

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai kar, Élettani, Szervezettani és
Idegtudományi Tanszék

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Belgyógyászati Klinika



Tudományos Diákköri Konferencia Dolgozat

2024 tavasz

**A KALCIUM KIÁRAMLÁS ZAVARÁNAK
VIZSGÁLATA PANKREÁSZ DUKTÁLIS
ADENOKARCINÓMA (PDAC) SEJTEKBEN**

Horváth Zsófia

molekuláris biológia MSc II. évfolyam

Témavezetők: Dr. Madácsy Tamara, Dr. Maléth József

Belső konzulens: Sótiné Dr. Bagyánszki Mária

Szeged, 2024

Tartalom

I.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
II.	BEVEZETÉS	5
I/1.	A HASNYÁLMIRIGY NORMÁL FIZIOLÓGIÁJA, FELÉPÍTÉSE	5
I/2.	A HASNYÁLMIRIGY TUMOROS FOLYAMATAI	6
I/2/a.:	A Ca^{2+} SZIGNALIZÁCIÓ ÉS A PMCA SZEREPE A PDAC SEJTEKBEN	9
III.	CÉLKITŰZÉSEK	12
IV.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	13
III/1.	CAPAN-1 SEJTVONAL	13
III/2.	HUMÁN ORGANOID KULTÚRÁK	14
III/3.	2-DIMENZIÓS HUMÁN EPITÉL SEJTKULTÚRÁK LÉTREHOZÁSA:	15
III/4.	INTRACELLULÁRIS KALCIUM MÉRÉS:	16
III/5.	INTRACELLULÁRIS KLORID KONCENTRÁCIÓ MÉRÉS:	17
III/6.	IMMUNOFLUORESZCENS FESTÉS	18
III/7.	TRIKAFTA KEZELÉS:	19
III/8.	STATISZTIKAI ANALÍZIS	20
III/9.	ETIKAI ENGEDÉLY	20
V.	EREDMÉNYEK	21
IV/1.	AZ ADATBÁZIS ANALÍZISEK EREDMÉNYEI	21
IV/2.	A CAPAN-1 SEJTEK KIFEJEZIK A PMCA4-ET ÉS A CFTR-T	22
IV/3.	A HUMÁN 3D ORGANOIDOKBÓL SZÁRMAZÓ 2D SEJTKULTÚRÁK MEGTARTJÁK AZ EPITÉL FENOTÍPUSUKAT	23
IV/4.	A CFTR FUNKCIÓJA CSÖKKEN CAPAN-1 SEJTEKBEN	25
IV/6.	A CAPAN-1 SEJTEK Ca^{2+} KIÁRAMLÁSA SZIGNIFIKÁNSAN ALACSONYABB A 2D HPO-KHOZ VISZONYÍTVA	27
VI/8.	A CFTR ÉS A PMCA4 LOKALIZÁCIÓJA NEM VÁLTOZIK SZIGNIFIKÁNS MÉRTÉKBEN TRIKAFTA HATÁSÁRA CAPAN-1 SEJTEKEN	29
VI.	DISZKUSSZIÓ	31
VII.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	33
VIII.	TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	34
IX.	IRODALOMJEGYZÉK	35

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3D-hPO	3 dimenziós humán pankreász organoid
2D-hPO	2 dimenziós humán pankreász organoid
α-SMA	α -simaizom aktin
ADM	acinoduktális metaplázia
ARP	akut rekurrens pankreatitisz
ATP	adenozil-trifoszfát
BSA	borjú szérum albumin
CDKN2A/p16	ciklin dependens kináz inhibitor 2A
CFINH	cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor inhibitor
CFTR	cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor
CO₂	szén-dioxid
CP	krónikus pankreatitisz
CTRC	kimotripszin C
ER	endoplazmatikus retikulum
FDA	Food and Drug Administration (Amerikai étel és gyógyszer ügynökség)
Fura-2-AM	Fura-2- acetoximetil-észter
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IP3R	inozitol-trifoszfát receptor
IPMN	intraduktális papilláris mucinózus neoplázia
KM2	pirucvát kináz-M2
KO	knock out
KRAS	Kirsten patkány szarkóma vírus
MCU	mitokondriális kalcium uniporter
MQAE	6-metoxi-N-(3-sulfopropil)kinolínium
NCX	nátrium-kalcium cserélő
NF- κB	nukleáris faktor kappa könnyű lánc enhanszer aktivált B sejt
PanIn	pankreász intraepiteliális neoplázia
PC	pankreász rák
PDAC	pankreász duktális adenokarcinóma sejt
PM	plazmamembrán

PMCA	plazmamembrán Ca^{2+} pumpa
PRSS1	proteáz szerin 1
RCF	percenkénti fordulatszám
RT	szobahőmérséklet
SERCA	szarko-endoplazmatikus retikulum kalcium ATPáz
siRNS	kis interferáló ribonuklein sav
SMAD4	SMAD család protein 4
SMDT1	egyszeri átjárású, aszpartátban gazdag farkú membránfehérje 1
SOCE	kalcium raktározás irányította kalcium áramlás
SOX9	SRY-box transzkripció faktor 9
SPINK1	Kazal típusú szerin proteáz inhibitor 1
TBS	Tris puffertolt sóoldat
TNF	tumor nekrosis faktor
TP53	tumor protein 53

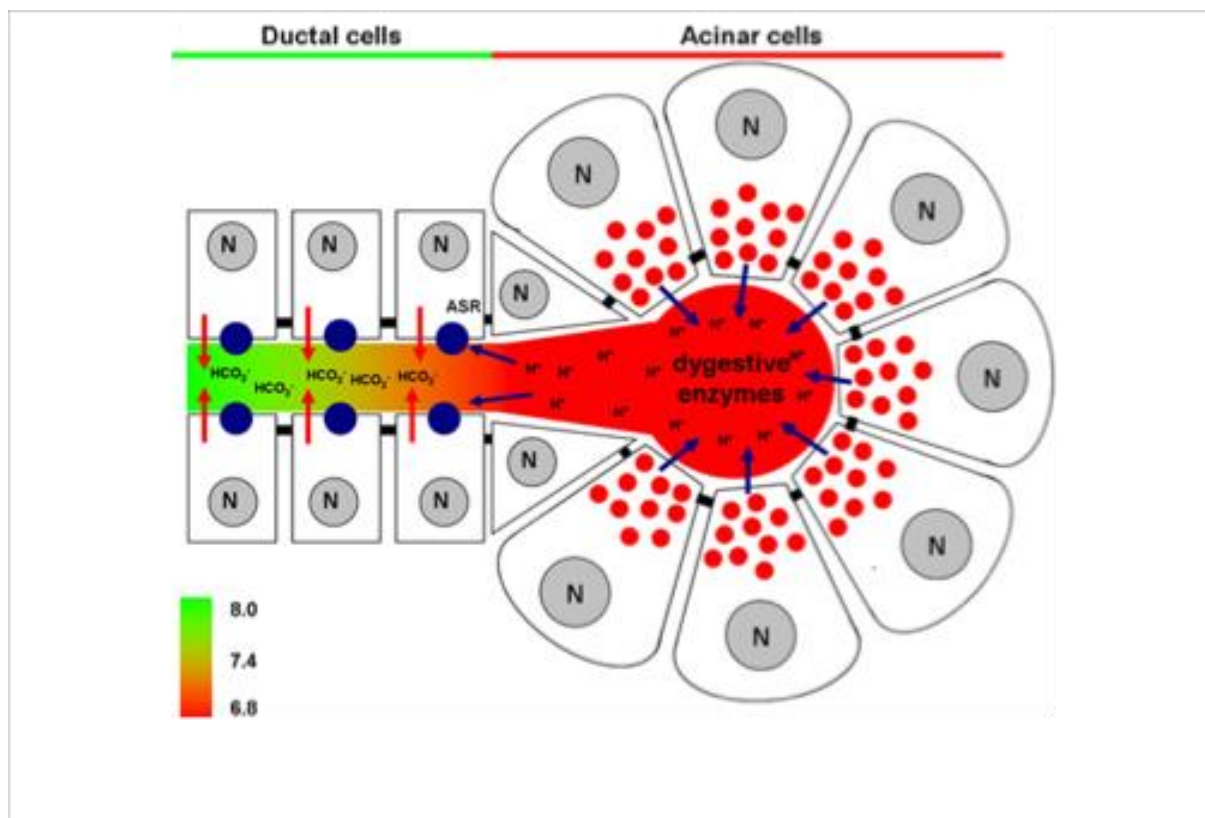
II. BEVEZETÉS

I/1. A HASNYÁLMIRIGY NORMÁL FIZIOLÓGIÁJA, FELÉPÍTÉSE

A hasnyálmirigy a gasztrointesztinális rendszer egyik kulcsfontosságú szerve. Legfőbb feladatai közé tartozik, hogy emésztőenzimeket szekretáljon a duodénumba, illetve endokrin szerv lévén, hormonokat bocsásson a véráramba. A megfelelő mennyiségű és minőségű szekrécióval hozzájárul az egészséges anyagcseréhez és energia fenntartáshoz. A mirigy egyaránt lát el exokrin és endokrin szekréciós funkciókat is. Az endokrin pankreász sejtjei a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben találhatóak, a teljes szerv pusztán 1-2%-át teszi ki. Olyan hormonokat termelnek, melyek a szervezet normál működésű anyagcseréjéhez elengedhetetlenek, például inzulin, glukagon, illetve szomatosztatin.¹

Ezzel ellentétben, az exokrin pankreász, egy jelentős hányadát, több mint 95%-át öleli fel a hasnyálmirigynek.¹ Az itt található acinus és dukális sejtek szorosan együttműködnek, így hozzájárulnak a hasnyálmirigy nedv kiválasztásához.² Az acinus sejtek főként emésztőenzimeket termelnek, mint például a zsírokat bontó lipáz, a szénhidrátokat bontó amiláz, illetve számos fehérjét emésztőenzimet, többek között tripszint és kimotripszint. Utóbbi kettő inaktív formában, megelőzve ezzel a szerv önemésztő folyamatait,^{3,4} azonban később a nyombélben enterokinázok hatására aktiválódik. Az acinus sejtekben korábban inhibitorral gátolt tripszin a nyombélben az enterokinázok hatására aktiválódik, aminek következtében további emésztőenzimek is működésbe lépnek.⁴

A dukális sejtek a bikarbonátban gazdag hasnyálmirigy nedvet szekretálják, ami segíti az emésztőenzimek kijutását a duodénumba.⁵ A hasnyálmirigy csatornáinaponta 2,5 l lúgot, bikarbonátban gazdag folyadékot választanak ki, amely nagyban hozzájárul a hasnyálmirigy homeosztázisához. Az ilyen kulcsfontosságú folyamatok funkcionális megváltozása patofiziológiás problémákhoz vezethet, mint például az akut pankreatitisz vagy cisztás fibrózis.⁶



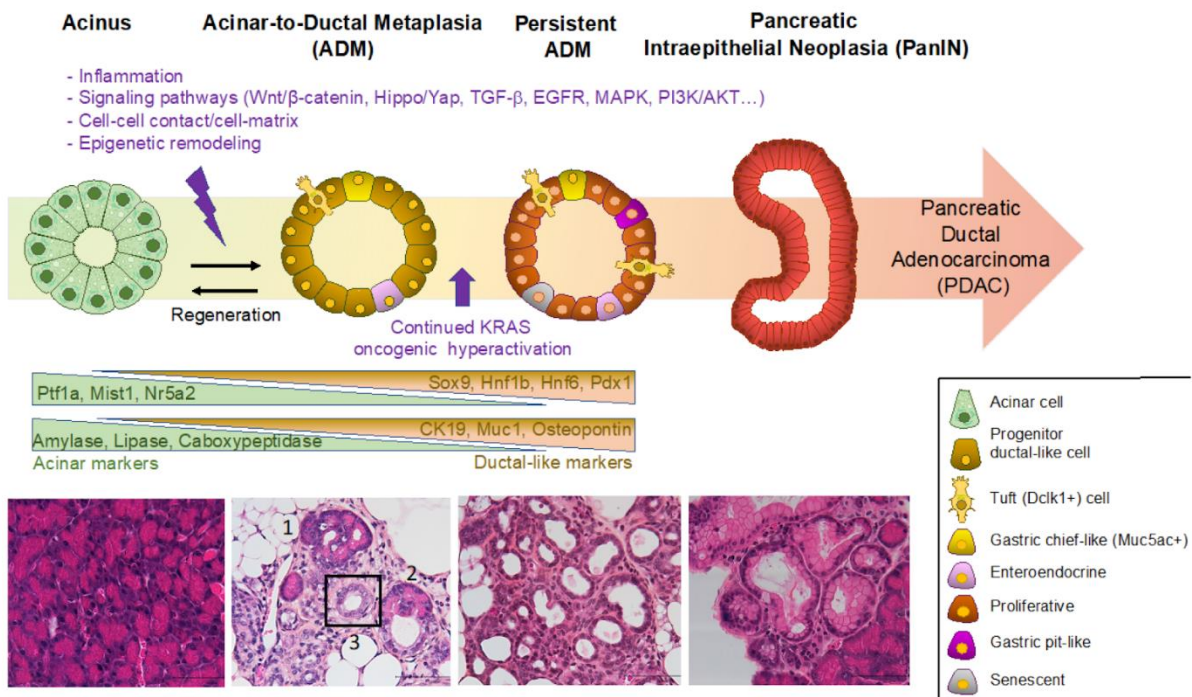
1. ábra Hegyi és mstai 2011- A lumenális pH változása az exokrin hasnyálmirigyben a szekréció során. Fiziológiai körülmények között az acinus sejtek emésztőenzimeket és protonokat választanak ki, amelyek közül az utóbbiak savasítják az acinusok közötti teret. Ezzel szemben a duktális sejtek bikarbonátot szekretálnak, ami megemeli az intraluminális pH-t, amely késlelteti az emésztőenzimek aktivációját.⁷

