

Intra-tumorális sejtes heterogenitás vizsgálata pancreas duktális adenokarcinómában organoid modellel

37. OTDK Biológia Szekció
Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar, Biológia Intézet
Biológus mesterszak

Készítette:

SZÁSZ REGINA

Külső konzulensek:

ZEÖLD ANIKÓ

PhD, egyetemi adjunktus
Semmelweis Egyetem, Általános
Orvostudományi Kar

WIENER ZOLTÁN

PhD, egyetemi docens
Semmelweis Egyetem, Általános
Orvostudományi Kar

Semmelweis Egyetem, Általános

Orvostudományi Kar

Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet

Belső konzulens:

KOVÁCS TIBOR

PhD, egyetemi adjunktus
Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Genetika Tanszék

SEMMELWEIS EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
GENETIKAI, SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI INTÉZET

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2023

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	3
ÖSSZEFOGLALÓ	4
BEVEZETŐ ÉS CÉLKITŰZÉSEK	5
Célkitűzések	6
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	7
HEK (humán embrionális vese) sejtek és humán PDAC organoid vonalak fenntartása, passzálása és mikroszkópos vizsgálata	7
Sejtek szortolása CD142 marker alapján, áramlási citometria	8
RNS izolálás és cDNS szintézis	9
Génexpresszió vizsgálata qPCR segítségével	9
Fehérjék lokalizációjának vizsgálata immunfestéssel	10
EREDMÉNYEK	12
A CD142 rossz prognosztikai marker hasnyálmirigy tumorban és magas szinten expresszálják a PDAC organoidok is.....	12
A humán PDAC organoidok heterogén módon expresszálják a CD142 fehérjét.....	13
Markerfehérjék expressziós különbségeinek vizsgálata a CD142 _{magas} és CD142 _{alacsony} sejtpopulációkban.....	15
A SOX9, Lumican és PDK1 fehérjék heterogenitása PDAC organoidokban	18
DISZKUSSZIÓ	20
SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	23
IRODALOMJEGYZÉK	24
KÖSZÖNETNYILVÁNYÍTÁS.....	26

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

BME: bazális membrán kivonat (basement membrane extract)

BSA: marha szérum albumin (bovine serum albumin)

CD142 (F3): koagulációs faktor III (coagulation factor III)

cDNS: komplementer dezoxiribonukleinsav

CRC: kolorektális daganat (colorectal cancer)

DAPI: 4',6- diamidino-2-fenil-indol

DNS: dezoxiribonukleinsav

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

EGF: epidermális növekedési faktor

EMT: epitheliális-mezenchimális tranzíció

EpCAM: epitheliális sejt adhézións molekula (epithelial cell adhesion molecule)

FACS: fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás (fluorescence-activated cell sorting)

HEK sejt: humán embrionális vesesejt (human embryonic kidney cells)

HPRT: hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz

IF: immuncitokémiai festés

Kras: „Kirsten rat sarcoma” vírus gén

KRT19: Keratin 19

PBS: foszfát-pufferes sóoldat (phosphate-buffered saline)

PDAC: hasnyálmirigy duktális adenokarcinóma (pancreatic ductal adenocarcinoma)

PDK1: piruvát dehidrogenáz kináz 1

PFA: paraformaldehid

qPCR: valós idejű polimeráz láncreakció

RNS: ribonukleinsav

SOX9: SRY(Sex-Determining Region Y)- Box 9

Wnt: wingless

ÖSSZEFOGLALÓ

A pancreas duktális adenokarcinóma (PDAC) a legveszélyesebb daganatok közé tartozik, 5 éves túlélési rátája évek óta változatlanul 8-9%. A betegség vizsgálatához organoid tenyészeteket használtunk, melyek a tumorokra jellemző sejtes heterogenitásuk megtartásával a legjobb *in vitro* humán tumormodellnek tekinthetők. Kutatásunk során egy specifikus markerre, a CD142 (az F3 gén terméke) szöveti faktorra összpontosítottunk, melyről munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy expressziója heterogén CRC tumor-asszociált fibroblasztokban. Online adatbázis elemzése alapján a CD142 a PDAC tumorsejtekben is heterogén módon expresszálódik, és a magasabb szintje rosszabb beteg túléléssel korrelál. Mindezek alapján PDAC organoidok segítségével vizsgáltuk, hogy a CD142 jelenléte milyen sejtes funkcióval hozható összefüggésbe. Kimutattuk a fehérje organoidokon belüli heterogén expresszióját, sikeresen elkülönítettük a CD142-t magasan és alacsonyan expresszáló sejtpopulációkat, és vizsgáltuk közöttük a génexpressziós különbségeket. Immuncitokémiai festéssel vizsgáltuk a CD142 és más fehérjék organoidokon belüli lokalizációját. Eredményeink azt mutatják, hogy a CD142-t magas szinten kifejező sejtekben a SOX9 transzkripció faktor is magasan expresszálódik, mely egy dedifferenciált állapotra utal. A CD142 magas expressziója mellett a sejtek részben elveszítik epitheliális jellegüket, azonban magasan jelen van bennük a KRT19 duktális marker, mely egy kevert fenotípusra utal. Vizsgálataink alapján felvetődik a kérdés, hogy a CD142 pozitív sejtek jelölhetnek-e egy intenzívebben proliferálódó sejtcsoportot.

BEVEZETŐ ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A hasnyálmirigy daganat egyik leggyakoribb típusa, a PDAC (pancreatic ductal adenocarcinoma- hasnyálmirigy duktális adenokarcinóma), a legnagyobb halálozási aránnyal járó daganatok közé tartozik, hasonlóan a tüdő rákhoz. A halálozási ráta meghaladja a 80-90 %-ot, a diagnózis és esetleges kezelések utáni 5 éves túlélési arány pedig 9% (Siegel *et al.*, 2022). A betegség egyik fő jellemzője, hogy a tünetek későn jelennek meg és a daganat maga agresszívan terjed, ezért korai diagnózisa és gyógyítása kimondottan nehéz. Jelenleg a legelterjedtebb kezelési módszerek közé tartozik a műtéti beavatkozás, valamint a különböző kemoterápiás szerek kombinált alkalmazása (Low *et al.*, 2021).

Mindezek miatt a PDAC további kutatása, megértése és kemoterápiás szerek fejlesztése nélkülözhetetlen. Ehhez pedig megfelelő modell rendszerek alkalmazása szükséges. A már régóta ismert sejttenyészetek és egér modellek mellett egy új rendszer jelent meg az utóbbi években, az organoid modell. Ezek a három-dimenziós *in vitro* rendszerek jól tükrözik a tumorok sejtes heterogenitását és a legjobb modellrendszert nyújtják az *in vivo* körülmények vizsgálatához (Boj *et al.*, 2015; Drost & Clevers, 2018). Emellett nagy előnyük, hogy közvetlenül a betegből származó sejtekből is ki lehet alakítani, így lehetőség nyílik célzott, páciens-specifikus terápiákra is (Low *et al.*, 2021; Bose *et al.*, 2022).

PDAC-ben azon betegek túlélése rosszabb, akik magasabb szinten expresszálják a CD142 (TF-szöveti faktor) nevű fehérjét és a tumorok sejtes heterogenitást mutatnak CD142 expresszió szempontjából (*The Human Protein Atlas* adatbázisából). A CD142-t egy szöveti faktornak (koagulációs faktor III) írták le és elsődlegesen a vérárvadásban van szerepe, de kiemelten fontos a daganatképződési folyamatokban is. Ez a sejtfelszínen található glikoprotein megtalálható tumor sejtek membránján is és befolyásolja azok mobilitását, inváziós képességét (Gao *et al.*, 2020), de jelenlétét összefüggésbe hozták a sejtek proliferációs képességével is (Al-Jazrawe *et al.*, 2023).

Kutatásunkban arra összpontosítottunk, hogy betegekből származó mintákból kifejlesztett PDAC organoidokon vizsgáljuk a sejtes heterogenitást a CD142 markerre vonatkozóan. FACS (Fluorescence-activated cell sorting, áramlási citometria) segítségével elkülönítettünk az organoid mintákból CD142 markert magasan és alacsonyan expresszáló sejteket, majd ezek számos génre vonatkozó expressziós mintázatait hasonlítottuk össze. Célunk az volt, hogy különbségeket tárjunk fel ezen sejtcsoportok között, ezáltal azt vizsgáljuk, hogy a páciensekben miért rosszabb a CD142-t magasan expresszáló tumoroktól szenvedők

túlélési esélye. Az RNS szintű jellemzés során a qPCR (valós idejű polimeráz láncreakció) technológiát alkalmaztuk és azt vizsgáltuk, hogy CD142-t magasan és alacsonyan expresszáló sejtekben különböző gének (progenitor, epitheliális, mesenchimális és inváziós markerek) expressziós szintje eltérő-e. Ezentúl bizonyos, a CD142 markerrel összefüggésbe hozható és a daganatképződésben fontos szerepet játszó gének fehérjetermékét is vizsgáltuk, ehhez a mintákat immuncitológiai úton megfestettük és konfokális mikroszkópban néztük, mutatnak-e sejtes heterogenitást organoidokon belül.

