

Sejt-sejt kölcsönhatások és hálózatok vizsgálata organoid technológiával

Wiener Zoltán

SEMMELWEIS EGYETEM, GENETIKAI, SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI INTÉZET, MOLEKULÁRIS ONKOBIOLÓGIAI KUTATÓCSOPORT



SEMMELWEIS
UNIVERSITY 1769

Hosszútávú *ex vivo* „minibél” tenyészetek előállítása (Sato T et al, 2009, Nature)

Wnt-agonista (R-Spondin) és
egyéb faktorok
(noggin, EGF, colon esetében
Wnt fehérjék)

Lgr5⁺ őssejtek vagy kripták



Matrigel (3D mátrix)



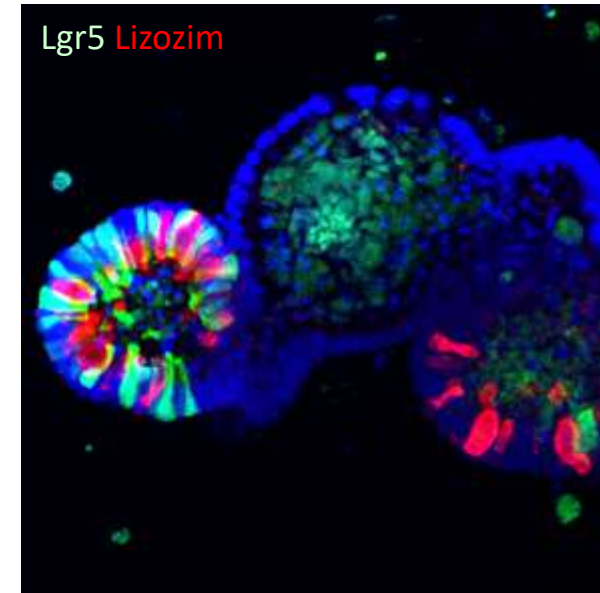
Hosszú távú kultúrák



Splitting



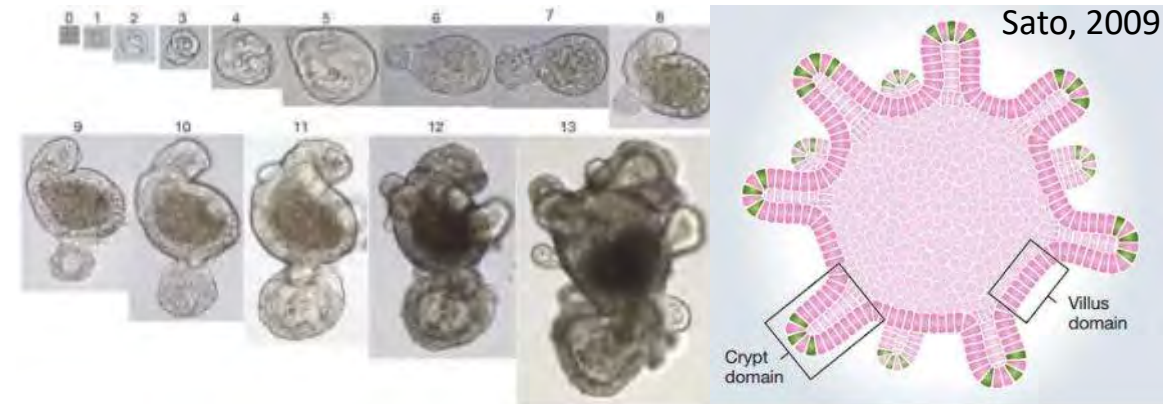
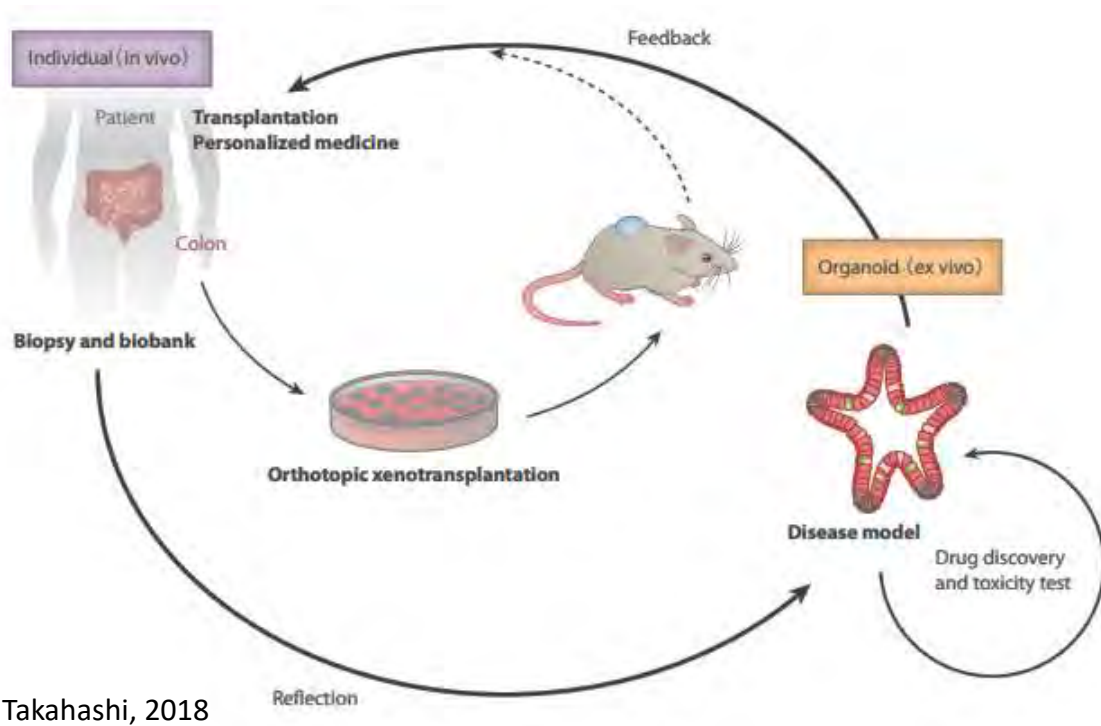
Új kultúrák indítása



Wiener Z et al, nem publikált

1. Sejt-sejt interakciók az őssejt niche-ben
2. Sejt-sejt interakciók az intra-tumorális heterogenitás kialakulásában
3. Személyre szabott medicina
4. Tumorsejtek és immunsejtek interakciójának modellezése humán rendszerben

Az organoid technológia a humán tumorok vizsgálatára és a személyre szabott medicinában