I/2. A HASNYÁLMIRIGY TUMOROS FOLYAMATAI

A pankréász működési zavarai számos, súlyos betegséghez vezethetnek, azonban ezek közül a hasnyálmirigyrák (pancreatic cancer - PC) prognózisa messze a legrosszabb⁸⁻¹⁰. Túlélési aránya 11% alatt van¹¹, és előrejelzések szerint a rákos megbetegedések okozta halálozások második vezető okává fog válni 2030-ra.¹² A PDAC egy agresszív lefolyású betegség, amelyet rossz klinikai prognózis, kevés és hiányos terápiás lehetőségek továbbá a korai felismerési módszerek hiánya jellemez. Tovább, a PDAC fenotipikus és a genetikus heterogenikus jellemzői tovább nehezítik az általános és effektív terápiák kialakításának lehetőségét. Tumoros elváltozásai túlnyomó részt, csaknem 90%-a¹³ az exokrin hasnyálmirigy duktális epitél sejtjeiből erednek, így a pankréász duktális adenokarcinóma (PDAC) szövettani altípusba sorolható.¹⁴ Rizikó faktorai közül a legmeghatározóbb a kor.¹⁵ A legtöbb beteget 50

éves kor felett diagnosztizálják, de számos elkerülhető környezeti faktor is áll a kialakulása mögött, mint például a dohányzás, amely kétszer, háromszor magasabb kialakulási esélyt eredményez a nem dohányzókhoz képest. A 2-es típusú diabétesz mellitusz és a krónikus pankreatitisz amelyek az esetek több mint harmadaért tehetők felelőssé.¹⁵ Az elhízás és az alacsony fizikai aktivitási szintén összefüggésbe hozhatók a kialakulásával.¹⁶ Erőteljes a korreláció a nagy mennyiségű alkoholfogyasztás és a hasnyálmirigy tumor kialakulás esélye között, míg a kis mennyiségű alkohol fogyasztása nem mutatott ezzel összefüggést.¹⁷ Megjegyzendő, hogy a nagy mennyiségű alkoholfogyasztás és a krónikus pankreatitisz kialakulása között is erős összefüggés figyelhető meg amely majdnem tízszeresére emeli a pankreász tumor kialakulásának esélyét.¹⁸

A PDAC egy rendkívül agresszív betegség, amelynek túlélési aránya az összes rákos megbetegedés közül a legalacsonyabb.¹⁹ Korai stádiumában gyakran tünetmentes, amely előrehaladott stádiumú diagnózist eredményez.²⁰ Ezen felül, kezelése önmagában is kihívást jelent, mivel gyakran rezisztens a standard terápiákra, ami rossz prognózishoz vezet.²¹ A PDAC-ban általánosan fordulnak elő olyan aktiváló mutációk, például a KRAS onkogénben, amelyek elősegítik a tumoros folyamatok iniciációját és fenntartását.^{22,23} Az olyan tumorszupresszor gének inaktivációja mint a CDKN2A/p16, TP53 és a SMAD4 a KRAS mutációval együtt agresszív PDAC tumor növekedést eredményeznek.²⁴⁻²⁷ A PDAC megjelenését előrevetítik az intraepiteliális neopláziák (PanIN) és az intraduktális papilláris mucinózus neopláziák (IPMN) kialakulása, amelyek prekarcióma jellegűek és hajlamosak PDAC-á alakulni.²⁸⁻³¹ Az olyan genetikai elváltozások, mint például a „driver mutációk” megjelenése, mint a KRAS vagy a TP53 gének, hatására a pankreász exokrin komponensei elvesztik funkciójukat és átalakulnak. Ez visszafordíthatatlan hatással van ez exokrin pankreász fiziológiájára, így az emésztőenzimek szekréciójára, tárolására és a felszabadulására is. A PDAC kialakulás kezdeti lépésének tekintik az acinoduktális metapláziának (ADM) nevezett folyamatot.³² **(2.ábra)** A hasnyálmirigy exokrin eredetű acináris sejtjei nagyfokú plaszticitásukról ismertek, mely az szerv homeosztázisa szempontjából meghatározó.³³ Ezen acináris sejtek, bizonyos hátrányos környezeti ingerek hatására - például szöveti károsodások, oxidatív stressz vagy gyulladásos útvonalak aktiválása- képesek transzdifferentiációval olyan jellegeket felvenni, melyek az epiteliális eredetű duktális sejtekre jellemzőek^{34,35} Az elváltozás során az acináris sejtek úgy alakulnak át, hogy progenitor sejt szerű tulajdonságokat szereznek, ami fokozza a sejtek fogékonyságát a pro-onkogén mutációkra.^{32,36}



2. ábra. Marstrand-Daucé és mtsai 2023.- Az acináris-ductalis metaplázia (ADM) kialakulásának és a hasnyálmirigy intraepiteliális neopláziává (PanIN) való progressziójának modellje. A képen az ADM kialakulása, az ADM kiváltó jelei, valamint az expressziós markerek változásai láthatók. Az ADM egy reverzibilis folyamat, amely lehetővé teszi a hasnyálmirigy acinus szövetének regenerálódását. Ha azonban tartósan fennáll az onkogén Kras-aktiváció, az ADM tartósan fennmaradhat, és az acinussejtek átprogramozása PanIN kialakulásához és PDAC progresszióhoz vezethet. Az acináris sejtek jelentős plaszticitást és heterogenitást mutatnak a metaplázia során. Hematoxilin/Eozin festéssel a megfelelő szövettani stádiumok láthatóak egérszövetben, beleértve a normális acinus sejteket, az ADM-et és a PanIN-t. Továbbá láthatók az ADM során bekövetkező változások, így az acinusok lumenének megnagyobbodása (1), egy köztes szerkezet kialakulása (2) és az ADM duktális-szerű szerkezete (3). Méretarány: 100 μ m.³⁷

I/2/a.: A Ca^{2+} SZIGNALIZÁCIÓ ÉS A PMCA SZEREPE A PDAC SEJTEKBEN

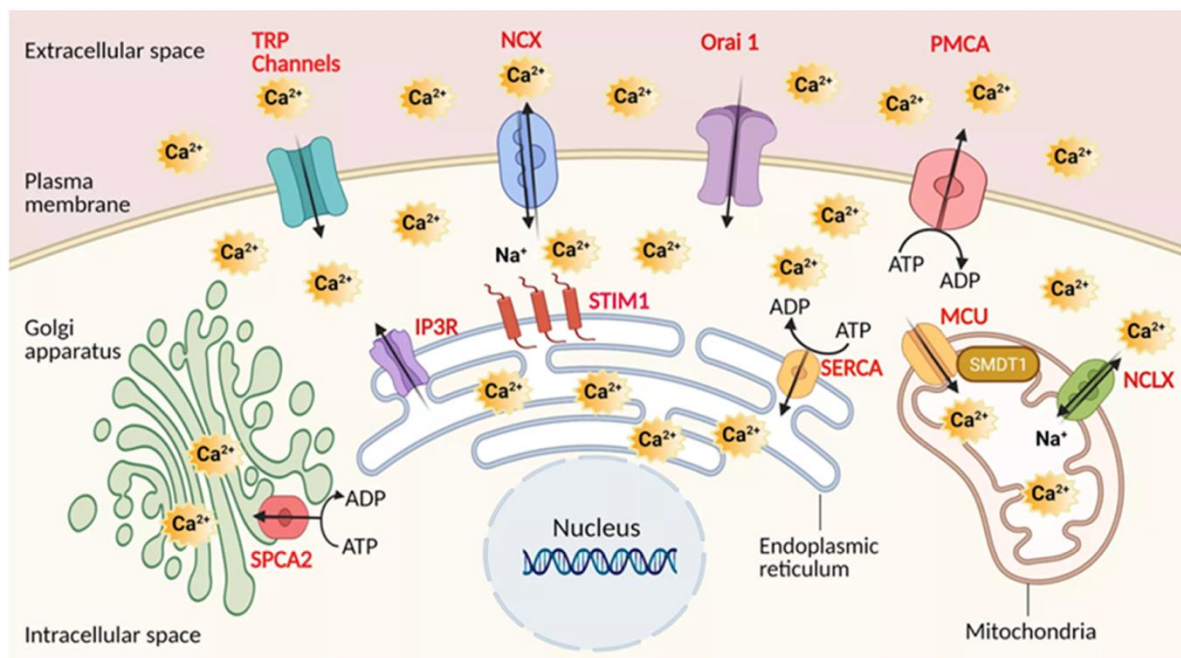
Az intracelluláris Ca^{2+} jelátvitel kulcsfontosságú szerepet játszik az exokrin hasnyálmirigy működésében.^{5,38} Legfontosabb feladatai közé tartozik az emésztőenzimek felszabadulásának szabályozása az acinus sejtekből, vagy bizonyos transzporterek és csatornák aktivitásának regulálása, amellyel így közvetett hatása van a duktális epitel sejtek bikarbonát és folyadék szekréciójára. A fiziológias receptor stimulálás során a sejtekben lévő kalcium felszabadul az endoplazmás retikulumból, amely a nem-excitábilis sejtekben az egyik legnagyobb Ca^{2+} raktár.³⁹ Ezt a felszabaduló Ca^{2+} mennyiséget az öv-szerűen elhelyezkedő a mitokondriumok puffereklik, de jellemző a gyors Ca^{2+} felvétel a Szarko-Endoplazmatikus Retikulum Kalcium ATPáz-ra (SERCA) továbbá a sejtől a plazmamembrán Ca^{2+} pumpán távolítja el a felesleget.⁴⁰ Ezen transzporterek működése ATP dependens folyamat. A PMCA pumpa fiziológias működéséhez elengedhetetlenül szükséges továbbá a CFTR-csatorna membrán jelenléte, amelyhez a pumpa közvetlen kalmodulin kapcsolatot létesít.⁴¹ Egy esetlegesen elhúzódó agonista stimuláció teljesen ki tudja üríteni a sejtek Ca^{2+} raktárait, ezért a sejtnak szüksége van egyéb mechanizmusra is, amely egyensúlyban tartja a háztartást.⁴² Ez a forrás általában a külső Ca^{2+} , amely a plazma membránon keresztül, áramlik be a sejtbe raktár függő módon. A Store Operated Ca^{2+} Entry-t (SOCE) két protein mediálja, az ER transzmembrán Ca^{2+} szenzor molekula, a STIM1 és a PM Ca^{2+} csatorna Orai1.⁴³ A csökkenő Ca^{2+} koncentráció az ER-ban a Stim1 transzlokációját idézi elő az ER-PM kontakt felületekre, ahol aktiválja az Orai1-csatornát. Ez egy fiziológias folyamat, amely, ha a folyamat sérül, toxikus Ca^{2+} szintet idézhet elő. Hasnyálmirigy megbetegedései során a kalcium jelátvitel zavart szenved, ami a sejtekbe történő túlzott kalcium beáramlást eredményez.⁴¹ A tartósan magas intracelluláris kalcium szint károsíthatja a mitokondriumokat és a végül sejt halálhoz vezet. Az acinus sejtekben idő előtt aktiválja a tripszinogént,^{44,45} a duktális sejtekben pedig csökkenti a bikarbonát elválasztást.⁴⁶ Ezek a változások a hasnyálmirigyben gyulladásos folyamatokat indítanak el amelyek hosszútávon hozzájárulhatnak az akut és a krónikus pankreatítisz kialakulásához.