Célkitűzések

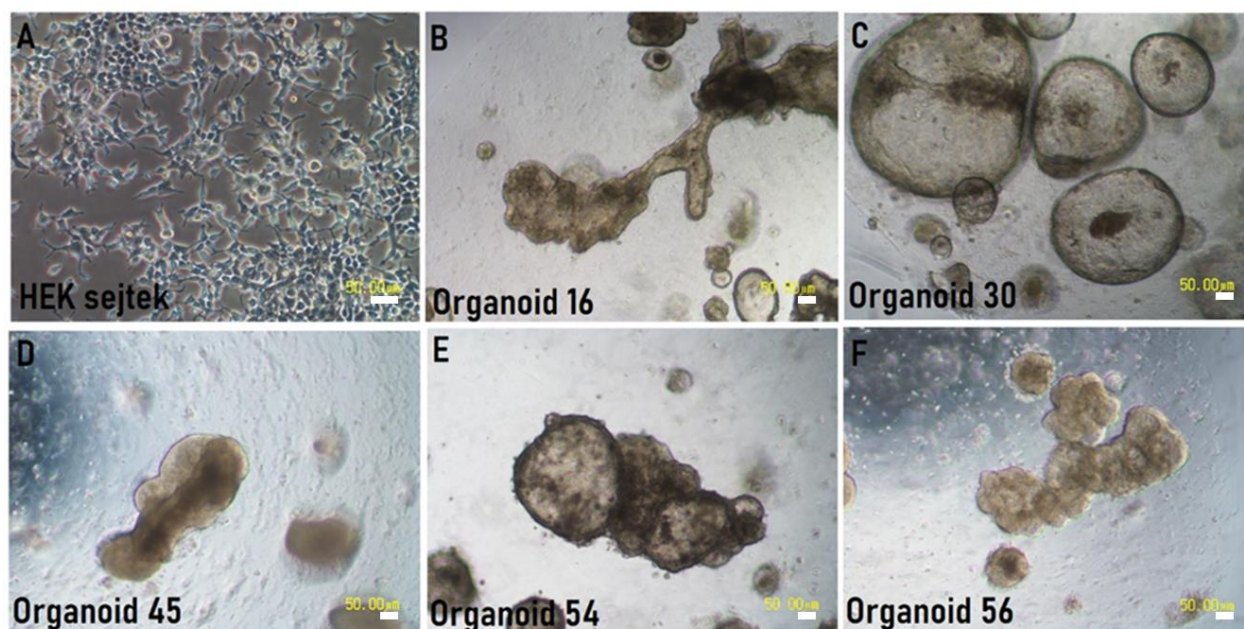
A PDAC az egyik legsúlyosabb és legveszélyesebb daganatok közé tartozik, felismerése és gyógyítása pedig gyakran nehézségbe ütközik, többek között azért is, mert a tünetek későn jelennek meg, valamint a kombinált terápiák vagy műtéti eljárások sajnos gyakran alacsony hatásfokúak. A PDAC tumor egyik fontos jellemzője a sejtes heterogenitás, ezen belül kiemelendő lehet a CD142 expressziójában esetlegesen megfigyelhető heterogenitás. Kutatásunk során a következőkre összpontosítottunk:

1. PDAC organoidok sejtes heterogenitása CD142-re nézve (IF).
2. Eltérő CD142 expressziót mutató sejtek külön választása, szortolása (FACS).
3. Szortolt sejtekben további gének expressziós szintjének összehasonlítása (qPCR).
4. CD142 és e fehérjével összefüggésbe hozható más fehérjék PDAC organoidokon belüli lokalizációjának vizsgálata (IF).

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

HEK (humán embrionális vese) sejtek és humán PDAC organoid vonalak fenntartása, passzálása és mikroszkópos vizsgálata

Az organoidok tápjának elengedhetetlen összetevője az R-spondin nevű szekretált fehérje, mely a proliferációt elősegítő Wnt szignálút vonal agonistájaként működik. R-spondin 1 nagy mennyiségű termelésére képes genetikailag módosított HEK sejteket (1.A.ábra) alkalmaztam (stabilan transzfektált 293T sejtek; teljes név: Cultrex HA-R-Spondin1-Fc 293T, R & D Systems 3710-001-10; Kuo, C.J. U.S. Patent 9,464,275.). A nem stabilan transzfektált sejteket Zeocin segítségével kisselektáltam (300ug/ml Zeocin, 10%-os DMEM, FBS médiumban). 60-70 %-os konfluencia elérése esetén a sejteken tápot cseréltem és 10 napig DMEM/F12-ben növesztettem. Ebbe a tápba (az organoid táp alapja) szekretálták az általuk termelt R-spondin fehérjét. 10 nap leteltével a sejtápot fúgáltam (3000g 15 perc, 6°C) és 0,2 mikronos szűrőn átszűrtem a sejtörmelék eltávolítása céljából, majd a kapott szűrt felülúszót olyan organoid táppal kevertem 1:1 arányban, mely kétszeres mennyiségben tartalmazott minden összetevőt.



1.ábra: *A) Humán embrionális vese sejtekről és B-F) különböző organoid vonalakról (organoid 16, 30, 45, 54, 56) készített saját mikroszkópos képek. Méretarány: 50µm*

Kutatócsoportunk PDAC páciensekből származó tumor mintákból alapított organoid tenyészeteket (1.B-F.ábra). Jelen munkában használt összes PDAC organoid vonal EGF (epidermális növekedési faktor) nélküli médiumban is fenntartható volt, ami mutatta, hogy mindegyik a KRAS (PDAC driver mutáció) szignálútvonalban lévő mutációval rendelkezett. Az organoidokat BME (bazális membrán esszencia) cseppben növesztettem többlyukú tenyésztő plate-ekben, a használt tápoldat összetevői az alábbi táblázatban láthatók (1.táblázat).

Alaptáp tartalma	Funkciók	Végkoncentráció
DMEM/F12	Alapmédium	–
B27	Növekedési faktorok és vitaminok	2%
N2	Növekedési faktorok és vitaminok	1%
Gasztrin	Peptid hormon	0,01%
HEPES	Megfelelő pH kialakítása	1%
AB/AM	Antibiotikum	2%
Glutamin	Nélkülözhetetlen aminosav	1%
N-acetil-L-cisztein	Glutation antioxidáns prekursora	0,10%
Teljes táp (alaptáp kiegészítve)	Funkciók	Végkoncentráció
R-spondin	Wnt szignalizáció aktiválása	0,20%
A-8301	TGF- β receptor inhibitor	0,10%
Y-27632	ROCK inhibitor	0,10%

1.táblázat: Az organoidok tenyésztéséhez szükséges összetevők.

Az organoid tenyészetek fenntartása érdekében a mintákat körülbelül két hetente passzáltam, mely a következő folyamatot jelentette: 1. az organoidokat tartalmazó BME cseppek felkaparása, fizikai összetörése (6x fel-le szuszpendálás), 2. a plate lyukak átmosása foszfát-puffer sóoldattal (PBS), 3. a minta fugálása fuga csőben 7 percig 300 g-n, 4. felülúszó eltávolítása, 5. minta visszahelyezése BME-be (25 μ l/csepp), 6. a BME csepp gélszerű megszilárdulását követően a táp hozzáadása. Az organoidokat inverz mikroszkóp segítségével vizsgáltam.

A Cultrex HA-R-Spondin1-Fc 293T sejtekkel valamint az organoidokkal való munka BL2 (Biosafety level 2) laboratóriumban történt, mely során betartottam a kötelező óvintézkedéseket (eldobható kesztyű használata, a munka során keletkezett hulladékok, inkluzíve folyadékok fekete dekontamináló (biohazard) kukába gyűjtése).

Sejtek szortolása CD142 marker alapján, áramlási citometria

A tenyésztett mintákat (20-30 cseppben növesztett organoid tenyészet) felkapartam és lefugáltam (7 perc, 300g), majd a pelletet Tryple (tripszin, Gibco) oldatban inkubáltam (37°C,

10 perc), hogy a sejtközzötti kapcsolatok minél jobban széteszenek. Ezután PBS-el a Tryple-t kihígítottam és ismét lefugáltam (5 perc, 300g). A pelletet Ca^{2+} mentes FACS pufferben (1 μM EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav), 25mM Hepes, 1% BSA; PBS-ben) vettem fel, majd újabb fugálást követően a keletkezett pelletet 55 μl FACS pufferben felszuszpendáltam. A mintából 5 μl -t kivettem kontrolnak (festetlen sejtek), a maradék 50 μl mintához hozzáadtam a fikoeritrinnel jelölt humán anti-CD142 ellenanyagot (2 μl /50 μl puffer; Biolegend #365203,) és 30 percig sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltam. Ezután a mintákat kiegészítettem 300 μl -re hideg FACS pufferrel, jégre helyeztem és közvetlenül a szortolás előtt 70 μm pórusméretű szűrőn átszűrtem. Az áramlási citometria mérésekhez SONY LE-SH800 sejtszortoló gépet használtunk.