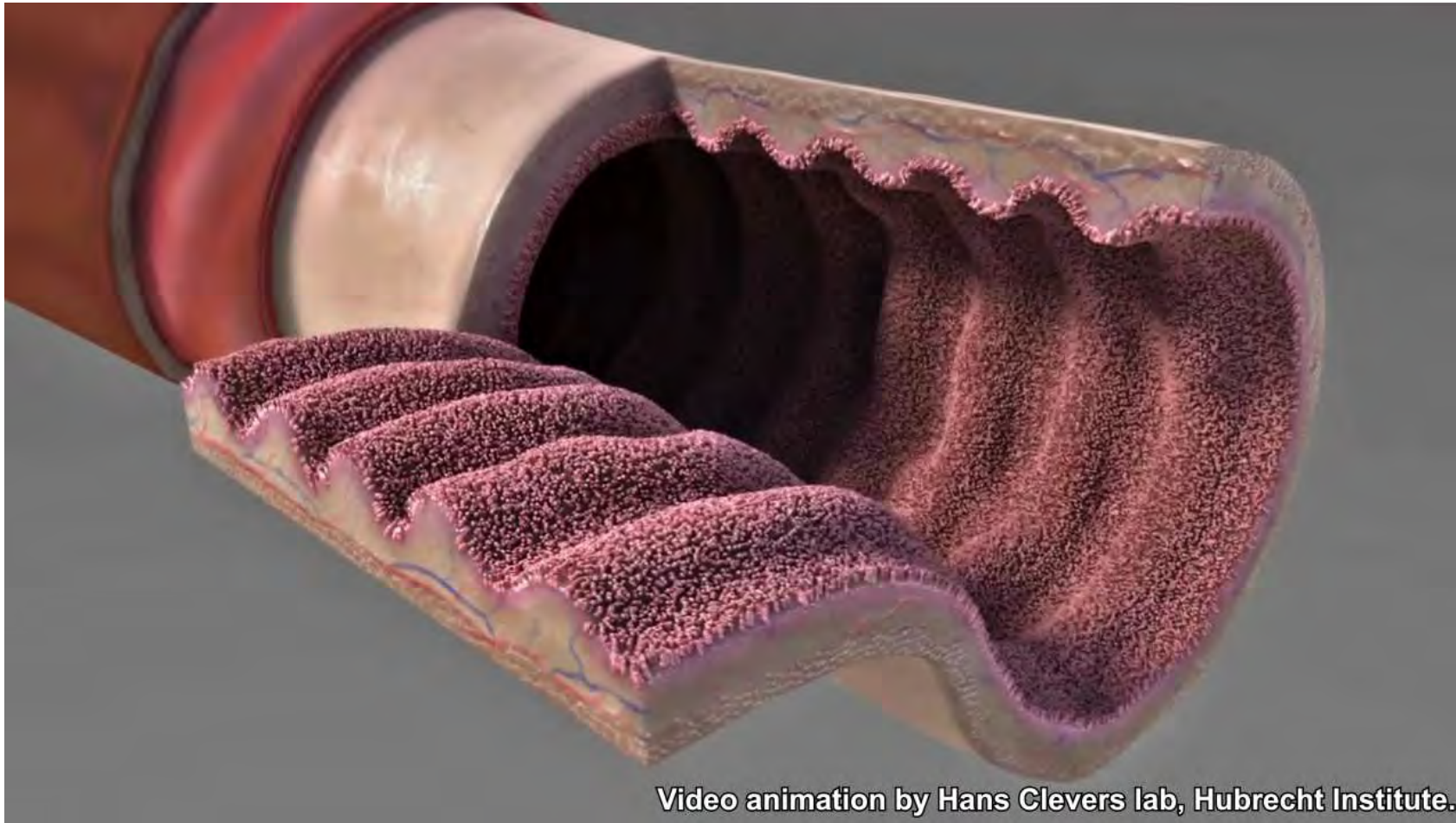


Betegekből származó organoidok:

- Gyors, betegre jellemző modell
- Eredeti sejt heterogenitás
- Hatóanyagok személyre szabott szűrése
- Személyre szabott terápia
- Mutációs vizsgálatok, gene editing
- Transzplantáció

- CRC organoid biobank: van de Wetering M et al, Cell. 2015;161:933-45
- Máj: Huch M et al, Cell. 2015;160:299-312
- Gyomor biobank: Yan HHN et al, Cell Stem Cell. 2018;23:882-897.e11.
- Pankreas: Boj SF et al, Cell. 2015;160:324-38
- prosztatata és prosztatatarák: Karthaus WR et al, Cell. 2014;159:163-75
- Mellrák biobank: Sachs N et al, Cell. 2018 Jan 11;172:373-386.e10.
- Tüdőrák biobank (2023)

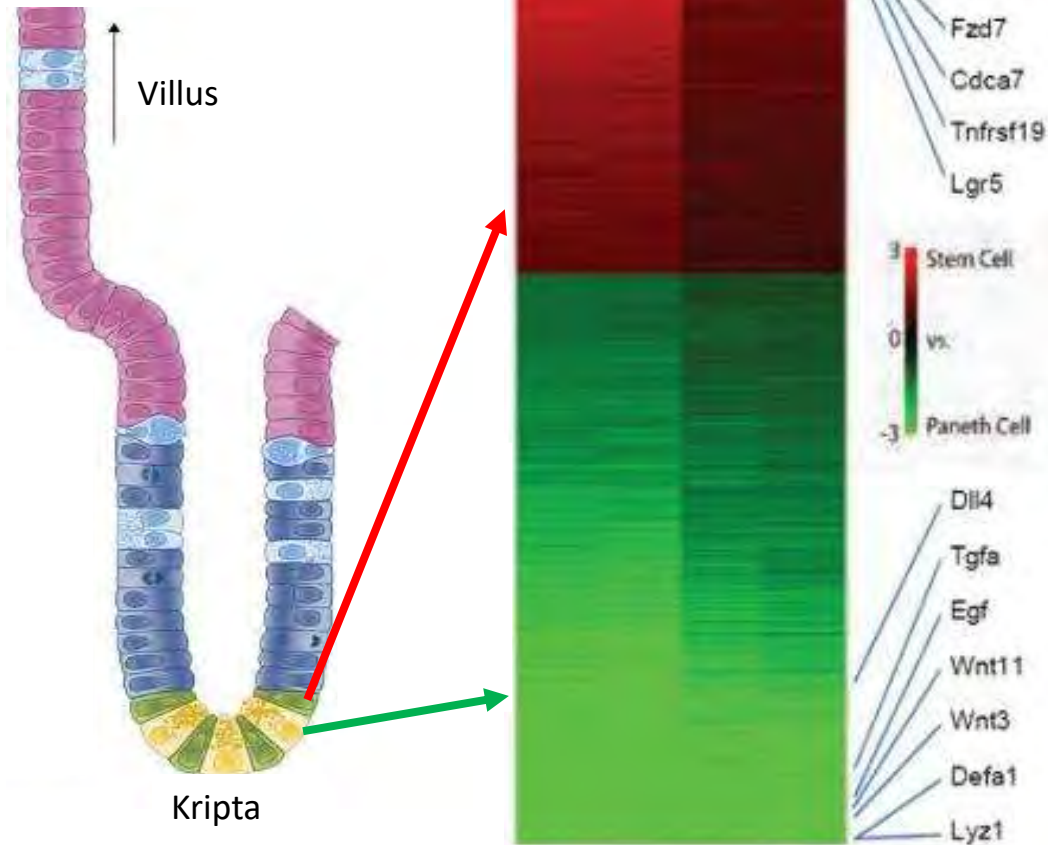
A bél epithélium strukturális felépítése



Video animation by Hans Clevers lab, Hubrecht Institute.

