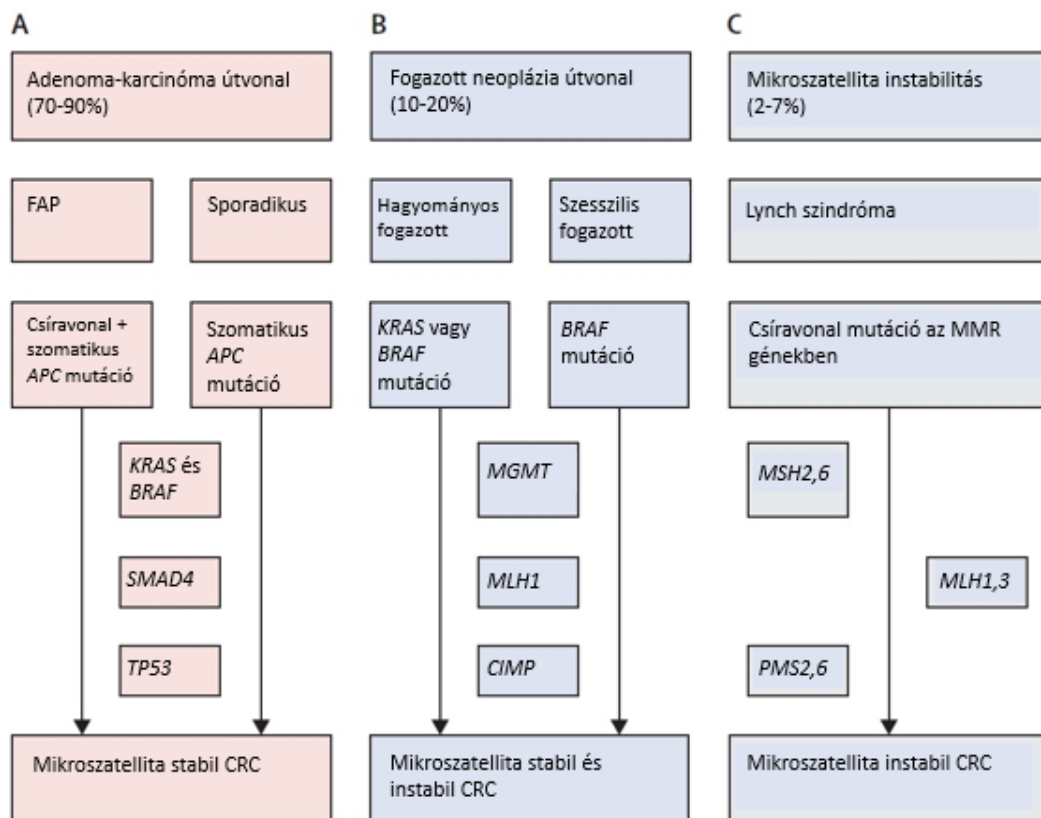
2.1. A vastag- és végbél tumorok jellemzői, főbb kiváltó okai

A nyugati populáció tagjainak legalább felében 70 éves korukra kialakul kolorektális neoplázia, ezeknek az eseteknek a 10%-a rosszindulatúvá is válik, így a kolorektális karcinóma (CRC) az egyik leggyakoribb oka a daganatos eredetű, halállal végződő betegségeknek [1]. Férfiak esetében a második, nők esetében a harmadik helyen áll a tumoros megbetegedések előfordulásának listáján, és földrajzi elterjedését tekintve inkább a fejlett országokra jellemző [2]. Hogy mi ennek az oka, arra több lehetséges magyarázatot is találhatunk. A fejlett országokban az utóbbi két évtizedben jelentősen megemelkedett a daganatszűrések gyakorisága, valamint egyre több diagnosztikai módszer áll rendelkezésre (kolonoszkópia, genetikai vizsgálat), így nem meglepő, hogy több CRC esetet regisztrálnak azokhoz az országokhoz képest, ahol a szűréseknek nincs megfelelő háttér [3]. Emellett természetesen az emberek életvitele, táplálkozása is hatással van a bélrendszerben a daganatok kialakulására. Egyre több kutatás támasztja alá, hogy megfelelő diéta (például tejtermékekben, rostokban, kalciumban, teljes kiőrlésű gabonákban gazdag étrend) segít a CRC megelőzésében. Ezzel szemben úgy találták, hogy a vörös húsok és a különféle feldolgozott húsipari termékek, melyek a fejlett országokban közkedvelt gyorséttermekben könnyen elérhetőek, elősegítik a betegség kialakulását [4]. Megelőzőként még fontos a dohányzás kerülése, valamint a fizikailag aktív életmód folytatása [5].

A CRC kialakulásának több útvonala is ismert. Az esetek túlnyomó többségében a betegség az adenoma-karcinoma útvonalon alakul ki, mely során a bélhám epithél sejteinek megváltozott működése miatt egy Lieberkühn-kripta környékén abnormális sejtszaporulat jelenik meg (polip, adenoma), majd ez a képződmény idővel (akár 10-15 év) rosszindulatú daganattá válik [6]. A sejtek megváltozott működésének a hátterében a betegek legnagyobb részében a mutáción átesett *adenomatous polyposis coli (APC)* gén áll, mely megjelenhet a csírvonalban, vagy sporadikusan a szomatikus sejtekben is. *Vogelstein* és munkatársai írták le a klasszikus útvonalként is ismert CRC kialakulási folyamatot, mely során az *APC* mutációt követően egyéb mutációk is szükségesek a

tumor kialakulásához (1. ábra A) [7]. Az így kialakult tumorokat mikroszatellita stabil CRC-nek is szokták nevezni.

Egy másik, alternatív útvonal az úgynevezett „fogazott” útvonal, ami a CRC esetek 10-20%-áért felel (1. ábra B). Ez az eset a *RAF* és *RAS* mutációkkal, epigenetikai instabilitással jellemezhető és CpG sziget metilációs fenotípust mutat. A folyamat során kialakulhatnak mikroszatellita stabil és instabil tumorok egyaránt. Az így létrejött tumorok morfológiailag megkülönböztethetőek a klasszikus adenoma-karcinoma típustól, hiszen itt a hagyományos polipok helyett fogazott polipok jelennek meg a bélben [8] Ezeket a kolorektális léziókat tovább lehet bontani szesszilis fogazott adenoma és hagyományos fogazott adenoma fő csoportokra, de előfordulnak hiperplastikus adenomák, vagy a fenti típusoknak a keverékei is [9]. Az egyes adenoma típusok fontosak a kezelés kiválasztása és a betegség kimenetele szempontjából [8].



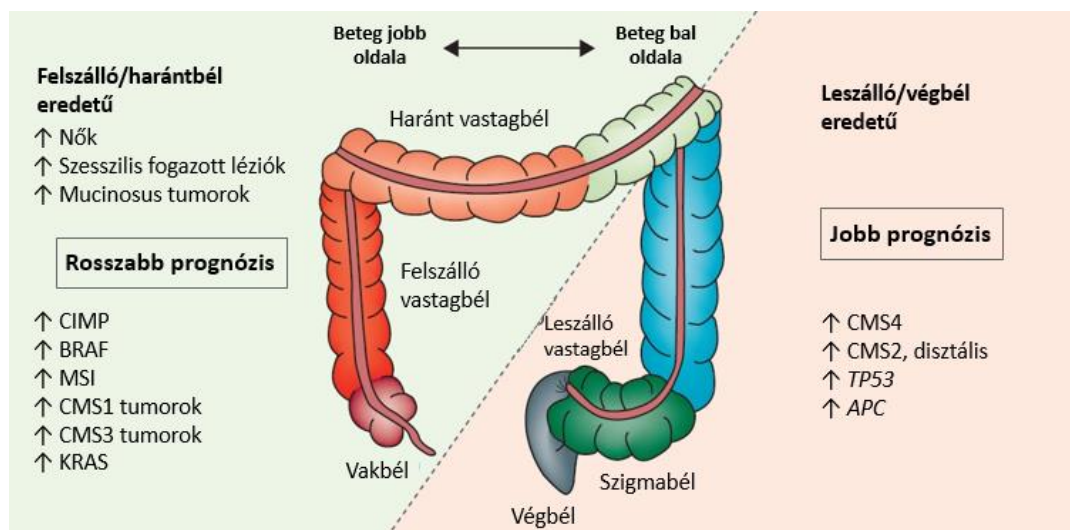
1. ábra. CRC fejlődési útvonalak.

A) A CRC esetek döntő többsége az adenoma-karcinoma útvonalon történik, melynek egyik fontos kezdeti lépése az *APC* mutáció kialakulása. B, C) A CRC kisebb gyakorisággal kialakulhat a fogazott neoplázia és a mikroszatellita útvonalon is. Az ábrát Dekker és mtsi nyomán a szerző módosította [5].

A mikroszatellita instabil útvonalra a DNS hibajavító enzimek hibás működése jellemző, a mismatch repair gének inaktíválódnak (1. ábra C). A jelenség háttérben csíravonal mutáció is állhat, ebben az esetben öröklődő betegségről beszélhetünk (Lynch szindróma) [5]. A mikroszatelliták rövid (1-6 bázispár) tandem ismétlődésű szakaszok (STR, short tandem repeat), melyek a genomnak hozzávetőlegesen a 3%-át teszik ki. A DNS szál másolása során ezek a tandem repeatek magas mutációs kockázatot jelentenek, amit normál esetben a DNS hibajavító enzimek korrigálnának. Ebben a CRC fejlődési útvonalban az MMR gének mutációja miatt ez a folyamat gátolva van, így a genomban instabilitás alakul ki, mely a mikroszatelliták ismétlődési egység szám változásában is megnyilvánul [10].

A fenti csoportosításnak egyéb nevezéktana is ismert, ami alapján az első (1. ábra A) csoport megfelel a kromoszóma instabil útvonalnak (CIN), a második (1. ábra B) a CpG sziget metilátor fenotípusnak (CIMP) [10].

A CRC-ben különféle molekuláris eltéréseket figyelhetünk meg, ha a jobb (proximális) és bal oldali (disztális) bélszakaszban kialakult tumorokat hasonlítjuk össze. A *TP53*, *KRAS*, *BRAFV600*, *PIK3CA*, *SMAD4*, *CTNNB1*, *GNAS*, és *PTEN* gének mutációs eloszlása különbözik a jobb és bal oldali kolon daganatok esetén. A felszálló ági kolon tumorral rendelkező betegek túlélési esélyei rosszabbak a leszálló ágiakhoz képest (2. ábra) [5, 11].



2. ábra: A leszálló és a felszálló ági kolon tumorokra eltérő mutációs mintázat jellemző. A különbségekből adódóan más a két CRC típus prognózisa és az alkalmazott terápiák hatékonysága is. Az ábrát Dekker és mtsi nyomán a szerző módosította [5].

Az utóbbi években génexpresszió alapján is állapítottak meg CRC altípusokat, létrehozva ezzel egy új csoportosítási rendszert. Ez egy nemzetközi együttműködés keretein belül valósult meg, ahol hatalmas adatmennyiség feldolgozását követően több független csoportosítás alapján végül négy konszenzus molekuláris alcsoportot (CMS, consensus molecular subtype) hoztak létre. A CMS1-re a mikroszatellita instabilitás jellemző, az ide tartozó tumorok erőteljesen aktiválják az immunrendszert és nagy mennyiségű mutációt tartalmaznak. A CMS2 a leggyakoribb, az esetek 37%-a ide tartozik. Jellemző rá a *WNT* és *MYC* jelátviteli útvonal aktiváltsága. A CMS3-ba tartozó tumorokban anyagcsere rendellenességek tapasztalhatók. A CMS4 egy mesenchymalis fenotípusú tumorcsoport, jellemző rá a TGF β jelátviteli út kiemelt aktivitása, a sztromális sejtek nagy száma és angiogenezis. A CRC esetek 23%-a ide tartozik [12].

2.1.1. A CRC kialakulásában szerepet játszó főbb jelátviteli útvonalak

A CRC kialakulása az esetek többségében három jelátviteli út módosulásával függ össze, ezek a TGF β , a WNT és az EGFR jelátviteli útvonalak [13].

- TGF β

A TGF β a sejteknek az egyik legsokoldalúbb jelátviteli útvonala, számos fontos folyamat szabályozásában vesz részt (differenciálódás, sejtosztódás, sejtmozgások), ezen kívül alapvető szerepe van az embrionális fejlődésben, sebgyógyulásban, érhalózat kialakulásában (angiogenezis) is [14]. A tumoros mikrokörnyezetben a TGF β fő termelői a tumor-asszociált fibroblasztok (CAF-ok) [15, 16], melyekről a későbbiekben részletesen is szó lesz a dolgozatban. A TGF β család tagjai inaktív formában szekretálódnak, majd az extracelluláris mátrixban (ECM) történik a tárolásuk [17]. Ahhoz, hogy a TGF β kifejthesse a hatását, az inaktív, tárolt formájából aktivált formába kell kerülnie. A TGF β 1 aktivátora például a plazmin, a mátrix metalloproteázok, thrombospondin-1, alacsony pH, illetve a reaktív oxigén gyökök [18]. A TGF β családba tartozó ligandok szerin/treonin kináz receptorokhoz kötődnek (I-es és II-es típusú receptorok). A ligand a II-es típusú receptorhoz kötődik, ami ezután toborozza és foszforilálja az I-es típusú receptort. Az I-es típusú receptor így aktiválódik, és el tudja látni a fő feladatát, ami a SMAD fehérjék foszforilálása. A foszforilált SMAD fehérje ezután bejut a sejtmagba, és ott különböző gének expresszióját szabályozza [19].

A TGF β számos sejtciklus ellenőrzési csomóponthoz (cell-cycle checkpoint) köthető gén szabályozója (p21, p27, p15), melyek aktiválódása a sejtek osztódásának gátlásához vezet [20]. Normál bél hámszövetben tumorszuppresszorként működik, mivel visszaszorítja a sejtosztódást [21]. Xu és munkatársai azonban azt is kimutatták, hogy a TGF β a daganatok kialakulásának csak a kezdeti szakaszában lévő sejtek esetén lát el tumorgátló feladatokat, az előrehaladottabb stádiumú tumorok működését, a metasztázist már elősegíti [22].

- WNT/ β -catenin

A WNT/ β -catenin jelátviteli útvonalnak fontos szerepe van különböző fejlődési folyamatok szabályozásában és a szöveti homeosztázis fenntartásában. Hatással van többek között a sejtosztódásra, differenciálódásra és a sejtek halálára [23, 24]. A WNT fehérjék a klasszikus ER-Golgi szekréción keresztül keletkeznek, palmitoilálódnak, majd az extracelluláris térbe jutnak, ahol a sejtek felszínén található Frizzled receptorhoz kötődhetnek a Fzd-Lrp5,6 komplexekben. Jelenleg három különböző útvonalat ismerünk a WNT receptorok aktiválására. Az első a kanonikus WNT/ β -catenin kaskád, amiről a legtöbb információval rendelkezünk, de létezik a nem kanonikus planáris sejt polaritás útvonal (Wnt-PCP), és a WNT/ Ca^{2+} útvonal is. Egy WNT receptor típust többféle WNT fehérje is aktiválhat. A kanonikus útvonal esetében a Wnt jelátvitel erősségét és hosszát szabályozza például az R-Spondin-1 fehérje, ami az LGR5 receptorhoz kapcsolódik, mely gátolja a Fzd inaktivációját és a WNT jel kikapcsolását. Minthogy a hosszan tartó és erős WNT jelátviteli út intenzitás kritikus a bélben található kripták őssejtjeinek az osztódásában, így az R-Spondin fehérjék nélkülözhetetlenek a bél epithelium homeosztázisának a fenntartásában [23].

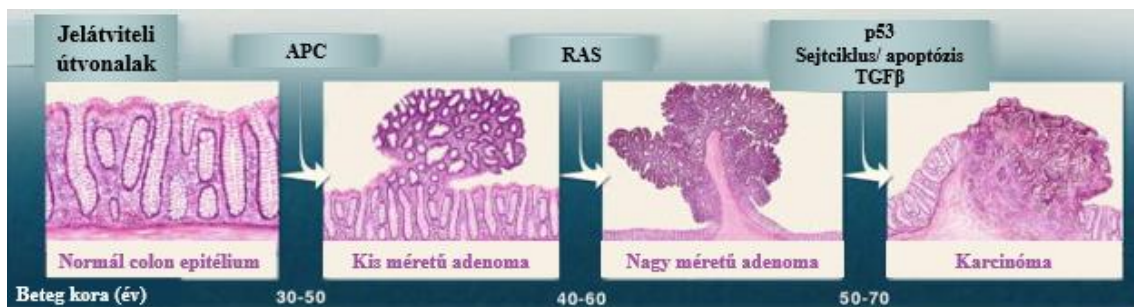
- EGFR/MAPK

Az EGFR egy transzmembrán fehérje, ami a tirozin kináz receptorok közé tartozik [25]. A jelátviteli útvonal több sejt-folyamat szabályozásában is részt vesz (növekedés, osztódás, túlélés), így az útvonal aberráns működése miatt ezeknek a folyamatoknak a megváltozott szabályozása tumorok kialakulásához vezethet [26]. A MAPK a szerin/treonin kináz család tagjaként számos, hierarchikusan működő foszforilációs-aktivációs lépést indít be a sejtek felszínétől kezdve a sejtmagig [27], és szabályozás szempontjából downstream helyezkedik el az EGFR-hez képest [28]. A jelátviteli útvonal

központi szereplői a kis GTP-áz RAS fehérjék, ahova a KRAS is tartozik [27]. Ha az útvonal szabályozása nem megfelelően működik, akkor az intenzív sejtosztódás, megnövekedett hatékonyságú túlélés, angiogenezis, anti-apoptózis, invázió és metasztázis miatt rosszindulatú daganatok kialakulását eredményezi CRC-ben, így az útvonal a daganat kezelésében terápiás célpontnak számít [29].

2.1.2. Genetikai mutációk felhalmozódása

A CRC egy tipikusan lassan kialakuló tumortípus, melynek kifejlődése évtizedekig is eltart, a fejlődése során pedig különféle genetikai mutációkat halmoznak fel a tumoros szövet sejtjei [1]. A betegek jelentős részénél az *APC* génben megjelenő inaktiváló mutáció központi CRC tumorigenezist kiváltó hatással bír (3. ábra). Az *APC* mutáció következtében a WNT útvonalban szereplő, citoplazmatikus multiprotein komplex működése kiesik, így a β -catenin nem ubiquitinálódik és nem bomlik le, felhalmozódik a citoplazmában és a sejtmagba transzlokálódik, ahol a TCF/LEF transzkripció faktorok kofaktoraként a WNT célgénnek átírását eredményezi. A Wnt jelátviteli útvonal folyamatos, külső ligandoktól független aktiváltsága ezáltal a sejtosztódás gyakoriságának megemelkedéséhez, valamint a bélhámsejtek differenciálódási folyamatának gátlásához vezet [7].



3. ábra: Az egészséges bélhámban *APC* mutációt követően adenomák, később további mutációk hatására rosszindulatú daganat jön létre. Az ábrát Vogelstein és mtsi alapján a szerző módosította [6].

2.1.3. Örökletes vastag- és végbél daganat

A környezeti hatások mellett örökletes tényezők is szerepet játszhatnak a CRC kialakulásában. Családi öröklődés vizsgálatok és ikervizsgálatok alapján a CRC-t kiváltó okok generációról generációra való átadásának esélye 12% és 35% között van [30]. A páciensek 5-7%-a esetén beszélhetünk egy ismert genetikai elváltozásból adódó örökletes szindrómáról, ami tumorhoz vezet [31]. Az örökletes CRC szindrómák közül a legtöbb ismerettel az örökletes nem polipózis CRC-ről (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC) és a familiáris adenomatosus polipózis (Familial Adenomatous Polyposis, FAP) betegségről rendelkezünk [1].

- HNPCC

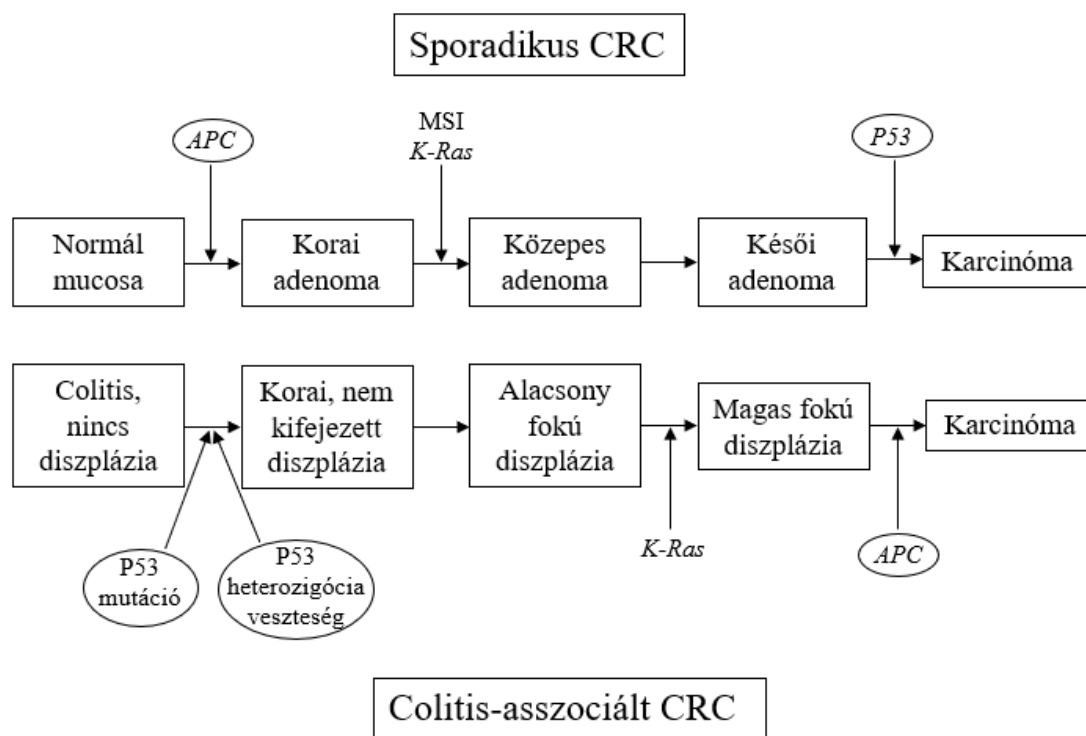
A HNPCC, vagy más néven Lynch szindróma egy autoszomális domináns öröklődésű szindróma, ami a DNS hibajavítási (mismatch repair) folyamatban résztvevő gének (*MSH2,6*, *MLH1,3*, *PMS1,2* gének) mutációja miatt alakul ki [32]. A betegség már 50 éves kor előtt jelentkezhet, az érintetteknek nagyobb a hajlama a kolorektális (főként jobb oldali), illetve azon kívüli tumorok fejlesztésére (endometrium, ovárium, vékonybél). Gyakran előfordul, hogy a páciensekben egynél több elsődleges daganat alakul ki [33].

- FAP

A FAP egy autoszomális domináns öröklődésű betegség, ami 1:7000 gyakorisággal jelenik meg a kaukázoid népességben. A betegség során az érintettek beleiben már 20-30 éves korukra több száz, vagy akár több ezer polip (adenoma) alakul ki. Habár ezek a polipok jóindulatú sejtgyűjtemények, azonban a hatalmas számuk miatt nagy az esély rá, hogy az egyik végül rosszindulatúvá válik, és kialakul a CRC [1]. A betegség hátterében a mutáns *APC* gén áll, azonban a mutáns gén örökletes formája a CRC eseteknek kevesebb mint 1%-át okozza. A FAP esetén jellemző a Knudson-féle két találat hipotézis, melynek lényege, hogy egy gén egyik allélja a csírvonalbeli mutációt hordozza, majd idővel a heterozigóta személy másik alléljában szomatikus mutáció következik be. Az *APC* gén homológja megtalálható az egérben is, így az *Apc*^{Min/+} egerekkel a CRC tumorigenezisének bizonyos lépései megfelelően tanulmányozhatóak [34].

2.1.4. Gyulladásos bélbetegségek és a CRC kapcsolata

Általánosan elfogadott tény, hogy krónikus gyulladásos bélbetegséggel (IBD, inflammatory bowel disease), küzdő betegeknél magasabb a CRC kialakulásának az esélye [35, 36], amit az is alátámaszt, hogy a CRC kialakulását befolyásoló kockázati tényezők között az IBD a harmadik helyet foglalja el a FAP és a HNPCC mögött [37]. Az IBD két fő formája a Crohn betegség és a colitis ulcerosa. A CRC patogenezise az IBD-ben még nincs teljesen felderítve, de a gyulladt bélhámiban több változás is bekövetkezik, ami később tumor kialakuláshoz vezethet, például epigenetikai változások, genetikai instabilitás, gyulladásos mediátorok miatt egészségestől szövettől eltérő immunválaszok, oxidatív stressz, illetve a bél mikrobiom megváltozása is jellemző [35]. A colitis-asszociált CRC kialakulásában a genetikai instabilitás miatt mutációk megjelenése is közre játszik, habár a mutációk felhalmozódása itt eltér a sporadikus CRC kialakulásra jellemző mutációs mintázattól (4. ábra) [38, 39].

**4. ábra. A sporadikus és a colitis-asszociált CRC molekuláris patogenezise.**

Számos olyan mutáció, ami szerepet játszik a sporadikus CRC progressziójában, fontos a colitis-asszociált CRC kialakulásában is, habár az egyes genetikai események a betegség kialakulásának eltérő szakaszaiban következnek be. Az ábrát Kim és mtsi. alapján a szerző módosította [35].

2.1.5. A bél mikrobiom és a CRC kapcsolata

A tumoros mikrokörnyezetben található mikrobiótákat manapság a tumorerő kialakulásában fontos környezeti faktornak tekintik például a kolorektumban, a májban és az epevezeték környékén kialakuló daganatok esetében [40]. Az utóbbi években egyre többen kezdték el kutatni a bélben található baktériumoknak a CRC kialakulásában betöltött szerepét, minek köszönhetően mára már tudjuk, hogy bizonyos mikrobák gyakrabban fordulnak elő a tumoros betegek széklet- és nyákmintáiban a nem tumoros páciensek mintáihoz képest [41]. A bél baktériumflórája és a daganatok közötti összefüggés elsősorban a mikrobiom és a bélgyulladás közti szoros kapcsolatból adódik. Számos kutatócsoport dolgozott az utóbbi évtizedben genetikailag módosított egér törzsekkel, és az úgynevezett germ-free törzsek minden esetben IBS mentesek voltak, ami arra utal, hogy a mikrobiom jelenléte kritikus faktor a bélben a gyulladások kialakulásához. A mikrobióta elsősorban a veleszületett immunrendszer stimulálásán keresztül váltja ki a gyulladást a bélhamban [42].

Clevers és mtsi. vizsgálták a CRC és a mikrobiom közötti összefüggést az organoid technológia felhasználásával (organoidok: háromdimenziós szövettényeszetek, bővebben a daganatkutatás sejtbioológiai eszközei fejezetben lesz róluk szó) [43]. Jól ismert tény, hogy az *Escherichia coli* az egészséges bélflórában is jelen lévő mikroba, azonban fontos tudni, hogy a baktériumtörzs B2 filogenetikai csoportja úgynevezett „pks” genomi szigettel rendelkezik, ami a Colibactin nevű genotoxin szintéziséért felel. A Colibactin igazoltan duplaszálú DNS töréseket indukál eukarióta sejtekben [44], így a pks+ baktériumok jelenléte összefügg a CRC kialakulásával [43]. A kísérletek során kolon organoidokat fertőztek pks+ *E. coli*-val 5 hónapon keresztül, majd teljes genom szekvenálást végeztek az organoidokon, és összehasonlították az eredményeket a fertőzés előtti szekvenálási adatokkal. A vizsgálatok kimutatták, hogy a pks+ baktériumokkal fertőzött organoidokban egy olyan mutációs mintázat alakult ki, ami főként a CRC sejtek genomjára jellemző [43].

Azonban nem minden baktériumtörzs vált ki gyulladást elősegítő hatást. A *Lactobacillus paracasei* az egyik legjobban karakterizált probiotikus törzs, melynek ismertek a gyulladáscsökkentő képességei is. Ráadásul Choi és mtsi. kimutatták, hogy a *Lactobacillus paracasei* eredetű extracelluláris vezikulák (EV - lásd bővebben a

következő fejezetben) visszaszorítják a CRC sejtek gyulladásos reakcióját. Az EV-k csökkentették a sejtekben pro-inflammatorikus citokinek (TNF α) expresszióját, és serkentették az anti-inflammatorikus citokinek (TGF β , IL10) kifejeződését [45].

2.2. A sejtek közti kommunikáció új formája: az extracelluláris vezikulák

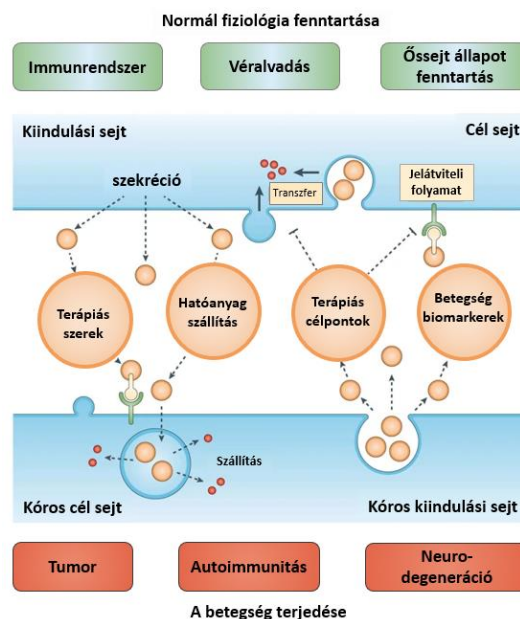
Az extracelluláris vezikulák (EV-k) lipid kettős réteggel körbevett struktúrák [46], eredetük szerint megkülönböztethetjük az endoszomális kompartmentből származó és a plazmamembránról lefűződő EV-eket [47]. Mivel az eredetükre specifikus egyedi EV markereket egyelőre nem sikerült azonosítani, így a MISEV2018 (Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018) útmutatásai alapján kerülni kell az endoszomális útvonalra utaló „exoszóma”, vagy a plazmamembrán lefűződésre utaló „mikrovezikula” elnevezéseket [46]. Az EV-k nem csak a kialakulásuk szempontjából, de a méretük alapján is nagyon heterogén struktúrák. A méret szerinti meghatározás alapján a 200 nm alatti vezikulák a kis EV-k, a 200 nm fölöttiek pedig a közepes/nagy EV-k, így ezt a két csoportot differenciál centrifugálással el lehet egymástól választani. Az EV-eket csoportosíthatjuk a biokémiai jellegeik alapján is, így pl a felszínükön található molekulák alapján (többek között a CD81, CD63, AnnexinV jelenléte vagy hiánya) [46].

Egyre több kutatási eredmény bizonyítja az EV-k intercelluláris kommunikációban betöltött fontos szerepét. Az EV-knek a sejtek közti kommunikációt befolyásoló jellege abból fakad, hogy képesek membránnal védett módon a vezikulák lumenjében, vagy a felszínükön fontos biológiai molekulákat (fehérjék, lipidek, nukleinsavak) szállítani [48]. Ezek a vezikulák által szállított cargo-k (cargo: a szállított molekulák) a kibocsátó sejtre specifikusak, így információt szolgáltatnak az EV-t termelő sejt típusáról, fiziológiai állapotáról (apoptózis, gyulladás, stb) [49]. Ez lehetőséget ad az EV-kkel kapcsolatban egy további csoportosítási módra, ami alapján beszélhetünk hipoxiás EV-kről, tumoreredetű oncoszómákról (large oncosome), vagy például az apoptotizáló sejtek által termelt apoptotikus testekről [46].