RNS izolálás és cDNS szintézis

A miRNeasy Micro Kit (Qiagen) protokollja alapján teljes RNS-t izoláltam az organoidokból, illetve a szortolt sejtekből. A mintákat 0.7 ml QIAzol reagensben (Qiagen) vettem fel, majd a végén 14 μl vízzel eluáltam az oszlopról. Az RNS koncentrációt NanoDrop eszköz segítségével mértem meg. További felhasználásig az RNS mintákat -80°C -on tároltam. A cDNS szintézishez minden mintából 300ng RNS-t tettem fel és a SensiFast cDNS Szintézis Kit Protokolt használtam (Bioline; 4 μl 5x TransAmp puffer, 1 μl Reverz transzkriptáz, RNS; össztérfogat: 20 μl / H_2O). A szintézis során a PCR gép beállításai az alábbiak voltak: $25^{\circ}\text{C}/10$ perc, $42^{\circ}\text{C}/30$ perc, $85^{\circ}\text{C}/5$ perc. A folyamat végén a cDNS mintákat -20°C -ra helyeztem.

Génexpresszió vizsgálata qPCR segítségével

A minták génexpressziójának vizsgálatához qPCR technológiával vizsgáltam 40 gén expresszióját (2.táblázat). Az eredményekben ezek közül több kiemelt gén expresszióját mutatom be. A qPCR mérést Biorad géppel végeztem. A mérésekhez 384 lyukú plateket használtam, melyekbe két különböző keveréket töltöttem: i.) vízben hígított cDNS (1,85 μl RNS-mentes víz és 0,15 μl cDNS; összesen 2 μl /lyuk), ii.) a primerek keveréke: 2,5 μl No-ROX (nem tartalmaz referencia fluoreszcens festéket) SYBR Green oldathoz adtunk 0,25 μl forward és 0,25 μl reverz primert; összesen 3 μl /lyuk). A két keveréket lyukanként összemértem, így 5 μl reakcióelegy került bele egy lyukba. Háztartási génként HPRT-t használtam és minden primer-keveréket összemértem 2 μl vízzel is negatív kontrollként. A qPCR során a következő beállításokat alkalmaztam: $95^{\circ}\text{C}/2$ perc, $95^{\circ}\text{C}/5$ másodperc, $60^{\circ}\text{C}/30$ másodperc (utóbbi kettő 41 cikluson át); $95^{\circ}\text{C}/5$ másodperc, $65^{\circ}\text{C}/5$ másodperc, $95^{\circ}\text{C}/$

50 másodperc. A kapott eredményeket Bio-Rad CFX Maestro Szoftverrel értékeltem ki és táblázatban/grafikusan ábrázoltam a 2^{-dCt} értékeket (illetve azok %-os összehasonlítását).

Vizsgált gén nevének rövidítése	Primer szekvencia forward	Primer szekvencia reverz	Termék hossza (bázispár)
hACTA2	5'-CTGACCCCTGAAGTACCCGAT-3'	5'-GTCATTTTCTCCCGTTGGC-3'	167
hBMPR2	5'-TGCAGGTTCTCGTGCTAGG-3'	5'-CCTGGTCCCAACAGTCTTCG-3'	114
hCAV1	5'-CGCGACCCCTAAACACCTCAA-3'	5'-GAAGCTGGCCTTCCAATGC-3'	108
hCD133 (Prominin I)	5'-GCCTCTGGTGGGGTATTTCT-3'	5'-TACCTGGTGATTGCCACAA-3'	181
hCD142	5'-ACCGACGAGATTGTGAAGGA-3'	5'-TGTCCGAGGTTGTCTCCAG-3'	152
hCD44	5'-GGCTTTCAATAGCACCTTGC-3'	5'-GTTGTTTGTCTGCACAGATGG-3'	142
hCDH1	5'-CCTTATGGCCACAGTCCATT-3'	5'-TCCCCAAAATTCTCAGTTGG-3'	155
hCDH11	5'-GCCCAAGTTACATCCACGA-3'	5'-TGATGTTGAGCCAGGCTGTT-3'	217
hCDH2	5'-CATCCCTCAATCAACTTGC-3'	5'-CCGAGATGGGGTTGATAATG-3'	164
hCDH4	5'-CATCAACGTGCCCGAGAAGT-3'	5'-TGTACCGGATGGGGATGTCA-3'	92
hCEACAM5	5'-GCGACCCAGTCATCCTGAAT-3'	5'-GCTCTTGTGTGTGTGCTGG-3'	174
hCTNND1	5'-GCGATTGCTTCGAAAGGCTC-3'	5'-ATTCCCACTCAATGTGGCGT-3'	203
hCXCL12	5'-GTGGTCTGTGCTGGTCTC-3'	5'-ATCTGAAGGGCACAGTTTGG-3'	161
hEpCAM	5'-CTGGCCGTAACCTGCTTTGT-3'	5'-CATCATTTGTTCTGGAGGGCC-3'	178
hEZR	5'-GCTTGGAGTTGATGCCCTTG-3'	5'-GTGCTTCTTGTGTCGATGGGT-3'	143
hGATA6	5'-ACCACCTTATGGCGCAGAAA-3'	5'-ATAGCAAGTGGTCTGGGCAC-3'	95
hGREM1	5'-CCGCACTGACAGTATGAGCC-3'	5'-GTCTGCTCTGAGTCATTGTGC-3'	153
hHPRT	5'-TGAGGATTGGAAAGGGTGT-3'	5'-TCCCTGTTGACTGGTCAAT-3'	252
hID4	5'-GCACGTTATCGACTACATCTC-3'	5'-CACAGAAATGCTGTGCGCC-3'	195
hIL1A	5'-AGTAGCAACCAACGGGAAGG-3'	5'-AAGGTGCTGACCTAGGCTTG-3'	128
hIL1R1	5'-ACTGATTCTTCTCTGGAGGC-3'	5'-ATCCTGGAGGCTTGTCTGT-3'	183
hKLF6	5'-AACCAGGCACCTCCGAAAGCAC-3'	5'-CTCAGAGGTGCCTCTTCATGTG-3'	113
hKRT19	5'-CTGAAGGAAGAGCTGGCCTA-3'	5'-TGACCTCATATTGGCTTCGCA-3'	157
hKRT5	5'-TGAAATCAACAAGCGTACCAGT-3'	5'-CCACCTTGTTTCATGTAGGCA-3'	83
hKRT6A	5'-GAGGAGATTGCTCAGAGAAGCC-3'	5'-CAATCTCTGCTTGGTGTGCG-3'	121
hLUM	5'-CCTGGTTGAGCTGGATCTGT-3'	5'-GTAGGATAATGGCCCAAGGA-3'	145
hMMP14	5'-TACGGCTTGCAAGTAACAGG-3'	5'-GTAGCGCTTCTTCGAACAT-3'	123
hMMP2	5'-TGGATGATGCCTTTGCTCGT-3'	5'-CAAAGGGGTATCCATCGCCA-3'	135
hMUC1	5'-GTTACGGGTTCTGGTCATGC-3'	5'-TTGGTAGTAGTCGGTCTGG-3'	195
hMYC	5'-TCCTCGGATTCTCTGCTCTC-3'	5'-CTCTGACCTTTTGCAGGAG-3'	180
hNES	5'-CTGCGGGCTACTGAAAAGTT-3'	5'-TGAGCGATCTGGCTCTGTAG-3'	80
hPDX1	5'-AAGTCTACCAAGCTCACGC-3'	5'-GTTCAACATGACAGCCAGCT-3'	186
hS100A2	5'-TGATGTGCAATTCTCTGGAGCAG-3'	5'-TCCACTTTCTCCCCACAAAG-3'	154
hSOX9	5'-AGTACCCGCACCTTGACAAAC-3'	5'-CGTTCTTACCAGACTTCTCTC-3'	177
hSOX9	5'-AGTACCCGCACCTTGACAAAC-3'	5'-CGTTCTTACCAGACTTCTCTC-3'	177
hST6GALNAC1	5'-AGTCACGACTACGTGTTCCG-3'	5'-CCCAGAGGCACGTTCTTGA-3'	156
hTTF1	5'-TGGAGAACAAGGTGATCTGCG-3'	5'-AACAGCAGCCCTTATTGAC-3'	162
hVCAM1	5'-GATTCTGTGCCCACAGTAAGGC-3'	5'-TGGTCACAGAGCCACCTTCTTG-3'	118
hVEGFA	5'-AAGGAGGAGGGCAGAATCAT-3'	5'-CACACAGGATGGCTTGAAGA-3'	143
hVIM	5'-GGTACTCGCATTTCCACCT-3'	5'-CTCAATGTCAAGGGCCATCT-3'	238

2.táblázat: A qPCR során vizsgált géneket, azok primer szekvenciáját és a keletkezett termékek hosszát összefoglaló táblázat.