Sejttípusok funkciói: Paneth sejtek a vékonybélben (niche faktorok termelése)

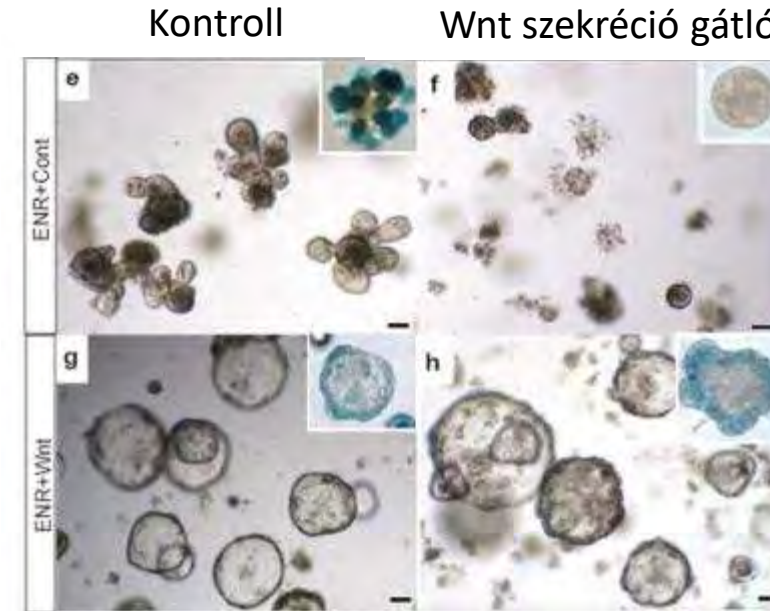
A Paneth sejtek által termelt faktorok



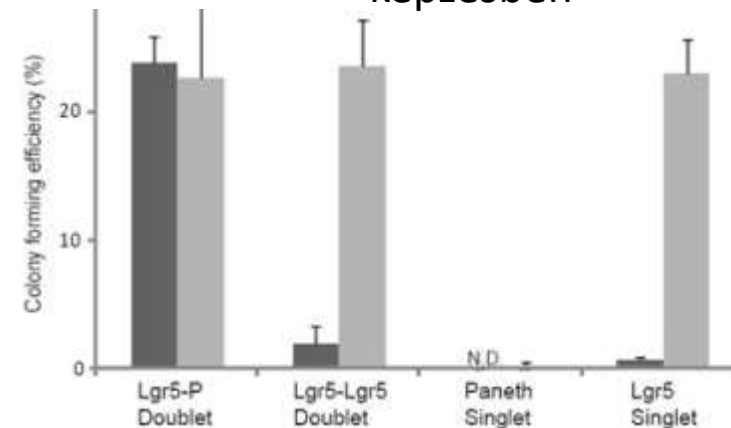
- IL-22, IFN γ szerepe az őssejt niche-ben

Sato T et al, Nature, 2011

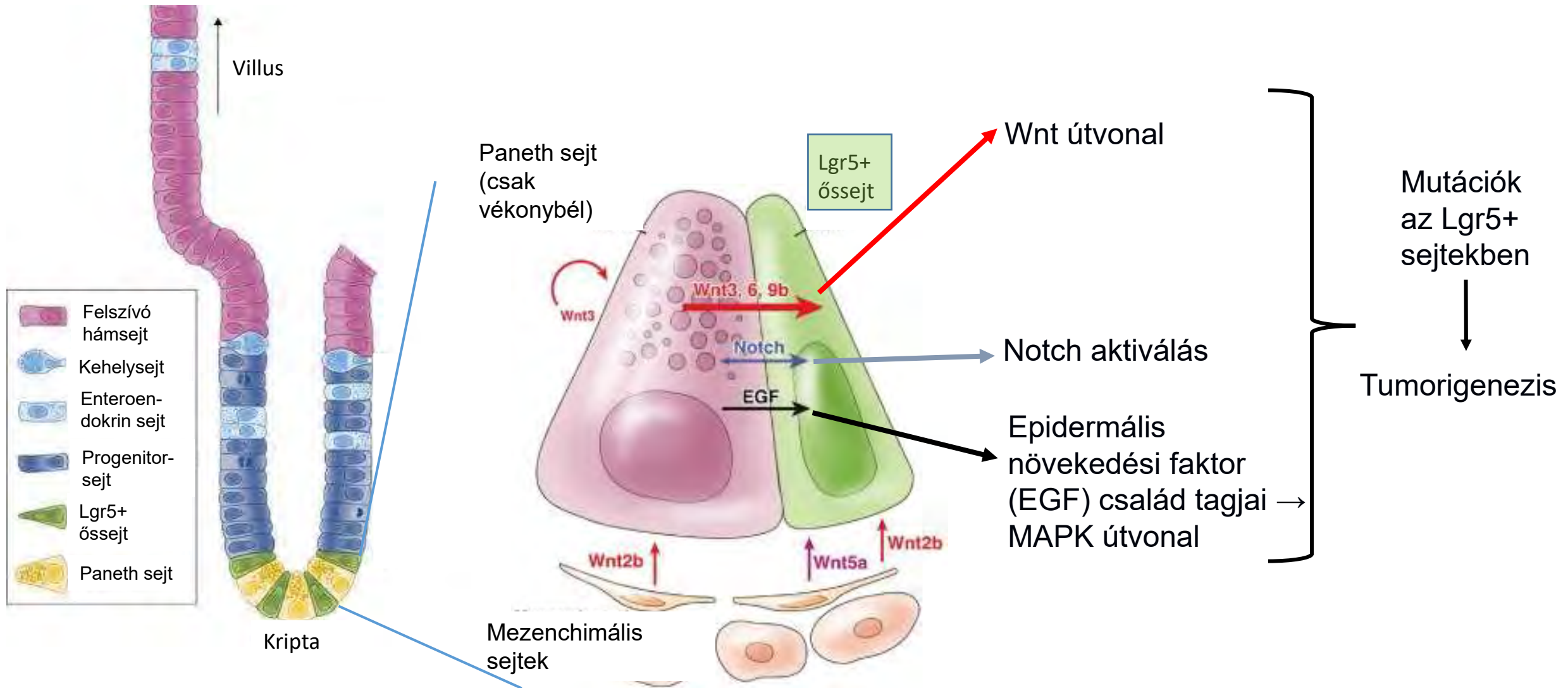
A Wnt szekréció gátlása az őssejt pusztulásához vezet