Az EV-k tumorfejlődésben betöltött szerepe egy nagyon intenzíven kutatott tudományterület. Ismert, hogy a tumoros szövet sejtjei több EV-t termelnek a normál

sejtekhez képest [50-52], azonban ennek a jelenségnek az okai még nem teljesen tisztázottak. Számos kutatócsoport, köztük a miénk is kimutatta, hogy az EV-k a tumorok növekedéséhez, fejlődéséhez fontos molekulákat, például EGFR-t képesek szállítani, amik a tumoros sejtek osztódását és az angiogenezist is serkentik [53-56].

Így tehát az EV-k előnyös tulajdonságai, melyek a sejtek normál fiziológiás állapotának fenntartásához elengedhetetlenek (molekulák védett módon, koncentráltan történő szállítása a sejtek között), a betegségek terjedéséhez is segítséget nyújthatnak. Az EV-k terápiás és diagnosztikai célú felhasználása többnyire még a kutatási és fejlesztési szakaszban van, azonban már megjelentek FDA által jóváhagyott, EV-alapú diagnosztikai eljárások. Ilyen például a Bio-Techne által kifejlesztett ExoDx Prostate IntelliScore (EPI) teszt, egy rutinszerűen alkalmazható folyadék biopsziás teszt, ami kiváltja a sokszor szükségtelen prosztata biopsziás beavatkozásokat. Az EV-eket a jövőben felhasználhatjuk különféle gyógyszer hatóanyagok célba juttatásához, illetve, ha ismert a hatásmechanizmusuk egy betegség kialakulásában, akkor terápiás célpontként vagy diagnosztikai eszközként is alkalmazhatóak (5. ábra) [57].



5. ábra Az EV-knek szerepe van a normál fiziológiás állapot fenntartásában és a betegségek terjedésében is. Az EV-k terápiás felhasználása során a vezikulákat használhatjuk gyógyszer szállító eszközökként, melyekkel specifikusan célba juttathatjuk a hatóanyagokat. Mivel a kóros sejtek által kibocsátott EV-k specifikusak a kibocsátó sejtre, így diagnosztikai célokra is használhatóak, illetve általuk beavatkozhatunk a kóros sejtek közti jelátviteli folyamatokba. Az ábrát EL Andaloussi S. és mtsai nyomán a szerző módosította [57]

2.3. A tumoros mikrokörnyezet CRC-ben

2.3.1. Tumorasszociált fibroblasztok

A tumorasszociált fibroblasztok (CAF-ok) heterogén sejtcsoportot alkotnak a daganatos szövetben, ahol többek között az extracelluláris mátrix (ECM) fő alkotóit termelik (kollagén, elasztin, fibronectin). CRC szövetekben a CAF-ok TGF β 1-et és TGF β 3-at szekretálnak, így a fibroblasztok mennyisége összefüggésben van a tumoros mikrokörnyezetben (TME) található egyéb sejtekben a TGF β jelátviteli út aktiváltságával [15, 16]. A TGF β azonban magukra a fibroblasztokra is hatással van, ez az egyik fő aktiváló faktoruk, az aktív fibroblasztok pedig fokozzák a metasztázist, részben az IL-11 termelésén keresztül [15]. A sztrómális fibroblasztok jelentősen elősegítik a CRC tumorigenezist a hepatocita növekedési faktor (HGF) termelésével, mely hozzájárul a tumor összejt fenotípust kialakításához a Wnt aktivitás fokozása által [58]. Így tehát a tumoros szövetben a CAF-ok mennyiségének növekedése negatívan befolyásolja a CRC betegek túlélését [16].

A CAF-okat gyakran az α -simaizom aktin (α -smooth muscle actin, α SMA) és a fibroblaszt aktivációs protein (FAP) fehérjék expressziója alapján azonosítják. Munkánk során peritumorális fibroblasztokkal (PTF) is dolgoztunk, melyek izolálása a tumoros szövet melletti normál szövetből történik, és gyakran alkalmazzák nem aktivált kontrollként a CAF-ok mellett [59]. Egy nemrég megjelent publikáció azonban összehasonlította a CAF-ok és a PTF-ek expressziós mintázatát, és csupán kis mértékű különbséget találtak a CAF-PTF párok tagjai között. Ebben a tanulmányban az α SMA-t általánosságban az aktivált fibroblasztok markereként használták, ami a PTF-ekben is jelen volt [60].

Összességében a CAF-ok nagy mértékben hozzájárulnak ahhoz, hogy a CRC sejtes heterogenitása és agresszív tumor összejt fenotípusa kialakuljon [58, 61]. Munkacsoportunk kimutatta, hogy a kolon fibroblaszt eredetű EV-k amphiregulin-t (AREG) szállítanak, és az EV-knek központi szerepe van a bélőssejt niche kialakításában [62]. Azonban az EV-knek, mint a CRC sejtek és a sztrómasejtek közötti szállítóeszközöknek a szerepe még mindig nem teljesen tisztázott.

2.4. A daganatkutatás sejtbiológiai eszközei

Az *in vitro* és *in vivo* modellek nagy jelentőséggel bírnak a tumorkutatásban, hiszen lehetővé teszik, hogy azonosíthassunk különféle karcinogén faktorokat, tesztelhetünk terápiákat és tumorelles szereket, illetve általuk beeláthatunk a tumorok fejlődésének és a metasztázis kialakulásának a molekuláris mechanizmusába. Míg az *in vivo* modellek nagy előnye, hogy a kísérleti rendszerben adott a komplexitás, addig hátrányuk, hogy az állatmodellek nem mindig tökéletesek a humán tumorok megismerésére. Míg emberben például a CRC a vastag- és a végebelet érinti, a modellként használt *Apc^{min/+}* egerek elsősorban a vékonybélben fejlesztenek tumorokat, melyek jóindulatú polipok. Ezzel szemben az *in vitro* kísérleti felállásban könnyebben befolyásolhatunk minden külső tényezőt (hőmérséklet, pH, faktorok, stb), így a kapott adatokat könnyebb értékelni, azonban az ilyen rendszereknek sokkal kisebb a fiziológiai relevanciája [63]. Az *in vitro* modellrendszer alatt általában a 2 dimenziós (2D) tumoros sejtvonalakkal (állat/humán) végzett kísérleteket értjük, azonban jelenleg a legkorszerűbb *in vitro* tumor modellnek a 3 dimenziós (3D) sejt- és szövetkultúrák számítanak [64].

2.4.1. A 2D és 3D sejt- és szövettenyésztési modellek összehasonlítása

Az *in vitro* sejttenyészetek a kutatások során gyakran alkalmazott betegség modellek, mivel, egy adott sejttípusból több sejtvonalat is létrehozhatunk, melyeknek eltér a genetikai háttere, mutációs mintázata. Ezáltal egy adott genetikai háttérrel rendelkező tenyészet egy adott betegséget modellezhet [65]. A különféle gyógyszerek tömeges szűrésére napjainkban is a 2D sejtvonalakat használják, főként egyszerűségük, reprodukálhatóságuk, alacsony költségük miatt [66]. Azonban a 2D rendszerekből hiányzik a komplexitás, a sejteket körülvevő heterotipikus környezet, betegségek modellezéséhez több dimenzióra van szükség (1. táblázat) [64]. Szervezetünkben a szövetek sejtei egy bonyolult 3D környezetben működnek, ahol hatással van rájuk az extracelluláris mátrix (ECM) váza, illetve az ECM egyéb sejtei. Enélkül a dinamikus, oda-vissza ható biokémiai és biofizikai támogatás nélkül a modellrendszerünkben

hiányozni fognak azok az információk, amik a sejt-sejt kommunikációs, sejt-ECM interakciós, az *in vivo* körülményekre is jellemző működésből fakadnak [67].

1. táblázat: A 2D és 3D szövettenyésztési technológiák összehasonlítása. A táblázatot Liu és mtsi alapján a szerző módosította [64].

	2D rendszer	3D organoid rendszer
Előállítás módja	Szilárd felületen, egy sejsorban növesztve	Matrigel-be ágyazva önszervező mechanizmussal
Előállítási idő	Gyors	Lassú
Sejt morfológia	Természetellenes: kilapulnak egy szilárd tenyész felületen	Sejttípusra jellemző méret és alak, hasonló az <i>in vivo</i> állapothoz
Sejttípusok	Általában egy típus. Nehéz együtt tenyészteni több sejttípust.	Heterogén sejttenyészet, hasonló az <i>in vivo</i> állapothoz
ECM	Korlátozott az összetétele és kapcsolata a sejtekkel	<i>In vivo</i> -szerű összetétel és sejt kontaktus
Szöveti felépítés	Hiányzik	Adott szervre emlékeztető komplex felépítés
Növekedési faktor és tápanyag diffúzió	Rövid diffúziós távolságok (csak a sejtmembránon keresztül), a sejtek általában fiziológiásnál magasabb adagot kapnak	Nem hatékony a transzport a belül elhelyezkedő sejtekhez, ami a sejtek halálához vezet
Vaszkuarizáció	Hiányzik	Hiányzik
High-throughput kísérletek	Lehetséges	Nem lehetséges
Kontrollálhatóság	Magas	Alacsonyabb
Genom-szerkesztés	Könnyű	Nehéz
Karakterizálás és elemzés	Sejtes és molekuláris elemzésekre korlátozódik; sejtek visszakeresése könnyű	Lehetséges szöveti funkció analízis; nehéz visszakeresni a sejteket; nehéz elemezni a belső sejt fenotípusokat. Fejlesztések elérhetőek fluoreszcens riporterekkel és egysejt-omika technológiákkal.

2.4.2. A CRC kutatásban használt sejtvonalak

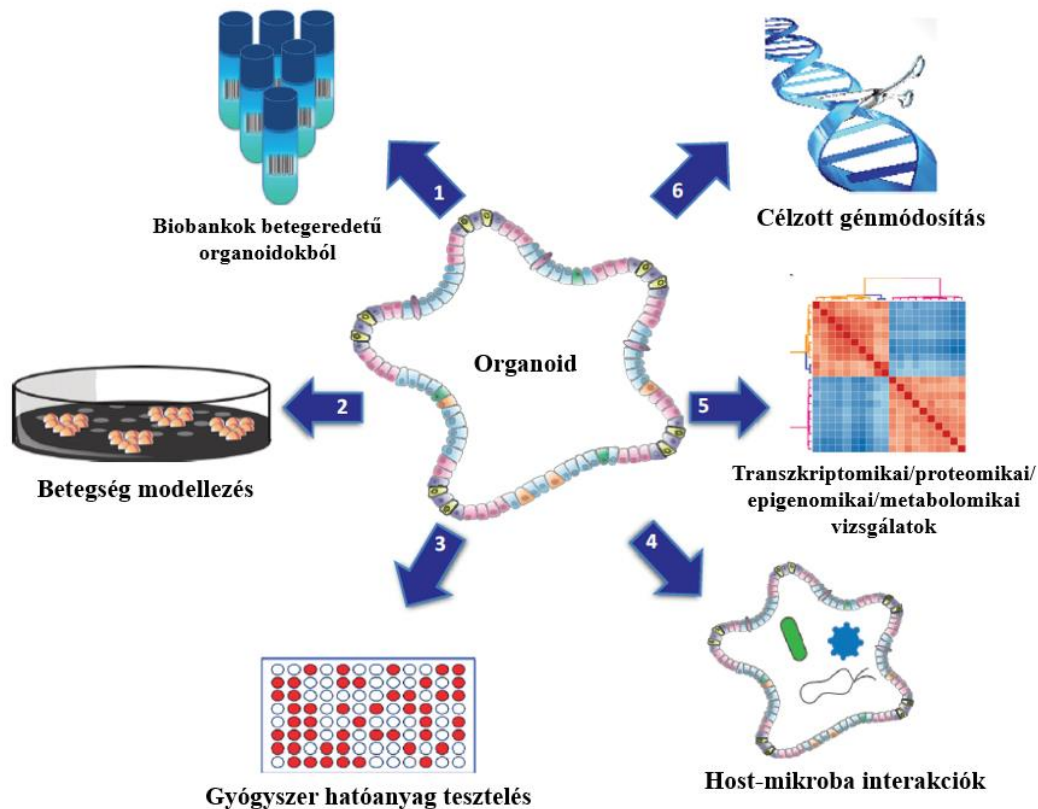
Annak ellenére, hogy a tumorkutatásban használt sejtvonalak klinikai relevanciáját időről időre megkérdőjelezzik, még ma is a humán tumor eredetű sejtvonalakokat használják leggyakrabban a daganatok biológiájának és a különböző kezeléseknél a tanulmányozására [68]. Az „omika” technológiák előtérbe kerülésével lehetővé vált a tumorok molekuláris szintű karakterizálása, és kiderült, hogy az egyes tumorok genetikai szinten mennyire heterogének [69]. Ezzel együtt a sejtvonallakkal szemben is elvárás lett, hogy ezt a nagyfokú heterogenitást lefedjék. A CRC az egyik legheterogénebb genetikai háttérrel rendelkező tumoros megbetegedés [70], így nem meglepő, hogy vizsgálatához számos sejtvonalt rendelkezésünkre áll. Berg és mtsi. 34 CRC sejtvonalt multi-omikai vizsgálatát és karakterizálását végezték el [71], az ilyen jellegű kutatások fontos segítséget nyújtanak a kutatók számára, hogy a tanulmányaikhoz a lehető legmegfelelőbb tumoros sejtvonalt választhassák ki.

2.4.3. A 3D szövettenyésztési technológia

A 3D szövettenyésztés során organoidokat hozunk létre önszerveződő össejtekből *in vitro* körülmények között [72]. Az organoid kifejezés már 75 éve ismert a tudományban, azonban ekkor a klasszikus fejlődésbiológiai kutatások során még csak a 3D sejttaggregátumokat (szferoid, spheroid) nevezték így [73]. Ma már képesek vagyunk organoidokat létrehozni humán, betegeredetű szövetekből, és mivel ezek az organoidok megtartják az eredeti szövetre jellemző sejtes heterogenitást, genetikai jellegzetességeket, így ezek a tenyészetek kiválóan alkalmasak humán betegségek vizsgálatára [72].

Organoidokat tenyészthetünk pluripotens össejtekből (embrionális össejt, indukált pluripotens össejt) vagy felnőtt össejtekből, melyek szövetspecifikusak [72]. A technológia fejlődése során az áttörést az egér bélszövet Lgr5+ össejtjeiből létrehozott tenyészetek jelentették. Az össejt-niche utánzásával folyamatosan osztódó tenyészeteket alakítottak ki, melyek megtartották az eredeti szövetre jellemző felépítést és funkciót. Az Lgr5+ össejteket, vagy az azokat tartalmazó kriptákat Matrigel-be ágyazták, amik meghatározott környezeti faktorok jelenlétében 3D organoidokat alakítottak ki (a Matrigel egy, az Engelbreth–Holm–Swarm tumoros sejtvonalt által szekretált mátrix, ami támaszt nyújt a fejlődő szövetnek) [74].

A felnőtt szöveti őssejtekből származó organoidok fiziológiailag kompatibilisek a gazdaszervezet normál szövetével, így ez a szövettenyésztési módszer az őssejt transzplantáció egy új módját jelentheti [75]. Az utóbbi években a kutatók organoid biobankok létrehozásán dolgoznak, melyekbe betegek mintáiból létrehozott organoidokat tárolnak. Wetering és mtsi. például CRC páciensek műtét során eltávolított tumoros szövetéből izolált organoidokat gyűjtött biobankba. Ezek a tumor organoidok lefedik a CRC genetikai alcsoportjait, így hatékony gén-gyógyszer kapcsolati vizsgálatokat lehet rajtuk végezni. A kutatások segítenek előre vinni a személyre szabott tumorterápiás kezelések kifejlesztését [76]. Az organoid technológiát ezek mellett felhasználják fertőzések vizsgálatára, különféle „omikai” változások nyomon követésére, illetve célzott génmódosításokat is végre lehet rajtuk hajtani (6. ábra) [72].



6. ábra: Az őssejt eredetű organoidok klinikai felhasználásának lehetőségei.

1) A betegeredetű organoidokból biobankokat lehet létrehozni, 2) különféle betegségeket lehet velük modellezni, 3) gyógyszer hatóanyagokat lehet rajtuk tesztelni. 4) Vizsgálhatjuk az organoidokon a sejtek és a fertőző mikrobák interakcióit (az organoid lumenjében van a sejtek apikális oldala), 5) különféle kezelések, mutációk hatására az „omikai” változásokat. 6) Az organoidokon célzott génmódosítást vihetünk végbe, mely során akár betegséget okozó mutációk is kijavíthatók (pl cisztás fibrózis esetén [77]). Az ábrát Dutta és mtsi alapján a szerző módosította [72].

3. Célkitűzések

Munkánk során elsődleges célunk a CRC sejtek és a sztromális fibroblasztok közti extracelluláris vezikulákon 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 kolon fibroblasztokra, és ha igen, milyen hatással?
4. A kolon 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 kolon fibroblasztok aktiváltsági foka befolyásolja-e az EV termelést, a kibocsátott EV-k tartalmát?

4. Anyagok és módszerek

4.1. A sejt kultúrák fenntartása

A HCT116, SW620 és HT29 sejt vonalakat Prof. Kali Alitalo-tól kaptuk a Helsinki Egyetemről, Finnországból. Az SW1222 sejt vonalat az ECACC-tól (European Collection of Authenticated Cell Cultures), az ATCC-1459 humán kolon fibroblasztot az American Tissue Culture Collection-tól vásároltuk. A Thp1 sejt vonal szintén az ATCC-től származik. A sejteket DMEM médiumban tartottuk (DMEM high glucose, Gibco-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 10% FBS (Gibco), glutamine és Penicillin/Streptomycin (Gibco) hozzáadásával. EV izolálás előtt a sejteket 3x mostuk PBS-sel, majd a következő 48 órában FBS-mentes médiumban, 2,5% EV-mentes FBS-t tartalmazó médiumban, vagy nem teljes CRC organoid médiumban (lásd később) voltak tenyésztve. Az EV-mentes FBS egész éjszaka tartó 100 000g-s centrifugálással állítottuk elő, vagy a Gibco cégtől szereztük be (exosome-depleted One-shot FBS). A sejteket a tenyészedények aljáról TrypLE (Gibco) hozzáadásával távolítottuk el, majd Bürker-kamrában számoltuk meg. 3D sejttenyészetek indításához a sejteket TrypLE segítségével felszedtük a tenyészedény aljáról, majd sejt vonalától függően 5000-10000 sejtet Matrigel (Corning) mátrixban tenyésztettünk 12-14 napig. A sejt kultúrák Mycoplasma fertőzöttségét rendszeresen ellenőriztük Hoechts festéssel, és a kísérleteink során csak fertőzésmentes kultúrákat használtunk.

4.2. *Apc*-mutáns egér organoidok létrehozása

A Pest Megyei Kormányhivatal, mint állategészségügyi hatóság, engedélyezte számunkra az egerek fenntartását és a velük való kísérletek elvégzését. A normál kriptákat C57Bl/6J (Jackson Laboratory, 000664) vagy UBI-GFP (Jackson Laboratory, 004353) egerekből származó bélszövetből izoláltuk.

Az izolálás során a vékonybelet felnyitottuk, PBS-sel mostuk, majd a szövetet végig PBS-ben tartva 0,5 cm-nél kisebb darabokra vágtuk. Alapos mosás után a szövetdarabokat EDTA-ban (ethylenediaminetetraacetic acid) inkubáltuk 30 percig 4 °C-on. Az emésztést követően centrifugálással elkülönítettük a kriptákat a sejtektől.

Hozzávetőlegesen 1000 kriptát ágyasztunk be növekedési faktor csökkentett és fenolvörös-mentes Matrigel-be (Corning), 48 lyukú lemezen egy 20 μ l-es cseppet helyeztünk el egy-egy lyuk alján. Az így elindított kultúrákat vékonybél organoid médiumban tartottuk (SIM, small intestine medium), mely az alábbiakat tartalmazta: advanced DMEM/ F12 médium (Gibco), B27 és N2 kiegészítők (Gibco), 10 mM HEPES (Sigma), 1 μ M N-acetil cisztein (Sigma), glutamin, penicillin/streptomycin antibiotikum, 100 ng/ml noggin (Peprotech), 50 ng/ml EGF (Peprotech) és 500 ng/ml egér R-Spondin1 (R&D Systems). Az organoidok passzálása 4-5 naponként szükségessé vált, ekkor erőteljes pipettázással különválasztottuk egymástól, majd új Matrigel mátrixba tettük a kriptákat.

Néhány kísérletben az organoidokhoz GSK-3 gátló CHIR99021-t (3 μ M, Tocris) adtunk, amit DMSO-ban oldottunk fel, kontrollként 1% DMSO-t vagy 100 ng/ml egér Wnt3a-t (Peprotech) alkalmaztunk 3 napon keresztül, mielőtt a mintákat előkészítettük immunhisztokémiai jelöléshez. Ezen kísérletek során az EV-eket az organoid felülúszóból 3 nappal a kezelést követően anti-CD81 ellenanyaggal fedett gyöngyökkel izoláltuk, az EV izolálási módszerről a későbbiekben részletesen is szó lesz (ellenanyaggal fedett gyöngyökkel történő EV izolálás fejezet).

Az általunk használt egér *Apc* sgRNS szekvenciát, amit korábban már publikáltak (sgRNS4, [77]), lentiCRISPR v2-be (Addgene 52961) klónoztuk a BsmBI restrikciós helyekre az Addgene felhasználói útmutatójának megfelelően. Az *Apc* mutáns organoidok a korábban már publikált [77], általunk kissé módosított protokoll alapján lettek létrehozva. Az organoidokat SIM-ben tenyésztettük a GSK-3 inhibitor CHIR99021 jelenlétében, majd 2 nap elteltével TripLE hozzáadásával egysejtes szuszpenziót hoztunk létre a tenyészetből. Centrifugálás után a sejt pelletet felszuszpendáltuk SIM-ben, amihez még CHIR9902-t és 10 μ g/ml Y-27632-t (Rho-kináz gátló, Sigma) is adtunk, majd 48 lyukú lemezen 400-400 μ l-t tettünk ki ebből a keverékből. Az így kirakott sejteket JetPEI (Polyplus Transfection) segítségével transzfektáltuk 1 μ g plazmid és 2 μ l JetPEI reagens hozzáadásával a felhasználói útmutatónak megfelelően. A sejteket 600g-vel szobahőmérsékleten 1 órán keresztül centrifugáltuk, majd további 4 órán át inkubáltuk 37 °C-on. Mosás után a sejteket Matrigel-be ágyazva kiraktuk plate-re Y-27632-t is tartalmazó SIM-ben. A médiumból 3 nap elteltével eltávolítottuk a Rho-kináz gátlót, az

R-Spondin 1-et, a noggint és az EGF-et, így az *Apc* mutációval rendelkező organoidokat a következő 6 napban ki tudtuk szelektálni.

4.3. Humán organoid kultúrák létrehozása

A humán minták felhasználása az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT-TUKEB) engedélyével (51323-4/2015/EKU), valamint a betegek írásbeli hozzájárulásával történt. A szövetdarabok feldolgozását a korábban publikált eljárás alapján végeztük [76, 78]. A szövetmintát hideg PBS-ben tartottuk feldolgozásig, majd steril olló és csipesz segítségével 1-2 mm nagyságú darabokra vágtuk szét. A feldarabolt mintát 5x mostuk PBS-sel, majd a szövetdarabokra emésztő puffert tettünk (20% FBS (Gibco) tartalmú DMEM high médium (DMEM high glucose, Gibco-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), penicillin/streptomycin [Invitrogen], 75 U/mL IX-es típusú kollagenáz [Sigma], 125 µg/mL II-es típusú diszpáz [Invitrogen], DNáz I (Invitrogen)), majd a mintát 37°C-os inkubátorban tartottuk 45-90 percig, a mintát tartalmazó csövet 15 percenként egy percig vortexeltük, hogy gyorsítsuk a folyamatot. Az emésztés után a mintát alaposan szétpipettáztuk 10ml-es hegytel felszerelt pipettorral, amíg a szövetdarabok szét nem estek. A nagyobb, emésztetlen darabokról óvatosan leszívtuk a kriptákat és a sejteket tartalmazó felülúszót, sorozatos centrifugálással elválasztottuk a kriptákat tartalmazó frakciót a minta többi részétől. Az egysejtes frakciót a későbbiekben felhasználtuk fibroblasztok izolálására, ahogy az a 4.5-ös bekezdésben (betegeredetű fibroblasztok izolálása) is olvasható. Az izolált kriptákat ezután Matrigel-be ágyaztuk, a mintákra humán organoid médiumot (HOM) tettünk, melynek az alkotói a következők: advanced DMEM/F12 N2 és B27 kiegészítővel, 10 mM HEPES, 1 mM N-acetil cisztein, glutamine, penicillin/streptomycin, 500 nM A83-01 (Sigma), 10 µM SB202190-Monohydrochloride (Sigma) és 50 ng/ml epidermális növekedési faktor (EGF). Az izolálás után közvetlenül, illetve a későbbiekben azoknál a passzálásoknál, ahol az organoidokból egysejtes szuszpenziót csináltunk, a tenyészmédium két napon keresztül tartalmazott Rho-kináz gátlót is (Rho-kinase inhibitor Y27632, Sigma). Az organoidokat 4-6 naponta passzáltuk, melynek során a Matrigel-be ágyazott organoidokat mechanikailag szétszedtük, PBS-ben felvettük, 300g-vel 5 percig centrifugáltuk, majd új Matrigel mátrixban újra kiraktuk a cseppeket új tenyészmedényekbe. Bizonyos esetekben

szükség volt rá, hogy passzálás során egysejtes szuszpenziót hozzunk létre az organoidokból, ekkor TripLE kezelést is alkalmaztunk.

Néhány kísérlet során a fent leírt passzálási eljárást követően az organoidokat nem Matrigel-be ágyztuk, hanem 24 lyukú szuszpenziós lemezen (Eppendorf) HOM-ban tartottuk. A hipoxiás kísérleteket AnaeroGen 5,5L-es zsákok (Thermo Fischer) segítségével végeztük. A hipoxiás körülményeket anaerob indikátorral (Thermo Scientific, BR0055B) ellenőriztük. Amikor az organoid eredetű EV-k fibroblasztokra kifejtt hatását vizsgáltuk, az organoidokat két napon keresztül tenyésztettük friss HOM-ban (kb 1×10^6 sejt/lyuk), majd az izolált EV-eket 1×10^5 fibroblaszthoz adtuk EV-mentes médiumba keverve. A microarray kísérletek során az EV-k $1,5 \times 10^6$ sejtről lettek izolálva, majd 2×10^6 fibroblaszthoz lettek hozzáadva.

4.4. Kollagén-alapú organoid kultúrák

Az organoidokat eltávolítottuk a Matrigel-mátrixból, centrifugáltuk 300g-vel 5 percre, kétszer mostuk PBS-sel, majd I-es típusú kollagénbe (rat tail, Ibbi) ágyztuk. 100 μ l kollagén keverékhez 60 μ l vizet, 10 μ l 10x MEM-et (Gibco) és 30 μ l kollagén I-et kevertünk össze, és a pH-t 1M-os NaOH-val beállítottuk 7,2-re. Ezután ezt összekevertük a fent leírt módon megtisztított organoidokkal, majd a tenyészedények (48/24 lyukú lemez, Eppendorf) aljára kirakott cseppekben növesztettük a kultúrákat HOM-ban. Az organoidok kollagén mátrixból való eltávolításához a cseppeket kollagenáz II-vel (Sigma) kezeltük 30 percre keresztül 37 °C-on, majd a cseppek szétpipettázását követően a sejteket ismét centrifugáltuk.

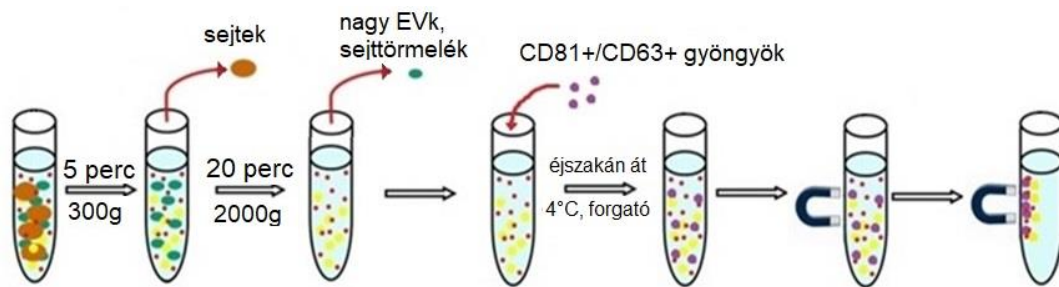
4.5. A betegekből származó fibroblasztok izolálása

A peritumorális (PTF) és tumor asszociált fibroblasztok (CAF) izolálása során a betegekből származó szövetet úgy jártunk el, ahogy az a 4.3. fejezetben ismertetésre került (humán organoid kultúrák izolálása). Az emésztés után a mintát alaposan szétpipettáztuk 10 ml-es hegytel felszerelt pipettával, amíg a szövetdarabok szét nem estek. Ezután a sejteket tartalmazó felülúszót lepipettáztuk a megmaradt nagyobb szövetdarabokról, centrifugacsőbe tettük és 5 percre 300g-vel centrifugáltuk. A sejteket

tartalmazó pelletet petricsészébe tettük és médiumot (DMEM high glucose, GlutaMAX (Gibco), 10% FBS (Gibco), cyprofloxacin, antibiotikum/antimycotikum keverék) tettünk rájuk. Másnap a nem letapadó sejteket eltávolítottuk a tenyészetből.

4.6. Ellenanyaggal fedett gyöngyökkel történő EV izolálás

A sejteket 10-14 napig növesztettük a tenyészedényben, majd két nappal az EV izolálás előtt a sejtekről a használt médiumot friss, EV-mentes FBS-t (2%, Gibco One-Shot Exo-free FBS) tartalmazó, vagy FBS mentes tápra cseréltük. 48 óra után a sejtekről a felülúszót centrifuga csövekbe tettük. A felülúszóból differenciál centrifugálással (300g / 5 perc, majd 2000g / 20 perc) eltávolítottuk a sejttörmelékét és a nagyobb méretű vezikulákat, elsősorban apoptotikus testeket (7. ábra). Az izolálás lépéseit kontrollként üres EV-mentes médiummal is elvégeztük.



7. ábra Az ellenanyaggal fedett mágneses gyöngy alapú EV izolálás lépései. Az első centrifugálással (300g) a sejteket, a másodikkal (2000g) az apoptotikus testeket és a sejttörmelékét távolítjuk el a felülúszóból. Ezt követi az EV-k ellenanyaggal fedett mágneses gyöngyökhöz való kötése, majd szeparálása.

A centrifugálás után kapott felülúszóból 250µl-t gyöngyöz kötéshez alkalmas, kónusz nélküli csövekbe tettük (0,5ml, Cryogenic vials, CryoKing), majd a mintákhoz 20µl anti-CD63, illetve 6 µl anti-CD81 ellenanyaggal konjugált mágneses gyöngyöt adtunk (Invitrogen™ Exosome-Human CD63/CD81 Isolation/Detection Reagent). A gyöngyöket előzőleg 0,1%-os BSA-val (Sigma) blokkoltuk 20 percen keresztül, hogy megelőzzük az EV-k aspecifikus kötődését a gyöngyökhöz. Ezt követően 4°C-os hűtőben éjszakán át forgattuk a csöveket az optimális EV-gyöngy kötés céljából. A sejtfelülúszó leszívása után a tenyészedényekben maradt sejteket minden esetben megszámoltuk tripánkék festést alkalmazva, az áramlási citometriával (FACS) kapott eredményeket erre a sejtszámra normalizáltuk.