A Ca^{2+} szignalizáció szerepe számos patológias folyamatban jól körülírt, így például a tumoros folyamatokban betöltött szerepe is jól ismert, ahol a tumor mikro környezetében betöltött egyensúlyi és kommunikációs szerepe elősegíti a tumor sejtek túlélését, proliferációját

és migrációját.⁴⁷ Ezért a tumoros folyamatokkal összefüggő Ca^{2+} szignalizáció vizsgálata elengedhetetlenül fontos az új terápiák és specifikus tumormarkerek kialakításához. A PDAC kialakulását alapvetően meghatározza a hasnyálmirigy sajátos élettana és mikrokörnyezete és az abban zajló folyamatok összessége. Minden sejt fiziológiás szabályozásának esetében elemi fontosságú a Ca^{2+} jelátvitel térben és időben történő megfelelő működése.⁴⁸ **(3. ábra.)** Amennyiben a hasnyálmirigy mikrokörnyezetben mutációk alakulnak ki, esetleg olyan abnormális fehérjék fejeződnek ki, melyek a sejt Ca^{2+} szintjének zavarát okozzák, befolyásolhatnak olyan főbb jelátviteli útvonalakat, melyek a Ca^{2+} függő módon működnek, ezáltal elősegítve a rákos patofiziológiás jellegek kialakulását.⁴⁹ Egyik legmeghatározóbb diszreguláció a Ca^{2+} szignalizációban a Ca^{2+} túlterhelés vagy overload, mely az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ irreverzibilisen növekedésével jár és összefüggésbe hozható az apoptotikus illetve nekrotikus sejt halállal.^{50,51}

A PDAC sejtekben kialakult ellenálló képesség a Ca^{2+} túlterhelés okozta sejt halállal szemben összefüggésbe hozható a plazma membrán Ca^{2+} ATPázok (PMCA) túlzott expressziójával.^{52–54} A PMCA-k a Ca^{2+} sejtekből történő kiáramlásáért felelős pumpák,¹⁹ melyek közül a PMCA4 izoforma jelentősebb szerepet tölt be olyan jelátviteli útvonalakban, mint a proliferatív jelátvitel,⁵⁵ az NF- κ B nukleáris transzlokáció,⁵⁶ a TNF-indukált sejthalál⁵⁷ és a migráció,⁵⁸ melyek közül sok fontos a rákos jellegek fenntartása érdekében.⁵⁹ James és munkatársai kimutatták, hogy PDAC sejteken a glikolízis gátlása ATP depláción keresztül a PMCA gátlásához és irreverzibilis Ca^{2+} túlterheléshez vezet. További szerzők rámutattak, hogy PDAC sejtekben a KM2, amely ATP-vel látja el a PMCA-t, overexpresszálódik a sejtekben, hogy a PMCA megnövekedett igényét elássák.⁶⁰ Sritangos és munkatársai pedig betegadatok elemzésével megállapították, hogy a PMCA4 overexpressziója a betegekben jelentősen csökkenti a túlélés esélyét, és MIA PaCa-2 sejtekben a PMCA4 siRNS mediált kiütése csökkentette a Ca^{2+} kiáramlást, a sejt migrációt és a sejteket érzékenyítette az apoptotikus folyamatokkal szemben.¹⁹ Korábbi tanulmányunkban leírtuk, hogy a PMCA4 pumpa expressziója szignifikánsan megemelkedik CFTR KO egerekben, amíg az aktivitása jelentősen csökken.⁴¹ Stopa és munkatársai egy nemrégiben megjelent tanulmányban rávilágítottak KRAS és TP53 mutáns egerek acinusain végzett kísérletekben, hogy a PMCA4 funkció szignifikánsan alacsonyabb volt a mutációt hordozó egerekben a kontroll egerekhez képest. Stopa és mtsai nem találtak különbséget a PMCA4 expressziós szintjében, amely meglepő Sritangos tanulmányának beteg adataival szemben. A PMCA4 tumor progresszióban betöltött szerepével

kapcsolatban számos kérdés merül fel vizsgálata kiemelten fontos az új, hatékony terápiák kialakításban.⁶¹



3. ábra. Bettaieb és mtsai. 2021- Kalcium transzporterek hasnyálmirigy duktális adenokarcinómában (PDAC). A csatornák és pumpák a lokalizációjuknak megfelelően vannak ábrázolva. Plazmamembrán: Transziens receptor potenciálcsoport (TRP), nátrium-kalcium cserélő (NCX), kalcium felszabadulás által aktivált kalcium csatorna fehérje 1 (Orai1), Plazmamembrán típusú Ca^{2+} ATPáz pumpa (PMCA). Mitochondrium: mitokondriális kalcium uniporter (MCU), mitokondriális nátrium-kalcium cserélő (NCLX). Endoplazmatikus retikulum: szarko-endoplazmatikus retikulum kalcium-ATPáz pumpa (SERCA), inozitol-trifoszfát receptor (IP3R). Golgi-készülék: szekréciós útvonal kalcium-ATPáz pumpája (SPCA). Szabályozó elemek: (STIM1), Egyszeri átjárású, aszpartátban gazdag farkú membránfehérje 1 (SMDT1).⁶²

III. CÉLKITŰZÉSEK

Hipotézisünk szerint, PDAC-ban a csökkenő PMCA4 funkció és növekvő expresszió mögött a CFTR-csatorna károsodása áll. Ezért tanulmányunkban célul tűztük ki humán eredetű PDAC sejtekben:

- a CFTR-csatorna és a PMCA Ca^{2+} pumpa funkciójának vizsgálatát,
- a CFTR korrekció hatásának vizsgálatát a két csatorna működésére
- a CFTR korrekció hatásának vizsgálatát a PMCA4 expressziójára
- a korrekció hatásának vizsgálatát a sejtek metasztázis képző képességére.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III/1. CAPAN-1 SEJTVONAL

A kísérletek során Capan-1 (Cytion, Cat. No.: 300143) hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtvonalat használtunk, melyeket IMDM tápoldatban (ATCC, Cat. No.: 30-2005) 10% magzati marha szérum (FBS) (Capricorn Scientific Cat. No.: FBS-12B), 1% kanamycin (Gibco, Cat. No.: 15160047) és 1 % Antibiotic-Antimycotic oldat (Gibco, Cat. No.: 1524-062) jelenlétében növesztettünk **(1. táblázat)**. A sejteket 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú közegben tenyésztettük, a sejtkultúrákat 6-8 naponta, körülbelül 80-90% -os konfluencia elérése után passzáltuk. A 2 dimenziós kitapadt sejteket TrypLE-Express (Gibco, Cat.No.: 12605-028) négyszeres hígítású oldatával emésztettük **(2. táblázat)**, majd a rövid emésztés leállítása után, az összeszedett sejtszuspenziót 15 ml-es centrifugacsőben üleptítettük (60 RCF, 3 perc, RT). A felülúszó eltávolítását követően a sejteket további 2 alkalommal mostuk és fugáltuk a korábban említett tápoldattal. Az utolsó centrifugálás után megmaradt pelletet megfelelő mennyiségű tápfolyadékkal hígítottuk, majd előmelegített tápoldatba juttattuk át, ahol a következő passzálság növekedett.

1. táblázat

Komponens neve	Gyártó, Cat.No.
IMDM	ATCC, Cat. No.: 30-2005
Magzati marha szérum (FBS)	Capricorn Scientific, Cat. No.: FBS-12B
Kanamycin Sulfate	Gibco, Cat. No.: 15160047
Antibiotic-Antimycotic	Gibco, Cat. No.: 1524-062

Capan-1 tápfolyadék komponensei

2. táblázat

Komponens neve	Gyártó, Cat.No.
TrypLE Express	Gibco, Cat.No.: 12605-028
DPBS (1x)	Gibco, Cat. No.: 14190-094

Emésztő oldat komponensei

III/2. HUMÁN ORGANOID KULTÚRÁK

A cadaver donorokból származó hasnyálmirigy szövetet, annak megtisztítása után mechanikus aprítással majd enzimatis emésztéssel készítettük elő Tuveson és Clevers izolálási protokollja alapján. Az organoid kultúrák indításához, a korábban többszörösen előemésztett szövetmintából egysejtes állapotú szuszpenziót hoztunk létre. Az ülepítéssel összegyűjtött, kis térfogatú sejtsuszpenziót extracelluláris mátrixot imitáló gélbe (Matrigel) (Corning, Cat.No.: 354234) juttatva homogén szuszpenzió jött létre, melyet 10 µl térfogatú dómok formájában 37°C-ra előmelegített, 24 lyukú sejtenyészeti lemezre pipettáztunk. A dómokat 37°C-os inkubátorban 10 percig polimerizáltak. Az immár megkötött dómokra 1-1 ml előmelegített tápoldatot fecskendeztünk, 0,22 µm pórusátmérőjű szűrőn (Labex, Cat.No.: FBS30PES022S) keresztül. Az továbbiakban a kultúrákat 37°C-on, 5%-os CO₂-ben inkubáltuk, és minden második napon frissítettük a tápfolyadékot **(5. táblázat)**. Ezt követően, a kultúra fenntartása érdekében az organoidokat megfelelő időközönként passzáltuk. Az organoidokat tartalmazó Matrigel dómokat pipetta segítségével felszívtuk majd 15 ml-es centrifugacsőben ülepítettük (750 RPM, 10 perc, 4°C). Ezt követően a felülúszó eltávolítása után TrypLE-Express (Gibco, Cat.No.: 12605-028) 25%-os oldatával emésztve **(2. táblázat)**, 37°C-ra előmelegített síkrázó inkubátorban újra egysejtes állapotba hoztuk a szuszpenziót. Az ezt követő centrifugálás (750 RPM, 10 perc, 4°C) után a felülúszót eltávolítottuk és mosó médiummal szuszpendáltuk **(3. táblázat)**. Újabb ülepítés után ismét elvégeztük a mosási folyamatot. A felülúszó eltávolítása után megmaradt kis térfogatú pelletet, a korábban leírtaknak megfelelően Matrigelbe vittük át, dómokat hoztunk létre, majd azok dermedését követően tápfolyadékot adtunk hozzá.

3. táblázat

Komponens neve	Gyártó, Cat.No.
Splitting médium	
Magzati marha szérum (FBS)	Gibco, Cat.No.: 10500064

Mosómédium komponensei

4. táblázat

Komponens neve	Gyártó, Cat.No.
Advanced DMEM/F-12	Gibco, Cat. No.: 12634-010
1 M Hepes	Gibco, Cat. No.: 15630-080
GlutaMax Supplement	Gibco, 35050-061
Primocin	InvivoGen, Cat. No.: ant-pm-2

Splitting médium komponensei

5. táblázat

Komponens neve	Gyártó, Cat.No.
Splitting médium	-
L-WRN kondicionált médium	-
A-83	TOCRIS, Cat. No.: 2939
mEGF	Gibco, Cat. No.: PMG8041
hFGF10	Peptrotech, Cat. No.: 100-26
Gastrin I	TOCRIS, 3006
N-acetylcystein	Sigma-Aldrich, Cat. No.: A9165
Nicotinamide	Sigma-Aldrich, N0636
B-27 Supplement (50X)	Gibco, Cat. No.: 17504001
Y-27632 Rho-Kinase Inhibitor	TOCRIS, Cat. No.: 1254
Prostaglandin E2 (PGE2)	TOCRIS, Cat. No.: 2296
Antibiotic-Antimycotic Solution	Gibco, Cat. No.: 1524-062
Kanamycin Sulfate	Gibco, Cat. No.: 15160047
Voriconazole	TOCRIS, Cat. No.: 3760

Tápfolyadék összetevői

III/3. 2-DIMENZIÓS HUMÁN EPITÉL SEJTKULTÚRÁK LÉTREHOZÁSA:

Annak érdekében, hogy 2 dimenziós humán epitél sejteket (2D hPO) hozzunk létre, szükséges, hogy a 3 dimenziós humán organoidok passzálása során kialakult egysejtes állapot elérése után létrejött sejt pelletet nem extracelluláris mátrixot imitáló Matrigel dómokba helyeztük át, helyette a saját tápfolyadékkal felhígítva sejtszuszpenziót hoztunk létre. Az így kialakult híg, homogén szuszpenziót 24 mm-es üveg fedőlemezzel kibélelt, 6 lyukú sejtenyészeti lemezre pipettáztuk át, majd hagytuk kitapadni a sejteket a fedőlemezre. Ezt követően 37°C, 5% CO₂ körülmények között inkubátorban növesztettük az így létrejött 2

dimenziós sejt kultúrát. A passzálást követő 24 órában várhatóan kitapadnak a sejtek. A tápfolyadékot 2 naponta frissítettük.

III/4. INTRACELLULÁRIS KALCIUM MÉRÉS:

A méréshez 24 mm átmérőjű üveg fedőlemezre növesztett sejteket (2D hPO, Capan-1) használtunk. A méréseket megelőzően a mintákat 30 percig inkubáltuk Fura-2-AM (Fura-2-acetoximetil-észter) 10 μM koncentrációjú fluoreszcens festékkel. A sejtben Ca^{2+} jelenlétében reagálva alakul ki a Fura-2 - Ca^{2+} komplex. A Ca^{2+} -hoz kötött Fura-2 fluoreszcenciája megváltozik, amelyet fluoreszcens mikroszkóp segítségével mérünk. A változás méréséhez 340 és 380 nm hullámhosszon gerjesztjük a sejteket, a fluoreszcencia emisszióját pedig 510 nm-en regisztráljuk. A Ca^{2+} koncentráció változását az F340/F380 arány adja meg. A mérés során Olympus IX71 fluoreszcens mikroszkópot használtunk. Miután a fedőlemezeket live imaging kamrába rögzítjük, a sejteken 10 ml/ perces perfúzióval 37°C-ra felmelegített oldatokat futtatunk át.