Lgr5+ őssejt – Paneth sejt dupletek hatékonyak az organoid képzésben

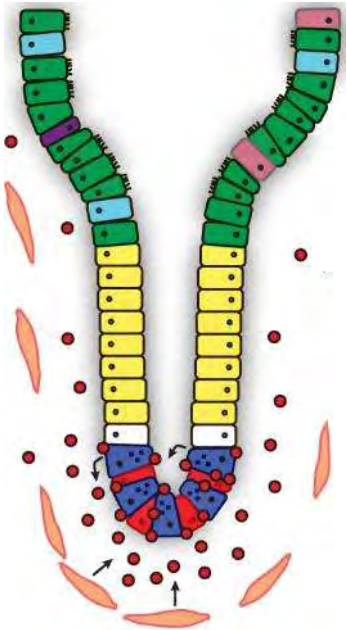


Az intesztinális őssejt niche és az Lgr5+ őssejtek

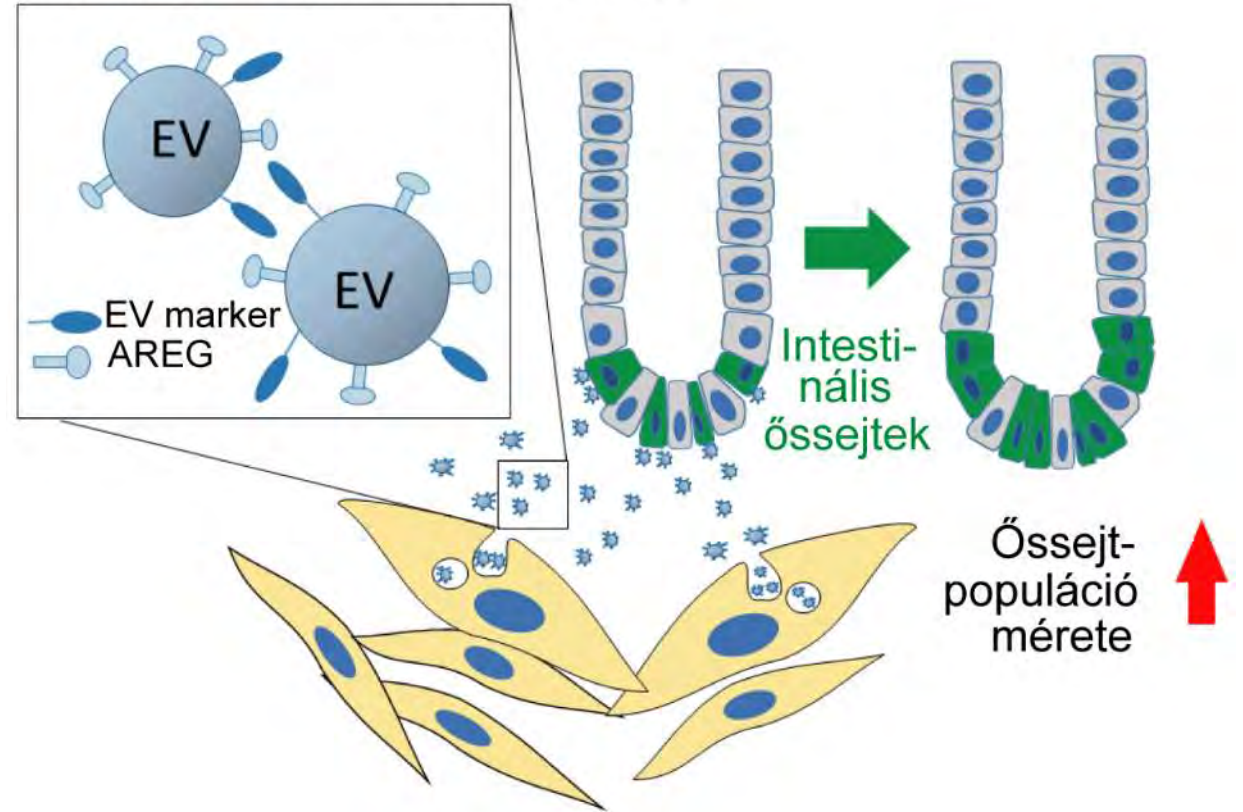


A fibroblaszt EV-k által szállított amfiregulinnak (AREG) központi szerepe van a normál ISC niche-ben

- Lgr5+ bélhám őssejtek: őssejt niche (ISCN)
- **Fibroblasztok által kibocsátott EV-k, mint niche faktorok?**