4.7. Egér eredetű EV detektálás anti-CD81 ellenanyaggal burkolt mágneses gyöngyökkel

Az anti-CD81 ellenanyagot (MA180209, Thermo Scientific) mágneses gyöngyökhöz kötöttük Dynabeads Antibody Coupling Kit (Invitrogen) segítségével, a felhasználói útmutató alapján 10 µl ellenanyagot kötöttünk 2 mg gyöngyökhöz. A FACS mérést megelőzően 2 µl ellenanyaggal fedett gyöngyöt adtunk 200 µl felülúszóhoz, a már korábban leírt (4.6.) eljárás szerint. Az inkubálás másnapján a mintákhoz PE konjugált CD81 ellenanyagot (MA517941, Thermo Scientific) adtunk, a pozitív EV-eket áramlási citométerrel detektáltuk, az eredményeket sejtszámra normalizáltuk.

4.8. EV-k detektálása FACS Calibur áramlási citométerrel

Az éjszakán át történő inkubálás során az EV-k az ellenanyaggal fedett gyöngyökhöz kötődtek, majd a mintákat áttettük 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe. A gyöngyöket mágneses állvány segítségével (DynaMag™-Spin, Invitrogen) szeparáltuk a sejtfelülúszóból. A gyöngyöket ezután háromszor mostuk PBS-sel, 2-2 µl fluoreszcens festékkel konjugált ellenanyagot adtunk a mintákhoz: egér anti-humán CD63-PE (SAB47000218, Sigma), egér anti-humán CD81-FITC (A15753, Molecular Probes), FITC Annexin V (SAB4700218, Sony), majd a mintákat 20 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A 20 perc letelte után a felesleges festéket tartalmazó PBS-t leszívtuk a mintákról mágneses állvány segítségével, a mintákat egyszer mostuk PBS-sel. A minták ezután FACS-csővekbe kerültek 300µl PBS-ben. A gyöngyök felületén lévő EV-eket FACS Calibur (BD) áramlási citométerrel megfelelő lézerbeállítások mellett detektáltuk (pozitív gyöngyök aránya).

4.9. qNano mérések

A sejtenyészetek/organoidok médiumában az EV-eket 48 órán át gyűjtöttük, majd a felülúszót centrifugáltuk 300g-vel 5 percig, majd 2000g-vel 20 percig, ezzel eltávolítottuk a sejteket és a sejttörmelégeket. Ezután a felülúszót qNano-val (Izon) elemeztük. SW1222

esetén az FU-t közvetlenül a 300g-s centrifugálás után elemeztük 100, 400, 800 vagy 2000 nm-es pórusméretű membránnal. Minimum 500 adatpontot gyűjtöttünk, amikor ez nem volt lehetséges, akkor a mérés 5 percen keresztül történt. A kalibráló gyöngyök (CPC100B vagy CPC400G, Izon) a mérés során használt minta saját médiumában lettek felfuszpendálva.

4.10. NTA mérések

A fibroblasztokat FBS-mentes médiumban tenyésztettük, és a méréseket mindig azonos tenyésztési körülményeket követően végeztük (6 lyukú lemez, 300 000 sejt/lyuk, 1,5 ml médium/lyuk). A fibroblaszt FU-kat 4 napig gyűjtöttük, 0,5 ml FU-t sorozat centrifugáltunk (300g 5 percig, 2000g 20 percig, 12500g 20 percig), majd a FU-val dolgoztunk tovább. 100 µl mintából 10x-es hígítást csináltunk PBS-sel, majd partikulum méreteloszlást és koncentrációt mértünk ZetaView Z-NTA műszer segítségével (Particle Metrix). Minden méréshez 11 sejt pozíciót vizsgáltunk 25 °C-on. A következő kamerabeállításokat használtuk: auto expose, gain: 28.8, offset: 0, shutter: 100, sensitivity: 80. A videót minimum 20-as fényerőn vizsgáltuk a ZetaView Analyze 8.05.10. szoftverrel.

4.11. EV-k proteomikai analízise

Organoid eredetű EV-k esetén a CRC organoidokat 20 µl-es Matrigel cseppekben tenyésztettük 48 lyukú lemezen 200 µl HOM-ban, majd a FU-t minden második nap eltettük. Az egy organoid vonalból származó mintákat egyben gyűjtöttük, majd az EV-ket differenciál ultracentrifugálással különítettük el összesen 23 ml FU-ból. Kontrollként organoid-mentes Matrigel cseppeken tartott HOM-ot használtunk, amit szintén ultracentrifugáltunk. Az EV pelletet 80 µl vízben vettük fel, majd a fehérjéket többször ismételt fagyasztási-olvasztási ciklussal, szonikálással, emésztéssel tártuk fel, a korábban már publikált módszer alapján [79]. A fehérje koncentrációt Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) segítségével mértük meg. A tömegspektrometria előtti EV előkészületeket [79] alapján tettük 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.

4.12. 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).

4.13. EV izolálás RNS analízisekhez

A sejt- vagy organoid felülúszót a gyűjtés után sorozat centrifugáltuk (300g 5 perc, 2000g 20 perc, 12500g 20 perc), majd a kis méretű EV-eket ultracentrifugálással izoláltuk (100.000g 70perc, majd PBS-es mosással újra 100.000g 70 perc). A miRNS detektáláshoz az ultracentrifugálással szeparált EV-eket vagy a CD63/81 ellenanyaggal fedett gyöngyökkel izolált EV-eket használtuk. Alternatív megoldásként az EV-eredetű RNS-t ExoRNEasy Serum/Plasma Starter Kit (Qiagen) segítségével izoláltuk 2 ml felülúszóból a gyártó útmutatásai alapján.

4.14. RNS izolálás és RNS mérések

Az RNS-t RNeasy Micro Kittel (Qiagen), a totál RNS-t (kis méretű RNS-ekkel) pedig miRNeasy Micro Kittel (Qiagen) izoláltuk a felhasználói útmutató alapján, melynek utolsó lépéseként az RNS-t 15 µl desztillált vízben eluáltuk az oszlopról. Néhány kísérletben az EV-eredetű miRNS-eket ExoRNEasy Serum/Plasma Starter Kittel (Qiagen) nyertük ki. Az RNS koncentráció meghatározására NanoDrop készüléket (ND-1000 Spectrophotometer) használtunk.

A miRNS-sel végzett kísérletekhez 2 µl total RNS-t írtunk vissza a TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kittel (Thermo Fisher) a felhasználói útmutató alapján. A PCR reakciókat TaqMan® Fast Advanced Master Mix és TaqMan® Advanced miRNA Assays (Thermo Fisher) segítségével végeztük el. A Ct küszöbértékét 35 ciklusnál határoztuk meg, ez alatt vettünk egy eredményt pozitívnak, és az eredmények ábrázolásakor a 35-Ct értékeket használtuk.

Az mRNS mérésekhez RNS-t izoláltunk az organoidokból, illetve a fibroblasztokból, majd az izolátumból 0,5 µg total RNS lett visszairva cDNS-sé SensiFast™ cDNA Synthesis Kit (Bioline) segítségével a felhasználói útmutató alapján.

A kvantitatív polimeráz lánreakciós méréseket SensiFAST™ SYBR Hi-ROX Kit (Bioline) segítségével végeztük SybrGreen detektálási módszerrel, a reakcióelegy összetétele 384 lyukú plate-en lyukanként a következő volt: 2µl cDNS-víz mix és 3µl primer-puffer mix, így a reakció 5 µl térfogatban zajlott (a primerek listája a 2. táblázatban található). A mérést Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR gépen végeztük. Az eredményeket az alábbi formula alapján számítottuk ki:

relatív expressziós szint = $2^{-\Delta Ct}$, ahol $\Delta Ct = Ct(\text{vizsgált gén}) - Ct(\text{housekeeping gén})$.

2. Táblázat. A qPCR analízishez felhasznált primerek

hACTA2_fw	CTGACCCTGAAGTACCCGAT
hACTA2_rev	GTCATTTTCTCCCGGTTGGC
hIL11_fw	GACAAATTCCCAGCTGACGG
hIL11_rev	CGCAGGTAGGACAGTAGGT
hFAP_fw	GGAAATGAGCTTCCTCGTCC
hFAP_rev	GGTGGATCTCCTGGTCTTTG
hGAPDH:fw	GGGTGTGAACCATGAGAAGT
hGAPDH_rev	CAGTGATGGCATGGACTGTG
hHPRT1_fw	TGAGGATTTGGAAAGGGTGT
hHPRT1_rev	TCCCCTGTTGACTGGTCATT
mMuc2-fw	TGCTATGTGCCTGGCTCTAA
mMuc2-rev	GCAGGTGGGTCTTCTTCAG
mAlpi-fw	GGAACAAGAAGGCAGCTGAA
mAlpi-rev	GGGTGTCTCCGGTCCTAGAT
mLgr5-fw	CCTGTCCAGGCTTTCAGAAG
mLgr5-rev	CTGTGGAGTCCATCAAAGCA
hIL6_fw	ATTCCAAAGATGTAGCCGCC
hIL6_rev	AGTGCCTCTTTGCTGCTTTC
hHBEGF_fw	TTATCCTCCAAGCCACAAGC
hHBEGF_rev	CCCATGACACCTCTCTCCAT

4.15. TaqMan low density miRNA array

A normál kolon fibroblasztokat (NCF) 10 ng/ml TGFβ hozzáadásával vagy anélkül tenyésztettük (6 lyukú lemez, 300.000 sejt/lyuk, 1,5 ml médium). A sejteket 4 napig tenyésztettük, majd az FU részecske koncentrációját sorozatos centrifugálás után (300g 5 perc, 2000g 20 perc, 12500g 20 perc) NTA-val mértük, majd 5×10^8 partikulumot 1 ml

PBS-ben vettünk fel. Az így elkészített mintát CD63 (40 μ l) és CD81 (12 μ l) ellenanyaggal konjugált mágneses gyöngyökkel inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Az inkubálás után a mintákat 5x mostuk PBS-sel, majd az így izolált EV-eket Qiazol-lal (Qiagen) lizáltuk. A teljes RNS-t a kis méretű RNS-sekkel együtt miRNeasy Micro Kit (Qiagen) segítségével izoláltuk felhasználói útmutató alapján 15 μ l vízben. 2 μ l teljes RNS-t Megaplex RT primerekkel visszaírtunk, Megaplex PreAmp Primerek segítségével felamplifikáltunk, végül TaqMan™ Array Human MicroRNA Card v2.0 felhasználásával vizsgáltunk a felhasználói útmutató alapján (minden reagens a Thermo Fisher-től származott). Az Array kártyákat ABI 7900HT műszerrel mértük le, és Ct<40 értékeket tekintettük miRNS-nek a mintákban. Ezután kiválasztottuk azokat a miRNS-eket, amik hiányoztak mindhárom kontrollból és jelen voltak a TGF β -kezelt mintákban (n=3). Háttérként sejtmentes lyukakról származó médiumból származó izolátumot is mértünk (n=2).

4.16. Microarray analízis

Az RNS minőségét Bioanalyzer Pico Chip (Agilent) 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 (Agilent) használtunk, Chipster-be importáltuk (www.chipster.csc.fi), majd standard Agilent one-color normalizációs módszert végeztünk. Az előszűrés során eltávolítottuk azon adatokat, melyek az 1SD-n belüliek voltak (százalék a kiszűréshez: kb 0,67, ami kb 1 SD). Az expressziós különbséget mutató géneket az empirikus Bayesian párosított t-próba használatával listáztuk ki. Az előszűrt géneket Pearson-távolsági módszerrel csoportosítottuk hierarchikusan. A microarray adatokat feltöltöttük a GEO adatbázisba (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) GSE114979 sorozatszámmal.

4.17. Szekvenálás

A cDNS-t a Phusion High Fidelity DNA Polymerase-zal (Thermo Fisher) amplifikáltuk fel a következő primerekkel: p53: TGA AGC TCC CAG AAT GCC AG és CTT CAG GTG GCT GGA GTG AG (65 °C), KRAS: CCC AGG TGC GGG AGAGA és AGG CAT CAT CAA CAC CCT GT (65 °C). A DNS-t ezután 2%-os agaróz gélből

izoláltuk, Gel Purification Kit (Macherey-Nagel) segítségével tisztítottuk, majd a forward primer felhasználásával Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer műszerrel megszekvenálták (Life Technologies) a Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében. Az adatokat a Chromas 2.6 program (Technelysium Pty Ltd) segítségével elemeztük.

4.18. Transzmissziós elektronmikroszkópia

Az ultracentrifugálás utáni pelletet 20 µl PBS-ben felfuszpendáltuk, majd a mintából 2 µl-t hártárával bevont rácsos gridre szárítottunk (formvar-carbon coated 300 mesh grid, Electron Microscopy Sciences, USA) 10 percen keresztül. Az EV-eket ezután a rácsra fixáltuk 4% glutáraldehiddel 10 percen át, majd a gridet háromszor mostuk vízzel. Az EV-eket 2%-os foszfowolframsavval festettük, szobahőmérsékleten hagytuk a gridre száradni, végül transzmissziós elektronmikroszkóppal (MORGAGNI 268D (FEI,Hollandia) képeket készítettünk a mintákról (együttműködés dr. Varga Zoltánnal, Természettudományi Kutatóközpont).

4.19. Wound-healing vizsgálat

Humán kolon fibroblasztokat 24 lyukú lemezen tenyésztettük, amíg konfluensek nem lettek. A tenyészetekbe 200 µl-es pipettaheggyel egy egyenes csíkot karcoltunk, majd a lyukakat háromszor mostuk PBS-sel, hogy a sejtörmelégeket eltávolítsuk. 250 µl friss médium (DMEM high médium 2,5%-os EV-mentes FBS-sel, antibiotikum/antimikotikum mixszel, glutaminnal) és 250 µl EV-mentes FU-t összekevertünk, hogy minden sejten legyen friss médium is és a kezeléshez használt FU is, amiből az EV-eket eltávolítottuk. Azon minták esetében, ahol EV kezelést csináltunk, az fenti mintából eltávolított EV pelletet 20 µl PBS-ben felfuszpendáltuk, majd a sejtek médiumához adtuk. 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.

4.20. Immuncitokémia

Az immuncitokémiához használt sejteket 4 vagy 8 kamrás Falcon CulturSlide tárgylemezen tenyésztettük (BD Biosciences), a sejtekre 200-300 µl médiumot tettünk. Amikor a sejt kultúrák elérték a megfelelő konfluenciát, a sejteket PBS-sel mostuk és szobahőmérsékleten 5 percig fixáltuk 4 %-os PFA-val. A fixálót PBS-sel 3 x 30 percen keresztül szobahőn mostuk ki. A fixált sejteket blokkoló és permeabilizáló pufferben (5% FBS, 0,2% BSA, 0,3% Triton X-100 PBS-ben) blokkoltuk 1 órán keresztül. Blokkolás után a mintákat elsődleges ellenanyagban éjszakán át 4°C-on inkubáltuk (nyúl anti-Ki67 (Abcam, ab16667), nyúl anti-IL6 (Abcam, ab214429), egér anti-E-cadherin (BD Transduction Laboratories, 610181), egér anti- α SMA (Sigma, A5228) patkány anti-vimentin (MAB2105, R&D Systems)), az elsődleges ellenanyagokat a már leírt blokkoló pufferben 1:200 arányban hígítottuk. Másnap a felesleges ellenanyagot kimostuk a mintákból 3x30 perces 0,3% Triton X-100 tartalmú PBS-es mosással (mosópuffer), majd rátettük a mintákra a másodlagos ellenanyagokat (anti-nyúl és anti-egér Alexa Fluor 488, anti-egér és anti-patkány Alexa Fluor 568, Thermo Fisher) 1:400 arányban hígítva a blokkoló pufferben, majd két órán át inkubáltuk szobahőn billegtetve.

Inkubálás után a mintákat háromszor 1 órán át mostuk mosópufferben, majd DAPI-t tartalmazó fedőmédiumot tettünk rájuk (ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI, Thermo Fisher). A mintákat konfokális mikroszkóppal (Zeiss LSM800) vizsgáltuk.

4.21. Szenescencia vizsgálat

A szenescencia meghatározása a szenescencia-asszociált- β -galaktozidáz (SA- β -Gal) aktivitásának kimutatásával történt, mely a szakirodalomban széleskörűen elfogadott módszer [80]. A fibroblasztokat 4 vagy 8 kamrás Falcon CulturSlide tárgylemezre tettük ki. Miután a sejtenyészetek konfluensek lettek, 4%-os PFA-val fixáltuk őket 5 percig, majd a fixálót 2x5 percig billegőn PBS-sel kimostuk. Összeállítottuk a szenescencia assay-hez az oldatokat a 3. táblázat alapján. Minden lyukba 250-250 µl oldatot tettünk a sejtekre, a lemezt alufóliába csomagoltuk, a sejteket 37 °C-on inkubáltuk (CO₂ mentes inkubátor), 24 óra után leállítottuk a reakciót a reakcióoldat vízre cserélésével. A lemezt látható fényű inverz mikroszkóppal vizsgáltuk.

3. Táblázat. 30 ml SA- β -Gal reakcióhoz szükséges oldat összetétele. X-Gal oldat: 100mg 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside 1 ml dimethylformamidban beoldva (valamennyi reagens a Sigma-tól származott).

citromsav (37mM) és nátrium foszfát (125mM)	6ml
kálium ferrocianát (100mM)	1,5ml
kálium ferricianát (100mM)	1,5ml
nátrium klorid (5M)	0,9ml
magnézium klorid (1M)	60 μ l
X-Gal oldat	300 μ l
víz (H ₂ O)	19,75ml

4.22. GSEA és túlélési analízisek

A géneexpressziós adatsort bevittük a Gene Set Enrichment Analysis szoftverbe (<http://www.broadinstitute.org/gsea>) [81, 82] és az elemzést az alapértelmezett beállításokkal futtattuk le, kivéve a „kisebb szettek kizárása” paramétert, amit 20-ra állítottunk be, és gén permutációt alkalmaztunk. A kegg.v3.1.symbols génsor módosított változatát használtuk (<http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb>) a Wnt target gének [83], bél összejt specifikus gének [84], és exoszóma specifikus gének hozzáadásával. A 0,1-nél kisebb FDR q értéket tekintettük szignifikánsnak. 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 (4. táblázat).

A túlélési analízishez a GSE17537 és a GSE14333 géncsoportokat használtuk, melyek a betegek túlélési adatait is tartalmazzák. Az expressziós adatokat z-score normalizációval transzformáltuk, mielőtt megcsináltuk volna a Kaplan-Meyer elemzést és a log-rank tesztet.

4. táblázat. Az exoszóma biogenezis géncsoport olyan génekkel, melyeknek a szakirodalom alapján ismert funkciója van az EV biogenezisben/szekréciónban.

Gén szimbólum	Gén szimbólum	Gén szimbólum
CD63	RAB27B	STAM
CD81	RAB2B	TSG101
CD9	RAB35	VAMP7
CHMP2A	RAB5A	VPS25
CHMP3	RAB7	VPS28
CHMP4A	RAB9	VPS32
CHMP4B	RALA	VPS36
CHMP6	SDCBP	VPS37A
HGS	SDCBP2	VPS37B
PDCD6IP	SMPD1	VPS37C
PLD2	SMPD2	VPS4A
RAB11A	SMPD3	VPS4B
RAB27A	SNF8	VTA1

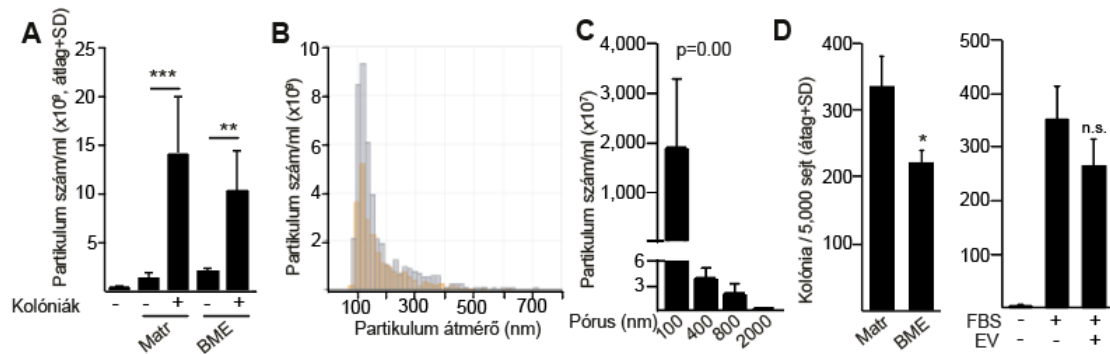
4.23. Statisztikai módszerek

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 és az átlag + SD értékeket ábrázoltuk, amennyiben nincs más az ábrafeliratokban feltüntetve.

5. Eredmények

5.1. A 3D CRC organoid kultúrák által termelt EV-k detektálhatóak a felülúszóban

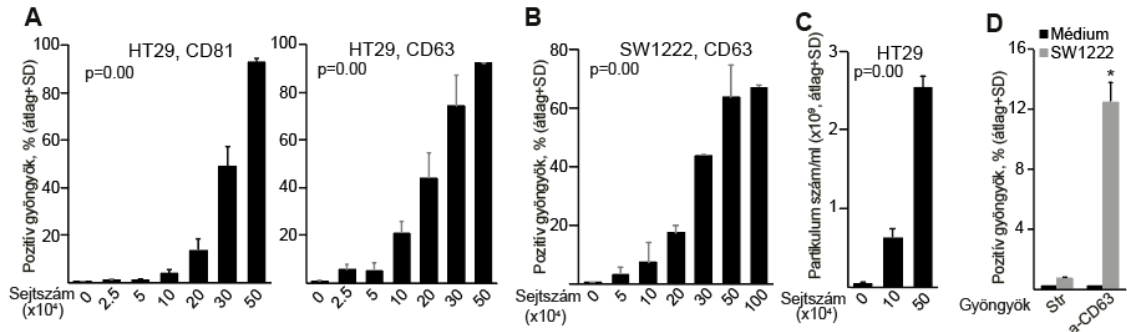
Az SW1222 CRC sejtvonal 3D mátrixban lumeneket tartalmazó komplex, nagy kolóniákat alkot (megakolóniák), melyekben találhatunk differenciált és differenciálatlan tumorsejteket is, hasonlóan az *in vivo* tumorokhoz [85, 86]. A 3D kultúráknak az EV-k vizsgálatához való kialakításakor kezdetben BME (basement membrane extract) és Matrigel mátrixokat használtunk. A kísérleteinkhez növekedési faktor mentes Matrigel-t használtunk, ami a döntő többségben jelen lévő laminin mellett kis mennyiségben kollagén IV-et is tartalmaz. qNano mérésekkel, ami alkalmas különböző méretű partikulumok detektálására, kimutattuk, hogy a sejtkolónia nélküli BME vagy Matrigel mátrixokról származó mintákban elhanyagolható volt a részecskemennyiség a 3D kolóniákról származó mintákhoz képest (8. ábra A). Megfigyeltük, hogy a kisebb méretű partikulumok magasabb koncentrációban voltak jelen a nagyobb méretűekhez képest SW1222 sejtvonal FU-jában (8. ábra B, C). A mérés során különböző pórusméretű membránokat használtunk. Érdekes módon valamivel intenzívebb volt az SW1222 kolóniaképző hatékonysága Matrigel-ben a BME mátrixhoz képest (8. ábra D), de a kibocsátott részecskék mennyiségében, melyet sejtszámra normalizáltunk, nem volt különbség (8. ábra A). Fontos megjegyezni, hogy az SW1222 sejteknek szükségük van EV-eket is tartalmazó vagy EV-mentes FBS-re (fetal bovine serum) ahhoz, hogy kolóniákat képezzenek (8. ábra D).



8. ábra: A 3D mátrixban tartott kolóniákból származó partikulumok detektálhatóak a felülűszóban. **A)** A médiumban a partikulumok mennyisége. A FU BME vagy Matrigel mátrixról származik, azonos számú SW1222 sejt jelenlétében vagy hiányában. A kolóniákat 12 napig tenyésztettük, majd médium csere után 48 órán át gyűjtöttük a mintákat (qNano, 100 nm pórusméret, n=3, párosítatlan t-próba). **B)** A partikulumok méretének az eloszlása. A FU SW1222 kolóniákról származik 12 nap tenyésztés után, a sejteket Matrigel-ben (szürke) vagy BME-ben (narancssárga) tartottuk. A mintákat médiumcsere után 48 órán keresztül gyűjtöttük. **C)** A részecske koncentrációt különböző pórusméretű membránokkal mértük. (qNano, n=3). A Matrigel-ben tenyésztett SW1222 FU-t 48 óra elteltével gyűjtöttük. A Matrigel kontroll FU-ból mért részecskeszámot, mint háttérrel, kivontuk minden pórusméret esetében az eredményekből. **(D)** Az SW1222 kolóniaképző hatékonysága Matrigel-ben és BME-ben (bal oldal) vagy Matrigel-ben 2,5% FBS hozzáadásával, EV-mentes FBS alkalmazásával vagy anélkül (jobb oldal) (n=3, párosított t-próba).

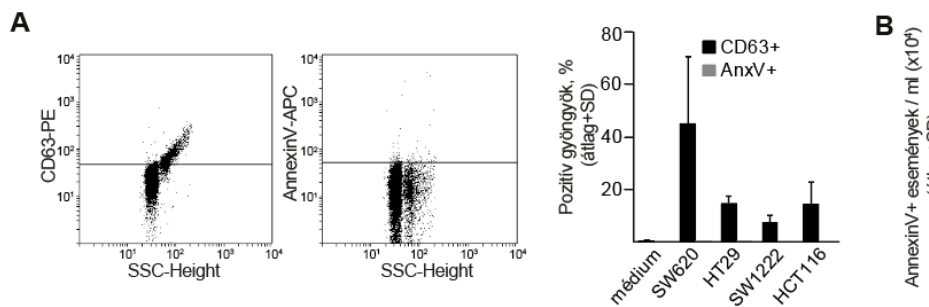
Annak érdekében, hogy azonosítsuk és értékeljük a sejt FU-ból származó EV-eket, anti-CD63 vagy anti-CD81 ellenanyaggal borított mágneses gyöngyöket használtunk, amiket fluoreszcensen jelölt anti-CD63 vagy anti-CD81 ellenanyaggal és áramlási citométerrel detektáltunk. Az ellenanyaggal fedett gyöngyök felszínére több CD63/81+ EV is kötődhet, így áramlási citométeres mérés során a pozitív gyöngyök arra utalnak, hogy a vezikulák jelen vannak a mintában. A CD63 és a CD81 általános elfogadott EV markerek, és a plazmamembránnal burkolt nagyobb EV-eket általában Annexin V-tel jelölik. Ahogyan azt már korábban mások leírták [87], mi is találtunk korrelációt a sejtszám és a pozitív gyöngyök (9. ábra A, B), illetve a sejtszám és a partikulumok mennyisége között (9. ábra C). Ez bizonyítja, hogy a mágneses gyöngy-alapú módszer használható az EV-k szemikvantitatív elemzéséhez. Miután a sejtszám és a pozitív gyöngyök közti korreláció csak egy bizonyos küszöbérték felett valósult meg, így az egyes összehasonlító elemzések során mindig azonos sejtszámot használtunk, és az eredményeket a végén sejtszámra normalizáltuk. Fontos megjegyezni, hogy az SW1222

sejtek által kibocsátott EV-k csak a CD63 ellenanyaggal burkolt gyöngyökhöz kötődtek, a a streptavidinnel burkolthoz nem (9. ábra D). Ez a kísérleti rendszer specifikusságát igazolja.



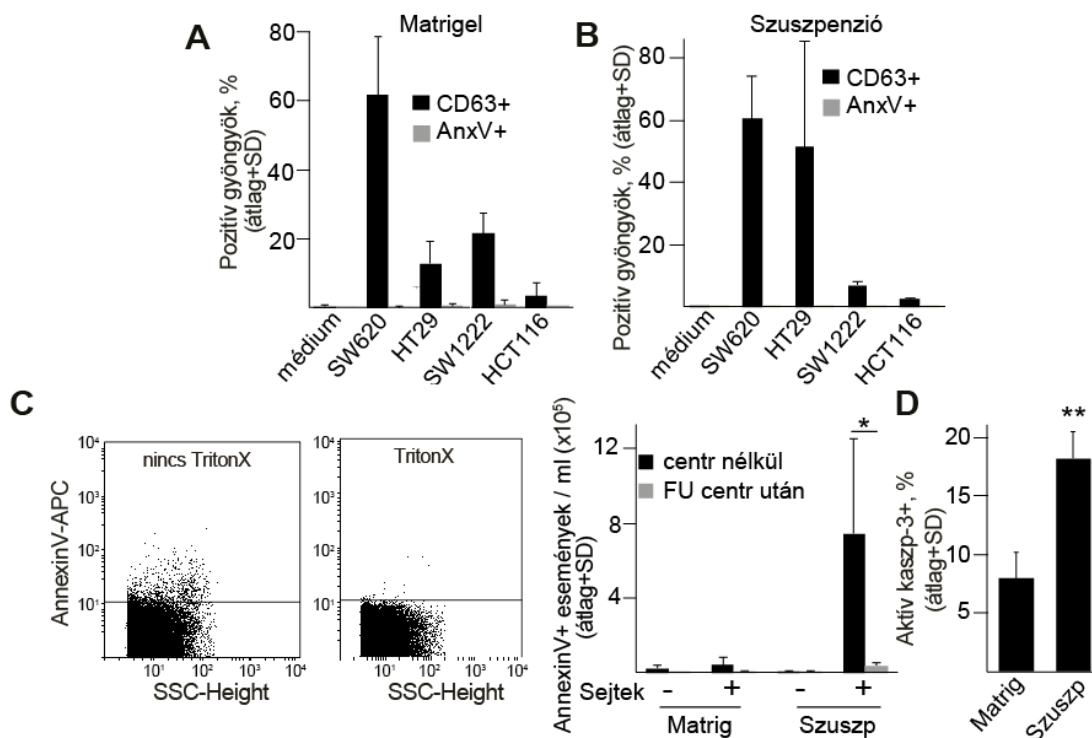
9. ábra: A-B) A pozitív gyöngyök százaléka 2D HT29 (A) vagy SW1222 (B) sejtek FU-jában emelkedő sejtszám esetén (áramlási citometria, n=2-3). Meg kell jegyezni, hogy SW1222 esetén a CD81+ gyöngyök száma 5% alatt volt magasabb sejtszámok esetén is. **C)** Partikulum koncentráció különböző sejtszámmal tenyésztett HT29 sejt vonal esetén (qNano, 400 nm pórus méret, n=3). **D)** A pozitív események százaléka CD63 ellenanyaggal vagy Streptavidinnel (Str) burkolt gyöngyök esetében CD63 ellenanyaggal való detektálást követően. A gyöngyöket 3D sejttenyészetek FU-jában (SW1222), vagy sejtmentes mátrix FU-ban inkubáltuk (áramlási citometria, n=3).