Fehérjék lokalizációjának vizsgálata immunfestéssel

Az organoid mintákat passzálás után üveg alapú 8-as osztott Falcon-kamrába raktam ki BME mátrix cseppekben, majd egy hét tenyésztés után paraformaldehiddel fixáltam (4%-os PFA, PBS-ben oldva, 60 percig szobahőmérsékleten). Sterilen kezeltem, így nátrium-azid hozzáadása nélkül a festésig 4°C-on tároltam parafilmel lezárva. Az immunfestéshez PBS-el mostam (háromszor 5 percig, billegtetőre helyezve), majd permeabilizáltam (0,5 %-os Triton-X 100 oldat PBS-ben oldva, 10 percig szobahőmérsékleten) és blokkoltam (blokkoló: 5%-os

FCS-magzati borjú szérúm; 0,2%-os BSA-marha szérúm albumin; 0,3%-os os Triton-X 100 oldat PBS-ben oldva; 1 óráig szobahőmérsékleten). PBS-es öblítést követően (5 percig, billegtetőn) hozzáadtam az elsődleges antitestet (kétszeresen híg blokkolóban oldva) és éjen át billegtetőn 4°C-on hagytam. Másnap mosással (0,3%-os Triton-X 100 oldat PBS-ben oldva, 4% nátrium-klorid tartalommal; háromszor 30 percig szobahőmérsékleten és billegtetőn) kimostam az elsődleges ellenanyag feleslegét, majd hozzáadtam a fluorokrómmal jelölt másodlagos ellenanyagot (kétszeresen híg blokkolóban oldva) és két órán át inkubáltam szobahőmérsékleten, billegtetőn. Mosás után (PBS, 3x30 perc) 300 nM végkoncentrációjú, PBS-ben oldott DAPI oldattal megfestettem a sejtmagokat (15 perc, szobahőn) majd kétszer 10 perces PBS-es mosás és a végül desztillált vizes öblítés (5 perc) után a Falcon kamra falait eltávolítottam és lefedtem a mintákat szobahőn szilárduló fedőanyaggal (Prolong Diamond Antifade Mountant, Invitrogen). A képek elkészítéséhez Leica konfokális lézer szkennings mikroszkópot használtunk. A felhasznált ellenanyagokat és hígításait az alábbi táblázat tartalmazza (3.táblázat).

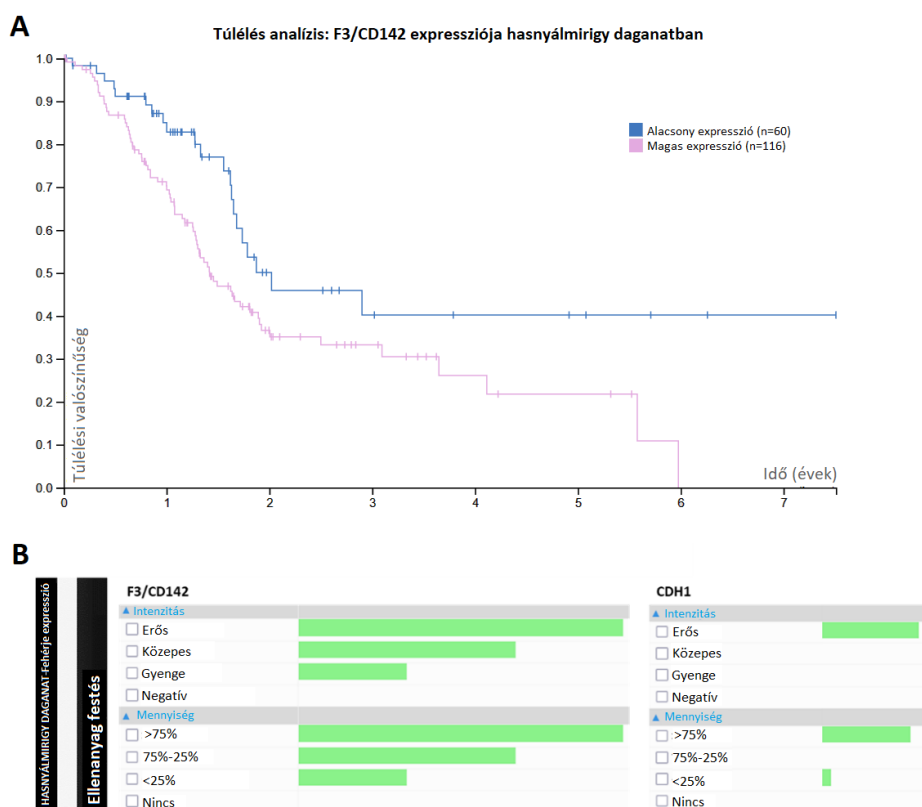
Elsődleges ellenanyag	Vizsgált gén	Másodlagos ellenanyag	Gerjesztési hullámhossz	Szín
direkt jelölt anti-humánCD142 (fikoeritrin)	hCD142	–	–	piros
nyúl- anti humán SOX9	hSOX9	szamár- anti nyúl	488	zöld
nyúl- anti humán Lumican	hLumican	szamár- anti nyúl	488	zöld
nyúl- anti humán SOX9	hSOX9	kecske- anti nyúl	568	piros
nyúl- anti humán PDK1	hPDK1	kecske- anti nyúl	568	piros

3.táblázat: Az immuncitokémiai festések során alkalmazott elsődleges-és másodlagos ellenanyagok adatait összefoglaló táblázat.

EREDMÉNYEK

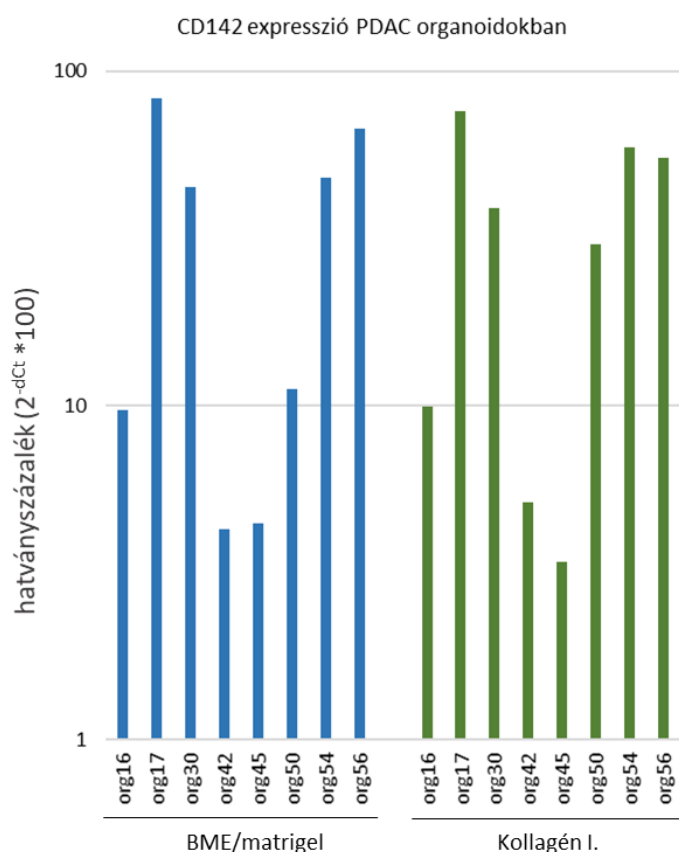
A CD142 rossz prognosztikai marker hasnyálmirigy tumorban és magas szinten expresszálják a PDAC organoidok is

Online adatbázis (www.proteinatlas.org) adatai alapján azt találtam, hogy hasnyálmirigy tumor esetében az F3/CD142 magasabb expressziója rosszabb prognózissal társul (2.A.ábra). Érdekes módon az adatbázis alapján azt találtam, hogy míg kolorektális tumor esetében (CRC) a tumorsejtekben alig expresszálódik az F3/CD142 (nem mutatott adatok), hasnyálmirigy tumor esetében ezen fehérje expressziója magas és magas szinten jelen van a tumorsejtek nagy százalékában (>75% festett sejt per látótér) valamint az expressziója tumoron belül is mutathat heterogenitást (2.B.ábra, bal oldali grafikon). Utóbbi nem minden fehérjére jellemző, például a CDH1 (E-cadherin génjének) expressziója a tumorsejtek többségében erősen jelen van de nem mutat ekkora heterogenitást (2.B.ábra, jobb oldali grafikon).



2.ábra: A) Magasabb CD142 expresszió (rózsaszín görbe) rosszabb túlélési rátát mutat hasnyálmirigy tumor esetében. B) Hasnyálmirigy tumorban a F3/CD142 expressziója heterogenitást mutat a tumorsejtek közt. (www.proteinatlas.org nyomán)

Ebből kiindulva adódik az a kérdés, hogy az F3/CD142 heterogén expressziója korreláltható-e valamilyen funkcióval, illetve, hogy milyen jellemzői vannak a CD142-t magasan expresszáló hasnyálmirigy tumorsejteknek. Kutatócsoportunk korábban 8 db PDAC organoid tenyészetet növesztett mind BME/Matrigel, mind kollagén-I cseppekben és az összesen 16 mintából teljes RNS-t izolált. A kollagén-I ebben az esetben egy alternatív extracelluláris mátrixot reprezentált, melynek mennyisége a tumorigenezis során feldúsul. Ezen mintákkal elvégzett qPCR eredményeim alapján az összes organoid vonal magas szinten expresszálta az F3/CD142 fehérjét és az expressziós mintázatban nem találtam különbséget BME és kollagén esetében (3.ábra).