Az extracelluláris vezikulák (EV) amphiregulint (AREG) szállítanak

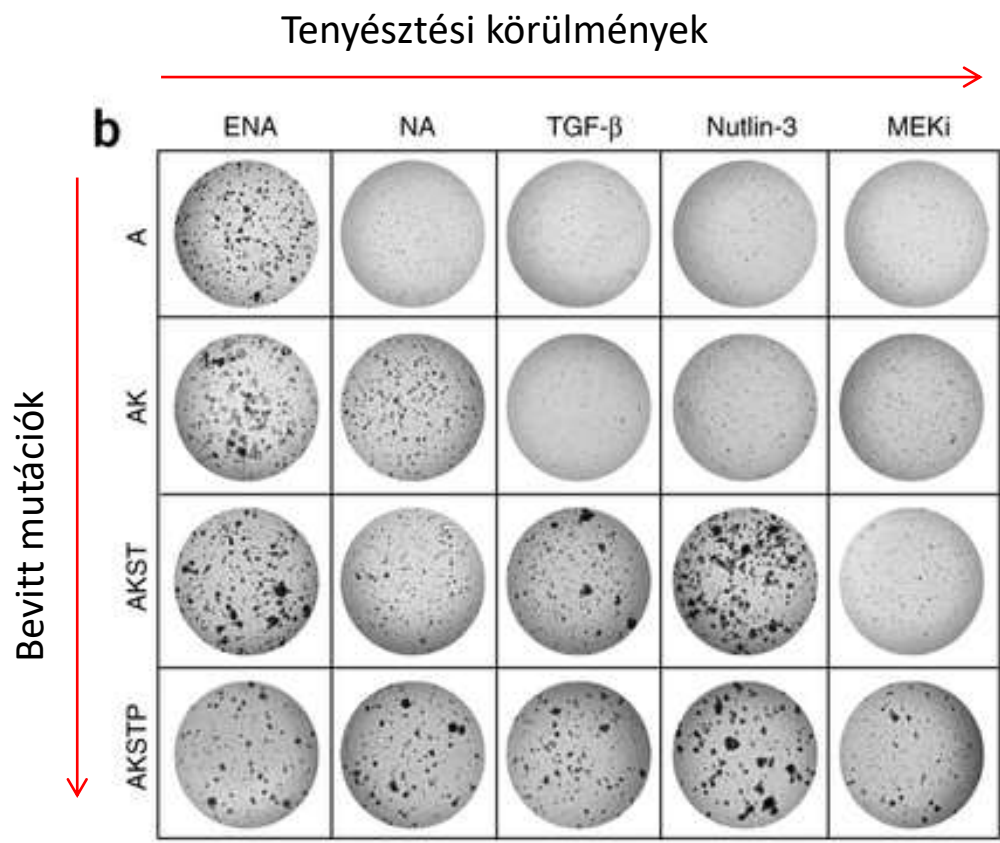
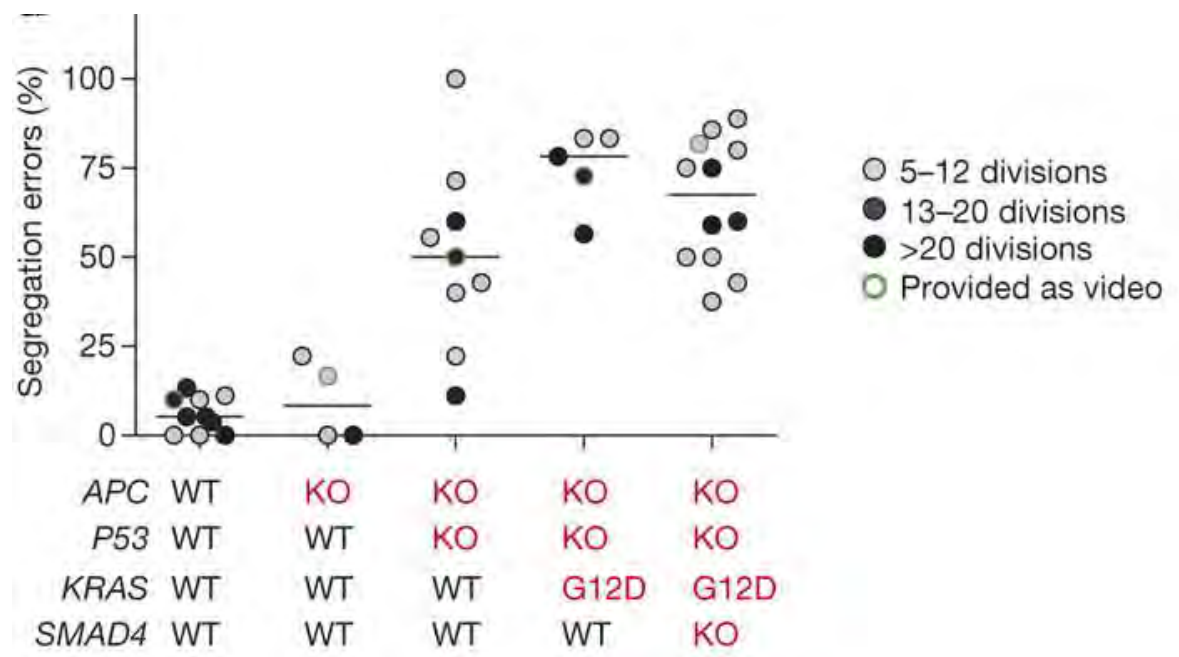


Oszvald Á et al. *Stem Cells*.
2020;38(2):291-310.

Normál intestinális őssejt niche

A vastagbél-tumороk niche függésének és a mikro-környezet modellezése *in vitro* az organoid és a CRISPR-Cas9 technológiák alkalmazásával

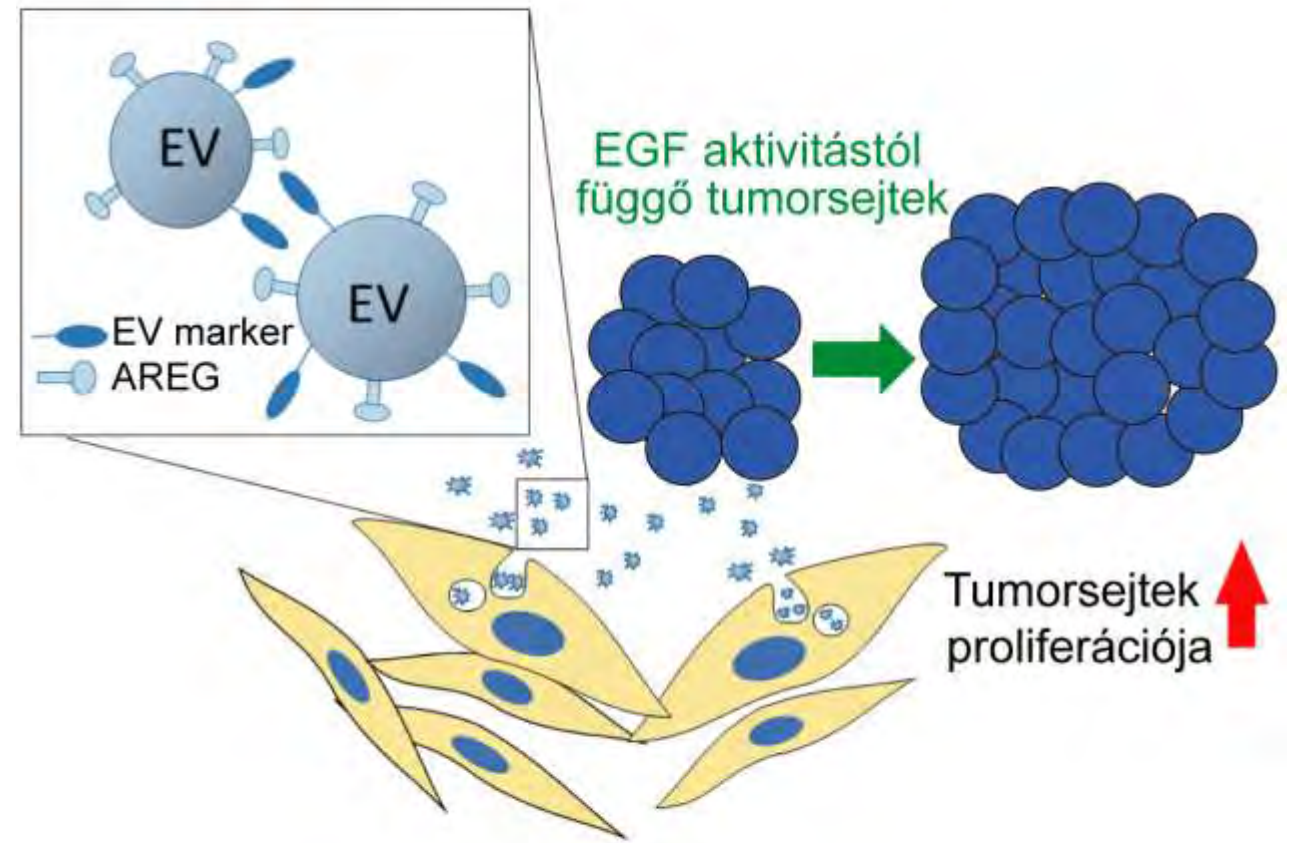
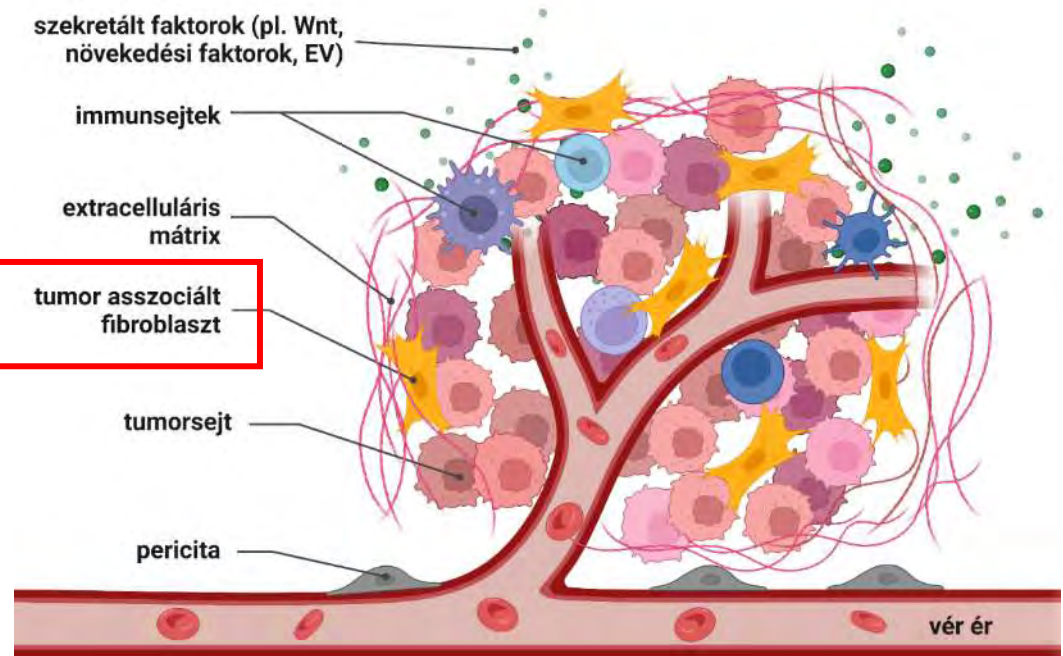
- Colon organoidok genetikai módosítása, mutációk bevitele a CRISPR-Cas9 technológiával