A következő lépésként az SW1222 sejt vonalon kívül más CRC sejt vonalakat is felhasználtunk, melyek 3D-ben tenyésztve kolóniákat képeznek. Az összes sejt vonal esetén 2D kultúrák FU-jában detektáltunk CD63+/Annexin V- EV-eket a gyöngyalapú módszerrel, és Annexin V+ nagy méretű EV-eket áramlási citométerrel (10. ábra A, B).



10. ábra: A) A feltüntetett sejt vonalakat sejtjeit 2D-ben tenyésztettük, az EV-eket anti-CD63 gyöngyökkel izoláltuk és anti-CD63 vagy Annexin V ellenanyaggal detektáltuk, a pozitív gyöngyök számát áramlási citométerrel mértük. A bal oldali és a középső ábrák reprezentatív áramlási citometriás mérések az SW1222 sejt vonalról. Jobb oldali ábra: az áramlási citometriás eredmények kvantifikálása. **B)** Annexin V+ események detektálása az EV kapuban 2D kultúrák FU-jából. Az apoptotikus testeket eltávolítottuk az FU-ból a mérés előtt. Ezekben a kísérletekben a nagy EV-eket közvetlenül mértük áramlási citométerrel.

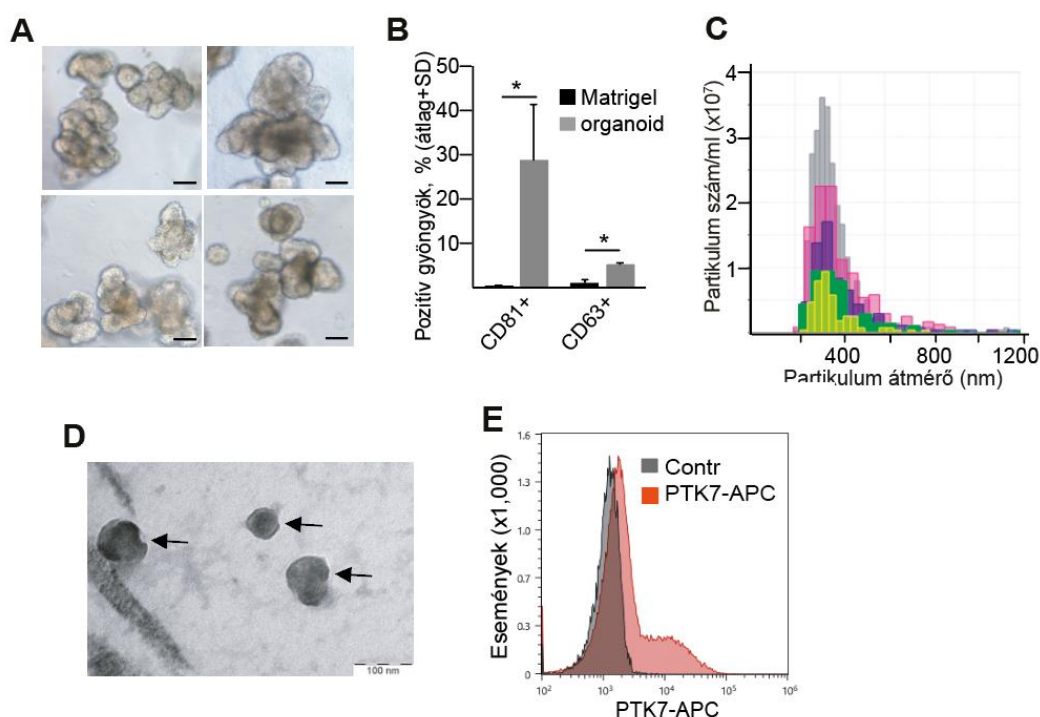
A fentiekhez hasonlóan Matrigel-ben tartott 3D tenyészetek, illetve 3D tenyészetből eltávolított, majd a továbbiakban szuszpenziós formában tartott kultúrák is termeltek CD63+/Annexin V- EV-eket (11. ábra A, B). Érdekes módon amikor a két tenyésztési körülményt összehasonlítottuk, a nagyobb méretű Annexin V+ események magasabb koncentrációban voltak jelen a szuszpenziós módon tartott 3D mátrixból kivett kultúrákban, mint a 3D-ben tenyésztettek FU-jában (11. ábra C). Ezen kísérletek során a detektált Annexin V események érzékenyek voltak Triton X-100 lízisre a már korábban publikált, áramlási citometriás módszert alkalmazva [88]. Az eredmények alapján a nagyobb méretű EV-k főként a szuszpenziós körülmények között tartott tenyészetekben találhatóak meg, azonban ez a tenyésztési körülmény megemelte az aktív kaszpáz-3+ apoptotikus sejtek számát a kolóniákban (11. ábra D), tehát a szuszpenziós tenyésztés nem optimális számukra. A 3D-ben tenyésztett sejtek felülúszójában az Annexin V+ események hiánya arra utalhat, hogy a nagyobb méretű EV-k nem tudnak kiszabadulni a Matrigel mátrixból.



11. ábra: A-B) A pozitív gyöngyök százaléka Matrigel-ben tenyésztett 3D kultúrák esetén **A)** vagy Matrigel tenyésztés után a gélből eltávolított kultúrák szuszpenziós tartása esetén **B)** 48 órás EV gyűjtést követően. **C)** Az Annexin V+ események száma SW1222 sejt felülúszóban 3D tenyészetből vagy 3D tenyésztést követően a kolóniák szuszpenziós tartásából (áramlási citometria). Bal oldali és középső panel: reprezentatív ábrák áramlási citometriás mérésekből szuszpenziós tenyésztést követően. Az Annexin V+ eseményeket

TritonX kezelés előtt és után mértük le (lásd: Anyagok és módszerek fejezet). Jobb oldali panel: sejtek jelenlétében/nélkül készült, illetve 20 perces 12500 g-vel történő centrifugálás előtti/utáni minták kvantifikálása. Vegyük észre, hogy az EV-k nem detektálhatóak a felülúszóból a centrifugálást követően ($n = 3$, t-próba). **D**) Az aktív kaszpáz-3 események százaléka SW1222 sejtvonal különböző tenyésztési körülményei esetén (áramlási citometria, $n = 3-5$, t-próba). A pozitív gyöngyök százalékos eredményei sejtszámra lettek normalizálva (A, B).

Munkánk során 3D organoid technológiát használtunk CRC-ben szenvedő betegekből származó szövettenyészetek létrehozására (12. ábra A). Fontos, hogy az összes betegeredetű organoid vonalunk termelt CD63+ és CD81+ EV-eket 3D mátrixban tenyésztve (12. ábra B). Az EV-k jelenlétét az organoidok FU-jában qNano mérésel (12. ábra C) és transzmissziós elektronmikroszkóppal is igazoltuk (12. ábra D).



12. ábra: A CRC betegeredetű 3D organoid kultúrák felülúszójában mérhetőek az EV-k. **A)** CRC betegeredetű organoidok morfológiája (méret: 50 μ m). **B)** Az EV-kötött, CD81- vagy CD63 ellenanyaggal fedett gyöngyök százaléka CD81 vagy CD63 ellenanyaggal detektálva. A felülúszót 3D kultúrát tartalmazó vagy üres Matrigel cseppekről izoláltuk 48 óra után (áramlási citometria, $n = 3$, t-próba). A pozitív gyöngyök százalékos arányát 300,000 sejtre normalizáltuk. **C)** Öt organoid kultúrából származó partikulumok méreteloszlása és mennyisége (qNano 400 nm pórusmérettel). **D)** Transzmissziós elektronmikroszkóppal készült kép CRC organoid eredetű EV-kről (nyilakkal jelölve) differenciál ultracentrifugálással való izolálás után. **E)** Reprezentatív ábra a CRC organoid eredetű sejtek sejtfelszíni PTK7 expressziójáról (áramlási citometria)

A további kísérleteink során három CRC organoid vonalat használtunk (CRC1-3). Mindhárom CRC organoid vonal esetén a sejteknek egy csoportja erősen pozitív volt PTK7-re, melyet az utóbbi években azonosítottak, mint az összejszerű CRC sejtek markerét (12. ábra E) [89]. Annak kiderítésére, hogy melyik jelátviteli útvonal mutáns az organoid vonalakban, megvizsgáltuk a túlélésüket R-Spondin1 vagy EGF hiányában, illetve nutlin-3 jelenlétében. A *KRAS/BRAF* mutációt hordozó organoidokat az EGF-et nem tartalmazó médiummal lehet kisselektálni, míg az R-Spondin1 hiányában is növekedő organoidokban az APC/ β -catenin jelátviteli útvonal van meghibásodva (lásd [90, 91]). Fontos megemlíteni, hogy a nutlin-3 gátolja a p53 kötődését az ubiquitin ligáz MDM2-höz, a p53 stabilizálódik, így a normál p53 jelátviteli útvonallal rendelkező sejtek apoptózissal elpusztulnak. Ahogy várható volt, minden organoid vonal képes volt növekedni a Wnt agonista R-Spondin1 hiányában, de egyik sem élte túl az EGF hiányát, és nem voltak érzékenyek a nutlin-3-ra. Ezek az eredmények bizonyították, hogy az organoid kultúráink folyamatosan aktív Wnt és mutáns p53 jelátviteli útvonallal rendelkeznek, de a *KRAS* útvonal nem mutáns (5. táblázat).

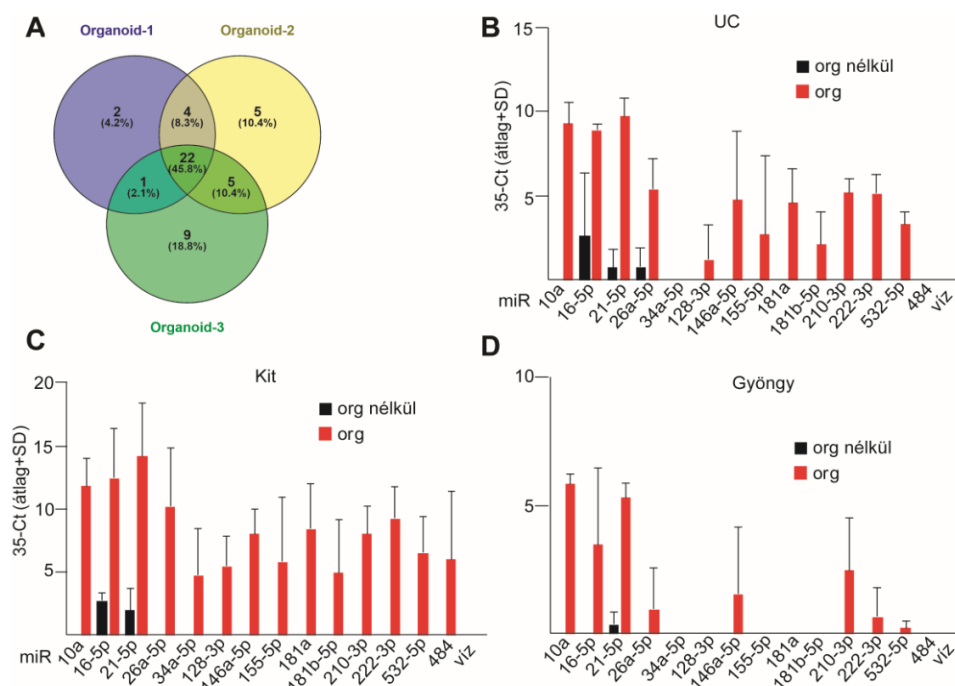
5. táblázat. A CRC betegeredetű organoidok jellemzői. A *KRAS* mutáció tesztelésekor csak a 12, 13, 18 és 61 kodonok lettek tesztelve, melyekben megjelenő bizonyos mutációknak ismert onkogén hatásuk van.

Minta	p53 mutáció	Nutlin-3 érzékenység	KRAS mutáció	EGF függőség
CRC1	V274A	nem	nem	igen
CRC2	V274A	nem	nem	igen
CRC3	V274A	nem	nem	igen

5.2. Az organoid eredetű EV-k fehérjéket és miRNS-eket hordoznak

Az EV-kre úgy is tekinthetünk, mint fehérjéket és miRNS-eket a sejtről sejtre szállító eszközökre. Elemeztük a 3D organoid eredetű EV-k fehérjetartalmát, 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 (13. ábra A, Függelék 1. táblázat). Az organoid-EV minták között átfedést mutató fehérjék többsége a sejtek adhéziójában fontos, ezen kívül különböző

sejtes folyamatokhoz köthető fehérjék is jelen voltak, például apoptózis szabályozása, hősokk protein, stb. A szakirodalom alapján ezek a fehérjék nem a CRC-re specifikus fehérjék, illetve más daganatokkal sem hozták specifikusan összefüggésbe őket, csak általánosan változik néhányuk szintje egyes tumorokban. Annak bizonyítására, hogy az organoid eredetű EV-k szállítanak miRNS-eket, az EV mintákban 14, a miRNS és EV kutatások során gyakran vizsgált miRNS jelenlétét vizsgáltuk (Függelék 2. táblázat), az izolálást három különböző módszerrel végeztük el. Míg a miR-484-et és a miR-34a-5p-t csak a kereskedelmi forgalomban kapható EV izoláló kittel előállított mintában tudtuk detektálni, addig a többi miRNS különböző mennyiségben, de megtalálható volt mind a kittel, mind az ultracentrifugálással készített mintában (13. ábra B, C). Érdekes módon, amikor az EV-eket az ellenanyaggal fedett gyöngyös módszerrel izoláltuk, csupán 8 miRNS-t tudtunk kimutatni a vizsgált 14-ből, (13. ábra D), és ez az izolálási módszer adta a legkisebb nem specifikus háttérrel (a detektált miRNS-ek száma az organoid nélküli FU-ban).



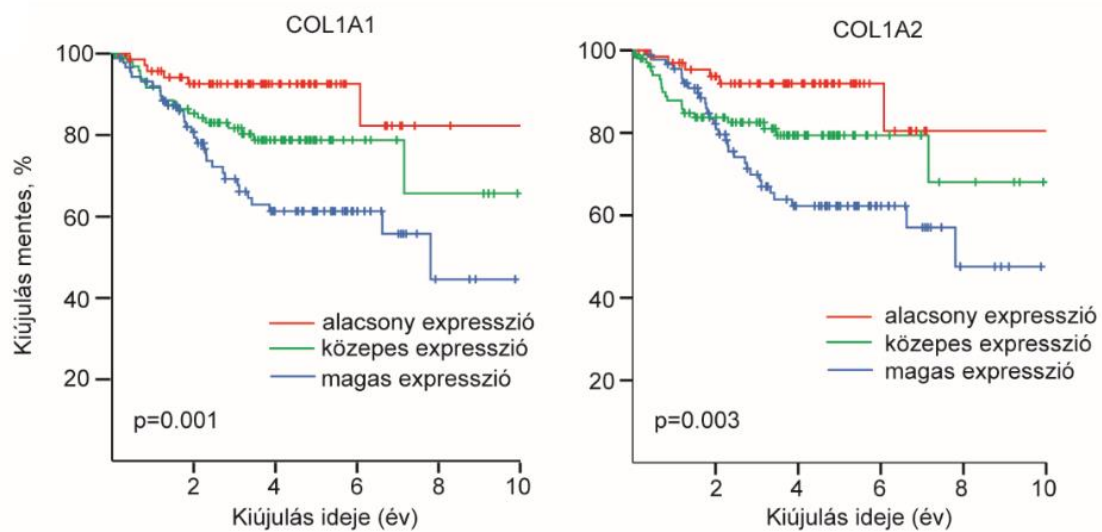
13. ábra: A CRC organoid eredetű EV-k proteomikai karakterizálása és miRNS profilja.

A) A három CRC organoid vonal esetében detektált fehérjék Venn diagramja. Lásd még: Függelék 1. táblázat. **B-D)** A feltüntetett miRNS-ek 35-Ct értékei különböző izolálási módszereket követően. UC: differenciál centrifugálás és ultracentrifugálás (**B**), Kit: ExoRNEasy Micro Kit (Qiagen) (**C**), Gyöngy: anti-CD63-fedett gyöngyök (**D**). Mindegyik esetben azonos sejtszámmal végeztük a kísérleteket (TaqMan assay, n=3).

Az EV izolálási módszer tehát nagyban befolyásolja a detektálási profilt 3D organoidból származó EV-k esetében, és nagy a variancia az egyes minták között is.

5.3. A tumort támogató kollagén I ECM fehérje serkenti az organoidok EV termelését

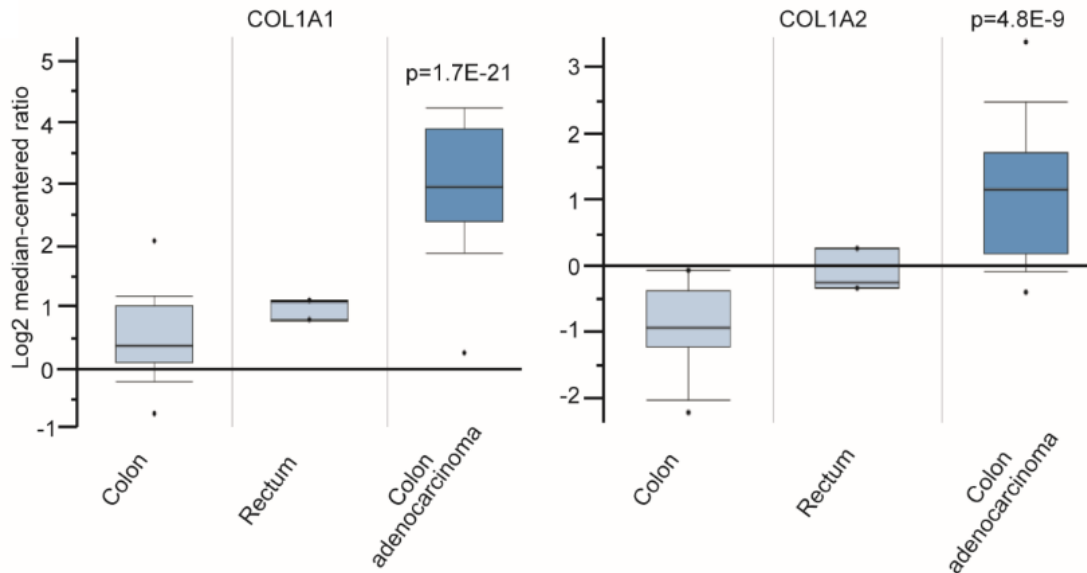
Miután bizonyítottuk, hogy az organoidok 3D mátrixokban tenyésztve termelnek EV-eket, szeretnénk volna felhasználni a rendszerünket arra, hogy olyan faktorokat azonosíthassunk, amik az EV termelésre hatással vannak. A CRC kialakulásában kritikus az ECM felépítésének a megváltozása, például a kollagén I mennyiségének a megemelkedése [92]. A túlélési analízis alapján a COL1A1 és COL1A2 gének expressziós szintje és a CRC betegek túlélési esélyeinek romlása között összefüggés van (14. ábra), ami alátámasztja a szakirodalomban is fellelhető adatokat [93, 94].



14. ábra: A kollagén I-et kódoló COL1A1 és COL1A2 gének túlélési analízise.

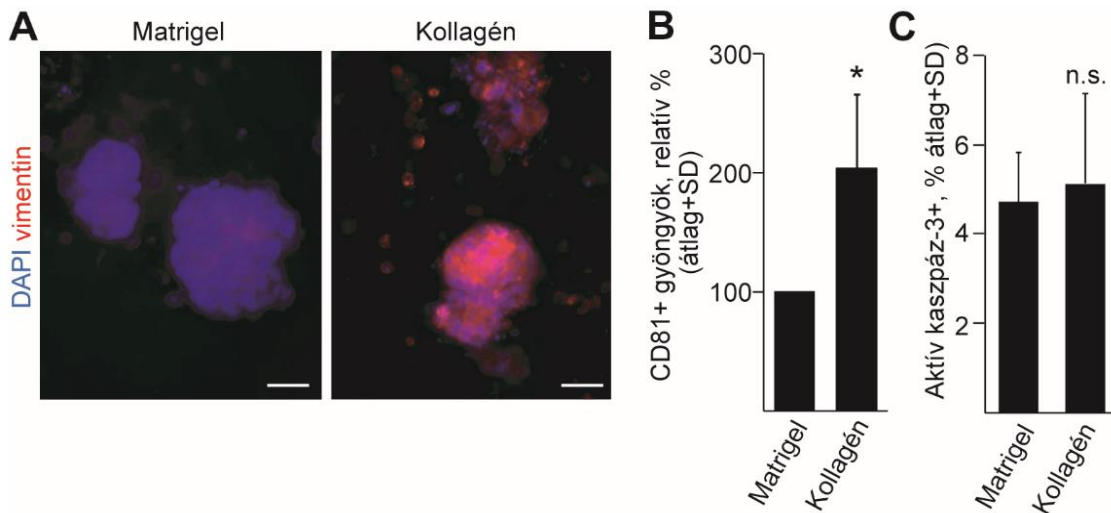
Kaplan-Meier túlélési plot a jelölt génekre. A feltüntetett p-értéket log rank teszttel határoztuk meg (a vizsgált génekhez tartozó próba ID: COL1A1: 202311_s_at, COL1A2: 202404_s_at).

A microarray adatokat tartalmazó TCGA adatszoport Oncomine adatbázis analízise kimutatta, hogy a CRC betegekben az egészségesekhez képest magasabb a COL1A1 és COL1A2 gének expressziója (15. ábra).



15. ábra: A kollagén I-et kódoló COL1A1 és COL1A2 gének expressziós analízise. A jelzett gének normalizált expressziós szintje a TCGA adatsorban (Oncomine analízis, www.oncomine.org, a COL1A1 esetén a riporter A_23_P207521 és a COL1A2 esetén A_23_P255247. Riporter: a próba a microarray analízis során. Az eredmények az összes riporter esetén szignifikánsak voltak).

A betegeredetű CRC organoidok kollagén I-ben tenyésztve morfológiai változáson mentek keresztül, ezzel párhuzamosan megemelkedett bennük az epitheliális-mezenchymális (EMT) marker vimentin expressziós szintje (16. ábra A), és a kultúrák kirakása után 2 nappal a kollagén mátrix serkentette az EV termelést is (16. ábra B). Fontos megfigyelés, hogy a kollagén mátrixban való növekedés az organoidokban nem okozott apoptózist, nem nőtt meg az aktív kaszpáz-3 pozitív sejtek száma (16. ábra C).

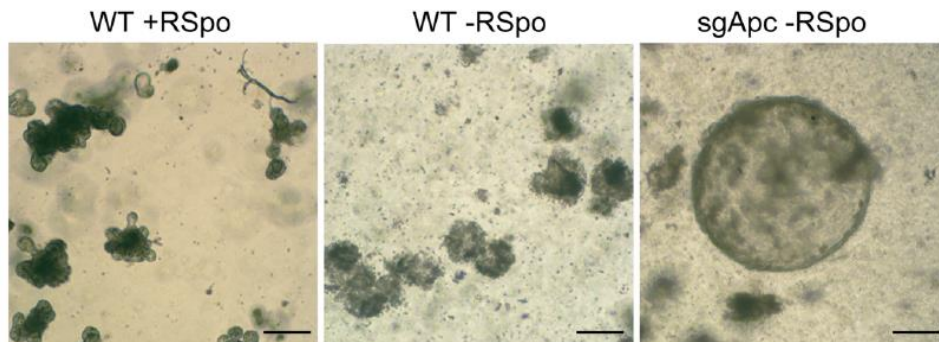


16. ábra A Matrigel kollagén I-re való cseréje megemelkedett EV termelést eredményez CRC organoidokban. **A)** Vimentin whole-mount immunfestés az egyik CRC organoid vonalon, amit 48 órán át Matrigel-ben vagy kollagénben tenyésztettünk (representatív ábra). **B)** CRC organoid eredetű EV mintában a CD81+ gyöngyök relatív százaléka. A kísérletek párosítottak voltak, és minden alkalommal a kollagén eredetű, sejtszámra normalizált adat a normalizált Matrigel eredetű adathoz volt hasonlítva (n = 4). Az organoidok nélkül tartott Matrigel, illetve kollagén mintákról származó FU-ban a pozitív gyöngyök százaléka 1% alatt volt. **C)** CRC organoidokban az aktív kaszpáz-3+ apoptotizáló sejtek mennyiségének meghatározása. A mintákról whole-mount immunfestést követően képeket készítettünk, majd a pozitív sejteket megszámláltuk. Minden CRC organoid vonalból 10 organoidot számoltunk le, és az értékelés során ezeknek az átlagát használtuk (egy organoid vonalat tartalmazó csepp Matrigel-ben több organoid növekszik, az egész cseppet megfestettük). Méterarány: 20 μ m. Párosított próba (**B**, **C**).

5.4. Az *Apc* mutáció serkenti a 3D organoidok EV termelését

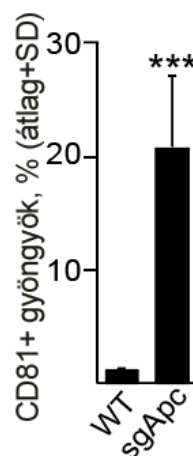
Széles körben elfogadott tény, hogy a tumoros sejtek EV termelése intenzívebb a normál szövethez képest. Ennek az oka, hogy ez köthető-e valamilyen mutációhoz, azonban még nem ismert. Mivel a CRC sejtek a tumorigenezisnek egy késői szakaszát reprezentálják, és számos mutációt hordoznak, a kísérletek 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 élnek túl (17. ábra).



17. ábra Egér vékonybél organoidok morfológiája. Az első és középső ábrán a vad típusú, az utolsó ábrán a már *Apc* mutációt hordozó organoidok látszanak. Jól látszik, hogy a vad típusú organoidok csak R-Spondin-1 jelenlétében maradnak fenn (első kép), anélkül elpusztulnak (középső kép), az *Apc* mutációt hordozó organoidoknak azonban nincs szükségük R-Spondinra a túléléshez (utolsó kép). Méretarány: 100 μ m

Érdekes módon az organoidok által kibocsátott CD81+ EV-k mennyisége az *Apc* mutációt követően jelentősen megemelkedett (18. ábra).

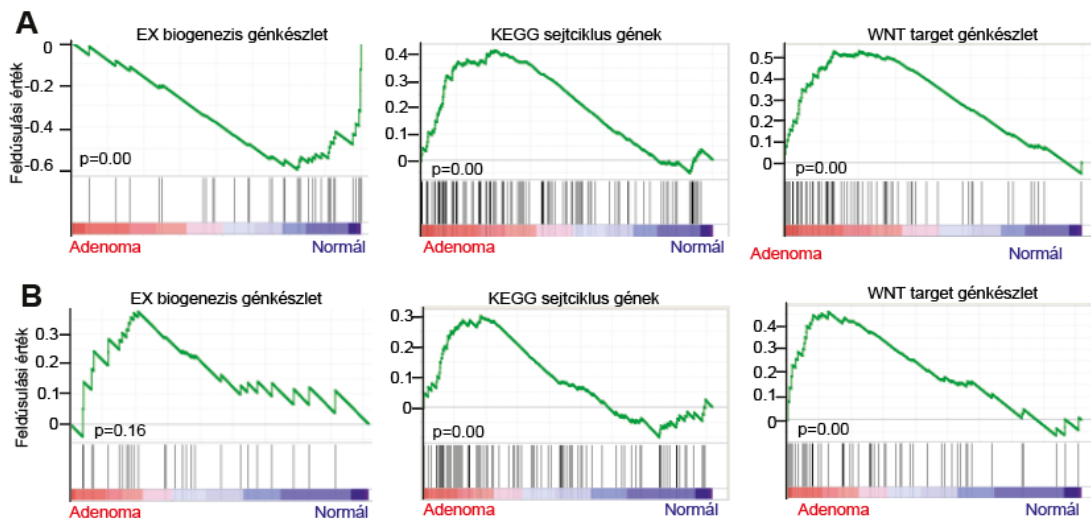


18. ábra: *Apc* mutációt követően megemelkedik a CD81+ EV-k mennyisége.

A CD81+ gyöngyök százaléka, sejtszámra normalizálva (áramlási citometria). Az anti-CD81 ellenanyaggal fedett gyöngyöket WT vagy *Apc*-mutáns (sgApc) organoidok felülúszójában inkubáltuk egy éjszakán keresztül, majd az EV-kötött gyöngyöket anti-CD81 ellenanyaggal detektáltuk (n=4, párosítatlan t-próba).

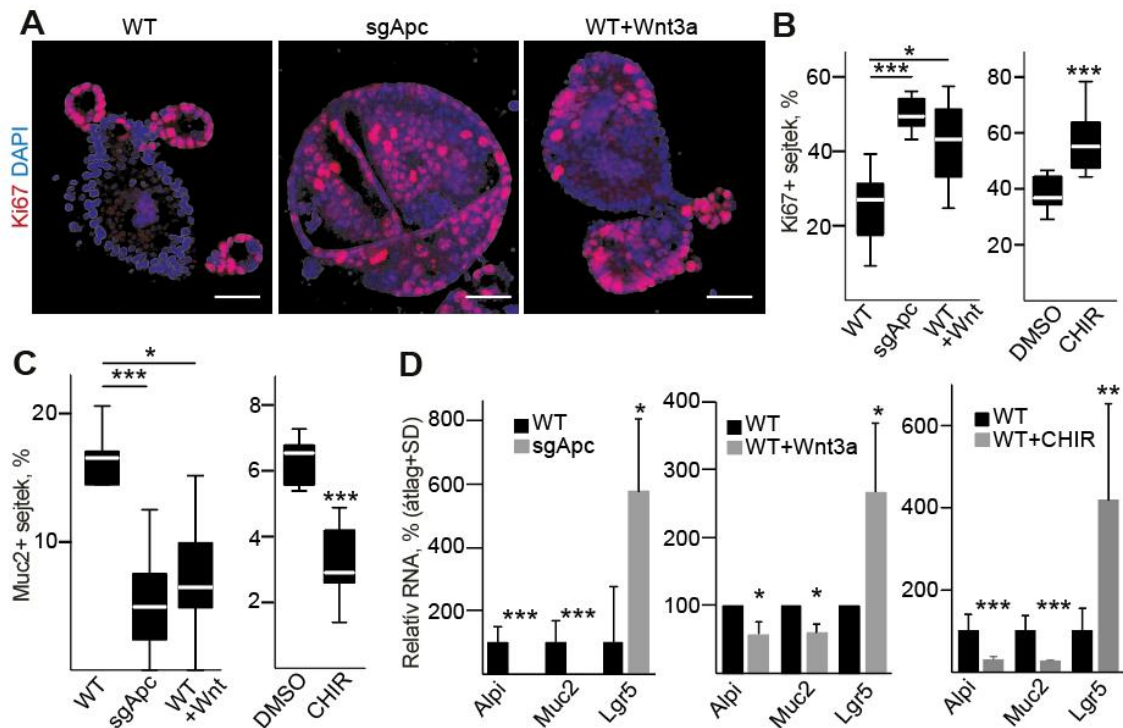
Az egyik lehetséges magyarázat az *Apc* mutáció miatt bekövetkező fokozott EV termelésre, hogy az egyes EV termelésben érintett gének expressziója intenzívebbé válik.