A mérésekhez felhasznált oldatok és összetevőik:

6. táblázat

Komponens neve	Gyártó, Cat.No.
Sodium-chloride (NaCl)	Sigma Aldrich, S9888-2.5kg
Potassium-chloride (KCl)	Sigma Aldrich, P3911-500G
Na-Hepes	Sigma Aldrich, H3375-1KG
CaCl_2 1M-os törzsoldat	
MgCl_2 1M-os törzsoldat	
D-(+)-Glucose	Sigma Aldrich, G8270

Hepes oldat komponensei

7. táblázat

Komponens neve	Gyártó, Cat.No.
Sodium-chloride (NaCl)	Sigma Aldrich, S9888-2.5kg
Potassium-chloride (KCl)	Sigma Aldrich, P3911-500G
Na-Hepes	Sigma Aldrich, H3375-1KG
MgCl_2 oldat	
D-(+)-Glucose	Sigma Aldrich, G8270

EGTA (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid)	Sigma Aldrich, E4378-10G
--	--------------------------

Ca²⁺ mentes Hepes komponensei

8. táblázat

Komponens neve	Gyártó, Cat.No.
Sodium-chloride (NaCl)	Sigma Aldrich, S9888-2.5kg
Potassium-chloride (KCl)	Sigma Aldrich, P3911-500G
Na-Hepes	Sigma Aldrich, H3375-1KG
CaCl ₂ 5 M-os törzsoldat	
MgCl ₂ 1 M-os törzsoldat	
D-(+)-Glucose	Sigma Aldrich, G8270

5 mM Hepes komponensei

III/5. INTRACELLULÁRIS KLORID KONCENTRÁCIÓ MÉRÉS:

A méréshez szintén 24 mm átmérőjű fedőlemezre növesztett sejteket (2D-hPO, Capan-1) használtunk. A sejteket MQAE (6-metoxi-N-(3-sulfopropil)kinolínium) 5 µM koncentrációjú fluoreszcens festékkel 30 percig töltjük. Az MQAE az intracelluláris Cl⁻-ok hatására reagálva változtatja meg a fluoreszcenciáját. A molekulában bekövetkező változások a fluoreszcencia intenzitásának megváltozását eredményezik. A sejteket 350 nm hullámhosszon gerjesztjük, a fluoreszcencia emisszióját pedig 460 nm-en mérjük. A Cl⁻ koncentráció változását az F350/F460 arányból számítjuk ki.

A mérésekhez felhasznált oldatok és összetevőik:

9. táblázat

Komponens neve	Gyártó, Cat.No.
Sodium-chloride (NaCl)	Sigma Aldrich, S9888-2.5kg
Potassium-chloride (KCl)	Sigma Aldrich, P3911-500G
Sodium-bicarbonate (Na-HCO ₃)	Sigma-Aldrich, S6014-2.5KG
CaCl ₂ 1M-os törzsoldat	
MgCl ₂ 1M-os törzsoldat	
D-(+)-Glucose	Sigma Aldrich, G8270

HCO₃⁻ oldat komponensei

10. táblázat

Komponens neve	Gyártó, Cat.No.
Sodium-gluconate	Sigma-Aldrich, S2054
Potassium-sulfate	Sigma-Aldrich, P9458
Calcium-D-gluconate	Sigma-Aldrich, C8231-100

Cl⁻ mentes HCO₃⁻ oldat komponensei

III/6. IMMUNOFLUORESZCENS FESTÉS

A festéshez 24 mm átmérőjű fedőlemezre növesztett 2D-hPO illetve Capan-1 sejteket használtunk. A sejteket első lépésként PBS-sel (foszfát-puffer sóoldat) mosom. Ezt követően a feltáráshoz a mintákat 100%-os jéghideg (-20°C) metanolban 5 percig inkubálom -20°C-on, majd 1xTBS puffer segítségével fokozatosan mosom le a metanolt a mintákról. Következő lépésben a lemezeket nedves kamrára helyezve 10%-os BSA-TBS (**12. táblázat**) segítségével 2 órán keresztül blokkoljuk az aspecifikus kötőhelyeket 37°C-on. A blokkolás után BSA-TBS-ben 1:100 arányban oldjuk az elsődleges antitesteket. Ezt követően a mintáinkat -4°C-on egy éjszakán át inkubáljuk. Az elsődleges antitest (**13. táblázat**) kötődése után a mintákat 1x TBS-sel mossuk 3 alkalommal 5 percig. Ezután a másodlagos antitesteket (**14.táblázat**), BSA-TBS-ben, megfelelő hígításban (1:400), az előzőleg felvázolt módszerhez hasonlóan a mintákra juttatjuk. A másodlagos antitesttel 2-4 órán át, fénytől elzárt helyen, szobahőmérsékleten inkubáljuk a mintát. Utolsó lépések egyikeként, Hoechst 33342 (Thermo Fisher, Cat.No.: 62249) (2 µg/ml) sejtmagfestéket, 1:1000 arányban BSA-TBS-ben hígítva alkalmazunk a mintáinkon 15 percig. A fedés előtti utolsó lépésben a mintánkat 3 alkalommal TBS-sel mossuk. A kész mintáról lecsepegtetjük a folyadékot és egy ragasztó cseppel ellátott tárgylemezre fejjel lefelé ráfordítjuk a mintánkat. Pár perces szobahőn történő száradás után 4°C-on tároljuk a mintát. A kész festések kiértékelését Zeiss LSM 880 kofokális mikroszkóppal majd FiJi (NIH) programmal végeztük el.

11. táblázat

Komponens neve	Gyártó, Cat.No.
Tris	Sigma-Aldrich, Cat.No.: T1503
NaCl	Sigma-Aldrich, Cat.No.: 746398
KCl	Sigma-Aldrich, Cat.No.: 746436

dH ₂ O	-
-------------------	---

TBS oldat összetevői

12. táblázat

Komponens neve	Gyártó, Cat.No.
BSA (bovine serum albumine)	PanBiotech, P061391500
TBS	

BSA-TBS oldat összetevői

13. táblázat

Név	Gazdaszervezet	Klonalitás	Gyártó, Cat.No.
CFTR (CF3)	nyúl	poliklonális	Invitrogen, Cat.No.: MA1-935
PMCA4	nyúl	poliklonális	Alomone labs, Cat.No.: ACP-004
PMCA	egér	monoklonális	Abcam, Cat.No.: ab2825
SOX9	nyúl	monoklonális	Abcam, Cat.No.: ab185966
Vimentin	nyúl	monoklonális	Abcam, Cat.No.: ab92547
α -Smooth Muscle Actin	kecske	poliklonális	Novus, Cat. No.: NB300-978

A kísérleteink során felhasznált elsődleges antitestek listája

14. táblázat

Komponens neve	Gyártó, Cat.No.
Goat anti-Mouse Alexa 488	Thermo Scientific, Cat.No.: A11001
Donkey anti-Rabbit Alexa 594	Thermo Scientific, Cat.No.: 21207
Donkey anti-Goat IgG HL Alexa Fluor 488	Abcam, Cat.No.: ab150129
F(ab') ₂ -Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Ab. Alexa Fluor Plus 647	Thermo Scientific, Cat.No.: A48289

A kísérleteink során felhasznált másodlagos antitestek listája

III/7. TRIKAFTA KEZELÉS:

Mind a 2D-hPO és Capan-1 mintákon végeztünk Trikaftával történő kezelést. A Trikafta egy három komponensű terápiás szer, amely a következő molekulákból áll: Elexacaftor, Tezacaftor és Ivacaftor. A Trikafta egy a cisztás fibrózis kezelésében alkalmazott gyógyszer, amely rendelkezik mind az FDA mint az Európai Unió gyógyszer engedélyével. Hatása több szintű, az Elexacaftor és a Tezacaftor együtt, hatékonyabbá teszi a CFTR fehérje kihelyeződését

a plazmamembránba, míg az Ivacaftor a csatorna nyitását facilitálja. A sejteket passzálás után, táppal hígított sejtszuspenzióban egy 6 lyukú sejttenyészeti lemezben, 24 mm átmérőjű fedőlemezre raktuk. Az átlagosan 24 órát igénybe vevő letapadási folyamat után további 48 órát inkubáltuk őket tápfolyadékban oldott Trikaftával, majd a korábbiakban leírtakhoz hasonlóan vittünk véghez rajta mérési kísérleteket, illetve immunfluoreszcens festést.

15. táblázat

Komponens neve	Gyártó, Cat.No.
Tezacaftor	MedChemExpress, HY-15448
Elexacaftor	MedChemExpress, HY-111772
Ivacaftor	MedChemExpress, HY-13017

Trikafta komponensei

III/8. STATISZTIKAI ANALÍZIS

Az adatokat átlag $\pm$ SE-ben fejeztük ki. A csoportok közötti szignifikáns különbséget Mann-Whitney-tesztel v. Kruskal-Wallis-tesztel határoztuk meg. A $P < 0,05$ értéket szignifikánsnak tekintettük. A statisztikai számításokhoz GraphPad Prism programot használtunk.

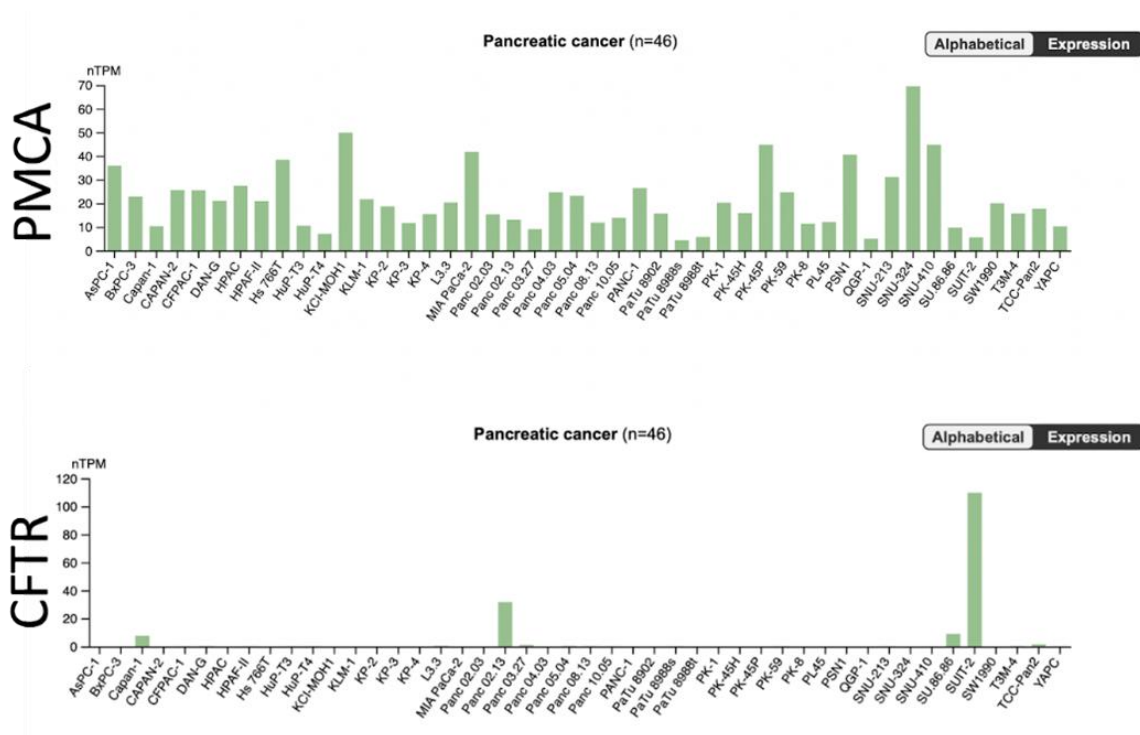
III/9. ETIKAI ENGEDÉLY

A cadaver donorok hasnyálmirigy szöveti minta gyűjtése a 37/2017-SZTE etikai engedély számmal történt.