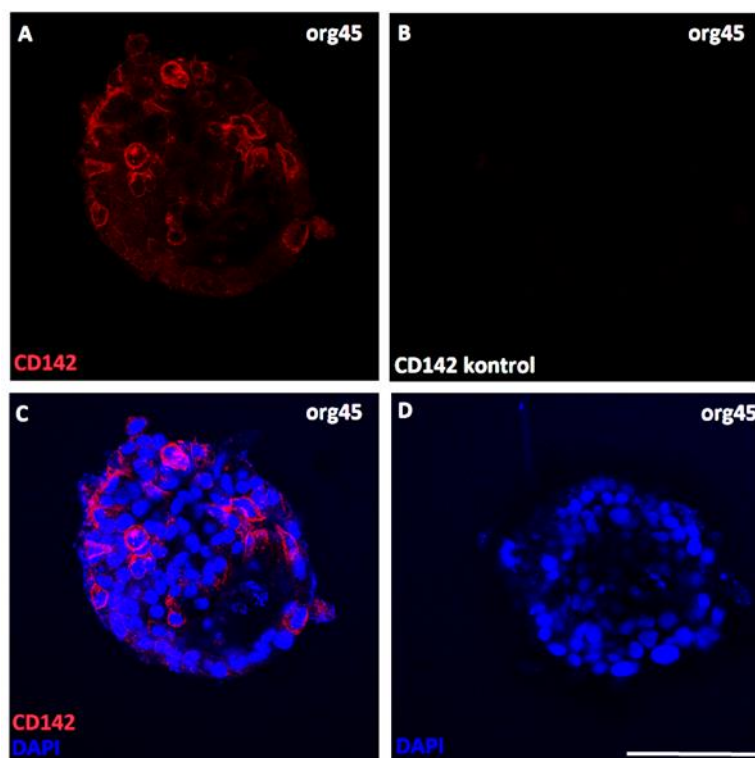


3.ábra: A PDAC organoidok–extracelluláris környezetől függetlenül magas szinten expresszálják az F3/CD142 fehérjét.

A humán PDAC organoidok heterogén módon expresszálják a CD142 fehérjét

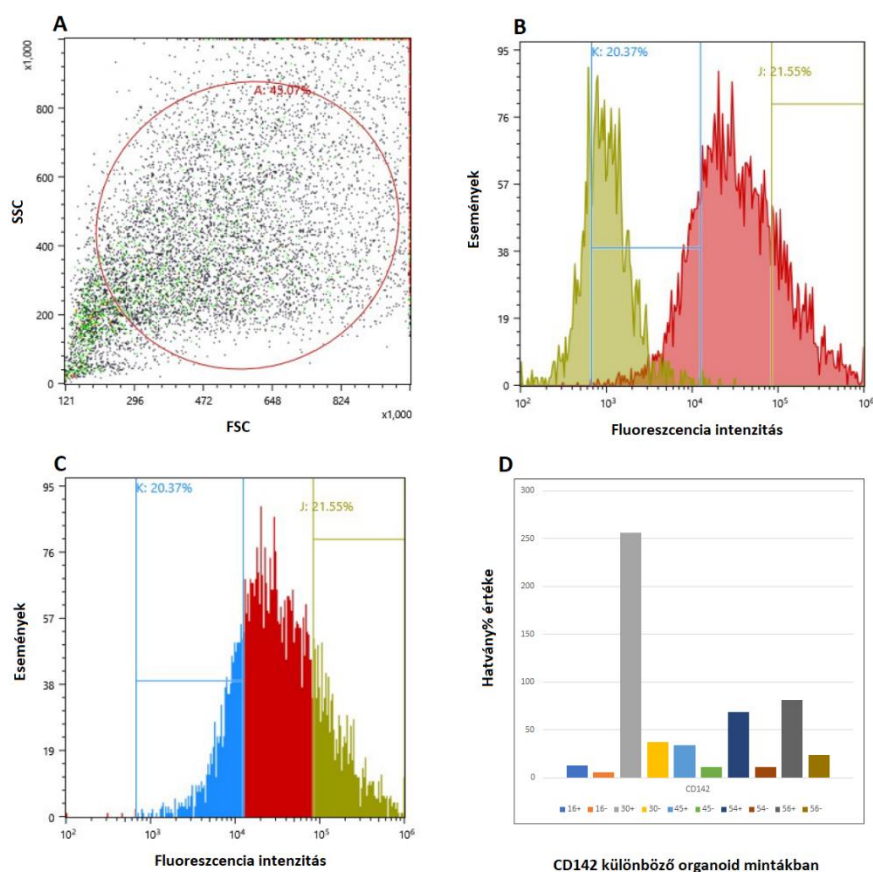
Az organoid tenyészetek nagyon jó modelljei a tumorkutatásoknak, mivel rendelkeznek a tumorok azon központi tulajdonságával, hogy sejtes heterogenitást mutatnak (Boj *et al.*, 2015; Drost & Clevers, 2018). Immuncitokémiai festéssel megmutattam, hogy a PDAC organoidokban heterogén módon expresszálódik az F3/CD142 fehérje. E membrán-lokalizált

fehérje az organoidot felépítő tumorsejtek egy részében detektálható, míg más sejtek negatívnak bizonyultak (4.ábra). Konfokális lézer szkennelés mikroszkóppal úgynevezett „z” irányban is végig szkenneltem az organoidokat és hasonló heterogén festést láttam minden fókusz síkban. Az organoidokat 40x objektívvel vizsgáltam, kisebb méretűeket választva, hogy beleférjenek egy látótérbe.



4.ábra: *A) CD142 heterogén expressziója, B) kontrol festés (csak szekunder antitest), C) CD142 heterogén expressziója (piros jel) és magfestés Dapi-val (kék jel), D) kontroll festés (csak szekunder antitest) és magfestés (DAPI). Méretarány: 25 μ m*

Áramlási citometria segítségével sikeresen elkülönítettünk olyan sejtcsoportokat, amelyek a CD142-t magasan (CD142_{magas}) vagy alacsonyan (CD142_{alacsony}) expresszálták. A beállítások során ügyeltünk arra, hogy kizárólag csak a nagyon magas és nagyon alacsony expressziót mutató sejteket válogassuk ki (felső és alsó kb. 20-20%-a sejteknek). A QIAzol-ba szortolt sejtek száma (10.000-20.000 sejt/organoid minta) elegendő volt megfelelő mennyiségű RNS izolálásához. Öt PDAC organoid vonalból szortoltam ki CD142_{magas} és CD142_{alacsony} sejteket, melyet egy reprezentatív ábrán mutatok be (5.ábra A-C). A szortolt sejtekből izolált teljes RNS minta CD142 mRNS tartalmát RT-qPCR-el vizsgáltam, ami igazolta a CD142_{alacsony} sejtek alacsony expresszióját a CD142_{magas} magas populációhoz képest minden mintapár esetében (5.D ábra).



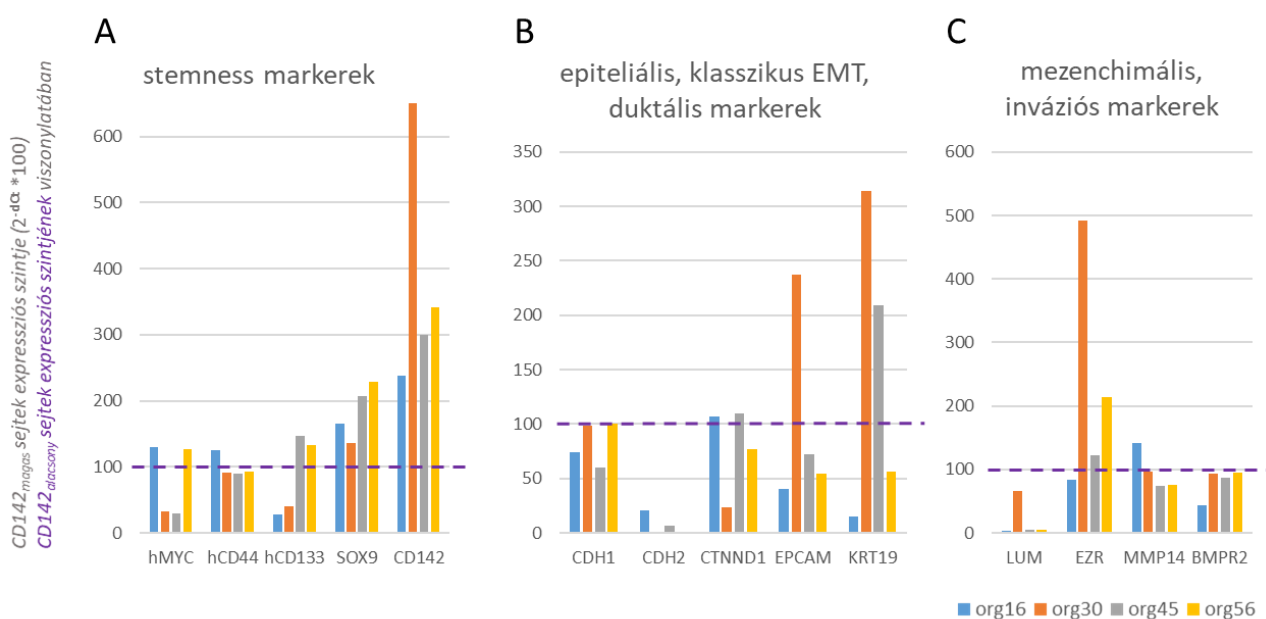
5.ábra: *A-C)* reprezentatív szortolási ábrák, $CD142_{magas}$ és $CD142_{alacsony}$ sejtek elkülönítése $aCD142$ -PE antitest segítségével. *D)* Eltérő $CD142$ expresszió a szortolt sejtekben.