[Drost J et al, Nature 521, 43–47 \(2015\)](#)

[Matano M et al, Nature Medicine 21, 256–262 \(2015\)](#)

A fibroblasztokból származó EV-k a CRC sejtek osztódását indukálják amfiregulin (AREG) szállítása által

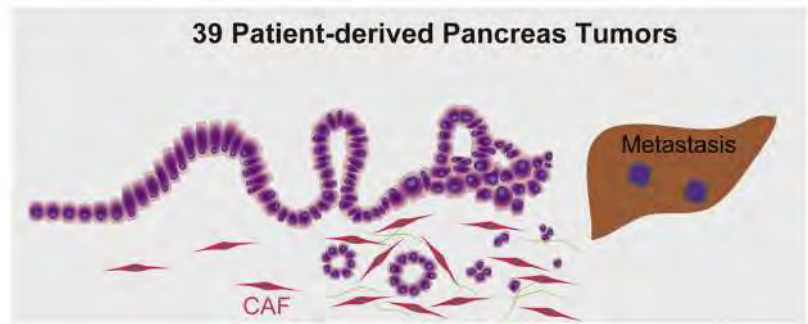


- ✓ A fibroblaszt eredetű EV-k AREG transzportja fontos mechanizmus lehet-e a CRC korai stádiumában?
- ✓ KRAS mutáció megjelenése → a CRC sejtek EGF aktivitástól függetlenek lesznek

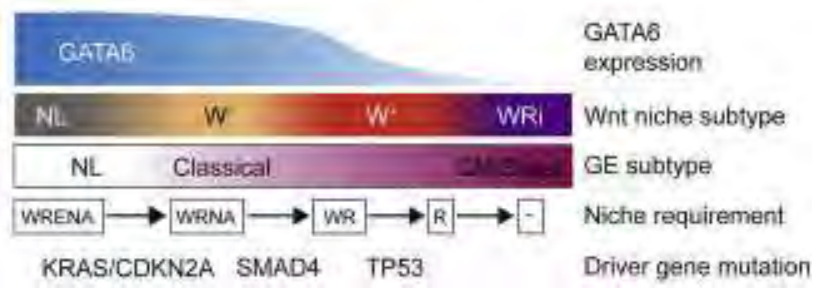
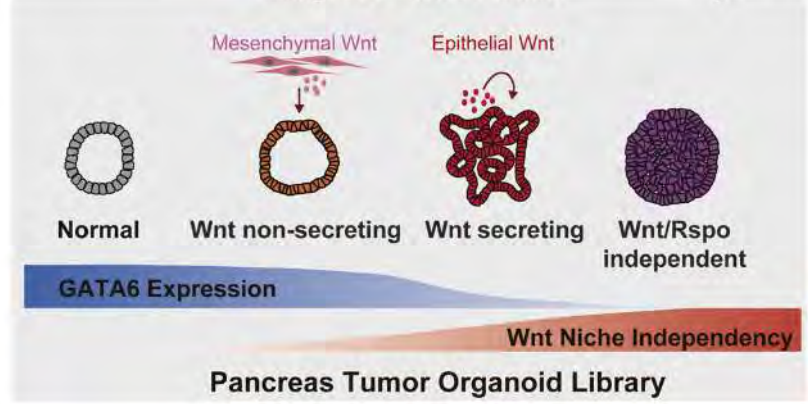
CRC tumorigenezis korai fázisa