Az EV típusok közül a legjobban az endoszomális eredetű exoszómák (EX) kialakulása és szekréciója van karakterizálva. Teszteltük, hogy vajon az EX útvonal felelős-e a megemelkedett EV termelésért. Kiválasztottunk 39 gént, amiknek bizonyítottan szerepe van az MVB kialakulásában és az EV-k kibocsátásában (pl. specifikus Rab fehérjék) (4. táblázat). Ezt a génkészletet használtuk Gene Set Enrichment Analysis-hoz (GSEA) publikusan elérhető expressziós adatokon, amik organoid könyvtárakból származtak [95]. Fontos, hogy ezek az organoid könyvtárak csak epiteliális eredetű sejteket tartalmaznak, így sztromális eredetű sejteket nem analizáltunk. A várakozásoknak megfelelően a humán adenoma eredetű mintákban a normál organoidokhoz képest a Wnt-target gének és a KEGG sejtciklus gének pozitív feldúsulását figyeltük meg (19. ábra A). Az exoszóma biogenezis génkészlet azonban nem mutatott pozitív feldúsulást (19. ábra A). Hogy kizárjuk annak a lehetőségét, hogy az exoszóma biogenezis génkészlet máshogy viselkedik emberben, mint egérben, megismételtük az elemzésünket olyan expressziós adatkészleten, ami egér eredetű WT bélhám sejtekből és *Apc*-mutáns adenomákból származott (GSE422). Ezen ismétlés során sem tapasztaltuk az exoszóma specifikus gének pozitív feldúsulását az adenoma mintákban (19. ábra B), ami arra utal, hogy az *Apc* mutációt követő megemelkedett EV-kibocsátás nem az EX biogenezis gének megemelkedett expressziójának következtében alakul ki ebben a kísérleti rendszerben.



19. ábra: Az EX biogenezis génkészlet nem mutat pozitív feldúsulást az intestinális tumor sejtekben. Génkészlet feldúsulási vizsgálat (GSEA) adenoma mintákat is tartalmazó humán CRC organoid könyvtárból (A), illetve egér bél adenoma sejtekből (B) származó expressziós adatkészletből. Mindkét esetben a humán vagy egér mintákat WT kontroll mintákhoz hasonlítottuk.

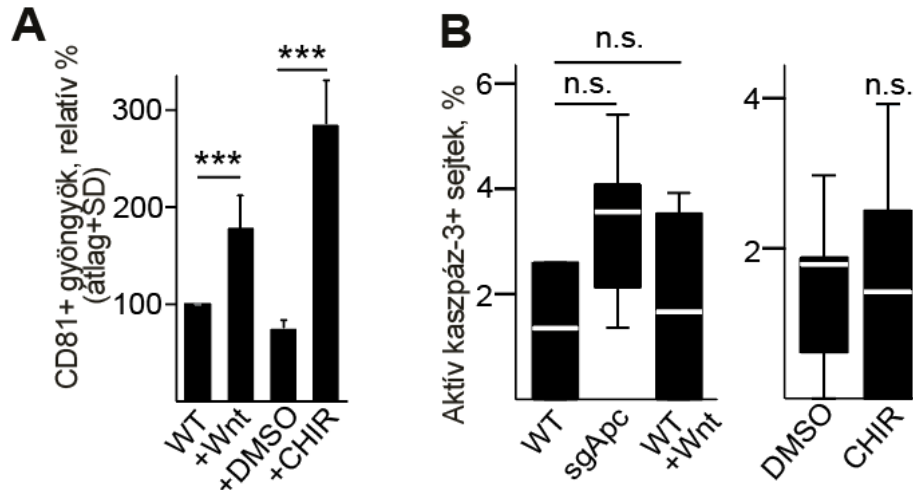
Annak kiderítésére, hogy a Wnt-útvonat aktiválása vezet-e megemelkedett EV-termeléshez, vad típusú intesztinális organoidokat kezeltünk Wnt3a-val, vagy a GSK-3-gátló CHIR99021-gyel, melyek a WNT-útvonat ismert aktivátorai. Az *Apc*-mutációhoz hasonlóan a Wnt3a és a CHIR99021 kezelés is megemelte a Ki67+ osztódó sejtek számát (20. ábra A, B), és csökkentette a Mucin-2+ kehelysejtek arányát (20. ábra C). Ezzel párhuzamosan igazoltuk, hogy a kezelésekre 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 (20. ábra D).



20. ábra Az egér intesztinális organoidok a Wnt-útvonat aktiválását követően úgy viselkednek, mint az *Apc*-mutáns organoidok.

A) Konfokális mikroszkópos képek WT, *Apc*-mutáns és Wnt3a kezelt (100ng/ml 3 napig) WT organoidokról (méretarány: 50 μ m). **B)** A Ki67 + és **C)** a Mucin2 + sejtek aránya *Apc* mutáció jelenlétében, vagy a jelzett kezelésekkkel. A sejteket konfokális mikroszkópos képeken számoltuk ($n = 8-10$). Abban az esetben, amikor az organoidokat a Wnt útvonat aktivátor CHIR99021-gyel kezeltük (3 μ M 3 napon keresztül), akkor az eredményeket a kontroll mintákhoz hasonlítottuk, amiket 1% DMSO jelenlétében tartottunk fenn. **D)** A jelölt gének relatív RNS szintje (qPCR, $n = 5$). Párosított t-próba (D), Kruskal–Wallis teszt Dunn post hoc teszttel (B, C bal oldali panel), vagy Mann–Whitney *U* teszt (B, C jobb oldali panel) statisztikai analíziseket használtunk.

Fontos, hogy az *Apc* mutációhoz hasonlóan a Wnt3a és a CHIR99021 kezelés hatására is jelentősen megemelkedett az organoidok EV-termelése (21. ábra A), miközben az aktív kaszpáz-3 + sejtek száma nem változott (21. ábra B).



21. ábra: A Wnt3a és CHIR99021 kezelés hatására megemelkedik az organoidok EV-termelése.

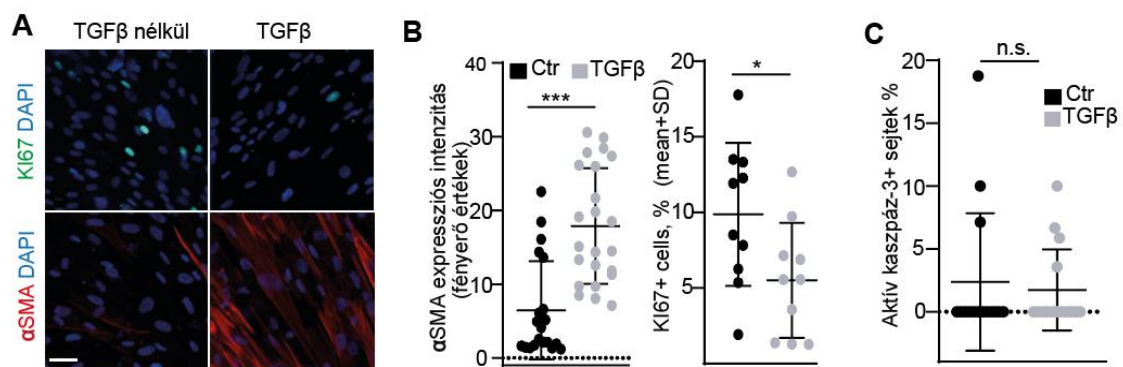
A) A CD81 + gyöngyök relatív százaléka (áramlási citometria). Az eredményeket minden esetben sejtszámra normalizáltuk, majd a kontroll, kezeletlen mintához hasonlítottuk. Az organoidok nélküli Matrigel kontroll minta minden esetben <1%-ban volt pozitív a CD81 gyöngyökre (n=5). **B)** Az aktív kaszpáz-3 + sejtek százaléka *Apc* mutációt, illetve a feltüntetett kezeléseket követően, konfokális mikroszkópos képeken számolva (n=10, minden Matrigel cseppben 10 organoidot számoltunk le, a jelölést 3 alkalommal ismételtük). Kruskal–Wallis teszt Dunn post hoc tesztel (A, B bal panel), vagy Mann–Whitney *U* teszt (B jobb panel) statisztikai analíziseket használtunk.

Összességében ezek az eredmények támogatják a hipotézisünket, miszerint az *Apc* mutáció a Wnt jelátviteli útvonal aktiválásán keresztül emeli meg az organoidok EV-termelését. 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.

5.5. A fibroblasztok aktiváltsága nincs hatással az EV termelésük intenzitására

Miután az adataink azt mutatták, hogy számos faktor serkenti az EV termelést adenoma és CRC sejtek esetében, így az organoid rendszert felhasználtuk arra, hogy megvizsgáljuk az EV-k szerepét a tumor-sztróma kommunikációban. A kísérleti rendszer felállítására előtt karakterizáltuk a rendelkezésünkre álló humán kolon fibroblasztokat, és megvizsgáltuk, hogy milyen faktorok befolyásolják az EV termelésüket.

A fibroblasztok a tumoros szövetben jellegzetes génexpressziós mintázattal rendelkeznek, így ezeket a tumorasszociált fibroblasztokat (CAF) aktivált állapotúnak tekintik. Ahogy az a bevezetőben is említésre került, a TGF β -nak kritikus szerepe van a kolon fibroblasztok aktiválásában, mivel például elősegíti a metasztázis képződés kezdeti lépéseit az IL-11 fibroblasztokból történő szekréciójának serkentésével [15]. Az aktivált fibroblasztok által kibocsátott EV-k CRC sejtekre kifejtett hatásának vizsgálatához széles körben elfogadott, reprodukálható, kereskedelmi forgalomban elérhető modellrendszert alkalmaztunk, az ATCC1459 normál humán kolon eredetű fibroblasztokat (NCF) aktiváltunk TGF β -val. Korábban már leírták, hogy a TGF β csökkenti a Ki67 + osztódó sejtek számát [16], és megemeli az α SMA expresszió intenzitását, ami az intesztinális myofibroblasztok általános markere (22. ábra A, B). Fontos, hogy a kezelések után a kaszpáz-3+ apoptotizáló sejtek mennyiségében nem tapasztaltunk változást. (22. ábra C).

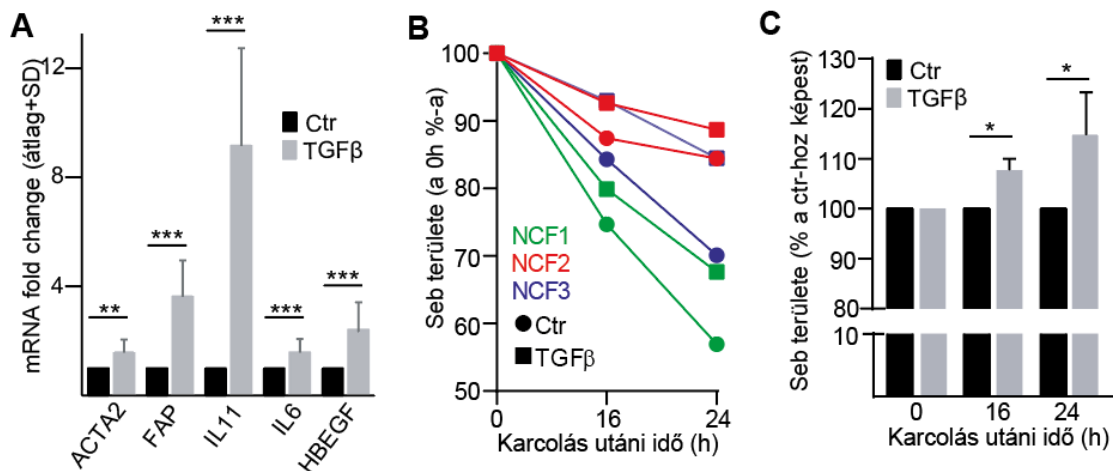


22. ábra: A TGF β aktiválja a normál kolon fibroblasztokat (NCF).

A-B) TGF β kezelt (4 nap) és kezeletlen minták KI67 és α SMA immunfestése. Konfokális mikroszkópos képek (A) és azok kvantifikálása (B). Az α SMA intenzitást ImageJ szoftverrel mértük. **C)** Az aktív kaszpáz-3 + sejtek aránya TGF β kezelt vagy kezeletlen

NCF-ekben immuncitokémiai festés és konfokális mikroszkópos képek alapján. Az adatok 3 megismételt kísérletből származnak (B, C). Mann-Whitney U-tesztet (B, C) használtunk $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.005$ szignifikancia értékekkel. Méretarány: 50 μm (A).

A TGF β kezelés után megemelkedett a *FAP*, *ACTA2* (αSMA -t kódolja), *IL6*, *IL-11* és *HBEGF* expressziós szintje, ami azt bizonyítja, hogy a kezelés jellegzetes transzkripciós változásokhoz vezet (23. ábra A). A normál fibroblasztok migrációs képességét is teszteltük, és azt tapasztaltuk, hogy TGF β hozzáadását követően a sejtek migrációs képessége csökken, sebgyógyulási vizsgálat során (wound healing assay) nagyobb marad a seb területe a fibroblaszt tenyészetben (23. ábra B, C).

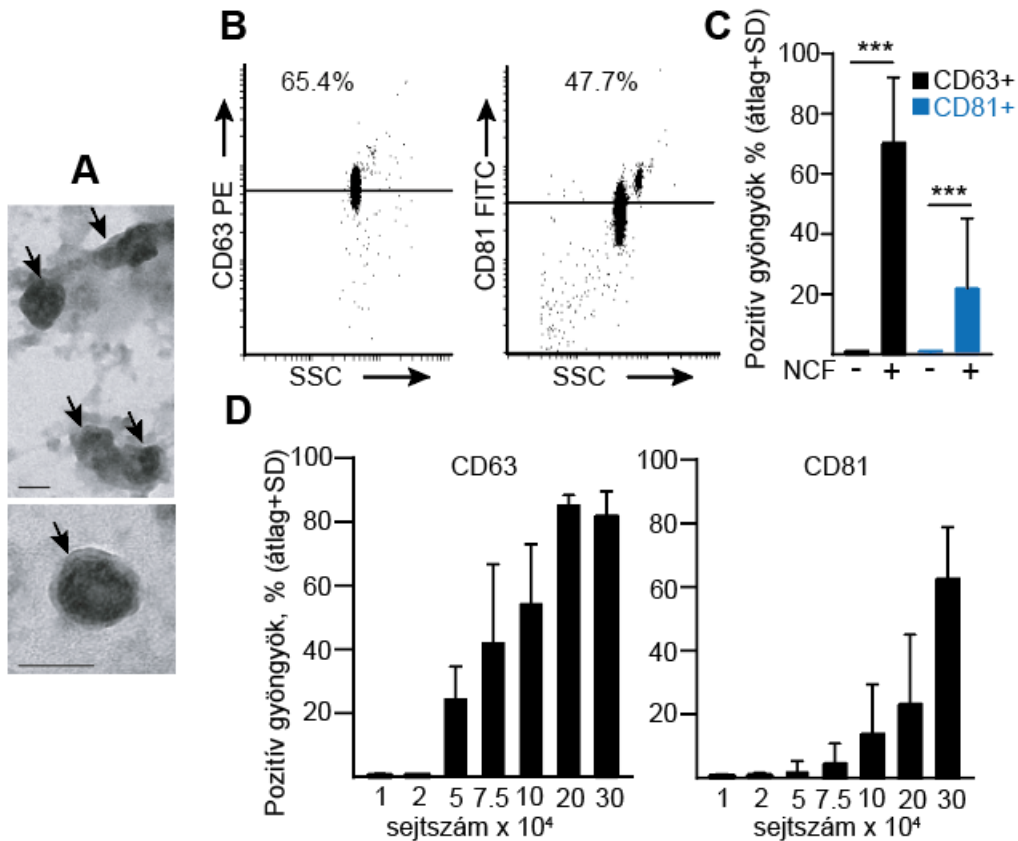


23. ábra: A TGF β aktiválja a normál kolon fibroblasztokat (NCF).

A) A jelölt gének mRNS expressziós változása NCF-ekben (RT-qPCR, n=6, párosított minták) B) Relatív seb területet a kiindulási seb területéhez képest C) és a seb területe a kezeltetlen kontrollhoz képest konfluens tenyészetekben. Párosított t-próbát használtunk (A, C) $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.005$ szignifikancia értékekkel.

Korábbi eredményeinkkel megegyezően [56] az EV-eket detektálni tudtuk az NCF kondicionált médiumában transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) (24. ábra A). Emellett ezekben a mintákban anti-CD63 vagy anti-CD81 ellenanyaggal fedett gyöngyök és áramlási citometria segítségével is ki tudtuk mutatni az EV-k jelenlétét (24. ábra B, C). A szemikvantitatív CD63 és CD81 specifikus gyöngy-alapú módszerrel a CRC sejtekhez

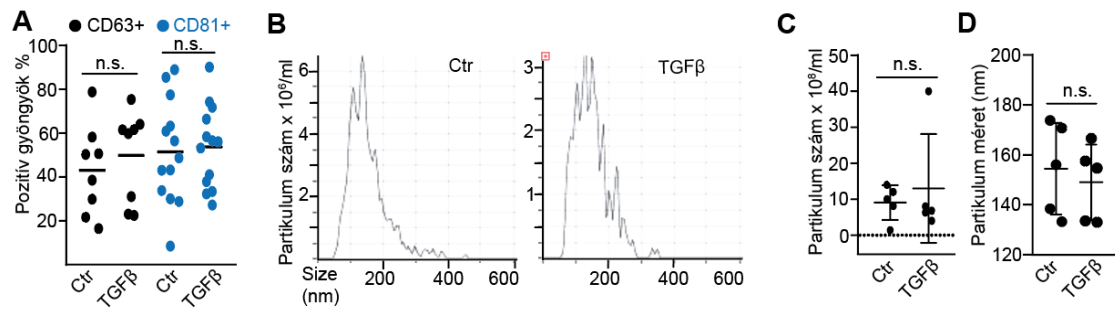
hasonlóan a fibroblaszt eredetű EV-k esetében is ki tudtuk mutatni a sejtszám és a pozitív gyöngyök száma közti pozitív korrelációt (24. ábra D) [87].



24. ábra: Az NCF-eredetű EV-k detektálhatóak a kondicionált médiumban.

A) Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) képek NCF felülúszóból származó UC pelletről. B-C) EV-k detektálása NCF FU-ból anti-CD81 és anti-CD63 ellenanyaggal fedett gyöngyökkel. Áramlási citometriás ábrák (B) és az adatok kvantifikálása (C). Az FBS-mentes médium mintákat (NCF-) hasonlítottuk az NCF FU-hoz (NCF+) (n=3). D) Az anti-CD63 vagy anti-CD81-fedett pozitív gyöngyök százaléka, miután a gyöngyöket különböző sejtszámú NCF tenyésztéről származó felülúszóban inkubáltuk (áramlási citometria, n=4). Párosított t-próbát (C) használtunk, méretarány: 50nm (A).

Ezt a módszert alkalmazva nem tapasztaltunk emelkedett CD81+ vagy CD63+ EV kibocsátást TGFβ kezelés után (25. ábra A, B). 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 (25. ábra C, D).



25. ábra: A TGFβ-nak nincs hatása a normál kolon fibroblasztok (NCF) EV termelésére.

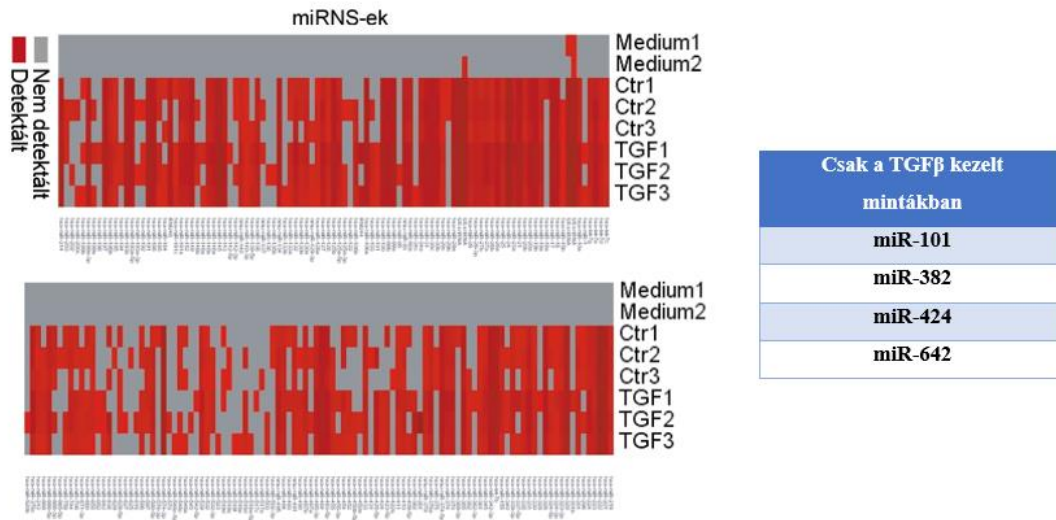
A) A TGFβ-kezelt (10ng/ml, 4 nap) és kezeletlen NCF felülúszóban inkubált pozitív gyöngyök százaléka (100 000 sejtre normalizált eredmények). **B-D)** Reprezentatív ábrák (B), a partikulumok koncentrációja (C, 100 000 sejtre normalizált értékek) és a partikulumok mérete (D) TGFβ-kezelt és kontroll NCF-ek felülúszójában. Mann-Whitney U-tesztet (A, C, D) használtunk.

Fontos megemlíteni, hogy ezeknél a kísérleteknél az összes adat sejtszámra lett normalizálva, kizárva annak a lehetőségét, hogy a TGFβ kezelés után az osztódó sejtek mennyiségének a változása befolyásolja az eredményeket. Ezek az eredmények arra mutatnak rá, hogy a TGFβ általi NCF aktiválásnak nincs jelentős hatása a fibroblasztok EV termelésére.

5.6. A TGFβ-indukált fibroblaszt aktiválás módosítja az EV-k miRNS cargo-ját

Az NCF-ek aktiválását követően az EV-k tartalmában bekövetkező változások meghatározásához először a miRNS-eket vizsgáltuk, amiknek köztudottan fontos szerepe van a sejtek közti EV-mediált kommunikációban. A korábban leírt eredmények alapján, ha a miRNS izolálás az ellenanyaggal fedett gyöngyökkel történő EV izolálási módszert követően történik, akkor kisebb a miRNS háttér a többi EV izolálási módhoz képest. Így az anti-CD63 és anti-CD81 ellenanyaggal fedett gyöngyökkel történő izolálást alkalmaztuk ebben az esetben is a miRNS vizsgálatokhoz. 377 miRNS-t vizsgálva, 209 miRNS-t detektáltunk a hat minta közül legalább az egyikben (26. ábra, Függelék, 3. táblázat), és négy olyan miRNS-t (hsa-miR-101, 382, 424, 642), ami a TGFβ-kezelt minták közül mindegyikben jelen volt, a kezeletlenek közül azonban egyikben sem. Így

az eredmények alapján a TGF β megváltoztatja az EV-cargo miRNS profilját, bár a szakirodalom alapján ezeket a miRNS-eket még nem hozták összefüggésbe a CRC-vel.

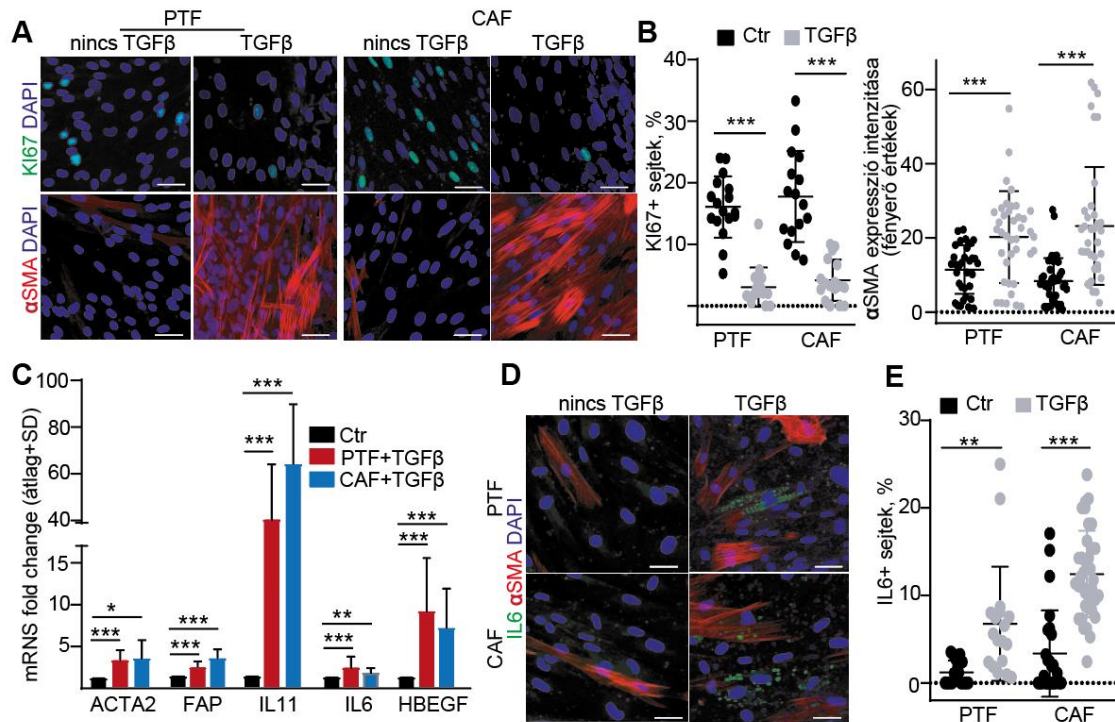


26. ábra: A TGF β módosítja az NCF-eredetű fibroblasztok miRNS cargo-ját.

A TGF β kezelt/kezeletlen NCF-ek EV mintáiban a miRNS-ek jelenléte/hiánya. Csak azok a miRNS-ek vannak feltüntetve, amik legalább az egyik mintában megtalálhatóak. (A teljes miRNS lista a Függelék 3. táblázatban.) Jobb oldali táblázat: a miR-101, 382, 424, 642 miRNS-ek csak a TGF β -kezelt mintákban voltak jelen.

5.7. A TGF β nincs hatással a CRC betegeredetű fibroblasztok EV-kibocsátására

Hogy alátámasszuk az eredményeinket egy másik modellrendszerben is, sejtkultúrákat hoztunk létre a betegek kolonjának peritumorális (normál, PTF), és tumoros részéből (CAF). Az NCF-ek esetén kapott eredményekhez hasonlóan a TGF β csökkentette az osztódó sejtek arányát és megemelte a α SMA expresszióját, ami a myofibroblasztok általános markere CAF-ok és PTF-ek esetén is (27. ábra A, B). Emellett a *FAP*, *ACTA2*, *IL-6*, *IL-11* and *HBEGF* gének megemelkedett expressziós szintjét is megfigyeltük (27. ábra C). Az NCF-ektől eltérően a TGF β kezelés IL6+ sejtek megjelenését, így a sejtes heterogenitást eredményezte CAF és PTF tenyészetekben (27. ábra D, E).

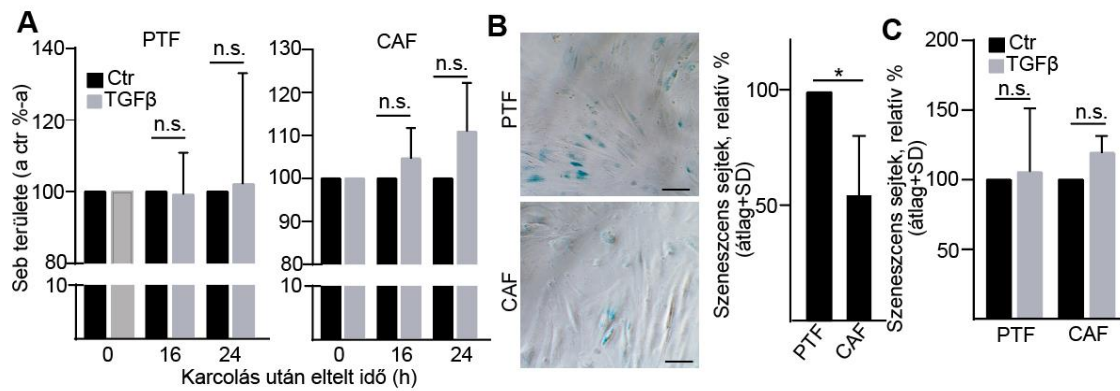


27. ábra: A TGFβ aktiválja a CAF-okat és a PTF-eket.

A-B) αSMA and KI67 immunfestés kontroll és TGFβ-kezelt PTF és CAF sejtekben (konfokális mikroszkóp) (A) és a kvantifikálásuk (B). Az αSMA expressziós intenzitása ImageJ szoftverrel lett meghatározva. Az adatok három megismételt kísérletből származnak. **C)** Az adott mRNS-ek expressziós változása TGFβ-kezelt fibroblasztokban kezeletlen kontrollhoz (ctr) képest (RT-qPCR, n=4). Párosított összehasonlításokat végeztünk a kontroll és a kezelt minták között, és a kontroll minta értékét mindig 1-nek vettük. **D)** IL-6 és αSMA detektálása a PTF és CAF kultúrákban (konfokális mikroszkóp). **E)** Az IL6+ sejtek aránya (konfokális mikroszkópos képek alapján kvantifikálva). Mann-Whitney U-tesztet (B, E), párosított t-próbát (C) végeztünk *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005 szignifikancia értékekkel. A PTF és CAF sejtvonalak nem egy betegből származtak, így a statisztikai elemzés során azok összehasonlítása nem történt meg a kezelt-kezeletlen összehasonlítás mellett. Egyes esetekben ugyanazon mintából több, különböző alkalommal is történt mérés. Méretarány: 50 μm (A, D)

A fibroblasztok TGFβ kezelésre adott reakciójának további karakterizálásához sebgyógyulási kísérletet is végeztünk. Érdekes módon a kezelés hatására nem tapasztaltunk különbséget a PTF és CAF kultúrák sebzárási képességében (28. ábra A), eltérően a normál fibroblasztoknál tapasztaltaktól, ahol a kezelés hatására csökkent a sejtek migrációs képessége. A sejtek szenescenciájának vizsgálata során megfigyeltük, hogy a CAF kultúra kevesebb SA-β-GAL aktivitással rendelkező szenescens sejtet tartalmazott a PTF párjához képest (28. ábra B). A SA-β-GAL tesztet széles körben

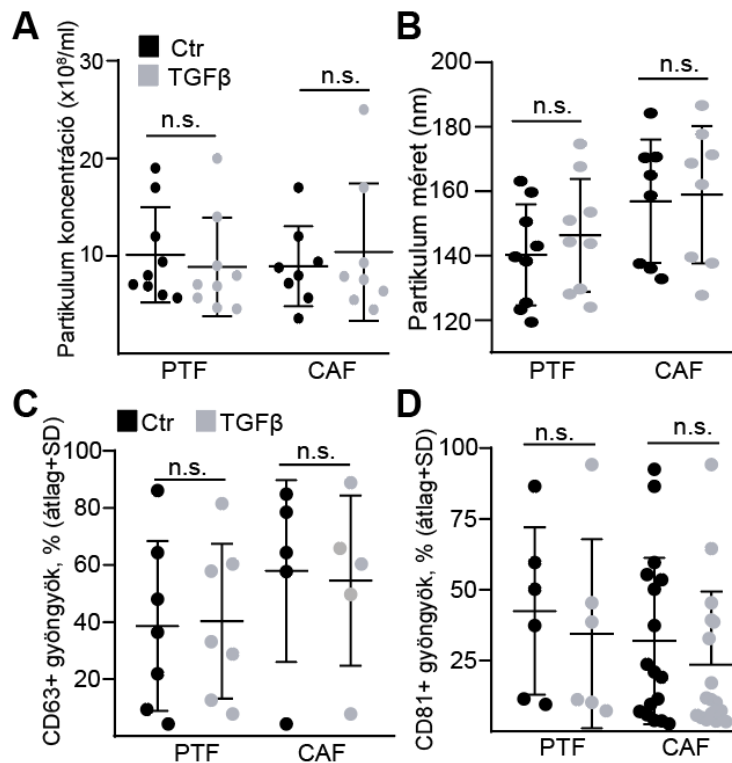
alkalmazzák a sejtvonalak szenescenciájának jellemzésére. A TGF β egyik fibroblaszt populációban sem módosította a szenescens sejtek arányát (28. ábra C).