Markerfehérjék expressziós különbségeinek vizsgálata a $CD142_{magas}$ és $CD142_{alacsony}$ sejtpopulációkban

A QIAGEN-be szortolt sejtekből izolált RNS mintákat teljes RNS mennyiségre normalizáltam (Nanodrop), vagyis mintánként azonos RNS mennyiségeket írtam át cDNS-re. A qPCR során a gének expresszióját a HPRT háztartási gén expressziójához viszonyítottam. A vizsgált és bemutatott géneket alábbiakban csoportosítottam: i, proliferatív (stemness=őssejtes) jellegű jelölő gének ii, epitheliális, duktális karakterisztikát, valamint klasszikus EMT-t (kadherin switch) jelző markerek iii, mezenchimális illetve inváziós fenotípusra utaló gének (6. ábra). Az eredményeket a négy általam fenntartott PDAC organoid vonal esetében mutatom be.

A $CD142_{alacsony}$ és $CD142_{magas}$ sejtek összehasonlítása volt a cél, így a qPCR eredményeket az alábbi módon ábrázolom: minden gén esetében kiszámoltam a hatványszázalékot (=expressziós szint, ami háztartási gén által normalizált expressziós érték: 2^{-dCt} , hatványának 100-szorosa; ahol a $dCt = Ct(\text{adott gén}) - Ct(\text{háztartási gén})$, esetünkben

HPRT)), majd az egyes mintákban (szortolt sejtpopulációpárookra vonatkoztatva) a CD142_{magas} sejtek expressziós szintjét CD142_{alacsony}-tól való százalékos eltérésként ábrázoltam a grafikonokban. A 100-as értéknél húzott lila szaggatott vonal az adott mintákból szortolt CD142_{alacsony} sejtek expressziós szintjét jelöli (6. és 7. ábra).



6. ábra: Különböző marker fehérjék expressziós szintjeinek összehasonlítása a szortolt sejtcsoportokban. A CD142_{alacsony} sejtek expressziós szintjét (hatványszázalék: $2^{-dCt} * 100$) 100%-nak vettem (lila szaggatott vonalak) és kiszámoltam mintapáronként a hozzá tartozó CD142_{magas} sejtek expressziós szintjének százalékos eltérését.

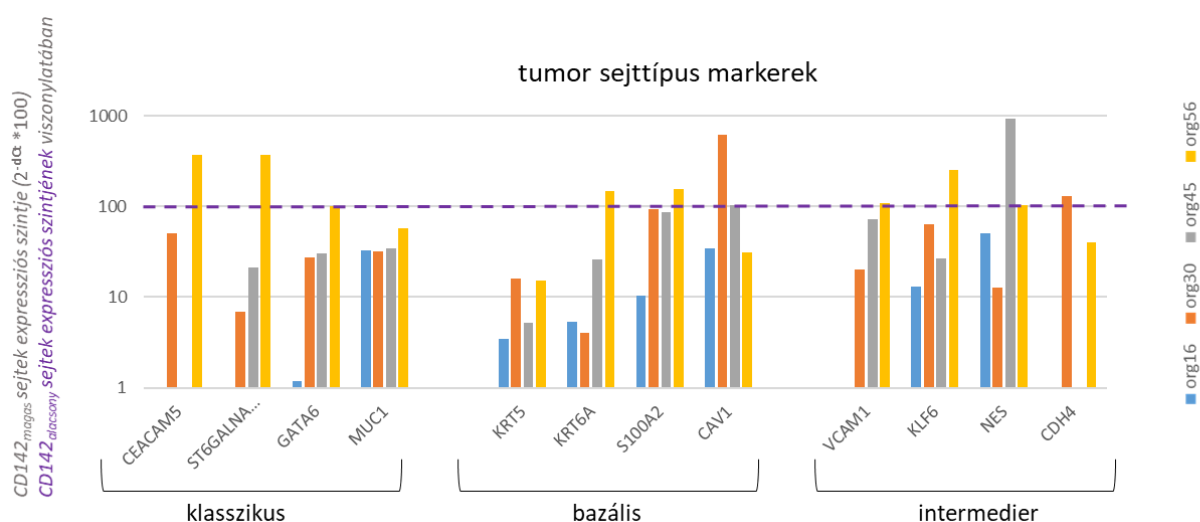
Az organoidok között több gén esetében heterogenitás mutatkozik arra vonatkozóan, hogy a CD142_{magas} sejtek milyen mértékben expresszálják az adott gént a CD142_{alacsony} populációhoz képest. (példaként 6.B ábra CTNND1, EpCAM, KRT19, valamint 6.C ábra EZR). Más gének expressziós mintázatában találtam konzekvenciát a párhuzamos biológiai mintákat nézve, azonban a CD142_{magas} sejtpopuláció minden esetben közel azonos expressziót mutatott a CD142_{alacsony} sejtpopulációval összevetve (6.A ábra CD44, 6.C ábra MMP14 és BMP2).

Míg minden egyes organoidban a CDH1 gén magas expressziót mutatott (átlagos Ct=25 értékkel), a CDH2 expresszió jóval alacsonyabb volt ennél (Ct értékek külön nincsennek ábrázolva), vagyis klasszikus kadherin csere nem mutatkozik ezen tumorsejteknel. Azonban a CD142-t magas szinten expresszáló sejtek esetében érdekes módon a CDH2 expressziós szintje

minden egyes mintában konzekvensen a CD142_{alacsony} sejtpopulációban detektált alatt maradt, amit jól tükröz a 6.ábra B grafikonja. Általánosságban elmondható, hogy a kadherineknél (CDH1, CDH2), valamint a p120 catenin (CTNND1) expressziós szintje a CD142_{magas} sejtpopulációkban közel azonos vagy alatta marad a CD142_{alacsony} sejtpopulációkban mért szintekhez képest. Mindemellett azt találtam, hogy a SOX9 transzkripciós faktor mind a négy organoid vonal esetében magasabb expressziót mutatott a CD142_{magas} mintákban (6.A ábra).

Összességében azt láttam, hogy mindkét sejtpopulációban megmaradnak az epitheliális markerek és magas szinten expresszálódnak az inváziós potenciálra utaló fehérjék is, mint az ezrin (EZR) és matrix metalloproteáz 14 (MMP14). Emelett érdekes módon a Lumican (LUM) nevű mezenchimális marker jóval alacsonyabb expressziót mutatott a CD142-t magas szinten expresszáló sejtekben (6.B ábra).

Legújabb kutatások azt eredményezték, hogy a PDAC tumoron belül különböző tumorsejttípusok lehetnek jelen, melyek klasszikus (sok glikolizált fehérjét termelő), bazális (magas keratin tartalmú) és intermedier (kettő közötti, mindkettő típusra jellemző markereket expresszáló) fenotípusú kategóriákba sorolhatók (Raghavan *et al*, 2021). Az általam szortolt sejtek esetében megvizsgáltam, hogy külön kategóriába sorolható-e a két szortolt sejtpopuláció. Bár konzekvencia nem figyelhető meg, számos tumorsejttípus-marker alacsonyabb szintű expressziót mutat a CD142_{magas} sejtpopulációban a CD142-t alacsonyan expresszáló mintákhoz viszonyítva (7. ábra).



7.ábra: Klasszikus, bazális és intermedier kategóriákba tartozó tumor markerek expressziós szintjének összehasonlítása különböző organoid vonalakból szortolt CD142_{magas} és CD142_{alacsony} sejtpopulációkban. Mintánként a CD142_{alacsony} sejtek expresszióját 100%-nak

vettem (lila szaggatott vonal) és ennek függvényében ábrázoltam az ugyanabból mintából szortolt CD142_{magas} sejtek expressziós szintjének százalékos eltérését.