V. EREDMÉNYEK

IV/1. AZ ADATBÁZIS ANALÍZISEK EREDMÉNYEI

Kísérleteink elvégzése előtt adatbázis analízist végeztünk. Ehhez a DepMap és a The Human Protein Atlas adatbázist használtuk fel, ahol a különböző pankréasz tumoros sejtvonalakat hasonlítottuk össze CFTR és PMCA4 expresszió alapján. A kísérletek kivitelezésére olyan sejtvonalra volt szükségünk, amely humán eredetű és együtt expresszálja a CFTR Cl⁻ csatornát, és a PMCA4 pumpát. A DepMap és a The Human Protein Atlas összehasonlítása alapján a Capan-1 sejtvonalra esett a választásunk. **(4.ábra)** A vizsgált csatornákon kívül továbbá szükség volt arra, hogy a választott sejtvonal PDAC eredetű legyen és hordozzon KRAS és TP53 mutációkat. a Capan-1 esetében ezt az analízist a DepMAP adatbázisának használatával végeztük el. **(5.ábra)**



4. ábra A Human Protein Atlas adatbázisában jól látható, hogy a Capan-1 sejtvonal egyaránt expresszálja a CFTR-csatornát és a PMCA pumpát

Oncogenic Alterations

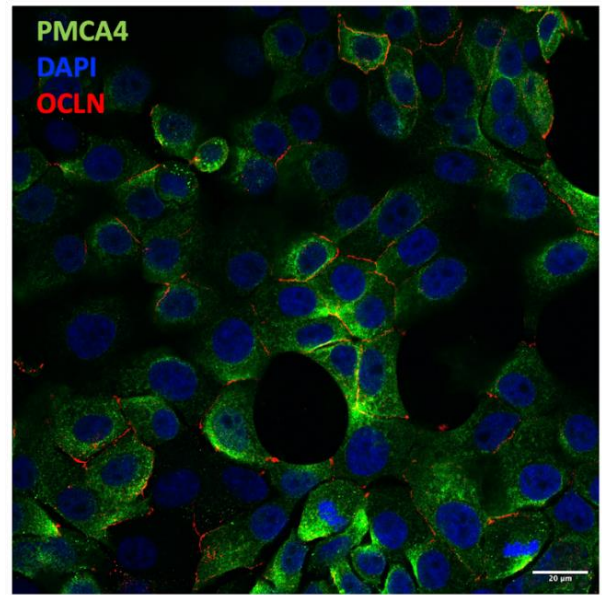
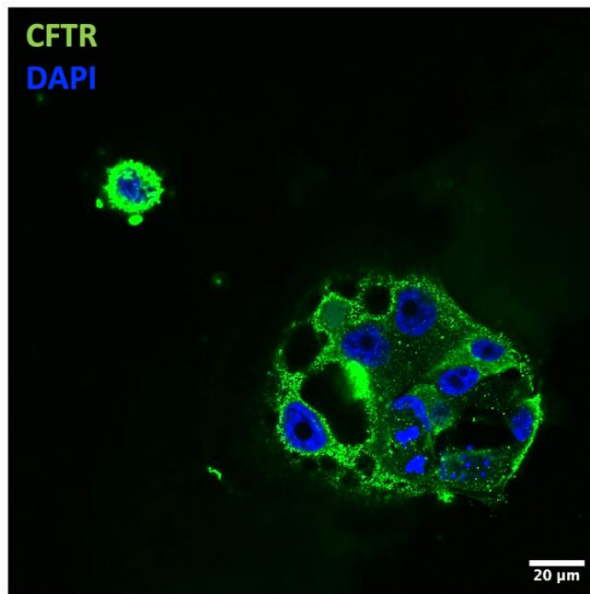
Gene	Alteration	Oncogenic	Function
KRAS	G12V	Oncogenic	Gain-of-function
TP53	A159V	Likely Oncogenic	Likely Loss-of- function

OncoKB v4.7

5. ábra A Capan-1 sejt vonal egyaránt tartalmazza a KRAS és TP53 mutációkat

IV/2. A CAPAN-1 SEJTEK KIFEJEZIK A PMCA4-ET ÉS A CFTR-T

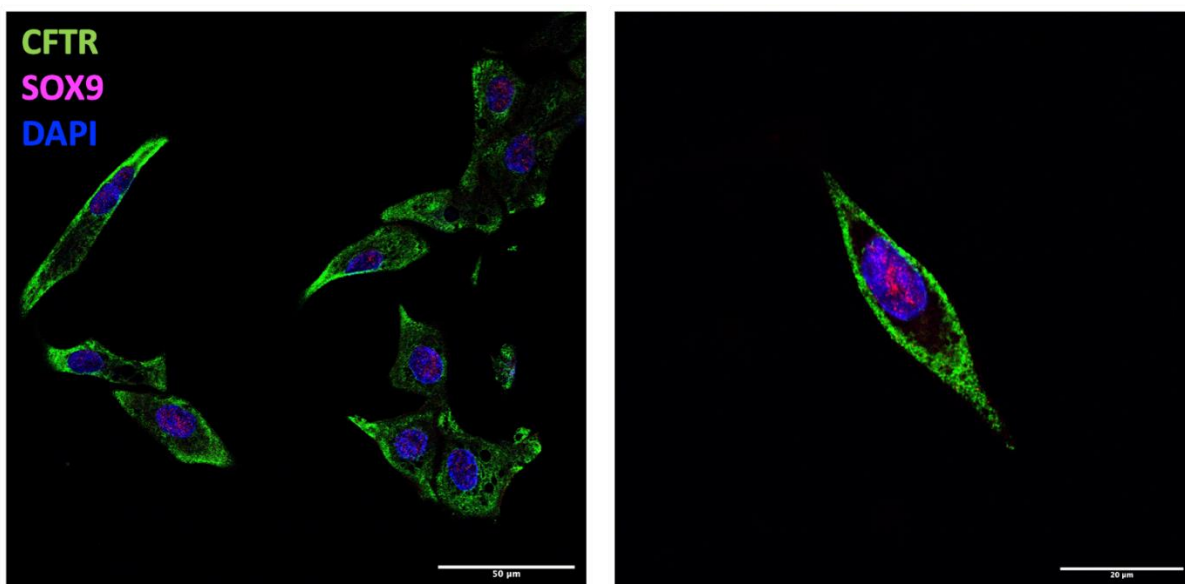
Feltételezésünk szerint a Capan-1 sejt vonal, habár expresszálja a CFTR Cl⁻ csatornát, az sem funkciójában, sem lokalizációjában nem egyezik meg az egészséges pankreász duktális epitél sejteken megfigyelttel. A lokalizáció vizsgálatára immunofluoreszcens festéseket végeztünk, ahol a CFTR és a PMCA4 fehérjéket jelöltük, majd a képeket konfokális mikroszkópiával értékeltük. Eredményeink alátámasztják, hogy mind a CFTR-csatorna, mind pedig a PMCA4 pumpa kifejeződik a Capan-1 sejt vonalon, és a CFTR esetében a fehérje ER vagy citoplazmatikus elrendeződést mutat zömében, amely feltételezi, hogy a csatorna funkciója sem lesz megfelelő. Hasonló elrendeződés figyelhető meg a PMCA4 lokalizációjában is, de a Ca²⁺ csatorna esetében membrán lokalizáció is felfedezhető. **(6.ábra)**



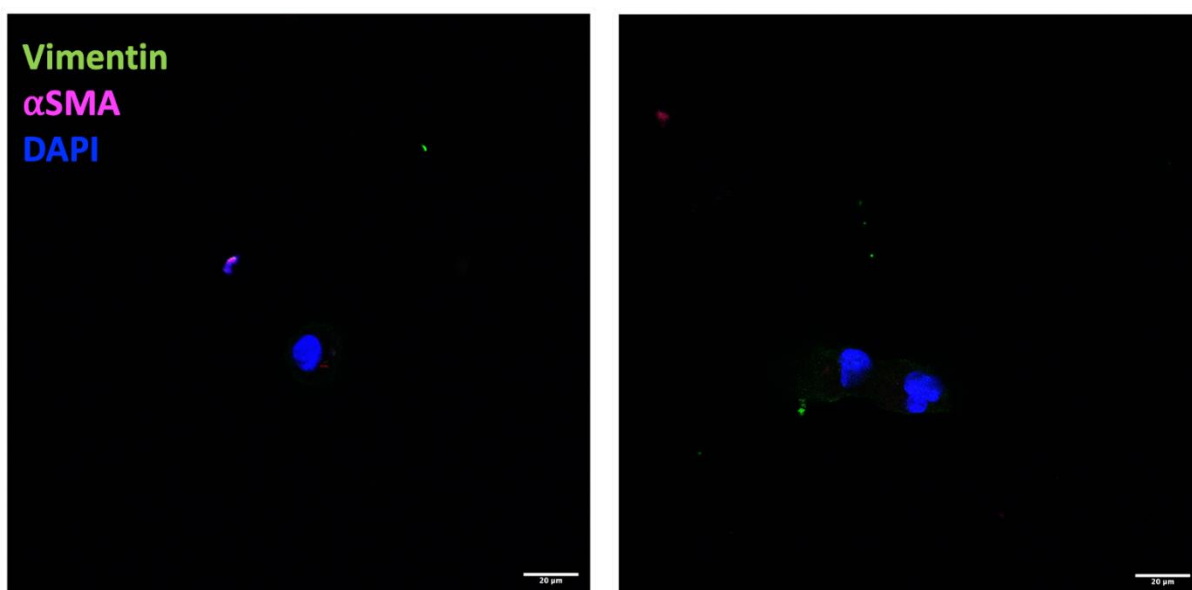
6. ábra A CFTR-csatrona és a PMCA4 pumpa kifejeződésének és lokalizációjának vizsgálata immunfluoreszcens festéssel Capan-1 sejtvonalon, amely alátámasztotta, hogy a Capan-1 sejtvonal kifejezi mindkét fehérjét.

IV/3. A HUMÁN 3D ORGANOIDOKBÓL SZÁRMAZÓ 2D SEJTKULTÚRÁK MEGTARTJÁK AZ EPITÉL FENOTÍPUSUKAT

Annak alátámasztására, hogy az epitél sejteket tartalmazó 3D humán pankreász organoid kultúrákból származó 2D pankreász sejt kultúrák megtartják eredeti duktális epitél fenotípusukat immunfluoreszcens festéseket végeztünk el. A festéseket azután végeztük, hogy a sejtek kitapadtak a 24 mm-es fedőlemezre. Az epitél eredet bizonyítására CFTR és SOX9 (**7.ábra**), a fibroblaszt fenotípus cáfolására pedig Vimentin és α -SMA fibroblaszt markerek (**8. ábra**) festését végeztük el. A konfokális mikroszkópiával készült képeink azt mutatják, hogy a 2D humán pankreász kultúrák kifejezik a CFTR-t és a SOX9-et, továbbá nem mutatnak festődést sem vimentinre, sem α -SMA-ra, ezzel alátámasztva, hogy a 3D-2D tranzíció nem változtatta meg a sejtek fenotípusát.



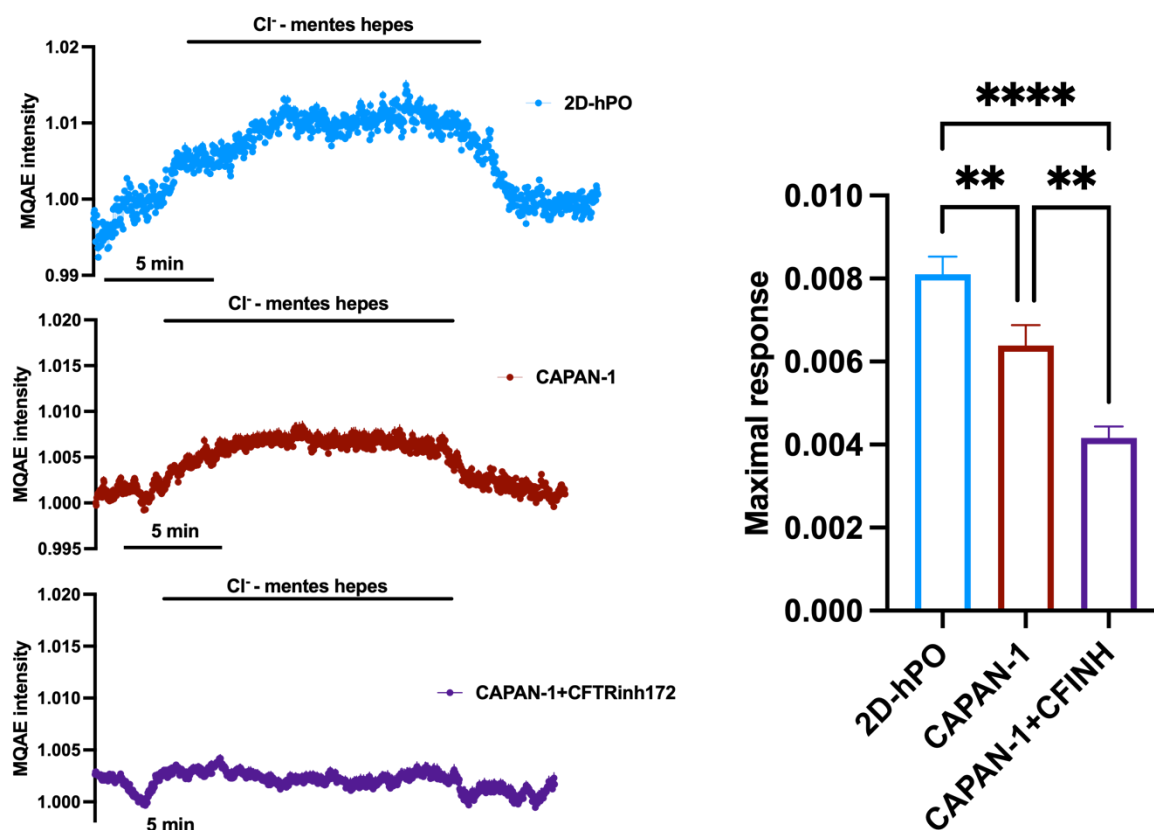
7. ábra A 2D humán epitél kultúrák kifejezik a CFTR és a SOX9 fehérjéket- A 2D humán kultúrák epitél eredetének vizsgálata a CFTR és SOX9 fehérjék kifejeződésének ellenőrzésével, amely megerősítette, hogy az organoidok megőrzik epitél jellegüket.