28. ábra: A kolon fibroblasztok migrációjának és szenescenciájának jellemzése.

A) A TGF β kezelt fibroblaszt tenyészetekben a sebterület relatív értéke a kezeltlen kontroll tenyészetek sebterületéhez képest. (n=3). **B-C)** Az SA- β -galaktozidáz aktivitással rendelkező sejtek aránya. Reprézantív mikroszkópos ábrák (B) és a kvantifikálásuk (C, n=3, párosított minták). Párosított t-próbát (A, B, C) végeztünk. Méretarány: 50 μ m (B).

Fontos, hogy a TGF β kezeléssel kiváltott fibroblaszt aktiválás a normál fibroblasztoknál megfigyeltekhez hasonlóan sem a CAF, sem pedig a PTF kultúrák esetén nem módosította a kibocsátott EV-k mennyiségét az NTA és a gyöngy-alapú mérések alapján (29. ábra A-D).

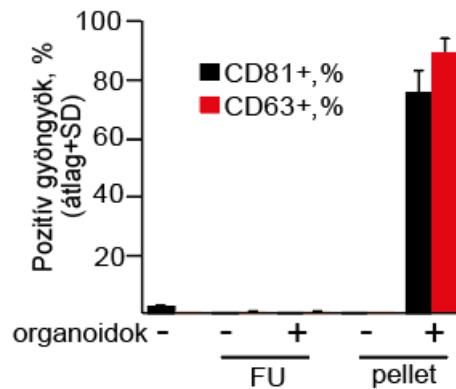


29. ábra: A TGFβ nem befolyásolja a peritumorális és a tumor-asszociált fibroblasztok EV termelését.

A-B) A partikulumok koncentrációja (A, 100 000 sejtre normalizálva) és mérete (B) TGFβ kezelt (10ng/ml, 4 nap) és kezeletlen PTF és CAF sejtek esetén, NTA-val mérve. **C-D)** A jelölt felülúszóban inkubált pozitív anti-CD63 (C) és anti-CD81 (D) gyöngyök százaléka (100 000 sejt számra normalizálva). Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk a statisztikai elemzésnél.

5.8. A CRC organoidokból származó EV-knek nincs jelentős hatásuk a fibroblasztokra

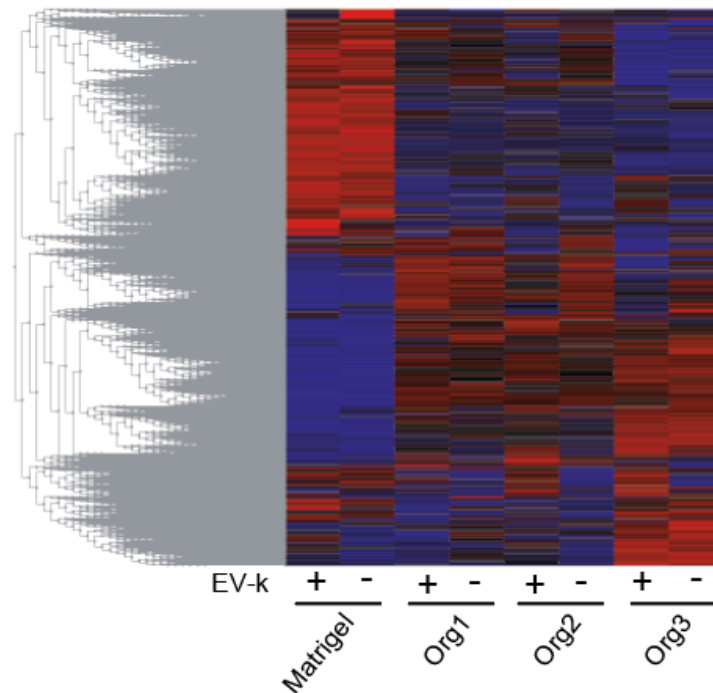
A humán kolon fibroblasztok karakterizálása és EV termelésük jellemzése után megvizsgáltuk, hogy a CRC organoid eredetű EV-k hatással vannak-e a fibroblasztokra. A kísérletekhez az EV-eket differenciál ultracentrifugálással izoláltuk. Az EV-gazdag pellet és az EV-mentes felülúszó EV-tartalmát anti-CD63 vagy anti-CD81 ellenanyaggal burkolt gyöngyökkel és áramlási citometriával igazoltuk (30. ábra)



30. ábra: Differenciál ultracentrifugálás után csak a pellet tartalmaz EV-eket.

A CD81 + és CD63 + gyöngyök százaléka anti-CD81 és anti-CD63 ellenanyaggal kimutatva (áramlási citometria). A gyöngyöket a 3D kultúrákból származó médium ultracentrifugálás után kapott felülúszójában, vagy a PBS-sel felfuszpendált pelletben inkubáltuk. Kontrollként organoid nélküli Matrigel-ről származó médiumot használtunk, amit szintén untracentrifugáltunk (n=2).

Az ATCC1459 humán kolon fibroblasztokat 3D CRC organoid felülúszóból készített EV-gazdag, illetve EV-mentes médiummal kezeltük, majd microarray vizsgálatot végeztünk. Ebben a kísérleti rendszerben az EV-k hatását az EV-mentes CRC-eredetű körülményekhez hasonlítottuk. Kontrollként CRC organoid-mentes Matrigel-ről származó mintát (pellet és FU) használtunk. Érdekes módon a CRC organoid eredetű médium az EV-tartalomtól függetlenül megváltoztatta a fibroblasztok génexpressziós mintázatát (31. ábra).

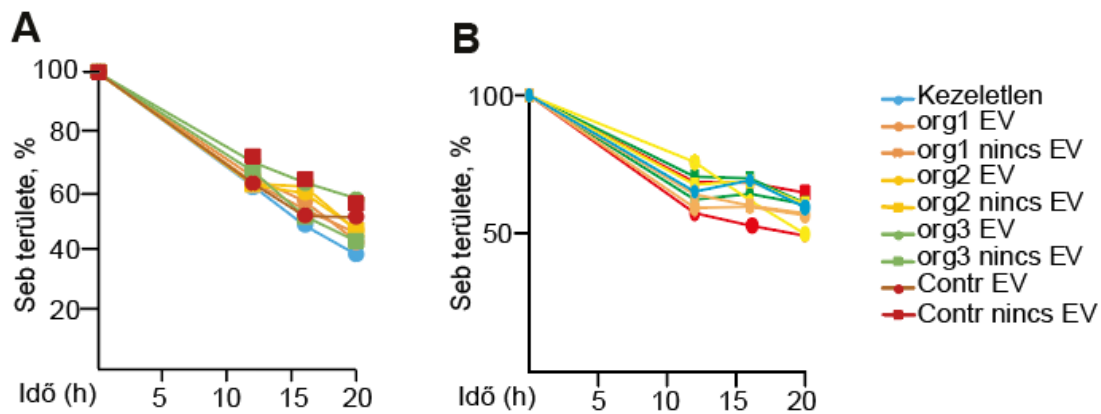


31. ábra: A CRC-eredetű médium az EV-tartalomtól függetlenül megváltoztatja a fibroblasztok génextpressziós mintázatát.

Humán kolon fibroblasztok microarray adatainak hierarchikus csoportosítása. A fibroblasztokat EV-gazdag és EV-mentes médiummal kezeltük, ami organoidokat tartalmazó, illetve nem tartalmazó Matrigel cseppekről származott (az EV-eket 300 000 sejtet tartalmazó kultúrák médiumából izoláltuk sorozatos ultracentrifugálással). Az RNS-t 48 órával a kezelést követően izoláltuk.

Érdekes módon a CRC-eredetű EV-knek nem volt jelentős hatása a fibroblasztok transzkripciós profiljára, és a géneknek csak egy kis csoportja (körülbelül 100 gén) mutatott kisebb (kevesebb, mint kétszeres) expressziós változást (Függelék, 4. táblázat).

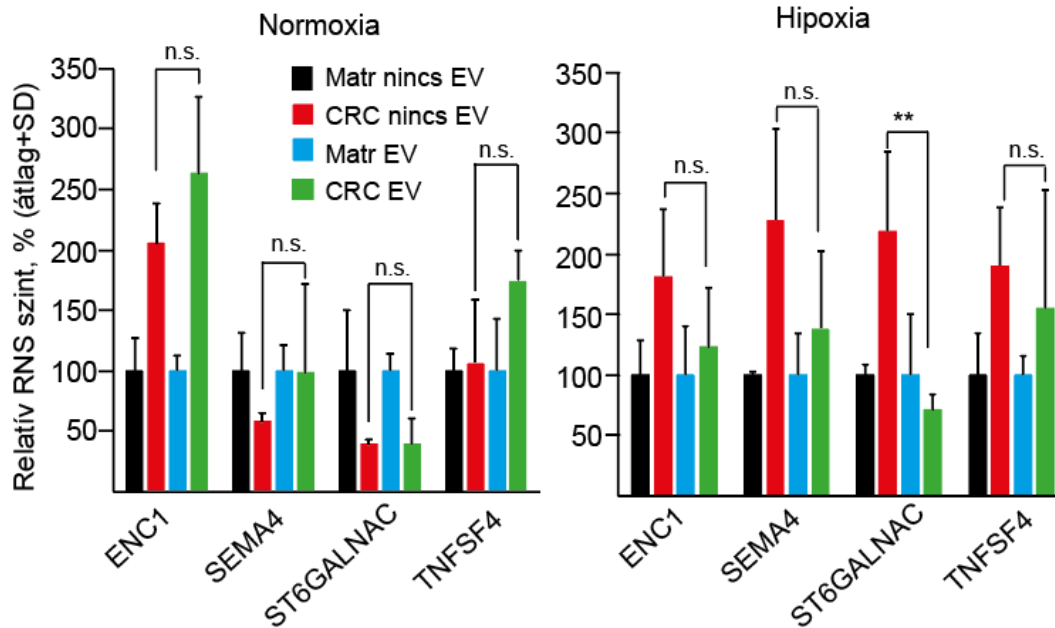
Szerettük volna tudni, hogy a CRC organoid eredetű EV-knek van-e kritikus hatása normál vagy kedvezőtlen körülmények között, ezért összehasonlítottuk a normoxiás és a hipoxiás tenyésztésből származó EV-k hatását. A CRC organoid eredetű EV-k nem serkentették a fibroblasztok motilitását sebgyógyulási vizsgálat során (wound healing assay) egyik tenyésztési körülményben sem (32. ábra).



32. ábra: A CRC organoid eredetű EV-k nem serkentik a kolon fibroblasztok motilitását.

A relatív seb területet a kiindulási seb területhez hasonlítottuk konfluens fibroblaszt tenyészetekben. A sejteket EV-gazdag (EV) vagy EV-mentes (nincs EV) médiummal kezeltük, amit a jelölt organoid kultúrák médiumából izoláltunk. Az organoidokat normoxiában (A) vagy hipoxiában (B) tenyésztettük. Contr: organoidot nem tartalmazó Matrigel-ről médium; Kezeletlen: a fibroblasztok nem lettek organoid eredetű médiummal kezelve.

Amikor a fibroblasztokat hipoxiás körülmények között tenyésztett CRC organoidokból származó EV-mentes médiummal kezeltük, akkor az EV-t is tartalmazó médium kezeléshez képest jellemzően megemelkedett a transzkripció aktivitása azoknak a géneknek, amik a fibroblasztok aktiváltságával kapcsolatban vannak (*ENC1*, *ST6GALNAC5*, *SEMA5A*, *TNFSF4*). Ehhez hasonló aktiváló hatást azonban nem tapasztaltunk, amikor normoxiában tenyésztett organoid eredetű EV-gazdag vagy EV-mentes médiummal történtek a kezelések (33. ábra).

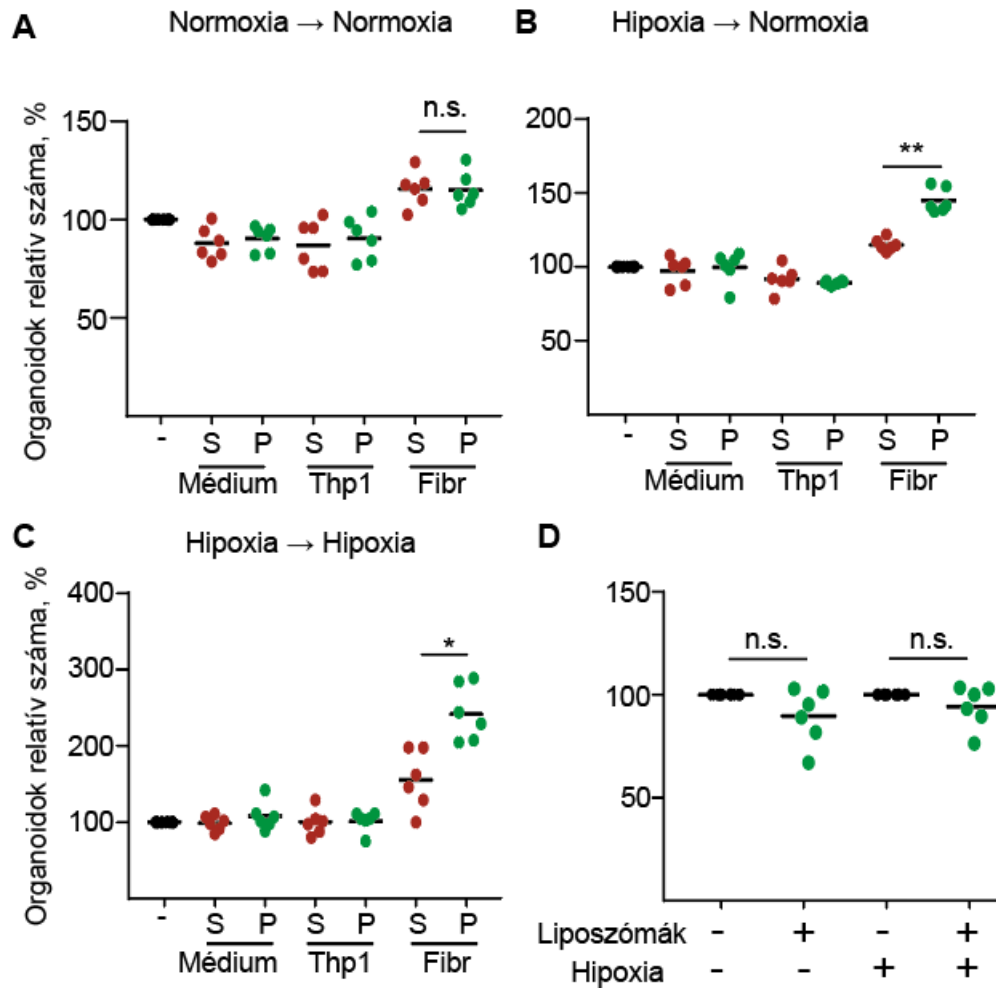


33. ábra: A fibroblaszt aktivációval kapcsolatos gének relatív RNS szintje.

A CRC organoidokról származó médiumot (a tenyésztés normoxiában és hipoxiában 3 napig tartott) ultracentrifugáltuk, majd a fibroblasztokat 2 napon keresztül kezeltük az EV-gazdag, illetve az EV-mentes médiummal. Matr: a fibroblasztok organoid-mentes Matrigel cseppek felülúszójával kezelve. RT-qPCR, n=3. ANOVA and Tukey post hoc teszt, csak a CRC nincs EV (piros) és a CRC EV (zöld) adatok közti összehasonlítás szignifikanciája van feltüntetve.

5.9. Hipoxiás körülmények között a fibroblaszt eredetű EV-k növelik az organoidok számát

Következő lépésként normoxiás és hipoxiás körülmények között tenyésztett humán kolon fibroblasztok médiumából izoláltunk EV-ket, 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 (34. ábra A-C), ezt a hatást azonban nem tapasztaltuk az EV-mentes médiummal történő kezelés esetében. Fontos, hogy a kísérleteket kontrollként elvégeztük akut monocytás leukémia, THP1 sejt vonal médiumából izolált EV-kkel és liposzómákkal is, melyek esetében nem tapasztaltunk hatást az organoidok növekedésére nézve (34. ábra D). Ezek alapján arra következtethetünk, hogy az organoidok kolónia kialakító képességének serkentése a hipoxiás fibroblaszt eredetű EV-khez köthető.



34. ábra: A hipoxiás fibroblaszt eredetű EV-k serkentik a CRC sejtek organoid formáló képességét.

A THP-1 sejtekről vagy a kolon fibroblasztokról (Fibr) a médiumot 2 napig gyűjtöttük, majd ultracentrifugáltuk, és a kezeléseink során a felülúszót (S: supernatant) vagy a pelletet (P) használtuk. A sejt kultúrák esetén a pellet tartalmazza az EV-eket. Kontrollként médiumot használtunk. A normoxiás (A) vagy hipoxiás (B, C) tenyésztési körülmények után a mintákat CRC organoid sejteken használtuk, majd a kolónia képző képességet normoxiában (A, B) és hipoxiában (C) is vizsgáltuk 4 nappal a kezelés után. Három organoid vonalat kétszer teszteltünk le (***) $p < 0,005$ mindhárom adatcsoport esetén Kruskal-Wallis statisztikai analízist végezve. A párosított összehasonlítások során Dunn post hoc tesztet végeztünk, melynek eredménye csak a jelölt összehasonlításoknál látható.) D) Az új organoidok száma 1×10^{11} liposzómával történő kezelést követően. Minden kísérletben az eredményeket a kezeletlen kontrollhoz hasonlítottuk. A liposzómákat normoxiában és hipoxiában inkubáltuk 2 napon keresztül, mielőtt a CRC organoid sejtekhez adtuk volna, majd a kolóniaképzést normoxiában és hipoxiában is teszteltük.

6. Megbeszélés

Eddig a legtöbb tanulmány 2D sejt kultúrák felhasználásával vizsgálta az EV-k funkcióit a CRC és egyéb tumorok esetében, habár a különböző sejt vonalak és tenyésztési körülmények alkalmazása során kapott eredmények között nem sok egyezést lehetett kimutatni. Ennek okát abban a tényben kereshetjük, hogy ezek a sejt vonalak különböző betegeket reprezentálnak, és a 2D kultúrákat létrehozó eljárások szelektív előnyt biztosítanak a gyorsan osztódó tumoros sejteknek 2D viszonyok között is. A közelmúltban kifejlesztett organoid technológia egy olyan magas szintű modellrendszert jelent, ami megtartja az *in vivo* tumorokra jellemző sejtes heterogenitást mesenchymális sejtek nélkül [72, 76, 95, 96]. Ráadásul a tenyésztési körülményeik úgy vannak szabványosítva és optimalizálva, hogy ezt a heterogenitást a lehető legnagyobb mértékben meg is őrizzék.

Tudomásunk szerint a dolgozat alapját adó egyik publikáció az első, amelyben 3D organoid technológiát alkalmaznak a CRC EV termelésének jellemzésére betegeredetű minták felhasználásával. Egy korábbi munkában Tauro B.J. és munkatársai szuszpenziós tenyésztési körülmények között tartott sejt vonal eredetű 3D kultúrákat vizsgált, ami nem változtatta meg jelentősen a sejtek túlélését, és a munka során két exoszóma alpopulációt különítettek el [97]. Eguchi T. és munkatársai mátrix-mentes 3D modellrendszert használtak a sejt kultúrák fenntartásához [98]. Érdekes módon a 3D kultúrák összehasonlítása során több apoptotizáló sejtet tapasztaltunk a szuszpenziós tartás esetén a Matrigel-es tenyésztéshez képest, habár az apoptotizáló sejt populáció mérete sejt vonaltól függő volt. Így a 3D-s szuszpenziós módszer csak néhány CRC sejt vonal és betegeredetű organoid számára jelenthet alternatív tenyésztési lehetőséget. Érdekes módon, amíg a sejt vonal eredetű 3D kultúrák esetén a CD63+ EV-k domináltak a felülúszóban, a betegeredetű szövetből származó organoidok több CD81+ EV-t termeltek, ami felveti annak a lehetőségét, hogy a sejt vonal eredetű 3D tenyészetek és az organoidok eltérő EV-eket bocsátanak ki. Ez egybevág a korábbi tanulmányok eredményeivel, melyek alapján az EV markerek sejt vonalanként változnak, és jelenleg nem áll rendelkezésünkre univerzális EV marker [99].

Az egyes sejtvonalak különböző mennyiségű EV szubpopulációt termelnek, és az EV alcsoportoknak különböző lehet a funkciójuk az eltérő biogenezis és molekuláris cargo miatt [100-102]. Bár ismert, hogy az EV-k molekuláris összetétele egyrészt a fehérjék poszttranszlációs módosulásaitól függ [103], egyéb mechanizmusok kevésbé ismertek. Mivel nincs olyan genetikai modell, amivel egy specifikus EV szubpopuláció termelődését blokkolhatnánk, így ajánlott az EV-eket méretük alapján csoportosítani (például kis- és nagyEV-k, sEV, lEV) [104]. Fontos, hogy a 2D és a szuszpenziós 3D tenyészetekkel ellentétben az Matrigel alapú 3D tenyészetek felülúszójában inkább kis méretű EV-eket találtunk. A nagy méretű EV-eket jelző Annexin V+ eseményeket a 3D tenyészetek felülúszójában nem tudtuk kimutatni, ami arra utal, hogy a nagyobb méretű EV-k a Matrigel mátrixból nem tudnak kiszabadulni

Habár az *in vivo* és *in vitro* tanulmányok a tumoros sejtek megemelkedett EV termeléséről számolnak be [50-52], a jelenségért felelős faktorok felderítésével csak kevés kutatás foglalkozik. A p53 jelenléte például kulcsfontosságú az EV termelés megemelkedéséhez DNS sérülés esetén tumoros tüdő sejtekben [105]. A *KRAS* mutáció egy másik fontos genetikai eseményt jelent számos sejtvonal esetén; CRC-vel foglalkozó tanulmányokban *KRAS* mutáció esetén főként az EV-k molekuláris cargojában bekövetkező változásokra fókuszáltak és bizonyos RNS-ek szelektív csomagolódását mutatták ki [106, 107]. Így az eredményeink, miszerint az *Apc* mutáció, ami kritikus genetikai változás a CRC kialakulásában, valamint a kollagén I ECM fehérje, ami gyakran feldúsul a CRC szövetben, serkenti az organoidok EV termelését, különösen érdekesek lehetnek testfolyadékokból származó tumor eredetű EV-k monitorozására szolgáló diagnosztikai módszerek kidolgozása során. Továbbá eredményeink azt mutatják, hogy az *Apc* mutáció az EV termelést serkentő hatását a Wnt út vonal indukálásán keresztül fejt ki. A Wnt aktivitás és a sejtosztódás szorosan összefüggő folyamatok a bélhám szövetében és az adenomákban. Mivel az összes eredményünk sejtszámra lett normalizálva, így a megemelkedett EV termelés hátterében nem a megnövekedett számú sejt áll. Megjegyzendő azonban, hogy további vizsgálatok szükségesek annak kiderítésére, hogy az intenzívebb EV termelés a Wnt út vonal közvetlen hatása, vagy a Wnt-indukált változásokat tükrözi a különböző sejtpopulációk arányaiban.

A sztromális fibroblasztok jelentősen befolyásolják a CRC tumorigenezist hepatocita növekedési faktor (HGF) termelésével, ami tumor őssejt fenotípus kialakulásához vezet [58], továbbá a TGF β aktiválja a fibroblasztokat, melyek így a metasztázist fogják elősegíteni részben az IL11 termelésük révén [15], emellett szoros összefüggés van a sztromális génexpressziós mintázat és a CRC túlélési valószínűsége között [16]. Bár az aktivált fibroblasztok számos tumortípus progressziójában fontosak, a pontos aktiválási mechanizmusuk és az így kialakuló fibroblaszt alpopulációk szerepe még nem teljesen ismert. Például a pankréász duktális adenokarcinóma (PDAC), ami egy különösen agresszív daganattípus, sztromális elemeket halmoz fel, ami myCAF és iCAF fibroblaszt sejteket is tartalmaz [108, 109]. Habár a tumorsejtekkel kapcsolatban lévő fibroblasztok α SMA-t expresszálnak, és myCAF-okká differenciálódnak, a perifériás fibroblasztok IL6-ot fejeznek ki, mint az iCAF-ok [108]. Ráadásul a TGF β gátolja az iCAF-ok differenciációját, így ez a citokin központi szerepet játszik a CAF-ok aktivációs mechanizmusában [109]. Egy korábbi publikáció érdekes módon IL6+ fibroblasztok jelenlétét is leírja CRC-ben [110]. Ezekkel az eredményekkel összhangban bizonyítottuk, hogy a TGF β fontos szerepet tölt be a PTF-ek és a CAF-ok heterogenitásának kialakításában CRC-ben. A sejtes heterogenitás jelentőségét már bizonyították normál humán kolon fibroblasztok esetében is különböző génexpressziós profillal rendelkező szubpopulációk azonosításával [111]. Érdekes módon a TGF β a kísérleteink során NCF tenyészetekbe nem hozott létre IL6+ sejtpopulációkat, habár más változások bekövetkezhetnek a kezelés hatására, amit nem teszteltünk.

A PTF-eket gyakran alkalmazzák, mint normál kontroll fibroblasztokat [60], habár egy nemrég megjelent tanulmány kevés különbséget talált a CAF-ok és a PTF-ek génexpressziós mintázata között, továbbá az α SMA, amit általános aktivált fibroblaszt markerként használnak, a PTF-ekben is jelen volt [60]. A TGF β -t a fibroblasztok legfőbb aktiválójaként tartják számon CRC-ben [15], ami jellegzetes gének, mint például az *IL11* expressziójához vezet [15]. Érdekes módon a PTF-ek és a CAF-ok is magasabb *IL11*, *ACTA2*, *HBEGF*, *IL6*, *FAP* expressziót mutattak a TGF β kezelést követően, ami arra utal, hogy ezek a fibroblasztok *in vitro* körülmények között tovább aktiválhatók. A kísérleteink során a PTF-ek és a CAF-ok számos TGF β kezelés utáni karakterizálási vizsgálatban azonos tulajdonságokat mutattak (sejtes heterogenitás, migrációs képességek a sebzárdási kísérletben, génexpressziós változások, sejtes szenescencia). Ezek az

eredmények arra utalnak, hogy a PTF-ek vagy már egy pre-aktivált állapotban vannak, vagy a CAF-ok elvesztik az aktivált formájukat a kísérleti rendszerünkben.

A CRC sejt eredetű EV-k polarizálják a tumorasszociált makrofágokat a miR-145 által [112], ami azt mutatja, hogy ezek az EV-k bizonyos sejtpopulációkban aktívak lehetnek. Érdekes módon az emlőtumorról ellentétben, ahol a tumoros sejtekből származó EV-k a Wnt-PCP (Wnt-planar cell polarity) jelátviteli útvonal sztromális aktiválódását okozzák, ami a tumoros sejtek migrációjához vezet [113], mi a kutatásaink során nem tapasztaltuk, hogy a CRC organoid eredetű EV-k hatással lennének a fibroblasztok aktivációjára. Érdekes módon összefüggést találtunk a normál fibroblasztok motilitása és az aktiváltsági fok között, mivel a TGF β általi aktiválás után a kezelt és kezeletlen fibroblasztok sebzárási képessége között különbséget láttunk, azonban az organoid eredetű EV-k nem befolyásolták a wound healing assay-ben a fibroblasztok sebzárási képességét. A gyulladt bélszövetre (Crohn betegség, colitis ulcerosa) jellemző a kolon fibroblasztok migrációs képességének csökkenése [114], és a kísérleteink során az aktivált fibroblasztoknál is a migrációs képesség csökkenését tapasztaltuk, azonban ez csak a normál sejtekre volt igaz, a CAF és PTF sejtek nem reagáltak a TGF β kezelésre csökkent migrációval.

Tehát láttuk, hogy a CRC organoid eredetű EV-knek nincs hatása a fibroblasztok aktiváltságára, azonban a fibroblaszt eredetű EV-k serkentették az organoidok kolóniaképző képességét hipoxiás körülmények között. Vizsgálatainkban olyan organoidokat használtunk, melyek külső EGF aktivitástól függenek, így EGF-et adunk az organoidoknak. Fontos, hogy munkacsoportunk nemrég kimutatta, hogy a normál fibroblaszt- illetve CAF-eredetű EV-k az EGF receptort aktiváló amphiregulint (AREG) szállítanak, ami a betegeredetű EGF-függő organoidok esetén megemelte az osztódó CRC sejtek számát EGF hiányában, azonban az EGF-független tenyészetekben ezt a hatást nem tapasztaltuk [62]. Modellünk szerint tehát a külső EGF aktivitást a fibroblasztokból származó EV-k szolgáltatják AREG által. Amennyiben azonban EGF-et adunk a CRC organoidokhoz, vagy a CRC sejtek már EGF függetlenek, a fibroblaszt EV-knek csak akkor van további hatásuk, ha előtte a sejteket hipoxiában tartottuk. Egy másik tanulmány szerint a CAF-EV-k a hasnyálmirigy tumor agresszivitását támogatták hipoxiában [115], ami arra utalhat, hogy az EV-k hatásának egy része csak kedvezőtlen körülmények között jelentkezik különböző tumor-modellekben.

A sztromális eredetű EV-k más fontos, a tumorigenezisben szerepet játszó folyamatokban is részt vesznek. Köldökzsínór vérből származó mesenchymális sejt eredetű EV-kben gátolták az ELFN1-S1 hosszú, nem kódoló RNS-t (lnc-RNS), melynek hatására a kolon adenokarcinóma növekedése és a sejtek migrációja lecsökkent [116]. Továbbá granulocita-mieloid eredetű szuppresszor sejtek S100A9 tartalmú EV-eket termelnek, amik így támogatják a CRC sejtek őssejt-szerű tulajdonságait [117]. Az M2 irányba polarizált makrofágok által termelt EV-k hozzájárulnak a CRC sejtek migrációjához [118]. Érdekes módon két elegáns tanulmány is alátámasztotta, hogy a fibroblaszt eredetű EV-k hatására a CRC sejtek rezisztensekké válnak a kemoterápiás szerekre [119, 120] és sejtvonalakat, illetve xenograftokat használva kiderítették, hogy a hatás a CRC sejtek Wnt fehérjéken keresztüli tumorőssejteké váló dedifferenciálódásán keresztül valósul meg [121]. A CAF-eredetű EV-k metasztatizist és epitheliális-mesenchymalis tranzíciót (EMT) indukálnak a miR-92a-3p által, és ez a hatás hangsúlyosabb volt a kontroll fibroblasztokhoz képest [120]. A kísérleteink során érdekes módon a TGF β -kezelt fibroblasztok által termelt EV-k miRNS profilja megváltozott a kezeletlen sejtekhez képest, a miR-101, 382, 424 és 642 miRNS-ek csak a kezelt sejtek EV-iben voltak kimutathatók. Ezeknek az miRNS-eknek a CRC sejtek proliferációjában és az apoptózisukban betöltött szerepe vitatott. Míg a miR-101-nek anti-proliferatív hatást tulajdonítanak [122, 123], addig a miR-382 szintje megemelkedik a CRC-ben, és a tumor progresszióját segíti elő [124].