Tüdő adenokarcinóma és PDAC: Wnt függés Wnt útvonal mutációk nélkül

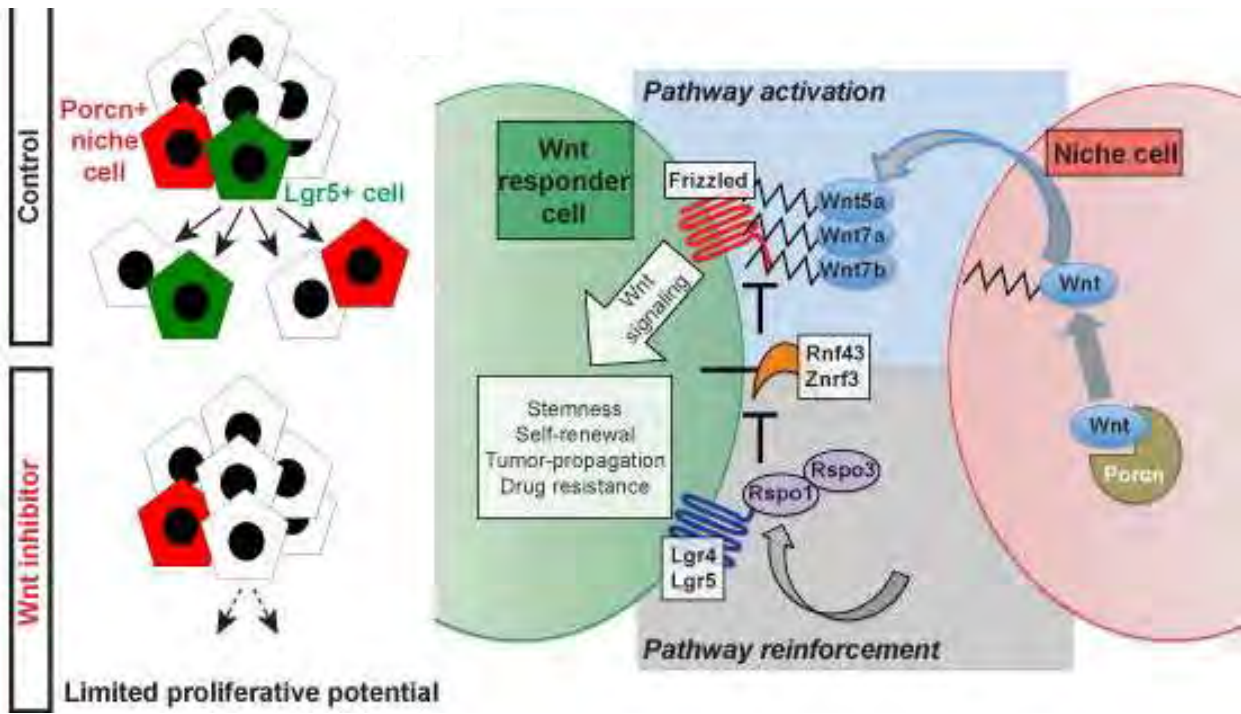
- PDAC: a progresszió során elveszik a külső Wnt függés (Seino T, 2018, Cell Stem Cell)



Malignant Transformation

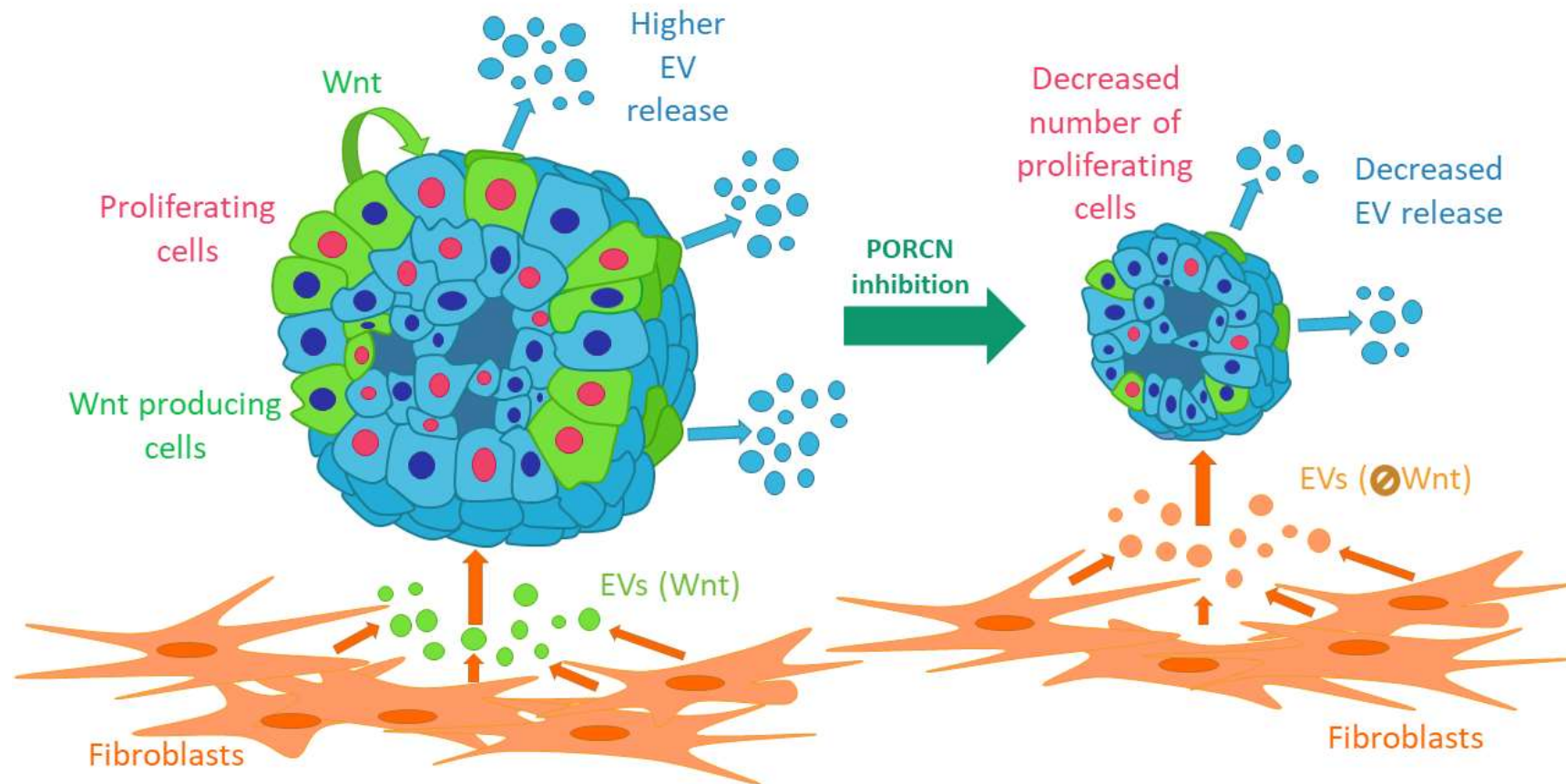


- Tüdő adenokarcinóma
- Wnt termelésre nézve intratumorális heterogenitás (Tammela T, 2017, Nature)
- Niche sejtek és responder sejtek
- Egér modell