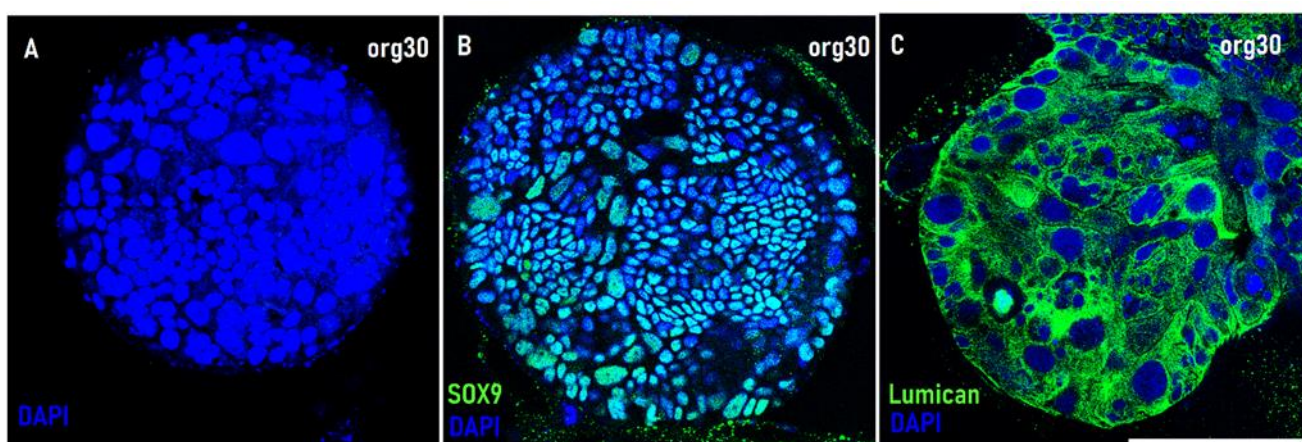
A SOX9, Lumican és PDK1 fehérjék heterogenitása PDAC organoidokban

A CD142 heterogenitása mellett kíváncsi voltam, hogy a SOX9 transzkripciós faktor és a Lumican proteoglikán fehérje milyen mintázatban expresszálódik a PDAC organoidokban. SOX9 esetében qPCR során is láthattuk, hogy magasabban expresszálódik a CD142 markert magasan expresszáló sejtekben, ezenkívül amellet hogy jelenléte progenitor státuszra utal korábbi kutatás azt is megmutatta, hogy fontos feladata lehet a tumorok inváziós képességében (Sun *et al.*, 2013). A Lumican mezenchimális marker esetében viszont jóval alacsonyabb expressziót mutattak a CD142_{alacsony} sejtek, azonban ezen marker extracelluláris jelenléte is összefüggésbe hozható a tumorképződéssel (Li *et al.*, 2014).

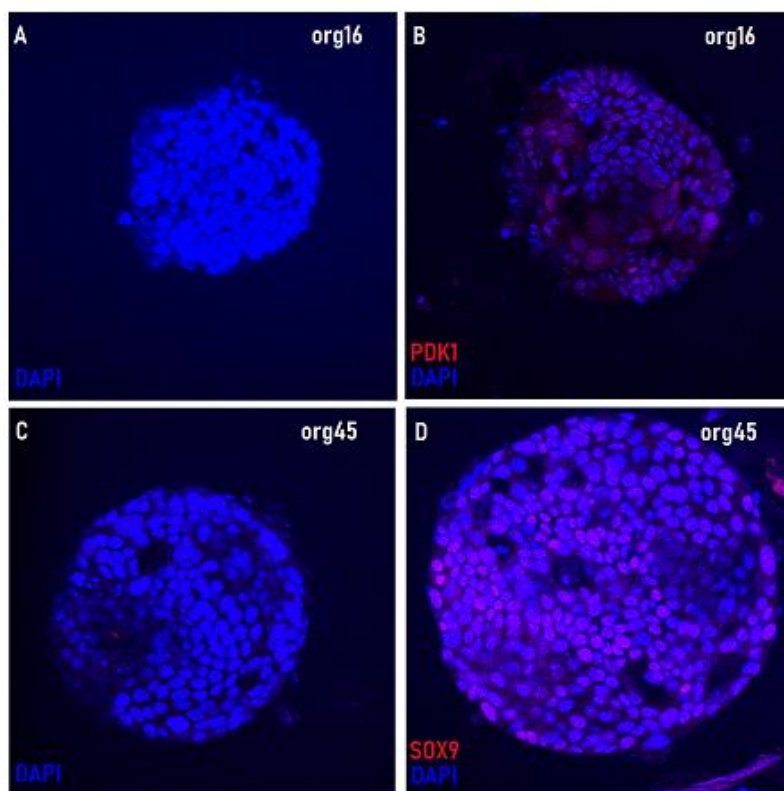
SOX9 esetében azt találtam, hogy az organoidokon belül jól elkülöníthetőek olyan területek, ahol a markert a sejtek erősen expresszálják, azonban az organoidon belül a festés heterogenitást mutatott, olyan területek is voltak ahol a sejtmagban nagyon gyengén volt detektálható ez a transzkripciós faktor. Megjegyzendő, hogy sok esetben ezek a különböző mértékű SOX9-sejtmagszignált mutató sejtek csoportosulást mutatnak (8.B ábra, 9.D ábra).

Ugyanezen festés során a Lumican markernél nem találtam egyértelműen kimutatható heterogenitást, a festés a minden sejt körül kimutatható volt (8.C ábra).

Megfestettem a PDK1 (piruvát-dehidrogenáz-kináz 1) enzimet, aminek szintén fontos szerepe lehet a tumorképződésben és a KRAS útvonal aktivitásában (Eser *et al.*, 2013). A PDK1 festés is mutatott organoidon belüli heterogenitást a tumorsejtek között (9.B ábra).



8.ábra PDAC organoidok immunfluoreszcens festése: **A)** kontroll (csak másodlagos antitest és DAPI), **B)** anti-SOX9-Alexa488 és DAPI **C)** anti-lumican-488 és DAPI. Méretarány: 25 μ m



9.ábra PDAC organoidok immunfluorszcens festése: **A)** és **C)** kontrollok (csak másodlagos antitest és DAPI), **B)** anti-PDK1-Alexa 568 és DAPI **C)** anti-SOX9-Alexa568 és DAPI. Méretarány: 25 μ m

DISZKUSSZIÓ

A CD142 fehérjét eredetileg egy koagulációs faktorként írták le (Morrissey, 2004). E fehérje jelenléte érdekes módon nagyban befolyásolja bizonyos tumorok, elsősorban a hasnyálmirigy daganatok fejlődését, túlélését. Ez a sejtfelszíni glikoprotein jelen van a hasnyálmirigy embrionális fejlődése során, mely embernél az embrió 4. hetében veszi kezdetét és a hasnyálmirigy kezdemény (angolul: „bud”) számos multipotens progenitor sejtet tartalmaz, melyek többek közt a SOX9 transzkripció faktor fehérjét expresszálják (Seymour *et al.*, 2007). Az embrionális fejlődés során a progenitor sejtek CD142 fehérjét is expresszálnak, ezen fehérje a pancreas exokrin fejlődése szempontjából szolgál egy progenitor státuszt jelölő sejtfelszíni markerként (Ramond *et al.*, 2017 és 2018). Míg CRC tumorban nagymértékben fibroblasztokban expresszálódik a CD142, még hozzá heterogén módon külön fibroblaszt alpopulációkat jelölve, melyekhez funkció is kapcsolt (Soós *et al.*, 2023), PDAC-ben online adatbázis alapján azt találtam, hogy ebben a tumortípusban, szemben a CRC-vel, erősen jelen van a CD142 a tumorsejtekben és expressziós szintje sejtes heterogenitást mutat (www.proteinatlas.org).

A PDAC organoidok megtartják a tumorokra jellemző sejtes heterogenitást, emellett kitűnő modellrendszerek amiatt is, hogy *in vitro* kontrollált körülmények közt növeszthetők. Ezt kihasználva megvizsgáltam, hogy ha a PDAC tumorra jellemző erős kollagén feldúsulást modellezzük, vagyis kollagén I cseppbe helyezzük az organoidokat, találunk-e expressziós különbségeket a CD142-re nézve ahhoz képest ha BME cseppben növesztjük. Eredményeim alapján elmondható, hogy ez a mikrokörnyezet változás nem befolyásolta a CD142 expressziót PDAC organoidokban: mind kollagén- mind BME – cseppben tenyésztve magasan expresszálják a CD142 fehérjét. A PDAC organoidok heterogén módon expresszálják a CD142-t és anti-CD142 ellenanyaggal jól elkülöníthetőnek bizonyultak a CD142-t magasan és alacsonyan expresszáló sejtpopulációk.

Több különböző gén expressziós szintjét is megnéztük, annak reményében, hogy ezen fehérjék expressziós szintje valamilyen módon összefüggésbe hozható a CD142 expressziójának mértékével és rávilágíthatunk a CD142_{magas} sejtpopuláció karakterisztikájára.

Eredményeim alapján azt találtam, hogy a PDAC organoidok megtartják az epitheliális jellegüket és ez jellemző mind a CD142_{magas}, mind a CD142_{alacsony} sejtekre is. Mindkét sejtpopuláció megtartotta az E-kadherin (CDH1) expresszióját, azonban érdekes módon egy olyan tendencia mutatkozott, hogy a CD142-t magasan expresszáló sejtek veszítenek

epitheliális jellegükből: közel azonos vagy egyes organoidoknál alacsonyabb E-kadherin (CDH1) és p120 (CTNND1) szintet mutattak. Utóbbi fehérje az E-kadherin membránban lévő stabilizációját segíti elő (Lo *et al*, 2018). a

Érdekes módon azt találtam, hogy a CD142_{magas} sejtek a tumorsejtek által amúgy is nagyon alacsonyan expresszált N-kadherint (CDH2) még alacsonyabb szinten expresszálták. Kadherin switch (=kapcsolás, klasszikus EMT) nem volt detektálható a PDAC organoidokban, de eredményeim alapján ezt a potenciált a CD142-t magasan expresszáló sejtek még inkább elveszítették. Emelett inváziós potenciáljuk megmaradt a CD142_{magas} sejteknek, amit tükröz a magas ezrin és MMP14 expressziójuk.