7. Következtetések

Kimutattuk, hogy a kisebb EV-k detektálhatóak a 3D organoidok és szferoidok felülűszójában, függetlenül attól, hogy milyen mátrixban tenyésztjük a kultúrákat. Bizonyítottuk, hogy a betegeredetű CRC organoidok termelnek EV-eket, amiket vizsgálhatunk is a felülűszóban, így igazoltuk, hogy a Matrigel alapú 3D organoid technológia alkalmas az EV-k vizsgálatára CRC esetén. Az eredményeink továbbá azt is mutatják, hogy a CRC tumorigenezisében kritikus faktorok, mint például az *Apc* mutáció vagy a kollagén I felhalmozódás módosítja az EV kibocsátás intenzitását tumor organoidokban.

A normál kolon 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 NF-eredetű EV-kben jelennek meg. Érdekes módon, bár a normál fibroblaszt eredetű EV-k serkentik a tumoros sejtek kolóniaképző képességét hipoxiában EGF-dependens CRC esetekben, az organoid eredetű EV-k nem eredményeztek jelentős változást a normál fibroblasztok aktiváltságában. Adataink szerint tehát a CRC sejtek és a fibroblasztok közötti kommunikációban a fibroblaszt eredetű EV-k szerepe jelentősebb az általunk használt modellrendszerben.

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.

8. Összefoglalás

Az EV-k membránnal körülvett struktúrák, amik biológiailag fontos molekulákat szállítanak a sejtek között, így az intercelluláris kommunikáció egy új formájának tekinthetjük őket. Mivel az EV-k a tartalmukat védett módon szállítják, és az EV kibocsátás a tumorigenezis során rendszerint megemelkedik, így az EV-k nagyon ígéretes eszközök a korai tumordiagnosztika fejlődéséhez. 3D technológiát alkalmazva bizonyítottuk, hogy a CRC betegeredetű organoidok kiváló modellrendszernek számítanak az EV-k vizsgálatához.

A CRC kialakulását elősegítő faktorok EV termelésre kifejtett hatásának vizsgálata során kimutattuk, hogy az *Apc* mutáció, ami a Wnt útvonal szabályozhatatlan aktív működéséhez, így a CRC betegek nagy részénél a tumor kialakulásának hátterében álló fő faktor, jelentősen befolyásolja a CRC sejtek EV termelését a Wnt jelátviteli út indukálása által. Továbbá az ECM-alkotó kollagén I, ami a tumorigenezis során felhalmozódik a daganatos szövetben, szintén megemeli a CRC sejtek EV kibocsátását. Érdekes azonban, hogy az organoid eredetű EV-knek nincs hatása a fibroblasztok aktiváltságára.

A TGF β , mint a fibroblasztok egyik fő aktivátora, megváltoztatja a normál fibroblaszt eredetű EV-k miRNS profilját. Fontos, hogy a fibroblaszt eredetű EV-k csak hipoxiás körülmények között serkentették a CRC organoid sejtek kolóniaformáló képességét, ami arra utal, hogy a miRNS-ek TGF β indukálta válogatása csak speciális feltételek mellett játszik szerepet CRC-ben.

Összességében eredményeink alapján az organoid rendszer alkalmas a tumoros sejtek EV termelésének tanulmányozására. Az *Apc* mutáció és a kollagén felhalmozódás kritikus faktorok a CRC sejtek EV termelésének indukálásában. A fibroblasztok által kibocsátott EV-k miRNS profilja módosul a TGF β -val való aktiválásukat követően, továbbá hipoxiás körülmények között a fibroblasztok aktiváltságától függetlenül a fibroblaszt eredetű EV-k serkentik a CRC sejtek kolóniaképző képességét.

8.1. Summary

Extracellular vesicles (EVs) are membrane-surrounded structures that transmit biologically important molecules from the releasing to target cells, thus providing a novel intercellular communication mechanism. Since EVs carry their cargo in a protected form and their secretion is generally increased in tumorigenesis, EVs hold a great potential for early cancer diagnosis. By 3D culturing, we provide evidence that colorectal cancer (CRC) patient-derived organoids, representing a state-of-the-art established and essential approach for studying human CRC, is a suitable model for EV analysis.

When testing the effects of major factors promoting CRC progression on EV release in the organoid model, we observed that *Apc* mutation, leading to uncontrolled Wnt activation and thus to tumorigenesis in the vast majority in CRC patients, critically induces EV release by activating the Wnt pathway. Furthermore, the extracellular matrix component collagen, known to accumulate in tumorigenesis, enhances EV secretion as well. Interestingly, we could not detect a major effect of organoid EVs on the activation of fibroblasts.

The TGF β , one of the most important activating factors of fibroblasts, changes the miRNA profile of the fibroblast-derived EVs. Importantly, the fibroblast-derived EVs induce colony formation of CRC organoid cells only under hypoxia, suggesting that TGF β -induced sorting of miRNAs plays a role in CRC only under specific conditions.

Collectively, we proved, that colorectal cancer patient-derived organoid system is a suitable model for EV analysis. Our results with CRC and *Apc*-mutant adenoma organoids identify *Apc* mutation and collagen deposition as critical factors for increasing EV release from tumors. Furthermore, we provide evidence that the miRNA profile of EVs derived from TGF β activated fibroblasts changes and stromal fibroblast-derived EVs contribute to tumorigenesis under unfavorable conditions in CRC.

9. Irodalomjegyzék

- [1] K.W. Kinzler, B. Vogelstein, Lessons from hereditary colorectal cancer, *Cell* 87(2) (1996) 159-170.
- [2] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J Clin* 68(6) (2018) 394-424.
- [3] E.H. Schreuders, A. Ruco, L. Rabeneck, R.E. Schoen, J.J. Sung, G.P. Young, E.J. Kuipers, Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes, *Gut* 64(10) (2015) 1637-1649.
- [4] M. Song, W.S. Garrett, A.T. Chan, Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention, *Gastroenterology* 148(6) (2015) 1244-1260.e1216.
- [5] E. Dekker, P.J. Tanis, J.L.A. Vleugels, P.M. Kasi, M.B. Wallace, Colorectal cancer, *Lancet* 394(10207) (2019) 1467-1480.
- [6] B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V.E. Velculescu, S. Zhou, L.A. Diaz, Jr., K.W. Kinzler, Cancer genome landscapes, *Science* 339(6127) (2013) 1546-1558.
- [7] E.R. Fearon, B. Vogelstein, A genetic model for colorectal tumorigenesis, *Cell* 61(5) (1990) 759-767.
- [8] M.J. Makinen, Colorectal serrated adenocarcinoma, *Histopathology* 50(1) (2007) 131-150.
- [9] M.J. Makinen, S.M. George, P. Jernvall, J. Makela, P. Vihko, T.J. Karttunen, Colorectal carcinoma associated with serrated adenoma--prevalence, histological features, and prognosis, *J Pathol* 193(3) (2001) 286-294.
- [10] C.R. Boland, A. Goel, Microsatellite instability in colorectal cancer, *Gastroenterology* 138(6) (2010) 2073-2087.e2073.
- [11] J.M. Loree, A.A.L. Pereira, M. Lam, A.N. Willauer, K. Raghav, A. Dasari, V.K. Morris, S. Advani, D.G. Menter, C. Eng, K. Shaw, R. Broaddus, M.J. Routbort, Y. Liu, J.S. Morris, R. Luthra, F. Meric-Bernstam, M.J. Overman, D. Maru, S. Kopetz, Classifying Colorectal Cancer by Tumor Location Rather than Sidedness Highlights a Continuum in Mutation Profiles and Consensus Molecular Subtypes, *Clin Cancer Res* 24(5) (2018) 1062-1072.
- [12] J. Guinney, R. Dienstmann, X. Wang, A. de Reynies, A. Schlicker, C. Soneson, L. Marisa, P. Roepman, G. Nyamundanda, P. Angelino, B.M. Bot, J.S. Morris, I.M. Simon,

S. Gerster, E. Fessler, E.M.F. De Sousa, E. Missiaglia, H. Ramay, D. Barras, K. Homicsko, D. Maru, G.C. Manyam, B. Broom, V. Boige, B. Perez-Villamil, T. Laderas, R. Salazar, J.W. Gray, D. Hanahan, J. Tabernero, R. Bernards, S.H. Friend, P. Laurent-Puig, J.P. Medema, A. Sadanandam, L. Wessels, M. Delorenzi, S. Kopetz, L. Vermeulen, S. Tejpar, The consensus molecular subtypes of colorectal cancer, *Nat Med* 21(11) (2015) 1350-1356.

[13] Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer, *Nature* 487(7407) (2012) 330-337.

[14] K.J. Gordon, G.C. Blobe, Role of transforming growth factor- β superfamily signaling pathways in human disease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1782(4) (2008) 197-228.

[15] A. Calon, E. Espinet, S. Palomo-Ponce, D.V. Tauriello, M. Iglesias, M.V. Cespedes, M. Sevillano, C. Nadal, P. Jung, X.H. Zhang, D. Byrom, A. Riera, D. Rossell, R. Mangués, J. Massagué, E. Sancho, E. Batlle, Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation, *Cancer Cell* 22(5) (2012) 571-584.

[16] A. Calon, E. Lonardo, A. Berenguer-Llargo, E. Espinet, X. Hernando-Momblona, M. Iglesias, M. Sevillano, S. Palomo-Ponce, D.V. Tauriello, D. Byrom, C. Cortina, C. Morral, C. Barcelo, S. Tosi, A. Riera, C.S. Attolini, D. Rossell, E. Sancho, E. Batlle, Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer, *Nat Genet* 47(4) (2015) 320-329.

[17] X. Xu, L. Zheng, Q. Yuan, G. Zhen, J.L. Crane, X. Zhou, X. Cao, Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis, *Bone Res* 6 (2018) 2.

[18] J.P. Annes, J.S. Munger, D.B. Rifkin, Making sense of latent TGF β activation, *J Cell Sci* 116(Pt 2) (2003) 217-224.

[19] J. Massagué, How cells read TGF- β signals, *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(3) (2000) 169-178.

[20] M. Zhao, L. Mishra, C.-X. Deng, The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer, *Int J Biol Sci* 14(2) (2018) 111-123.

[21] Z. Jiang, Q. Cao, G. Dai, J. Wang, C. Liu, L. Lv, J. Pan, Celastrol inhibits colorectal cancer through TGF- β 1/Smad signaling, *Onco Targets Ther* 12 (2019) 509-518.

- [22] J. Xu, S. Acharya, O. Sahin, Q. Zhang, Y. Saito, J. Yao, H. Wang, P. Li, L. Zhang, F.J. Lowery, W.L. Kuo, Y. Xiao, J. Ensor, A.A. Sahin, X.H. Zhang, M.C. Hung, J.D. Zhang, D. Yu, 14-3-3 ζ turns TGF- β 's function from tumor suppressor to metastasis promoter in breast cancer by contextual changes of Smad partners from p53 to Gli2, *Cancer Cell* 27(2) (2015) 177-192.
- [23] H. Clevers, Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease, *Cell* 127(3) (2006) 469-480.
- [24] K. Yang, X. Wang, H. Zhang, Z. Wang, G. Nan, Y. Li, F. Zhang, M.K. Mohammed, R.C. Haydon, H.H. Luu, Y. Bi, T.C. He, The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies, *Lab Invest* 96(2) (2016) 116-136.
- [25] Z. Koveitypour, F. Panahi, M. Vakilian, M. Peymani, F. Seyed Forootan, M.H. Nasr Esfahani, K. Ghaedi, Signaling pathways involved in colorectal cancer progression, *Cell & Bioscience* 9(1) (2019) 97.
- [26] A.M. Krasinskas, EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma, *Patholog Res Int* 2011 (2011) 932932.
- [27] M.L. Slattery, L.E. Mullany, L.C. Sakoda, R.K. Wolff, W.S. Samowitz, J.S. Herrick, The MAPK-Signaling Pathway in Colorectal Cancer: Dysregulated Genes and Their Association With MicroRNAs, *Cancer Inform* 17 (2018) 1176935118766522.
- [28] P. Wee, Z. Wang, Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways, *Cancers (Basel)* 9(5) (2017).
- [29] M. Frattini, P. Saletti, F. Molinari, S. De Dosso, EGFR signaling in colorectal cancer: a clinical perspective, *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy* 2015 (2015) 21.
- [30] K. Czene, P. Lichtenstein, K. Hemminki, Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database, *Int J Cancer* 99(2) (2002) 260-266.
- [31] S. Syngal, R.E. Brand, J.M. Church, F.M. Giardiello, H.L. Hampel, R.W. Burt, ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes, *Am J Gastroenterol* 110(2) (2015) 223-262; quiz 263.
- [32] P. Peltomaki, H.F. Vasen, Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. *The International*

Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, *Gastroenterology* 113(4) (1997) 1146-1158.

[33] H.T. Lynch, T. Smyrk, Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review, *Cancer* 78(6) (1996) 1149-1167.

[34] D.B. Levy, K.J. Smith, Y. Beazer-Barclay, S.R. Hamilton, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Inactivation of both APC alleles in human and mouse tumors, *Cancer Res* 54(22) (1994) 5953-5958.

[35] E.R. Kim, D.K. Chang, Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the risk, pathogenesis, prevention and diagnosis, *World J Gastroenterol* 20(29) (2014) 9872-9881.

[36] V. Cottet, V. Jooste, I. Fournel, A.M. Bouvier, J. Faivre, C. Bonithon-Kopp, Long-term risk of colorectal cancer after adenoma removal: a population-based cohort study, *Gut* 61(8) (2012) 1180-1186.

[37] M.N. Kulaylat, M.T. Dayton, Ulcerative colitis and cancer, *J Surg Oncol* 101(8) (2010) 706-712.

[38] S.A. Azer, Overview of molecular pathways in inflammatory bowel disease associated with colorectal cancer development, *Eur J Gastroenterol Hepatol* 25(3) (2013) 271-281.

[39] L. Tarmin, J. Yin, N. Harpaz, M. Kozam, J. Noordzij, L.B. Antonio, H.Y. Jiang, O. Chan, K. Cymes, S.J. Meltzer, Adenomatous polyposis coli gene mutations in ulcerative colitis-associated dysplasias and cancers versus sporadic colon neoplasms, *Cancer Res* 55(10) (1995) 2035-2038.

[40] S.H. Wong, J. Yu, Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 16(11) (2019) 690-704.

[41] J. Allen, C.L. Sears, Impact of the gut microbiome on the genome and epigenome of colon epithelial cells: contributions to colorectal cancer development, *Genome Med* 11(1) (2019) 11.

[42] R. Caruso, B.C. Lo, G. Núñez, Host–microbiota interactions in inflammatory bowel disease, *Nature Reviews Immunology* (2020).

[43] C. Pleguezuelos-Manzano, J. Puschhof, A.R. Huber, A. van Hoeck, H.M. Wood, J. Nomburg, C. Gurjao, F. Manders, G. Dalmaso, P.B. Stege, F.L. Paganelli, M.H. Geurts, J. Beumer, T. Mizutani, Y. Miao, R. van der Linden, S. van Elst, K.C. Garcia, J. Top,

R.J.L. Willems, M. Giannakis, R. Bonnet, P. Quirke, M. Meyerson, E. Cuppen, R. van Boxtel, H. Clevers, Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks(+) *E. coli*, *Nature* (2020).

[44] J.P. Nougayrede, S. Homburg, F. Taieb, M. Boury, E. Brzuszkiewicz, G. Gottschalk, C. Buchrieser, J. Hacker, U. Dobrindt, E. Oswald, *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells, *Science* 313(5788) (2006) 848-851.

[45] J.H. Choi, C.M. Moon, T.-S. Shin, E.K. Kim, A. McDowell, M.-K. Jo, Y.H. Joo, S.-E. Kim, H.-K. Jung, K.-N. Shim, S.-A. Jung, Y.-K. Kim, *Lactobacillus paracasei*-derived extracellular vesicles attenuate the intestinal inflammatory response by augmenting the endoplasmic reticulum stress pathway, *Experimental & Molecular Medicine* 52(3) (2020) 423-437.

[46] C. Thery, K.W. Witwer, E. Aikawa, M.J. Alcaraz, J.D. Anderson, R. Andriantsitohaina, A. Antoniou, T. Arab, F. Archer, G.K. Atkin-Smith, D.C. Ayre, J.M. Bach, D. Bachurski, H. Baharvand, L. Balaj, S. Baldacchino, N.N. Bauer, A.A. Baxter, M. Bebawy, C. Beckham, A. Bedina Zavec, A. Benmoussa, A.C. Berardi, P. Bergese, E. Bielska, C. Blenkiron, S. Bobis-Wozowicz, E. Boilard, W. Boireau, A. Bongiovanni, F.E. Borrás, S. Bosch, C.M. Boulanger, X. Breakefield, A.M. Breglio, M.A. Brennan, D.R. Brigstock, A. Brisson, M.L. Broekman, J.F. Bromberg, P. Bryl-Gorecka, S. Buch, A.H. Buck, D. Burger, S. Busatto, D. Buschmann, B. Bussolati, E.I. Buzas, J.B. Byrd, G. Camussi, D.R. Carter, S. Caruso, L.W. Chamley, Y.T. Chang, C. Chen, S. Chen, L. Cheng, A.R. Chin, A. Clayton, S.P. Clerici, A. Cocks, E. Cocucci, R.J. Coffey, A. Cordeiro-da-Silva, Y. Couch, F.A. Coumans, B. Coyle, R. Crescitelli, M.F. Criado, C. D'Souza-Schorey, S. Das, A. Datta Chaudhuri, P. de Candia, E.F. De Santana, O. De Wever, H.A. Del Portillo, T. Demaret, S. Deville, A. Devitt, B. Dhondt, D. Di Vizio, L.C. Dieterich, V. Dolo, A.P. Dominguez Rubio, M. Dominici, M.R. Dourado, T.A. Driedonks, F.V. Duarte, H.M. Duncan, R.M. Eichenberger, K. Ekstrom, S. El Andaloussi, C. Elie-Caille, U. Erdbrugger, J.M. Falcon-Perez, F. Fatima, J.E. Fish, M. Flores-Bellver, A. Forsonits, A. Frelet-Barrand, F. Fricke, G. Fuhrmann, S. Gabrielsson, A. Gamez-Valero, C. Gardiner, K. Gartner, R. Gaudin, Y.S. Gho, B. Giebel, C. Gilbert, M. Gimona, I. Giusti, D.C. Goberdhan, A. Gorgens, S.M. Gorski, D.W. Greening, J.C. Gross, A. Gualerzi, G.N. Gupta, D. Gustafson, A. Handberg, R.A. Haraszti, P. Harrison, H. Hegyesi, A. Hendrix, A.F. Hill, F.H. Hochberg, K.F. Hoffmann, B. Holder, H. Holthofer,

B. Hosseinkhani, G. Hu, Y. Huang, V. Huber, S. Hunt, A.G. Ibrahim, T. Ikezu, J.M. Inal, M. Isin, A. Ivanova, H.K. Jackson, S. Jacobsen, S.M. Jay, M. Jayachandran, G. Jenster, L. Jiang, S.M. Johnson, J.C. Jones, A. Jong, T. Jovanovic-Talisman, S. Jung, R. Kalluri, S.I. Kano, S. Kaur, Y. Kawamura, E.T. Keller, D. Khamari, E. Khomyakova, A. Khvorova, P. Kierulf, K.P. Kim, T. Kislinger, M. Klingeborn, D.J. Klinke, 2nd, M. Kornek, M.M. Kosanovic, A.F. Kovacs, E.M. Kramer-Albers, S. Krasemann, M. Krause, I.V. Kurochkin, G.D. Kusuma, S. Kuypers, S. Laitinen, S.M. Langevin, L.R. Languino, J. Lannigan, C. Lasser, L.C. Laurent, G. Lavieu, E. Lazaro-Ibanez, S. Le Lay, M.S. Lee, Y.X.F. Lee, D.S. Lemos, M. Lenassi, A. Leszczynska, I.T. Li, K. Liao, S.F. Libregts, E. Ligeti, R. Lim, S.K. Lim, A. Line, K. Linnemannstons, A. Llorente, C.A. Lombard, M.J. Lorenowicz, A.M. Lorincz, J. Lotvall, J. Lovett, M.C. Lowry, X. Loyer, Q. Lu, B. Lukomska, T.R. Lunavat, S.L. Maas, H. Malhi, A. Marcilla, J. Mariani, J. Mariscal, E.S. Martens-Uzunova, L. Martin-Jaular, M.C. Martinez, V.R. Martins, M. Mathieu, S. Mathivanan, M. Maugeri, L.K. McGinnis, M.J. McVey, D.G. Meckes, Jr., K.L. Meehan, I. Mertens, V.R. Minciocchi, A. Moller, M. Moller Jorgensen, A. Morales-Kastresana, J. Morhayim, F. Mullier, M. Muraca, L. Musante, V. Mussack, D.C. Muth, K.H. Myburgh, T. Najrana, M. Nawaz, I. Nazarenko, P. Nejsun, C. Neri, T. Neri, R. Nieuwland, L. Nimrichter, J.P. Nolan, E.N. Nolte-'t Hoen, N. Noren Hooten, L. O'Driscoll, T. O'Grady, A. O'Loghlen, T. Ochiya, M. Olivier, A. Ortiz, L.A. Ortiz, X. Osteikoetxea, O. Ostergaard, M. Ostrowski, J. Park, D.M. Pegtel, H. Peinado, F. Perut, M.W. Pfaffl, D.G. Phinney, B.C. Pieters, R.C. Pink, D.S. Pisetsky, E. Pogge von Strandmann, I. Polakovicova, I.K. Poon, B.H. Powell, I. Prada, L. Pulliam, P. Quesenberry, A. Radeghieri, R.L. Raffai, S. Raimondo, J. Rak, M.I. Ramirez, G. Raposo, M.S. Rayyan, N. Regev-Rudzki, F.L. Ricklefs, P.D. Robbins, D.D. Roberts, S.C. Rodrigues, E. Rohde, S. Rome, K.M. Rouschop, A. Rughetti, A.E. Russell, P. Saa, S. Sahoo, E. Salas-Huenuleo, C. Sanchez, J.A. Saugstad, M.J. Saul, R.M. Schiffelers, R. Schneider, T.H. Schoyen, A. Scott, E. Shahaj, S. Sharma, O. Shatnyeva, F. Shekari, G.V. Shelke, A.K. Shetty, K. Shiba, P.R. Siljander, A.M. Silva, A. Skowronek, O.L. Snyder, 2nd, R.P. Soares, B.W. Sodar, C. Soekmadji, J. Sotillo, P.D. Stahl, W. Stoorvogel, S.L. Stott, E.F. Strasser, S. Swift, H. Tahara, M. Tewari, K. Timms, S. Tiwari, R. Tixeira, M. Tkach, W.S. Toh, R. Tomasini, A.C. Torrecilhas, J.P. Tosar, V. Toxavidis, L. Urbanelli, P. Vader, B.W. van Balkom, S.G. van der Grein, J. Van Deun, M.J. van Herwijnen, K. Van

Keuren-Jensen, G. van Niel, M.E. van Royen, A.J. van Wijnen, M.H. Vasconcelos, I.J. Vechetti, Jr., T.D. Veit, L.J. Vella, E. Velot, F.J. Verweij, B. Vestad, J.L. Vinas, T. Visnovitz, K.V. Vukman, J. Wahlgren, D.C. Watson, M.H. Wauben, A. Weaver, J.P. Webber, V. Weber, A.M. Wehman, D.J. Weiss, J.A. Welsh, S. Wendt, A.M. Wheelock, Z. Wiener, L. Witte, J. Wolfram, A. Xagorari, P. Xander, J. Xu, X. Yan, M. Yanez-Mo, H. Yin, Y. Yuana, V. Zappulli, J. Zarubova, V. Zekas, J.Y. Zhang, Z. Zhao, L. Zheng, A.R. Zheutlin, A.M. Zickler, P. Zimmermann, A.M. Zivkovic, D. Zocco, E.K. Zuba-Surma, 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* 7(1) (2018) 1535750.

[47] J. Kowal, M. Tkach, C. Thery, Biogenesis and secretion of exosomes, *Curr Opin Cell Biol* 29 (2014) 116-125.

[48] E.I. Buzas, B. Gyorgy, G. Nagy, A. Falus, S. Gay, Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases, *Nat Rev Rheumatol* 10(6) (2014) 356-364.

[49] G. van Niel, G. D'Angelo, G. Raposo, Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19(4) (2018) 213-228.

[50] A. Koliopanos, H. Friess, J. Kleeff, X. Shi, Q. Liao, I. Pecker, I. Vlodavsky, A. Zimmermann, M. Büchler, Heparanase expression in primary and metastatic pancreatic cancer, *Cancer research* 61 (2001) 4655-4659.

[51] A. Zomer, C. Maynard, F. Verweij, A. Kamermans, R. Schäfer, E. Beerling, R. Schiffelers, E. Wit, J. Berenguer, S. Ellenbroek, T. Wurdinger, D. Pegtel, J. Rheenens, In Vivo Imaging Reveals Extracellular Vesicle-Mediated Phenocopying of Metastatic Behavior, *Cell* 161 (2015) 1046-1057.

[52] M. Bebelman, M. Smit, D. Pegtel, S. Baglio, Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer, *Pharmacology & Therapeutics* 188 (2018).

[53] K. Al-Nedawi, B. Meehan, R.S. Kerbel, A.C. Allison, J. Rak, Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(10) (2009) 3794.

[54] J. Skog, T. Wurdinger, S. van Rijn, D.H. Meijer, L. Gainche, W.T. Curry, B.S. Carter, A.M. Krichevsky, X.O. Breakefield, Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers, *Nature Cell Biology* 10(12) (2008) 1470-1476.

- [55] K. Al-Nedawi, B. Meehan, J. Micallef, V. Lhotak, L. May, A. Guha, J. Rak, Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells, *Nature Cell Biology* 10(5) (2008) 619-624.
- [56] Á. Oszvald, Z. Szvicsek, G.O. Sándor, A. Kelemen, A. Soós, K. Pálóczi, A. Bursics, K. Dede, T. Tölgyes, E.I. Buzás, A. Zeöld, Z. Wiener, Extracellular vesicles transmit epithelial growth factor activity in the intestinal stem cell niche, *Stem Cells* 38(2) (2020) 291-300.
- [57] E.L.A. S, I. Mäger, X.O. Breakefield, M.J. Wood, Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities, *Nat Rev Drug Discov* 12(5) (2013) 347-357.
- [58] L. Vermeulen, E.M.F. De Sousa, M. van der Heijden, K. Cameron, J.H. de Jong, T. Borovski, J.B. Tuynman, M. Todaro, C. Merz, H. Rodermond, M.R. Sprick, K. Kemper, D.J. Richel, G. Stassi, J.P. Medema, Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment, *Nat Cell Biol* 12(5) (2010) 468-476.
- [59] M. Herrera, C. Llorens, M. Rodríguez, A. Herrera, R. Ramos, B. Gil, A. Candia, M.J. Larriba, P. Garre, J. Earl, M. Rodríguez-Garrote, T. Caldés, F. Bonilla, A. Carrato, V. García-Barberán, C. Peña, Differential distribution and enrichment of non-coding RNAs in exosomes from normal and Cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer, *Mol Cancer* 17(1) (2018) 114.
- [60] M. Berdiel-Acer, R. Sanz-Pamplona, A. Calon, D. Cuadras, A. Berenguer, X. Sanjuan, M.J. Paules, R. Salazar, V. Moreno, E. Batlle, A. Villanueva, D.G. Molleví, Differences between CAFs and their paired NCF from adjacent colonic mucosa reveal functional heterogeneity of CAFs, providing prognostic information, *Mol Oncol* 8(7) (2014) 1290-1305.
- [61] A. Essex, J. Pineda, G. Acharya, H. Xin, J. Evans, E. Iorns, R. Tsui, A. Denis, N. Perfito, T.M. Errington, E. Iorns, R. Tsui, A. Denis, N. Perfito, T.M. Errington, Replication Study: Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment, *Elife* 8 (2019).
- [62] Á. Oszvald, Z. Szvicsek, M. Pápai, A. Kelemen, Z. Varga, T. Tölgyes, K. Dede, A. Bursics, E.I. Buzás, Z. Wiener, Fibroblast-Derived Extracellular Vesicles Induce Colorectal Cancer Progression by Transmitting Amphiregulin, *Front Cell Dev Biol* 8 (2020).

- [63] M.E. Katt, A.L. Placone, A.D. Wong, Z.S. Xu, P.C. Searson, In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform, *Front Bioeng Biotechnol* 4 (2016) 12.
- [64] C. Liu, A. Oikonomopoulos, N. Sayed, J.C. Wu, Modeling human diseases with induced pluripotent stem cells: from 2D to 3D and beyond, *Development* 145(5) (2018).
- [65] T. Takebe, B. Zhang, M. Radisic, Synergistic Engineering: Organoids Meet Organ-on-a-Chip, *Cell Stem Cell* 21(3) (2017) 297-300.
- [66] M. Chatzinikolaidou, Cell spheroids: the new frontiers in in vitro models for cancer drug validation, *Drug Discov Today* 21(9) (2016) 1553-1560.
- [67] F. Gattazzo, A. Urciuolo, P. Bonaldo, Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche, *Biochim Biophys Acta* 1840(8) (2014) 2506-2519.
- [68] J.P. Gillet, S. Varma, M.M. Gottesman, The clinical relevance of cancer cell lines, *J Natl Cancer Inst* 105(7) (2013) 452-458.
- [69] J. Casado-Vela, A. Cebrián, M.T. Gómez del Pulgar, J.C. Lacal, Approaches for the study of cancer: towards the integration of genomics, proteomics and metabolomics, *Clin Transl Oncol* 13(9) (2011) 617-628.
- [70] N. Rodriguez-Salas, G. Dominguez, R. Barderas, M. Mendiola, X. García-Albéniz, J. Maurel, J.F. Batlle, Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes, *Crit Rev Oncol Hematol* 109 (2017) 9-19.
- [71] K.C.G. Berg, P.W. Eide, I.A. Eilertsen, B. Johannessen, J. Bruun, S.A. Danielsen, M. Bjørnslett, L.A. Meza-Zepeda, M. Eknæs, G.E. Lind, O. Myklebost, R.I. Skotheim, A. Sveen, R.A. Lothe, Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies, *Mol Cancer* 16(1) (2017) 116.
- [72] D. Dutta, I. Heo, H. Clevers, Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems, *Trends Mol Med* 23(5) (2017) 393-410.
- [73] E. Smith, W.J. Cochrane, CYSTIC ORGANOID TERATOMA: (Report of a Case), *Can Med Assoc J* 55(2) (1946) 151-152.
- [74] N. Barker, J.H. van Es, J. Kuipers, P. Kujala, M. van den Born, M. Cozijnsen, A. Haegebarth, J. Korving, H. Begthel, P.J. Peters, H. Clevers, Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*, *Nature* 449(7165) (2007) 1003-1007.
- [75] M. Huch, J.A. Knoblich, M.P. Lutolf, A. Martinez-Arias, The hope and the hype of organoid research, *Development* 144(6) (2017) 938-941.