8. ábra A 2D humán epitél kultúrák nem fejezik ki a Vimentin és az α -SMA fehérjéket- A 2D humán epitél kultúrákon végzett immunofluoreszcens festés megerősítette, hogy a sejtek nem fejeznek ki fibrobalsztokra jellemző Vimentin és α -SMA fehérjéket.

IV/4. A CFTR FUNKCIÓJA CSÖKKEN CAPAN-1 SEJTEKBEN

A Capan-1 sejteken végzett CFTR immunofluoreszcens festés (4. ábra) eredménye arra utal, hogy az ER-ban rekedt Cl^- csatorna nem tudja kellően ellátni az ionszekrécióban betöltött feladatát. Ennek vizsgálatát fluoreszcens mikroszkópiával, Cl^- elvonás technikával vizsgáltuk. Ehhez egy Cl^- szenzitív festéket, az MQAE-t használtuk. A sejteket 24 mm-es üveg fedőlemezen történő növesztést követően 5 μM MQAE festékkel töltöttük fel. A mérést inverz fluoreszcens mikroszkóppal végeztük. A Cl^- elvonás eredményeként megjelenő változás a CFTR-csatorna aktivitását mutatja. Eredményeink azt mutatják, hogy a Capan-1 sejtek CFTR aktivitása szignifikánsan alacsonyabb a 2D hPO-n mért aktivitáshoz képest. Fontos eredmény továbbá, hogy a Capan-1 sejtek CFTR aktivitása további szignifikáns mértékben volt csökkenthető egy széles körben alkalmazott CFTR gátlószer, a CFTR (inh)-172 jelenlétében. Ez arra enged következtetni, hogy habár a Capan-1 sejtek CFTR aktivitása jelentősen alacsonyabb az egészséges sejtekhez képest, mégsem teljesen elégtelen. (9.ábra)

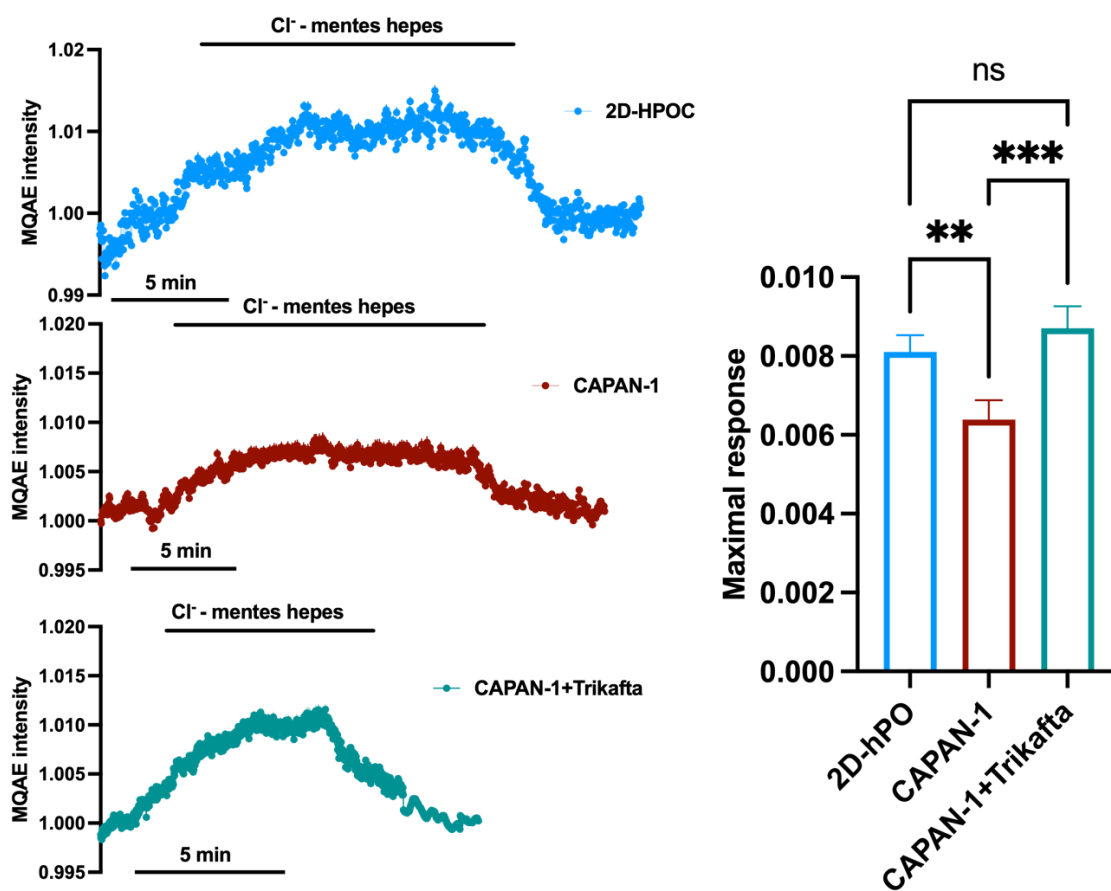


9. ábra CFTR-csatorna funkciójának vizsgálata Cl^- elvonással 2D-hPO, Capan-1, és CFTR-inh-172 (CFTR inhibitor) gátlószerrel kezelt Capan-1 sejtek esetében. - Cl^- elvonás technikával a sejtek Cl^- kiáramlásának vizsgálata szignifikánsan alacsonyabb CFTR aktivitást mutatott a Capan-1 sejtek

esetében a 2D hPO kultúrákhoz képest, amely aktivitás CFTR-inh-172 jelenlétében további szignifikáns mértékben csökkent.

IV/5. A CFTR Cl^- CSATORNA AKTIVITÁSA JAVÍTHATÓ CAPAN-1 SEJTEKBEN

Kísérleteink szempontjából fontos kérdés volt annak megválaszolása, hogy a Capan-1 sejtekben korrigálható-e a CFTR-csatorna funkciója. Ennek vizsgálatához a Capan-1 sejteket 48 órán keresztül, egy jelenleg már cisztás fibrózisban alkalmazott CFTR korrektorral, Trikaftával kezeltük. A Trikafta három komponensű korrektor, amely Elexacaftorból, Ivacaftorból és Tezacaftorból áll. Cl^- elvonásos kísérleteink a Trikafta kezelés követően azt mutatták, hogy a Trikafta képes helyreállítani a Capan-1 sejtek CFTR aktivitását, amellyel igazoltuk, hogy a korrekció megvalósítható, ráadásul egy már elérhető gyógyszer hatását is alátámasztottuk PDAC sejtekben. (10. ábra)

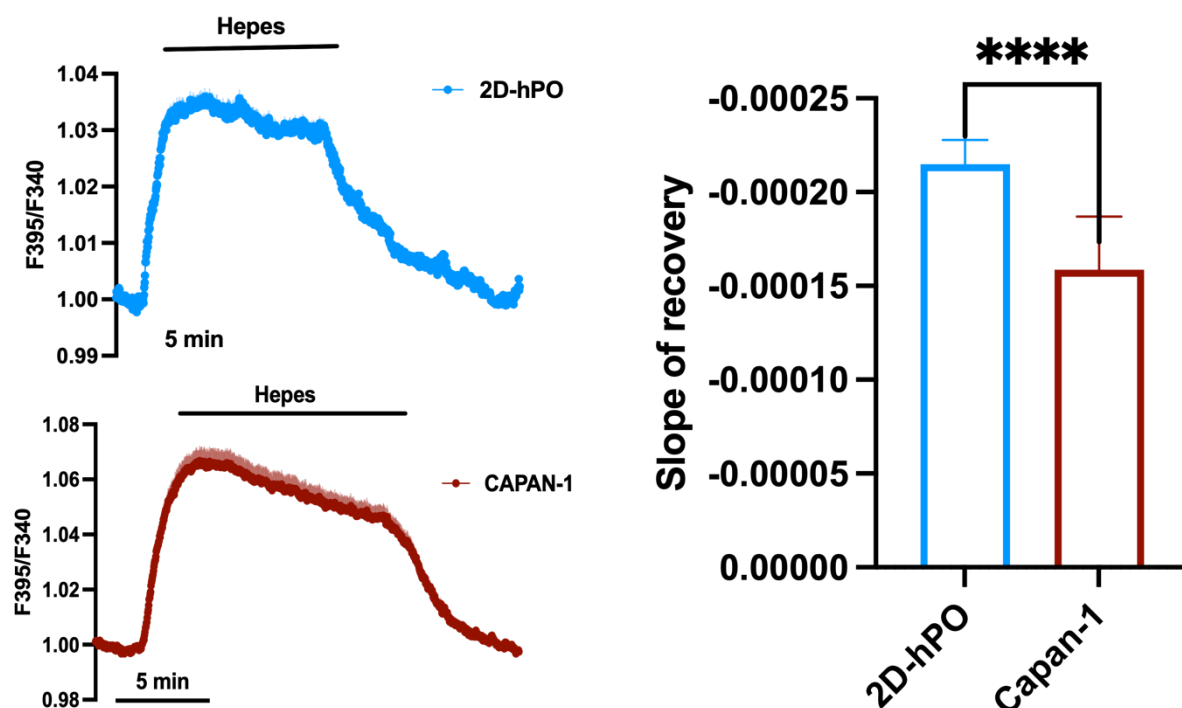


10. ábra CFTR-csatorna funkciójának vizsgálata Cl^- elvonással 2D-hPO, Capan-1, és Trikafta CFTR korrektorral kezelt Capan-1 sejtek esetében. A sejtek Cl^- elvonás technikával való vizsgálata azt

mutatta, hogy a Capan-1 sejtek CFTR aktivitása 48h Trikafta előkezeléssel szignifikáns mértékben javítható a kezelést nem kapott Capan-1 sejtekhez képest.

IV/6. A CAPAN-1 SEJTEK Ca^{2+} KIÁRAMLÁSA SZIGNIFIKÁNSAN ALACSONYABB A 2D HPO-KHOZ VISZONYÍTVÁ

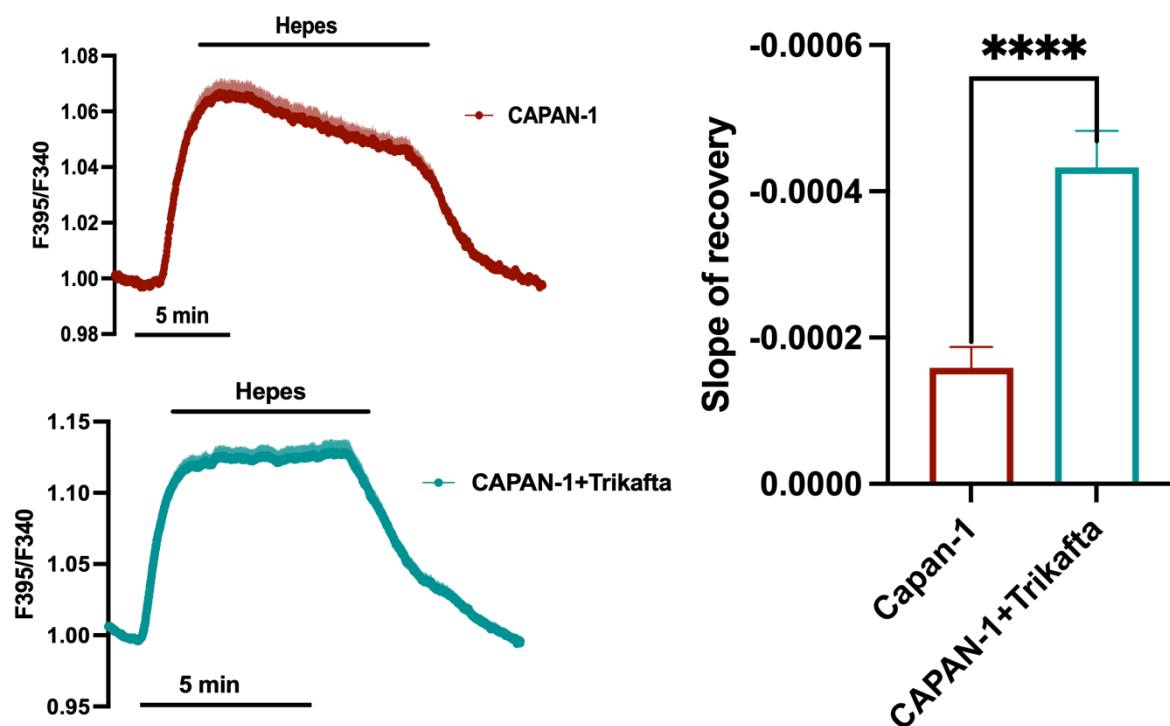
Egy előző tanulmányunk tanulsága alapján úgy gondoltuk, hogy a Capan-1 sejtek CFTR-csatorna diszfunkciója és diszlokalizációja negatívan befolyásolja a sejtek PMCA4 aktivitását. Feltételezésünk igazolására először a Capan-1 sejtek PMCA4 funkcióját FURA-2-AM szenzitív festékkel vizsgáltuk. A sejtekből ez endoplazmás retikulum depléciója után vizsgáltuk az elvonás mértékét, amely a PMCA4 aktivitását adja meg pankreász duktális epitél sejtekben. Ennek összehasonlításával megállapítottuk, hogy a Capan-1 sejtek PMCA4 funkciója szignifikánsan alacsonyabb a 2D-hPOknál. (11. ábra)



11. ábra PMCA4 aktivitásának vizsgálata intracelluláris Ca^{2+} méréssel 2D-hPO, Capan-1 sejtek esetében A Ca^{2+} kiáramlás vizsgálata szignifikánsan alacsonyabb PMCA aktivitást mutatott Capan-1 sejtekben a kontroll 2D-hPO-khoz viszonyítva.