A SOX9 transzkripciós faktor, mely túlműködését már korábban is összefüggésbe hozták a tumorképződéssel (Kopantzev *et al*, 2022; Jo *et al.*, 2014), magasabb expressziót mutatott azokban a mintáinkban, melyekben a CD142 expressziós szintje is jóval magasabb volt. Mind a SOX9, mind a CD142 hasnyálmirigy progenitor státuszt jelölő markerként van nyilvántartva, így ezen fehérjék együttes expressziója egy dedifferenciáltabb állapotra utalhat a PDAC tumorsejtek közt a CD142_{magas} sejtpopuláció esetében. Ezzel korrelál az a megfigyelés, hogy a CD142_{magas} sejtpopuláció több organoidban alacsonyabb szinten expresszált mind epitheliális markereket, mind a lumican mezenchimális markert. Immunfestés segítségével a heterogén CD142 expresszió mellett azt találtam, hogy mind a SOX9, mind a PDK1 jelenléte heterogenitást mutat a PDAC organoidot felépítő tumorsejtek közt. A PDK1 fehérjéről egy korábbi kutatás kimutatta, hogy kulcs szerepe lehet a KRAS útvonal aktiválásában számos tumorban, többek között PDAC-ban is (Eser *et al.*, 2013). Lumican esetében nem láttam ezt a heterogenitást, de mivel ez egy szekretált glikoprotein, eloszlása a mintában nem feltétlenül tükrözi a sejtek közti expressziós különbségeket. Ez lehet a magyarázata annak a látszólagos ellentmondásnak, hogy a qPCR eredmények CD142_{magas} sejtekben alacsonyabb Lumican expressziót mutattak.

A qPCR eredményeim alapján a CD142 antitesttel szortolt sejtpopulációk nem különíthetők külön tumorsejttípus csoportba, azonban csoportbesorolástól függetlenül mindegyik marker esetében az a tendencia mutatkozott, hogy a CD142_{magas} sejtek alacsonyabb szinten expresszálják ezeket a vizsgált géneket. Ezen eredmény szintén korrelál a dedifferenciáltabb státuszra mutató eredményekkel

Összeségében az mondható el, hogy a tumorok heterogenitásának vizsgálatára az organoid rendszer egy kitűnő modell, elsősorban azért is, mert nagyon jól megtartja és tükrözi az *in vivo* állapotra hasonló sejtes heterogenitást. Ez a heterogenitás mutatkozik CD142 expresszió esetében is. A SOX9 magasabb expressziója CD142-t magasan expresszáló

sejtekben és az a tendencia hogy ezen sejtekben az epitheliális jelleg gyengül, arra utal, hogy PDAC organoidokban a CD142 pozitív sejtek szortolásával egy dediferenciáltabb állapotú sejtpopulációt sikerült elkülönítenem.

Továbbiakban a kolokalizációs vizsgálatok fognak fényt deríteni arra, hogy a SOX9 és PDK1 fehérjék heterogén expressziós mintázata átfed-e a CD142 heterogenitás-mintázattal PDAC organoidokban. Emellett a CDH1 és EpCAM immunfestését is tervezem. A progenitor és egy esetleges erősen proliferáló jelleg további vizsgálatára KI67 festést tervezek. Reményeim szerint a jövőben még több hasonló összefüggést tárhatunk fel és közelebb kerülhetünk a hasnyálmirigy daganat és annak heterogenitásának pontosabb megismeréséhez és hatékonyabb gyógyításához.

SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

- A humán embrionális vese őssejteket (HEK, stabilan transzfektált 293T sejtek; teljes név: Cultrex HA-R-Spondin1-Fc 293T, R and D Systems 3710-001-10; Kuo, C.J. U.S. Patent 9,464,275.) fenntartottam megfelelő konfluencia elérése esetén organoid alaplátmédiumba helyeztem, és az általuk termelt R-spondint használtam a PDAC organoidok fenntartásához
- A páciensekből származó organoidokat BME cseppekben tenyésztettem (négy vonalat én tartottam fenn), a mintákkal folytatott munkát steril körülmények között végeztem.
- A tenyésztett organoidokat áramlási citometriához megfestettem, a QIAzol-ba szortolt, a mintákból RNS-t izoláltam amit cDNA-re ártírtam. A qPCR lemezeket megterveztem és összemértem a megfelelő reakcióelegyeket, majd az eredményeket kiértékeltem.
- Az organoid minták egy részét Falcon-kamrában tenyésztettem immuncitokémiai eljárás céljából, ezeket különböző marker fehérjékre specifikusan megfestettem, majd konfokális lézer szkennelés mikroszkópban megvizsgáltuk.

„Ezúton nyilatkozom, hogy TDK konferencián korábban nem értem el helyezést. Ha a jelen BTDK Konferencia előtt másik TDK konferencián helyezést érek el, arról a BTDK szervezőit még a konferencia előtt értesítem, a nyertes pályamunkát eljuttatom hozzájuk.”

Szász Regina

IRODALOMJEGYZÉK

Tudományos folyóiratok

Al-Jazrawe, M. *et al.* **CD142 Identifies Neoplastic Desmoid Tumor Cells, Uncovering Interactions Between Neoplastic and Stromal Cells That Drive Proliferation.** Cancer Research Communications 3, 697–708 (2023).

Boj, S. F. *et al.* **Organoid Models of Human and Mouse Ductal Pancreatic Cancer.** Cell 160, 324–338 (2015).

Bose, S. *et al.*, **A path to translation: How 3D patient tumor avatars enable next generation precision oncology.** Cancer Cell 40, 1448–1453 (2022).

Drost, J. & Clevers, H. **Organoids in cancer research.** Nat Rev Cancer 18, 407–418 (2018).

Eser, S. *et al.* **Selective Requirement of PI3K/PDK1 Signaling for Kras Oncogene-Driven Pancreatic Cell Plasticity and Cancer.** Cancer Cell 23, 406–420 (2013).

Gao, Q. *et al.* **CD142 plays an important role in the mobility of colorectal cancer cells.** Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 84, 1856–1860 (2020).

Jo, A. *et al.* **The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases.** Genes & Diseases 1, 149–161 (2014).

Kopantzev, E. *et al.* **SOX9 Protein in Pancreatic Cancer Regulates Multiple Cellular Networks in a Cell-Specific Manner.** Biomedicines 10, 1466 (2022).

Li, X. *et al.* **Extracellular Lumican Inhibits Pancreatic Cancer Cell Growth and Is Associated with Prolonged Survival after Surgery.** Clinical Cancer Research 20, 6529–6540 (2014).

Lo, H. C. & Zhang, X. H.-F. **EMT in Metastasis: Finding the Right Balance.** Developmental Cell 45, 663–665 (2018).

Low, R. R. J. *et al.* **The Diverse Applications of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Organoids.** Cancers 13, 4979 (2021).

Morrissey James H. **Tissue factor: a key molecule in hemostatic and nonhemostatic systems** Int J Hematol ;79(2):103-8 (2004).

Raghavan, S. *et al.* **Microenvironment drives cell state, plasticity, and drug response in pancreatic cancer.** *Cell* 184, 6119-6137.e26 (2021).

Ramond, C. *et al.* **Reconstructing human pancreatic differentiation by mapping specific cell populations during development.** *eLife* 6, e27564 (2017).

Ramond, C. *et al.* **Understanding human fetal pancreas development using subpopulation sorting, RNA sequencing and single-cell profiling** *Development* 145 (16): dev165480 (2018).

Seymour, P. A. *et al.* **SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 1865–1870 (2007).

Siegel, R. L. *et al.* **Cancer statistics, 2022.** *CA A Cancer J Clinicians* 72, 7–33 (2022).

Soós, A. Á. *et al.* **High CD142 Level Marks Tumor-Promoting Fibroblasts with Targeting Potential in Colorectal Cancer.** *International Journal of Molecular Sciences* 24, 11585 (2023).

Sun, L. *et al.* **Epigenetic Regulation of SOX9 by the NF- κ B Signaling Pathway in Pancreatic Cancer Stem Cells.** *Stem Cells* 31, 1454–1466 (2013).

Honlap

www.proteinatlas.org

KÖSZÖNETNYILVÁNYÍTÁS

Szeretném megköszönni Dr. Zeöld Anikó és Dr. Wiener Zoltán témavezetőimnek, Dr. Soós Andrásnak és Idan Carmi Phd hallgatónak a rengeteg segítséget és tanácsot, valamint azt is, hogy kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk. Emellett szeretném megköszönni a tanszék munkatársainak, hogy hozzájuk is bármikor fordulhattam és nagyon hálás vagyok, hogy egy ilyen jó hangulatú és barátságos közegben dolgozhattam. Valamint szeretném megköszönni belső konzulensemnek, Dr. Kovács Tibornak is a segítségét. Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak és páromnak a rengeteg segítséget és támogatást.