- [76] M. van de Wetering, H.E. Francies, J.M. Francis, G. Bounova, F. Iorio, A. Pronk, W. van Houdt, J. van Gorp, A. Taylor-Weiner, L. Kester, A. McLaren-Douglas, J. Blokker, S. Jaksani, S. Bartfeld, R. Volckman, P. van Sluis, V.S. Li, S. Seepo, C. Sekhar Pedamallu, K. Cibulskis, S.L. Carter, A. McKenna, M.S. Lawrence, L. Lichtenstein, C. Stewart, J. Koster, R. Versteeg, A. van Oudenaarden, J. Saez-Rodriguez, R.G. Vries, G. Getz, L. Wessels, M.R. Stratton, U. McDermott, M. Meyerson, M.J. Garnett, H. Clevers, Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients, *Cell* 161(4) (2015) 933-945.
- [77] G. Schwank, B.K. Koo, V. Sasselli, J.F. Dekkers, I. Heo, T. Demircan, N. Sasaki, S. Boymans, E. Cuppen, C.K. van der Ent, E.E. Nieuwenhuis, J.M. Beekman, H. Clevers, Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients, *Cell Stem Cell* 13(6) (2013) 653-658.
- [78] T. Sato, D.E. Stange, M. Ferrante, R.G. Vries, J.H. Van Es, S. Van den Brink, W.J. Van Houdt, A. Pronk, J. Van Gorp, P.D. Siersema, H. Clevers, Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium, *Gastroenterology* 141(5) (2011) 1762-1772.
- [79] X. Osteikoetxea, M. Benke, M. Rodriguez, K. Paloczi, B.W. Sodar, Z. Szvicsek, K. Szabo-Taylor, K.V. Vukman, A. Kittel, Z. Wiener, K. Vekey, L. Harsanyi, A. Szucs, L. Turiak, E.I. Buzas, Detection and proteomic characterization of extracellular vesicles in human pancreatic juice, *Biochem Biophys Res Commun* 499(1) (2018) 37-43.
- [80] A. Pribluda, E. Elyada, Z. Wiener, H. Hamza, R.E. Goldstein, M. Biton, I. Burstain, Y. Morgenstern, G. Brachya, H. Billauer, S. Biton, I. Snir-Alkalay, D. Vucic, K. Schlereth, M. Mernberger, T. Stiewe, M. Oren, K. Alitalo, E. Pikarsky, Y. Ben-Neriah, A senescence-inflammatory switch from cancer-inhibitory to cancer-promoting mechanism, *Cancer cell* 24(2) (2013) 242-256.
- [81] A. Subramanian, P. Tamayo, V.K. Mootha, S. Mukherjee, B.L. Ebert, M.A. Gillette, A. Paulovich, S.L. Pomeroy, T.R. Golub, E.S. Lander, J.P. Mesirov, Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(43) (2005) 15545-15550.
- [82] V.K. Mootha, C.M. Lindgren, K.F. Eriksson, A. Subramanian, S. Sihag, J. Lehar, P. Puigserver, E. Carlsson, M. Ridderstrale, E. Laurila, N. Houstis, M.J. Daly, N. Patterson, J.P. Mesirov, T.R. Golub, P. Tamayo, B. Spiegelman, E.S. Lander, J.N. Hirschhorn, D.

Altshuler, L.C. Groop, PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes, *Nat Genet* 34(3) (2003) 267-273.

[83] L.G. Van der Flier, J. Sabates-Bellver, I. Oving, A. Haegebarth, M. De Palo, M. Anti, M.E. Van Gijn, S. Suijkerbuijk, M. Van de Wetering, G. Marra, H. Clevers, The Intestinal Wnt/TCF Signature, *Gastroenterology* 132(2) (2007) 628-632.

[84] L.G. van der Flier, M.E. van Gijn, P. Hatzis, P. Kujala, A. Haegebarth, D.E. Stange, H. Begthel, M. van den Born, V. Guryev, I. Oving, J.H. van Es, N. Barker, P.J. Peters, M. van de Wetering, H. Clevers, Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate, *Cell* 136(5) (2009) 903-912.

[85] N. Ashley, T.M. Yeung, W.F. Bodmer, Stem cell differentiation and lumen formation in colorectal cancer cell lines and primary tumors, *Cancer Res* 73(18) (2013) 5798-5809.

[86] T.M. Yeung, S.C. Gandhi, J.L. Wilding, R. Muschel, W.F. Bodmer, Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(8) (2010) 3722-3727.

[87] M. Ostrowski, N.B. Carmo, S. Krumeich, I. Fanget, G. Raposo, A. Savina, C.F. Moita, K. Schauer, A.N. Hume, R.P. Freitas, B. Goud, P. Benaroch, N. Hacohen, M. Fukuda, C. Desnos, M.C. Seabra, F. Darchen, S. Amigorena, L.F. Moita, C. Thery, Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway, *Nat Cell Biol* 12(1) (2010) 19-30; sup pp 11-13.

[88] B. Gyorgy, K. Modos, E. Pallinger, K. Paloczi, M. Pasztoi, P. Misjak, M.A. Deli, A. Sipos, A. Szalai, I. Voszka, A. Polgar, K. Toth, M. Csete, G. Nagy, S. Gay, A. Falus, A. Kittel, E.I. Buzas, Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters, *Blood* 117(4) (2011) e39-48.

[89] S.J.A. Buczacki, S. Popova, E. Biggs, C. Koukorava, J. Buzzelli, L. Vermeulen, L. Hazelwood, H. Francies, M.J. Garnett, D.J. Winton, Itraconazole targets cell cycle heterogeneity in colorectal cancer, *J Exp Med* 215(7) (2018) 1891-1912.

[90] J. Drost, R.H. van Jaarsveld, B. Ponsioen, C. Zimmerlin, R. van Boxtel, A. Buijs, N. Sachs, R.M. Overmeer, G.J. Offerhaus, H. Begthel, J. Korving, M. van de Wetering, G. Schwank, M. Logtenberg, E. Cuppen, H.J. Snippert, J.P. Medema, G.J. Kops, H. Clevers,

Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells, *Nature* 521(7550) (2015) 43-47.

[91] M. Matano, S. Date, M. Shimokawa, A. Takano, M. Fujii, Y. Ohta, T. Watanabe, T. Kanai, T. Sato, Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids, *Nat Med* 21(3) (2015) 256-262.

[92] T.T. Vellinga, S. den Uil, I.H. Rinkes, D. Marvin, B. Ponsioen, A. Alvarez-Varela, S. Fatrai, C. Scheele, D.A. Zwijnenburg, H. Snippert, L. Vermeulen, J.P. Medema, H.B. Stockmann, J. Koster, R.J. Fijneman, J. de Rooij, O. Kranenburg, Collagen-rich stroma in aggressive colon tumors induces mesenchymal gene expression and tumor cell invasion, *Oncogene* 35(40) (2016) 5263-5271.

[93] X. Shen, M. Yue, F. Meng, J. Zhu, X. Zhu, Y. Jiang, Microarray analysis of differentially-expressed genes and linker genes associated with the molecular mechanism of colorectal cancer, *Oncol Lett* 12(5) (2016) 3250-3258.

[94] Z. Zhang, Y. Wang, J. Zhang, J. Zhong, R. Yang, COL1A1 promotes metastasis in colorectal cancer by regulating the WNT/PCP pathway, *Mol Med Rep* 17(4) (2018) 5037-5042.

[95] M. Fujii, M. Shimokawa, S. Date, A. Takano, M. Matano, K. Nanki, Y. Ohta, K. Toshimitsu, Y. Nakazato, K. Kawasaki, T. Uraoka, T. Watanabe, T. Kanai, T. Sato, A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis, *Cell Stem Cell* 18(6) (2016) 827-838.

[96] J. Drost, H. Clevers, Organoids in cancer research, *Nat Rev Cancer* 18(7) (2018) 407-418.

[97] B.J. Tauro, D.W. Greening, R.A. Mathias, S. Mathivanan, H. Ji, R.J. Simpson, Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids, *Mol Cell Proteomics* 12(3) (2013) 587-598.

[98] T. Eguchi, C. Sogawa, Y. Okusha, K. Uchibe, R. Iinuma, K. Ono, K. Nakano, J. Murakami, M. Itoh, K. Arai, T. Fujiwara, Y. Namba, Y. Murata, K. Ohyama, M. Shimomura, H. Okamura, M. Takigawa, T. Nakatsura, K.I. Kozaki, K. Okamoto, S.K. Calderwood, Organoids with cancer stem cell-like properties secrete exosomes and HSP90 in a 3D nanoenvironment, *PLoS One* 13(2) (2018) e0191109.

[99] M. Tkach, J. Kowal, C. Théry, Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 373(1737) (2018).

- [100] E. Willms, H. Johansson, I. Mäger, Y.X.F. Lee, K.E. Blomberg, M. Sadik, A. Alaarg, E. Smith, J. Lehtiö, S. Andaloussi, M. Wood, P. Vader, Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties, *Scientific Reports* 6 (2016) 22519.
- [101] T. Szabo, B. Tarr, K. Pálóczi, K. Eder, E. Lajkó, A. Kittel, S. Tóth, B. Gyorgy, M. Pasztoi, A. Németh, X. Osteikoetxea, E. Pállinger, A. Falus, K. Szabó-Taylor, E. Buzás, Critical role of extracellular vesicles in modulating the cellular effects of cytokines, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71 (2014).
- [102] R. Crescitelli, C. Lässer, T. Szabo, A. Kittel, M. Eldh, I. Dianzani, E. Buzás, J. Lotvall, Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes, *Journal of extracellular vesicles* 2 (2013).
- [103] O. Moreno-Gonzalo, I. Fernández Delgado, F. Sanchez-Madrid, Post-translational add-ons mark the path in exosomal protein sorting, *Cellular and Molecular Life Sciences* 75 (2017).
- [104] J. Kowal, G. Arras, M. Colombo, M. Jouve, J. Morath, B. Primdal-Bengtson, F. Dingli, D. Loew, M. Tkach, C. Théry, Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (2016).
- [105] X. Yu, S. Harris, A. Levine, Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res.* May, *Cancer research* 66 (2006) 4795-4801.
- [106] Y. Dou, D. Cha, J. Franklin, J. Higginbotham, D. Jeppesen, A. Weaver, N. Prasad, S. Levy, R. Coffey, J. Patton, B. Zhang, Circular RNAs are down-regulated in KRAS mutant colon cancer cells and can be transferred to exosomes, *Scientific Reports* 6 (2016) 37982.
- [107] D.J. Cha, J.L. Franklin, Y. Dou, Q. Liu, J.N. Higginbotham, M. Demory Beckler, A.M. Weaver, K. Vickers, N. Prasad, S. Levy, B. Zhang, R.J. Coffey, J.G. Patton, KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes, *eLife* 4 (2015) e07197.
- [108] D. Öhlund, A. Handly-Santana, G. Biffi, E. Elyada, A.S. Almeida, M. Ponz-Sarvise, V. Corbo, T.E. Oni, S.A. Hearn, E.J. Lee, Chio, II, C.I. Hwang, H. Tiriác, L.A. Baker, D.D. Engle, C. Feig, A. Kultti, M. Egeblad, D.T. Fearon, J.M. Crawford, H.

Clevers, Y. Park, D.A. Tuveson, Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer, *J Exp Med* 214(3) (2017) 579-596.

[109] G. Biffi, T.E. Oni, B. Spielman, Y. Hao, E. Elyada, Y. Park, J. Preall, D.A. Tuveson, IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGF β to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, *Cancer Discov* 9(2) (2019) 282-301.

[110] P.T. Huynh, E.J. Beswick, Y.A. Coronado, P. Johnson, M.R. O'Connell, T. Watts, P. Singh, S. Qiu, K. Morris, D.W. Powell, I.V. Pinchuk, CD90(+) stromal cells are the major source of IL-6, which supports cancer stem-like cells and inflammation in colorectal cancer, *Int J Cancer* 138(8) (2016) 1971-1981.

[111] J. Kinchen, H.H. Chen, K. Parikh, A. Antanaviciute, M. Jagielowicz, D. Fawcner-Corbett, N. Ashley, L. Cubitt, E. Mellado-Gomez, M. Attar, E. Sharma, Q. Wills, R. Bowden, F.C. Richter, D. Ahern, K.D. Puri, J. Henault, F. Gervais, H. Koohy, A. Simmons, Structural Remodeling of the Human Colonic Mesenchyme in Inflammatory Bowel Disease, *Cell* 175(2) (2018) 372-386.e317.

[112] H. Shinohara, Y. Kuranaga, M. Kumazaki, N. Sugito, Y. Yoshikawa, T. Takai, K. Taniguchi, Y. Ito, Y. Akao, Regulated Polarization of Tumor-Associated Macrophages by miR-145 via Colorectal Cancer-Derived Extracellular Vesicles, *The Journal of Immunology* 199 (2017) ji1700167.

[113] V. Luga, L. Zhang, A. Vitoria-Petit, A. Ogunjimi, M. Inanlou, E. Chiu, M. Buchanan, A. Hosein, M. Basik, J. Wrana, Exosomes Mediate Stromal Mobilization of Autocrine Wnt-PCP Signaling in Breast Cancer Cell Migration, *Cell* 151 (2012) 1542-1556.

[114] S.N. Leeb, D. Vogl, M. Gunckel, S. Kiessling, W. Falk, M. Göke, J. Schölmerich, C.M. Gelbmann, G. Rogler, Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase, *Gastroenterology* 125(5) (2003) 1341-1354.

[115] J. Leca, S. Martinez, S. Lac, J. Nigri, V. Secq, M. Rubis, C. Bressy, A. Sergé, M.-N. Lavaut, N. Dusetti, C. Loncle, J. Roques, D. Pietrasz, C. Bousquet, S. Garcia, S. Granjeaud, M. Ouaiissi, J. Bachet, C. Brun, R. Tomasini, Cancer-associated fibroblast-derived annexin A6+ extracellular vesicles support pancreatic cancer aggressiveness, *Journal of Clinical Investigation* 126 (2016) 4140-4156.

- [116] L. Dong, C. Ding, T. Zheng, Y. Pu, J. Liu, W. Zhang, F. Xue, P. Kang, Y. Ma, X. Wang, C. Mao, Extracellular vesicles from human umbilical cord mesenchymal stem cells treated with siRNA against ELFN1-AS1 suppress colon adenocarcinoma proliferation and migration, *Am J Transl Res* 11(11) (2019) 6989-6999.
- [117] Y. Wang, K. Yin, J. Tian, X. Xia, J. Ma, X. Tang, H. Xu, S. Wang, Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote the Stemness of Colorectal Cancer Cells through Exosomal S100A9, *Adv Sci (Weinh)* 6(18) (2019) 1901278.
- [118] J. Lan, L. Sun, F. Xu, L. Liu, F. Hu, D. Song, Z. Hou, W. Wu, X. Luo, J. Wang, X. Yuan, J. Hu, G. Wang, M2 Macrophage-Derived Exosomes Promote Cell Migration and Invasion in Colon Cancer, *Cancer Res* 79(1) (2019) 146-158.
- [119] Y. Hu, C. Yan, L. Mu, K. Huang, X. Li, D. Tao, Y. Wu, J. Qin, Fibroblast-Derived Exosomes Contribute to Chemoresistance through Priming Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer, *PLoS One* 10(5) (2015) e0125625.
- [120] J.L. Hu, W. Wang, X.L. Lan, Z.C. Zeng, Y.S. Liang, Y.R. Yan, F.Y. Song, F.F. Wang, X.H. Zhu, W.J. Liao, W.T. Liao, Y.Q. Ding, L. Liang, CAFs secreted exosomes promote metastasis and chemotherapy resistance by enhancing cell stemness and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer, *Mol Cancer* 18(1) (2019) 91.
- [121] Y.B. Hu, C. Yan, L. Mu, Y.L. Mi, H. Zhao, H. Hu, X.L. Li, Exosomal Wnt-induced dedifferentiation of colorectal cancer cells contributes to chemotherapy resistance, *Oncogene* 38 (2019) 1951+.
- [122] Q. Shao, J. Xu, R. Deng, W. Wei, B. Zhou, C. Yue, M. Zhu, H. Zhu, SNHG 6 promotes the progression of Colon and Rectal adenocarcinoma via miR-101-3p and Wnt/ β -catenin signaling pathway, *BMC Gastroenterol* 19(1) (2019) 163.
- [123] D. Sastre, J. Baiocchi, I.M. de Souza Lima, F. Canto de Souza, A.C. Corveloni, C.H. Thomé, V.M. Faça, J.L.D.S. Schiavinato, D.T. Covas, R.A. Panepucci, Focused screening reveals functional effects of microRNAs differentially expressed in colorectal cancer, *BMC Cancer* 19(1) (2019) 1239-1239.
- [124] A. Savardashtaki, Z. Shabaninejad, A. Movahedpour, R. Sahebnasagh, H. Mirzaei, M.R. Hamblin, miRNAs derived from cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer, *Epigenomics* 11(14) (2019) 1627-1645.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent eredeti 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

¹ Megosztott első szerzők

Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent eredeti 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. Osteikoetxea X, Benke M, Rodriguez M, Paloczi K, Sodar BW, **Szvicsek Z**, Szabo-Taylor K, Vukman KV, Kittel A, Wiener Z, Vekey K, Harsanyi L, Szucs Á, Turiak L, Buzas EI.

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

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a PhD tanulmányaim során nyújtott támogatást a páromnak, Babolcsay Norbertnek, aki végig türelemmel állt mellettem. Köszönettel tartozom a családomnak is, amiért főként a disszertáció megírásához szeretettel teli, gondoskodó, környezetet biztosítottak számomra.

Köszönöm Wiener Zoltánnak a témavezetői segítségét, és hogy a négy év során soha nem fogyott ki a témánk iránti lelkesedéséből, lendületéből. Az ő kutatói hozzáállása mindig segített átlendülni a nehezebb időszakokon is. Az évek során rengeteg tapasztalatot, tudást szereztem általa, amiket tovább vihetek a biológus pályafutásom következő állomásaira.

Rengeteg köszönettel tartozom a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet minden tagjának, akikkel napi szinten együtt dolgoztam a laborban. Különösen igaz ez a Molekuláris Onkobiológiai Kutatócsoportunk tagjaira, Oszvald Ádámra, Sándor Gyöngyvérre, Kelemen Andreára, Zeöld Anikóra és Soós Andrásra. Örülök, hogy egy ilyen, a munkahelyen kívül is összetartó, egymásra odafigyelő csapat tagja lehettem ennyi éven keresztül. Tóth Eszter és Försönits András, bár nem közös kutatási témán dolgoztunk, de mégis nap mint nap színesebbé és vidámabbá tették a laborban eltöltött időt, ami miatt nagyon hálás vagyok.

Köszönöm Varga Zoltánnak és Kiss Teréznek az elektronmikroszkópos képek, illetve a liposzómák elkészítésében nyújtott segítségüket.

Köszönöm Pápai Márton és Kovács István TDK hallgatóknak a kitartó és értékes munkájukat, amivel hozzájárultak a kutatási témám előrehaladásához.

Végezetül köszönettel tartozom a dolgozat bírálóinak, amiért elolvassák a dolgozatot, és értékes tanácsaikkal segítik a további munkánkat.

Függelék

1. táblázat: A fehérjék listája, amik mind a három organoid mintában (1-3) megtalálható, de az üres Matrigel mintában nem.

Jel	Leírás
CFAI	Complement factor I OS=Homo sapiens GN=CFI PE=1 SV=2
DHE3	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GLUD1 PE=1 SV=2
EPCAM	Epithelial cell adhesion molecule OS=Homo sapiens GN=EPCAM PE=1 SV=2
FPRP	Prostaglandin F2 receptor negative regulator OS=Homo sapiens GN=PTGFRN PE=1 SV=2
HEMO	Hemopexin OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2
HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1
IGHA1	Immunoglobulin heavy constant alpha 1 OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2
IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1
IGHG4	Immunoglobulin heavy constant gamma 4 OS=Homo sapiens GN=IGHG4 PE=1 SV=1
IGKC	Immunoglobulin kappa constant OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=2
IGLC3	Immunoglobulin lambda constant 3 OS=Homo sapiens GN=IGLC3 PE=1 SV=1
ITIH4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Homo sapiens GN=ITIH4 PE=1 SV=4
LAMA1	Laminin subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=LAMA1 PE=1 SV=2
LAMB1	Laminin subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=LAMB1 PE=1 SV=2
LAMC1	Laminin subunit gamma-1 OS=Homo sapiens GN=LAMC1 PE=1 SV=3
LG3BP	Galectin-3-binding protein OS=Homo sapiens GN=LGALS3BP PE=1 SV=1
NID1	Nidogen-1 OS=Homo sapiens GN=NID1 PE=1 SV=3
OLFM4	Olfactomedin-4 OS=Homo sapiens GN=OLFM4 PE=1 SV=1
PDC6I	Programmed cell death 6-interacting protein OS=Homo sapiens GN=PDCD6IP PE=1 SV=1
PGBM	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein OS=Homo sapiens GN=HSPG2 PE=1 SV=4
SDCB1	Syntenin-1 OS=Homo sapiens GN=SDCBP PE=1 SV=1
TRFE	Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3

2. táblázat: Az Advanced TaqMan miRNA vizsgálat során használt miRNS-ek.

miR	Assay_ID
mir-10a-5p	479241_mir
mir-128-3p	477892_mir
mir-146a-5p	478399_mir
miR-155-5p	483064_mir
mir_181a-5p	477857_mir
mir-181b-5p	478583_mir
mir-210-3p	477970_mir
mir-222-3p	477982_mir
mir-532-5p	478151_mir
mir_484	478308_mir

3. táblázat: A TGF β kezelt és kezeletlen humán normál kolon fibroblaszt eredetű EV-k miRNS tartalma. A táblázatban csak azok a miRNS-ek szerepelnek, amik legalább az egyik mintában előfordultak.

hsa-let-7c	hsa-let-7d	hsa-let-7e	hsa-let-7g
hsa-miR-1	hsa-miR-10a	U6 snRNA	U6 snRNA
hsa-miR-15b	hsa-miR-16	hsa-miR-17	hsa-miR-18a
hsa-miR-19a	hsa-miR-19b	hsa-miR-20a	hsa-miR-20b
hsa-miR-21	hsa-miR-23a	hsa-miR-24	hsa-miR-25
hsa-miR-26a	hsa-miR-26b	hsa-miR-27a	hsa-miR-27b
hsa-miR-28-3p	hsa-miR-28	U6 snRNA	U6 snRNA
hsa-miR-29a	hsa-miR-29b	hsa-miR-29c	hsa-miR-30b
hsa-miR-30c	hsa-miR-31	hsa-miR-34a	hsa-miR-34c
hsa-miR-92a	mmu-miR-93	hsa-miR-95	hsa-miR-99a
hsa-miR-99b	hsa-miR-100	hsa-miR-101	hsa-miR-103
hsa-miR-106a	RNU44	hsa-miR-106b	hsa-miR-122
hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-125b	hsa-miR-126
hsa-miR-127	hsa-miR-128a	mmu-miR-129-3p	hsa-miR-130a
hsa-miR-130b	hsa-miR-132	hsa-miR-133a	hsa-miR-133b
mmu-miR-134	hsa-miR-135b	hsa-miR-136	mmu-miR-137

hsa-miR-138	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-140-3p	mmu-miR-140
hsa-miR-142-3p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-143	hsa-miR-145
hsa-miR-146a	hsa-miR-146b	hsa-miR-148a	hsa-miR-148b
hsa-miR-149	hsa-miR-152	hsa-miR-181a	hsa-miR-181c
RNU48	hsa-miR-184	hsa-miR-185	hsa-miR-186
hsa-miR-191	hsa-miR-192	hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-193a-5p
hsa-miR-193b	hsa-miR-194	hsa-miR-195	hsa-miR-196b
hsa-miR-197	hsa-miR-198	hsa-miR-199a	hsa-miR-199a-3p
hsa-miR-199b	hsa-miR-200c	hsa-miR-202	hsa-miR-203
hsa-miR-214	hsa-miR-218	hsa-miR-221	hsa-miR-222
hsa-miR-223	hsa-miR-224	hsa-miR-296	hsa-miR-301
hsa-miR-301b	hsa-miR-320	hsa-miR-323-3p	hsa-miR-324-3p
hsa-miR-324-5p	hsa-miR-328	hsa-miR-329	hsa-miR-330
hsa-miR-331	hsa-miR-335	hsa-miR-337-5p	hsa-miR-339-3p
hsa-miR-340	hsa-miR-155	hsa-let-7b	hsa-miR-342-3p
hsa-miR-345	hsa-miR-361	hsa-miR-362-3p	hsa-miR-362
hsa-miR-365	hsa-miR-369-3p	hsa-miR-370	hsa-miR-374
mmu-miR-374-5p	hsa-miR-375	hsa-miR-376a	mmu-miR-379
hsa-miR-381	hsa-miR-382	hsa-miR-409-5p	hsa-miR-410
hsa-miR-411	hsa-miR-422a	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-424
hsa-miR-425-5p	hsa-miR-431	hsa-miR-433	hsa-miR-450a
hsa-miR-450b-5p	hsa-miR-452	hsa-miR-454	hsa-miR-455-3p
hsa-miR-455	hsa-miR-483-5p	hsa-miR-484	hsa-miR-485-3p
hsa-miR-487a	hsa-miR-487b	hsa-miR-490	mmu-miR-491
hsa-miR-493	hsa-miR-494	mmu-miR-495	hsa-miR-517c
hsa-miR-502-3p	hsa-miR-503	hsa-miR-517a	hsa-miR-518a-5p
hsa-miR-518d	hsa-miR-518e	hsa-miR-518f	hsa-miR-519a
hsa-miR-519d	hsa-miR-523	hsa-miR-532-3p	hsa-miR-532
hsa-miR-539	hsa-miR-542-5p	hsa-miR-545	hsa-miR-548a
hsa-miR-548c	hsa-miR-548c-5p	hsa-miR-570	hsa-miR-574-3p
hsa-miR-576-3p	hsa-miR-590-5p	hsa-miR-597	hsa-miR-598

hsa-miR-616	hsa-miR-625	hsa-miR-627	hsa-miR-628-5p
hsa-miR-629	hsa-miR-636	hsa-miR-642	hsa-miR-652
hsa-miR-655	hsa-miR-660	hsa-miR-671-3p	hsa-miR-708
hsa-miR-744	hsa-miR-758	hsa-miR-885-5p	hsa-miR-886-3p
hsa-miR-886-5p	hsa-miR-889	hsa-miR-212	hsa-miR-376c
hsa-miR-520b			

4. táblázat: EV-gazdag és EV-mentes CRC sejt eredetű médiummal kezelt fibroblasztok eltérő génexpressziója

Azonosító	Név	p-érték	Fold change (EV/noEV)
A_33_P3263538	NA	0.000309	1.543993487
A_33_P3382105	NA	2.00E-06	1.474269217
A_33_P3345743	NA	2.50E-05	1.391524844
A_23_P164022	MYO1C	1.20E-05	1.378723669
A_33_P3219697	NA	5.30E-05	1.375541818
A_33_P3802146	NA	3.40E-05	1.372367311
A_33_P3265606	NA	2.40E-05	1.353473524
A_33_P3209176	NA	2.20E-05	1.3441244
A_33_P3269803	NA	0.000672	1.337927555
A_23_P52336	UNC5B	0.000596	1.334839854
A_33_P3645805	NA	0.000399	1.325619442
A_23_P109907	ILDR1	0.00011	1.322560146
A_23_P214168	COL12A1	0.000715	1.322560146
A_24_P734953	TRNP1	8.80E-05	1.322560146
A_23_P60079	ANGPT2	0.000106	1.319507911
A_23_P382199	VAPA	0.000105	1.31646272
A_23_P146077	ZNF395	7.80E-05	1.310393404
A_33_P3246883	NA	0.000128	1.304352069
A_33_P3451157	NA	0.000129	1.295342252
A_23_P152858	COPRS	0.000523	1.292352831
A_23_P303718	DST	0.000513	1.289370309

A_33_P3239267	NA	0.00043	1.289370309
A_33_P3421219	NA	0.000215	1.289370309
A_33_P3752697	NA	0.000404	1.289370309
A_23_P52727	NAV2	0.000496	1.286394669
A_23_P69908	GLRX	0.000196	1.283425898
A_33_P3259557	NA	0.000163	1.280463977
A_33_P3294961	NA	0.000179	1.277508892
A_33_P3353051	NA	0.000194	1.277508892
A_23_P79927	NOP56	0.000156	1.271619167
A_24_P331704	KRT80	0.000288	1.271619167
A_33_P3338961	NA	0.000492	1.271619167
A_32_P41375	LINC01000	0.000204	1.268684494
A_33_P3280066	NA	0.000493	1.268684494
A_23_P59602	MIOS	0.000291	1.265756594
A_23_P73780	IRAK1	0.000363	1.265756594
A_24_P370887	VAMP3	0.000494	1.265756594
A_33_P3321781	NA	0.000175	1.265756594
A_33_P3364696	NA	0.000273	1.262835451
A_23_P135616	STX18	0.000411	1.25992105
A_23_P28466	DAW1	0.000484	1.25992105
A_23_P69586	FAT1	0.000385	1.25992105
A_23_P75380	AIP	0.000385	1.25992105
A_24_P304051	GSTO1	0.000859	1.25992105
A_33_P3241596	NA	0.00067	1.25992105
A_23_P201342	DVL1	0.000574	1.257013375
A_23_P162945	SRP54	0.000356	1.25411241
A_33_P3234487	NA	0.000875	1.25411241
A_33_P3262191	NA	0.00043	1.25411241
A_33_P3317253	NA	0.000388	1.25411241
A_24_P252130	PPARD	0.000725	1.251218139
A_33_P3243878	NA	0.000412	1.251218139

A_33_P3243907	NA	0.000388	1.251218139
A_33_P3333033	NA	0.00033	1.251218139
A_24_P116242	KLHDC2	0.000541	1.248330549
A_24_P160413	NA	0.000579	1.248330549
A_33_P3280044	NA	0.000528	1.248330549
A_33_P3422289	NA	0.000373	1.245449623
A_23_P166663	APPL1	0.000771	1.242575344
A_33_P3233841	NA	0.000522	1.242575344
A_33_P3220437	NA	0.000421	1.2397077
A_33_P3292179	NA	0.000541	1.2397077
A_33_P3407324	NA	0.00056	1.2397077
A_23_P117971	NA	0.000708	1.236846674
A_23_P145863	S100A11	0.000596	1.236846674
A_23_P87742	IFFO1	0.000871	1.236846674
A_33_P3397795	NA	0.000612	1.236846674
A_23_P14083	AMIGO2	0.000546	1.233992249
A_33_P3265956	NA	0.000627	1.233992249
A_33_P3289561	NA	0.000733	1.233992249
A_33_P3354499	NA	0.000805	1.231144413
A_24_P51588	CCNL2	0.000582	1.22830315
A_33_P3362321	NA	0.000948	1.22830315
A_33_P3385765	NA	0.000856	1.225468442
A_23_P161634	MUS81	0.000942	1.222640278
A_23_P395595	FNBP4	0.00095	1.222640278
A_33_P3304382	NA	0.000752	1.222640278
A_33_P3371718	NA	0.000854	1.222640278
A_33_P3384442	NA	0.000854	1.222640278
A_23_P208516	MBOAT7	0.000894	1.21981864
A_33_P3212823	NA	0.000776	1.21981864
A_33_P3759592	NA	0.000853	1.21981864
A_33_P3503937	NA	0.000892	1.217003513

A_33_P3326904	NA	0.000935	1.214194884
A_23_P54991	DYNLL2	0.000995	0.816014485
A_23_P19712	GMNN	0.000919	0.804780173
A_24_P117029	LDLR	0.000581	0.802922882
A_33_P3293524	NA	0.000789	0.79922115
A_23_P132277	MCM5	0.000435	0.795536484
A_33_P3368830	NA	0.000327	0.788218036
A_33_P3420446	NA	0.000643	0.784584098
A_23_P387471	MICB	0.000138	0.775572381
A_23_P20443	LZTS1	5.70E-05	0.759611332
A_33_P3247086	NA	3.80E-05	0.759611332
A_23_P30495	HMGCR	6.10E-05	0.742261785
A_33_P3382887	NA	0.000114	0.723634619