IV/7. A CAPAN-1 SEJTEK PMCA4 AKTIVITÁSA HELYREÁLL CFTR KORREKCIÓ HATÁSÁRA

Következő lépésben igazolni szeretnénk volna, hogy a PMCA4 csökkent működése összefügg a CFTR hibás működésével és kifejeződésével. Így a Capan-1 sejteket CFTR korrektor Trikaftával kezeltük 48 órán át, amellyel indirekt módon nyertünk bizonyítékot, a feltételezésünkre. Abban az esetben, ha a Capan-1 sejteket a mérés előtt 48 órával Trikaftával kezeltük, azt tapasztaltuk, hogy a sejtek PMCA4 funkciója szignifikánsan emelkedett, a kezelést nem kapott Capan-1 sejtekhez képest. (12. ábra) Ezzel alátámasztottuk, hogy a CFTR és a PMCA4 csökkent működése Capan-1 sejtekben is összefüggésben áll egymással, továbbá, a CFTR korrekciója a PMCA4 funkcióját is képes helyreállítani.

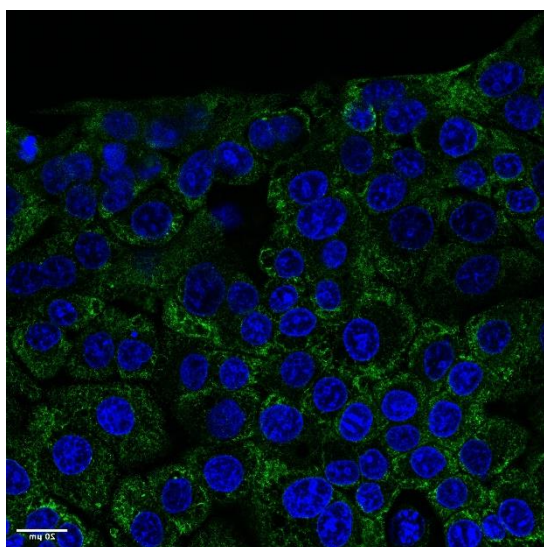


2. ábra PMCA4 aktivitásának vizsgálata intracelluláris Ca^{2+} méréssel Capan-1 és Trikaftával, CFTR korrektorral kezelt Capan-1 sejtek esetében-a Ca^{2+} kiáramlás vizsgálata szignifikáns javulást mutatott a PMCA4 aktivitásában a 48h Trikafta kezelést kapott Capan-1 sejtek esetében a kontroll Capan-1 sejtekhez képest.

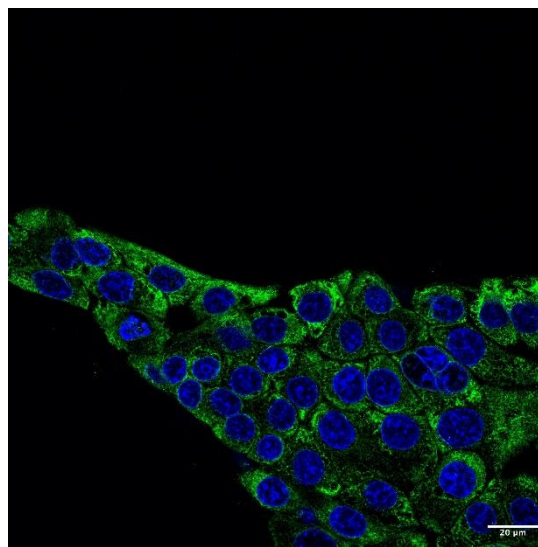
VI/8. A CFTR ÉS A PMCA4 LOKALIZÁCIÓJA NEM VÁLTOZIK SZIGNIFIKÁNS MÉRTÉKBEN TRIKAFTA HATÁSÁRA CAPAN-1 SEJTEKEN

Abból következően, hogy a CFTR aktivitása javulást mutatott Capan-1 sejtekben Trikafta kezelés hatására, feltételeztük, hogy ez lokalizációjában is változást okozhat. Ennek vizsgálatára immunfluoreszcens festést végeztünk. A festést megelőzően a Capan-1 sejteket 48 órás Trikafta kezelésnek tettük alá. A festés során a CFTR és PMCA4 fehérjét jelöltük. Eredményeink azt mutatják, hogy habár a CFTR membránba való kihelyeződése enyhe javulást mutat, de a jel nagyrészt citoplazmatikus elrendeződésű. A CFTR jele viszont erőteljesebb festődést mutat a Trikafta kezelt sejteken, a kezelést nem kapott Capan-1 sejtekhez viszonyítva. (13. ábra)

Kezeletlen Capan-1 sejtek CFTR elrendeződése



CFTR elrendeződése a 48 órás Trikafta kezelés után Capan-1 sejtekben

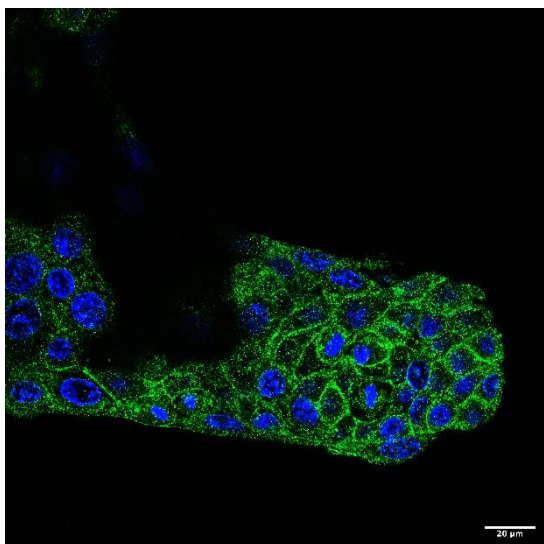


33. ábra A Capan-1 sejtek CFTR lokalizációjának vizsgálata immunfluoreszcens festéssel, 48 órás Trikafta kezelést megelőzően és utána. A kezelés javította a membránba történő kihelyeződést.

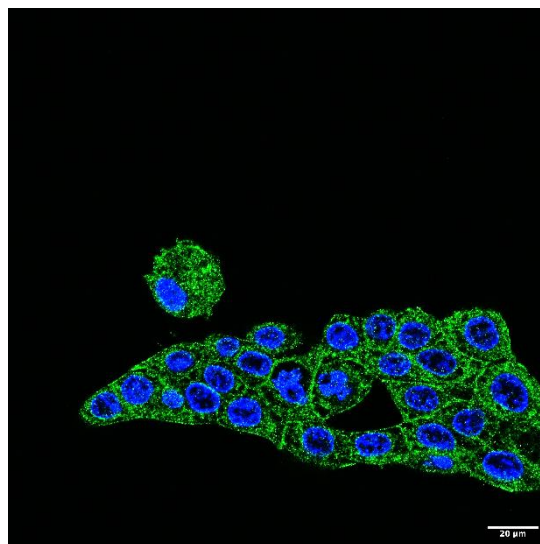
A kezelt Capan-1 sejtek PMCA fehérje immunfluoreszcens festése alapján a PMCA egyaránt mutat membrán lokalizációt, illetve citoplazmatikus elhelyezkedést, azonban nem látható számottevő változás a kezeletlen sejtekhez képest. Ez alapján elmondhatjuk, hogy a Trikafta kezelés nincs közvetlen jelentős hatással a PMCA4 lokalizációjára a sejtekben. Ez megerősíti

azon feltételezésünket, miszerint a PMCA4 önmagában nem sérült, funkciójának csökkenése más folyamat eredménye. Továbbá, hogy a Trikafta kezelés közvetetten, elsősorban funkcionálisan változtatja a PMCA4 működését. (14. ábra)

**Kezeletlen Capan-1 sejtek PMCA4
elrendeződése**



**PMCA elrendeződése a 48 órás Trikafta
kezelés után Capan-1 sejtekben**



14. ábra A Capan-1 sejtek PMCA lokalizációjának vizsgálata immunfluoreszcens festéssel, 48 órás Trikafta kezelést megelőzően és utána. A PMCA elrendeződése nem mutat szignifikáns változást a Trikafta kezelés hatására.

VI. DISZKUSSZIÓ

A pankreász duktális adenokarcinóma (PDAC) a hasnyálmirigyet érintő daganatos megbetegedés, amely az exokrin hasnyálmirigy epitél sejtjeiből alakul ki²¹. A PDAC betegek 5 éves túlélési rátája csupán 12% és a betegség köthető halálesetek száma évi közel 500 ezer főre tehető világszerte. A kedvezőtlen klinikai prognózis mellett, a limitált és gyakran hatástalan terápiás lehetőségek, továbbá a korai diagnosztikai módszerek hiánya miatt a PDAC napjaink egyik legjelentősebb megoldatlan klinikai problémáját testesíti meg. A PDAC tumorokra jellemző KRAS és TP53 gének mutációi alapvető szignalizációs útvonalak aktivitását változtatják meg, melyek következtében az epitél eredetű tumoros sejtek megnövekedett osztódási motilitási potenciállal és a hatékony sejthalált elkerülő tulajdonságokkal rendelkeznek. Korábbi tanulmányok leírták PDAC sejtekben, hogy a szignalizációban bekövetkező változások a sejtek megnövekedett metasztatikus képességét eredményezik⁶². A PMCA4 overexpressziója pankreász duktális adenocarcinómában a betegség kimenetelének jelentős romlását vetíti elő és erősen csökkenti a betegek túlélési esélyét. A sejtek ellenállóbban viselkednek az alkalmazott kemoterápiákkal szemben, továbbá metasztázis képző képességük is megnő. Sritangos és munkatársai a PMCA4 siRNS-el történő kiütésével bizonyították, hogy a PMCA4 expressziójának csökkenése gátolja a proliferációt és a migrációt¹⁹. Ezzel szemben Stopa és mtsai KRAS és TP53 mutáns egerekből izolált acinus sejteken azt a megfigyelést tették, hogy a PMCA4 aktivitása alacsonyabb a mutációkat hordozó egerek esetében, mint egészséges társaiknak⁶¹. Egy 2022-es tanulmányunkban egyértelmű interakciós kapcsolatot találtunk a CFTR Cl⁻ csatorna és a PMCA4 Ca²⁺ pumpa között, ahol többek között a CFTR KO egerek PMCA4 génexpressziós vizsgálata azt az eredményt hozta, hogy a CFTR KO egerekben szignifikánsan magasabb a PMCA4 expressziója a kontroll egerekhez képest⁴¹. Ezt a megfigyelést azzal magyaráztuk, hogy a pankreász duktális epitél sejtek a kieső PMCA4 funkciót próbálják mintegy kompenzációs mechanizmusként pótolni a pumpa overexpressziójával. Jelen eredményeink megerősítik, hogy PDAC-ban mind a CFTR, mind a PMCA pumpa károsodik. A pankreász duktális epitél sejtekben megfigyelt lokalizációjukhoz képest ER retenció figyelhető meg, továbbá mind a CFTR mind a PMCA4 aktivitása szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a Capan-1 sejtekben. Fontos eredmény, hogy a CFTR

korrekciója képes helyreállítani a CFTR és a PMCA4 funkcióját. Ezek alapján kérdésként merül fel, hogy a PMCA4 helyreállított funkciója következményeként csökken-e az overexpresszió mértéke is. Következő lépésben a Capan-1 és Trikafta kezelt Capan-1 sejtek proliferációs és migrációs képességét, valamint PMCA4 expresszióját tervezzük összehasonlítani. Eredményeink fontos mechanizmusra világíthatnak rá a PDAC progressziójában, és új terápiás, esetleg kiegészítő terápiás lehetőségek kutatását segítheti elő, amelyek segítenek csökkenteni a PDAC tumorok kemoterápiát elkerülő és metasztázis képző képességét, amely hosszú távon lenne képes növelni a betegek túlélési esélyét.

VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Maléth József tudományos főmunkatársnak és egyben a kutatócsoport vezetőjének, hogy helyet és lehetőséget biztosított számomra tudományos munkára.

Különös hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Madácsy Tamara egyetemi segédmunkatársnak, aki végtelen türelemmel és odaadással segített engem, valamint az elvárásokat felülmúlva segítette a dolgozat létrejöttét.

Köszönöm továbbá az MTA SZTE Momentum Epitél Sejt Szignalizációs és Szekréciós Kutatócsoport tagjainak, a laborbeli munkám során nyújtott segítségükért és gyakorlati tanácsaikért.

VIII. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

A 37. OTDK

BIOLÓGIA SEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK

2. SZÁMÚ MELLÉKLETE

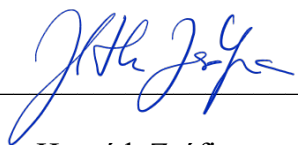
TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Horváth Zsófia** nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott „A kalcium kiáramlás zavarának vizsgálata pankreász duktális adenokarcinóma (PDAC) sejtekben” című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán jellemezve)
<i>Capan-1 sejtvonala fenntartása</i>	5
<i>Humán organoid kultúrák fenntartása</i>	2
<i>2 dimenziós humán epitel sejtek létrehozása</i>	1
<i>Intracelluláris kalcium mérés</i>	5
<i>Intracelluláris klorid koncentráció mérés</i>	5
<i>Immunfluoreszcens festés</i>	5
<i>Statisztikai analízis</i>	1
<i>Capan-1 sejtvonala kezelése Trikaftával</i>	5

Kelt: Szeged, 2024.04.15.

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Horváth Zsófia

aláírása



Dr. Madácsy Tamara

MTA SZTE Momentum Epitel Sejt Szignalizációs és
Szekréciós Kutatócsoport

aláírása

IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. Masson, E., Chen, J.-M., Scotet, V., Le Maréchal, C. & Férec, C. Association of rare chymotrypsinogen C (CTRC) gene variations in patients with idiopathic chronic pancreatitis. *Hum Genet* **123**, 83–91 (2008).
2. Jun, I. & Lee, G. M. Molecular Mechanisms of Pancreatic Bicarbonate Secretion. <https://doi.org/10.3998/panc.2017.01> (2017).
3. Domschke, S. és mtsai. Inhibition by somatostatin of secretin-stimulated pancreatic secretion in man: a study with pure pancreatic juice. *Scand J Gastroenterol* **12**, 59–63 (1977).
4. Johnstone, C. Pathophysiology and nursing management of acute pancreatitis. *Nursing Standard* **33**, 75–82 (2018).
5. Maléth, J. & Hegyi, P. Calcium signaling in pancreatic ductal epithelial cells: An old friend and a nasty enemy. *Cell Calcium* **55**, 337–345 (2014).
6. Hegyi, P. & Rakonczay, Z. The role of pancreatic ducts in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Pancreatology* **15**, S13–S17 (2015).
7. Hegyi, P., Maléth, J., Venglovecz, V. & Rakonczay, Z. Pancreatic Ductal Bicarbonate Secretion: Challenge of the Acinar Acid Load. *Front. Physio.* **2**, (2011).
8. Polonsky, K. S. The past 200 years in diabetes. *N Engl J Med* **367**, 1332–1340 (2012).
9. Braganza, J. M., Lee, S. H., McCloy, R. F. & McMahon, M. J. Chronic pancreatitis. *Lancet* **377**, 1184–1197 (2011).
10. Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N. & Depinho, R. A. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* **20**, 1218–1249 (2006).
11. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA A Cancer J Clinicians* **71**, 7–33 (2021).
12. Rahib, L. és mtsai. Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Research* **74**, 2913–2921 (2014).
13. Bettaieb, L. és mtsai. Ca²⁺ Signaling and Its Potential Targeting in Pancreatic Ductal Carcinoma. *Cancers* **13**, 3085 (2021).
14. Fesinmeyer, M. D., Austin, M. A., Li, C. I., De Roos, A. J. & Bowen, D. J. Differences in Survival by Histologic Type of Pancreatic Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **14**, 1766–1773 (2005).
15. Kleeff, J. és mtsai. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers* **2**, 16022 (2016).
16. Behrens, G. és mtsai. Physical activity and risk of pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol* **30**, 279–298 (2015).
17. Tramacere, I. és mtsai. Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. *Intl Journal of Cancer* **126**, 1474–1486 (2010).
18. Rahman, F., Cotterchio, M., Cleary, S. P. & Gallinger, S. Association between alcohol consumption and pancreatic cancer risk: a case-control study. *PLoS One* **10**, e0124489 (2015).
19. Sritangos, P. és mtsai. Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase Isoform 4 (PMCA4) Has an Important Role in Numerous Hallmarks of Pancreatic Cancer. *Cancers* **12**, 218 (2020).
20. Ansari, D. és mtsai. Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow. *Future Oncology* **12**, 1929–1946 (2016).
21. Grant, T. J., Hua, K. & Singh, A. Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* vol. 144 241–275 (Elsevier, 2016).

22. Hingorani, S. R. *és mtsai*. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**, 437–450 (2003).
23. Guerra, C. *és mtsai*. Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice. *Cancer Cell* **11**, 291–302 (2007).
24. Aguirre, A. J. *és mtsai*. Activated Kras and *Ink4a/Arf* deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* **17**, 3112–3126 (2003).
25. Hingorani, S. R. *és mtsai*. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* **7**, 469–483 (2005).
26. Bardeesy, N. *és mtsai*. *Smad4* is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev.* **20**, 3130–3146 (2006).
27. Hruban, R. H. *és mtsai*. Pathology of Genetically Engineered Mouse Models of Pancreatic Exocrine Cancer: Consensus Report and Recommendations. *Cancer Research* **66**, 95–106 (2006).
28. Delpu, Y. *és mtsai*. Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. *Curr Genomics* **12**, 15–24 (2011).
29. Di Magliano, M. P. & Logsdon, C. D. Roles for KRAS in Pancreatic Tumor Development and Progression. *Gastroenterology* **144**, 1220–1229 (2013).
30. Buscail, L., Bournet, B. & Cordelier, P. Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **17**, 153–168 (2020).
31. Bijlsma, M. F., Sadanandam, A., Tan, P. & Vermeulen, L. Molecular subtypes in cancers of the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **14**, 333–342 (2017).
32. Kanda, M. *és mtsai*. Presence of Somatic Mutations in Most Early-Stage Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Gastroenterology* **142**, 730-733.e9 (2012).
33. Puri, S., Folias, A. E. & Hebrok, M. Plasticity and Dedifferentiation within the Pancreas: Development, Homeostasis, and Disease. *Cell Stem Cell* **16**, 18–31 (2015).
34. Kopp, J. L. *és mtsai*. Identification of Sox9-Dependent Acinar-to-Ductal Reprogramming as the Principal Mechanism for Initiation of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **22**, 737–750 (2012).
35. Friedlander, S. Y. G. *és mtsai*. Context-Dependent Transformation of Adult Pancreatic Cells by Oncogenic K-Ras. *Cancer Cell* **16**, 379–389 (2009).
36. Orth, M. *és mtsai*. Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. *Radiat Oncol* **14**, 141 (2019).
37. Marstrand-Daucé, L. *és mtsai*. Acinar-to-Ductal Metaplasia (ADM): On the Road to Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) and Pancreatic Cancer. *IJMS* **24**, 9946 (2023).
38. Ahuja, M., Jha, A., Maléth, J., Park, S. & Muallem, S. cAMP and Ca²⁺ signaling in secretory epithelia: Crosstalk and synergism. *Cell Calcium* **55**, 385–393 (2014).
39. Pallagi, P., Madácsy, T., Varga, Á. & Maléth, J. Intracellular Ca²⁺ Signalling in the Pathogenesis of Acute Pancreatitis: Recent Advances and Translational Perspectives. *Int J Mol Sci* **21**, 4005 (2020).
40. Thorn, P., Lawrie, A. M., Smith, P. M., Gallacher, D. V. & Petersen, O. H. Ca²⁺ oscillations in pancreatic acinar cells: spatiotemporal relationships and functional implications. *Cell Calcium* **14**, 746–757 (1993).
41. Madácsy, T. *és mtsai*. Impaired regulation of PMCA activity by defective CFTR expression promotes epithelial cell damage in alcoholic pancreatitis and hepatitis. *Cell. Mol. Life Sci.* **79**, 265 (2022).

42. Parekh, A. B. & Putney, J. W. Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews* **85**, 757–810 (2005).
43. Cao, X. és mtsai. The ER/PM microdomain, PI(4,5)P₂ and the regulation of STIM1–Orai1 channel function. *Cell Calcium* **58**, 342–348 (2015).
44. Krüger, B., Albrecht, E. & Lerch, M. M. The Role of Intracellular Calcium Signaling in Premature Protease Activation and the Onset of Pancreatitis. *The American Journal of Pathology* **157**, 43–50 (2000).
45. Criddle, D. N. és mtsai. Fatty Acid Ethyl Esters Cause Pancreatic Calcium Toxicity via Inositol Trisphosphate Receptors and Loss of ATP Synthesis. *Gastroenterology* **130**, 781–793 (2006).
46. Maleth, J. és mtsai. Non-conjugated chenodeoxycholate induces severe mitochondrial damage and inhibits bicarbonate transport in pancreatic duct cells. *Gut* **60**, 136–138 (2011).
47. Gerasimenko, J. V. & Gerasimenko, O. V. Ca²⁺ Signaling and ATP Production in Pancreatic Cancer. *Function* **5**, zqad067 (2023).
48. Monteith, G. R., Davis, F. M. & Roberts-Thomson, S. J. Calcium Channels and Pumps in Cancer: Changes and Consequences. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 31666–31673 (2012).
49. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
50. Bruce, J. I. E. Metabolic regulation of the PMCA: Role in cell death and survival. *Cell Calcium* **69**, 28–36 (2018).
51. Criddle, D. N. és mtsai. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? *Cell Death Differ* **14**, 1285–1294 (2007).
52. Brini, M. & Carafoli, E. The Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase and the Plasma Membrane Sodium Calcium Exchanger Cooperate in the Regulation of Cell Calcium. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**, a004168–a004168 (2011).
53. James, A. D. és mtsai. The Plasma Membrane Calcium Pump in Pancreatic Cancer Cells Exhibiting the Warburg Effect Relies on Glycolytic ATP. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 24760–24771 (2015).
54. James, A. D., Chan, A., Erice, O., Siriwardena, A. K. & Bruce, J. I. E. Glycolytic ATP Fuels the Plasma Membrane Calcium Pump Critical for Pancreatic Cancer Cell Survival. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 36007–36019 (2013).
55. Zhao, X.-S. Plasticity and adaptation of Ca²⁺ signaling and Ca²⁺-dependent exocytosis in SERCA2^{+/-} mice. *The EMBO Journal* **20**, 2680–2689 (2001).
56. Curry, M. C., Luk, N. A., Kenny, P. A., Roberts-Thomson, S. J. & Monteith, G. R. Distinct Regulation of Cytoplasmic Calcium Signals and Cell Death Pathways by Different Plasma Membrane Calcium ATPase Isoforms in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 28598–28608 (2012).
57. Ono, K., Wang, X. & Han, J. Resistance to tumor necrosis factor-induced cell death mediated by PMCA4 deficiency. *Mol Cell Biol* **21**, 8276–8288 (2001).
58. Tsai, F.-C. és mtsai. A polarized Ca²⁺, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration. *Nat Cell Biol* **16**, 133–144 (2014).
59. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
60. James, A. D. és mtsai. Cutting off the fuel supply to calcium pumps in pancreatic cancer cells: role of pyruvate kinase-M2 (PKM2). *Br J Cancer* **122**, 266–278 (2020).
61. Stopa, K. B. és mtsai. Driver Mutations of Pancreatic Cancer Affect Ca²⁺ Signaling and ATP Production. *Function* **4**, zqad035 (2023).
62. Bettaieb, L. és mtsai. Ca²⁺ Signaling and Its Potential Targeting in Pancreatic Ductal Carcinoma. *Cancers* **13**, 3085 (2021).