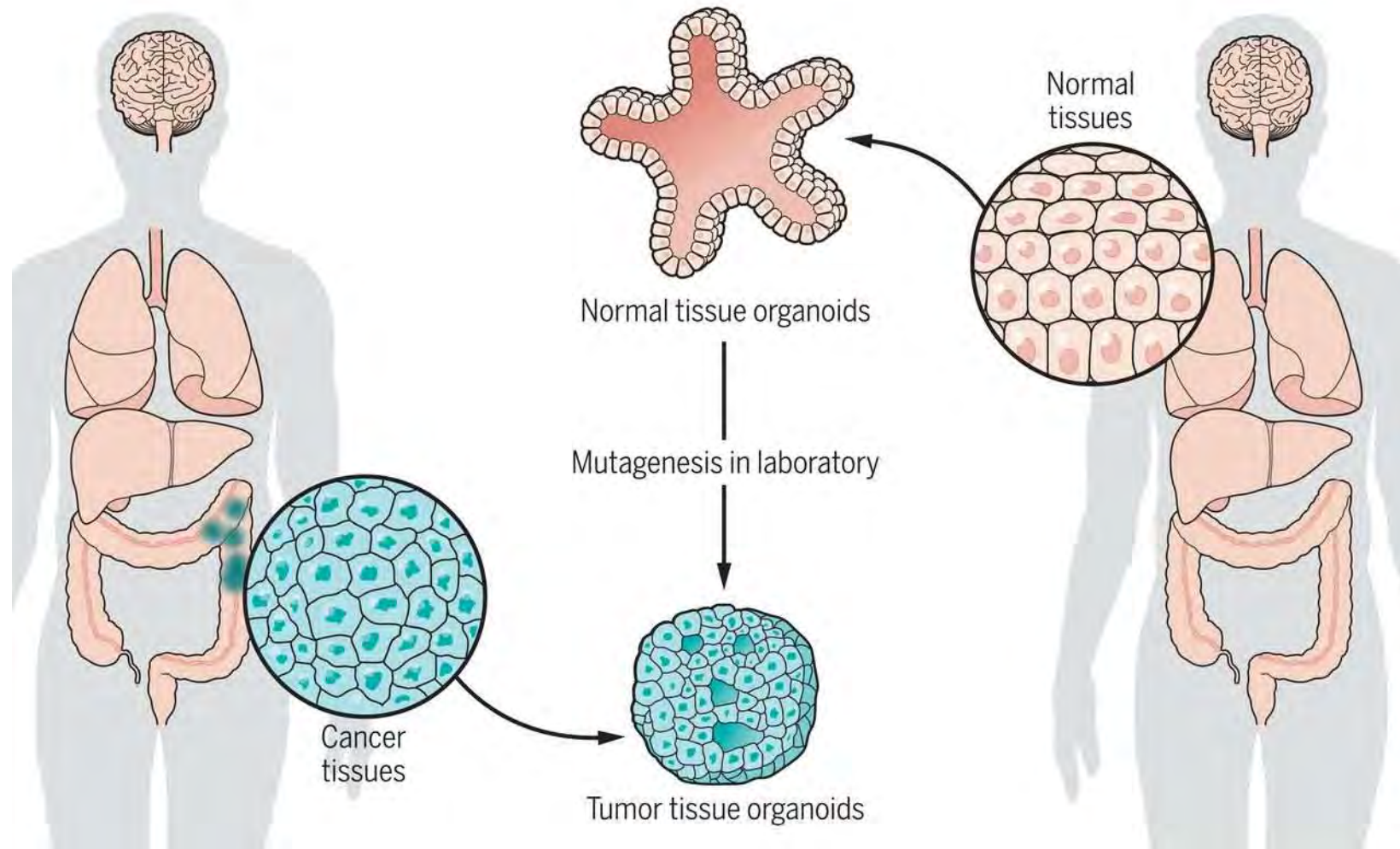


Humán tüdő adenokarcinóma intratumorális sejtes heterogenitása és a mikrokörnyezet szerepe

- Wnt termelésre nézve intratumorális heterogenitás
- A környező fibroblasztok fontos szerepe a Wnt termelésben
- A Wnt részben extracelluláris vezikulákhoz kapcsolva szállítódik



Humán tumor organoid biobankok készítése



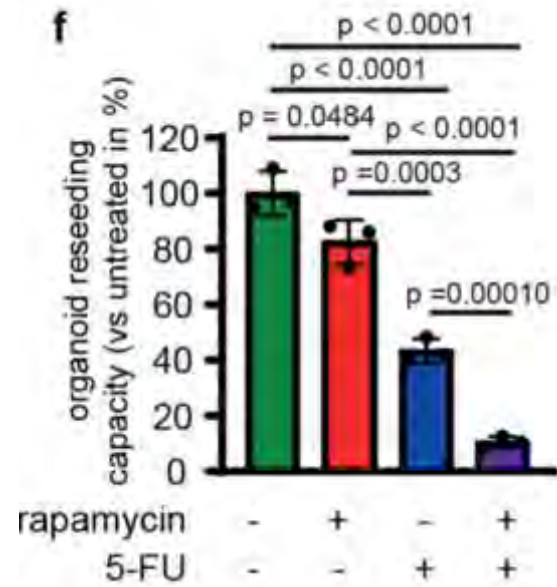
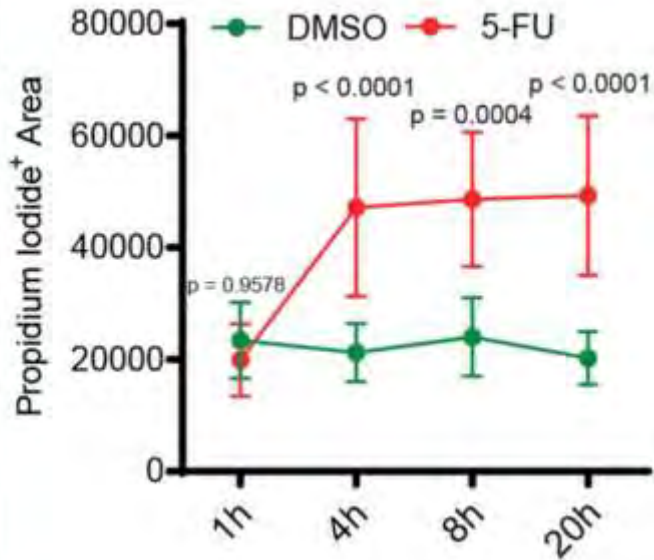
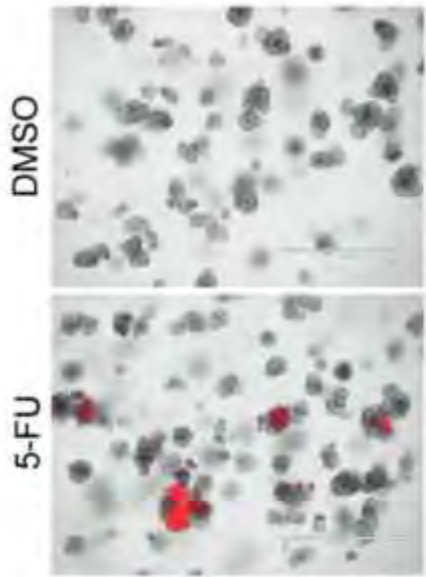
- CRC
- PDAC
- Mellrák
- Tüdőrák
- stb

David Tuveson, and Hans Clevers *Science* 2019;364:952-955

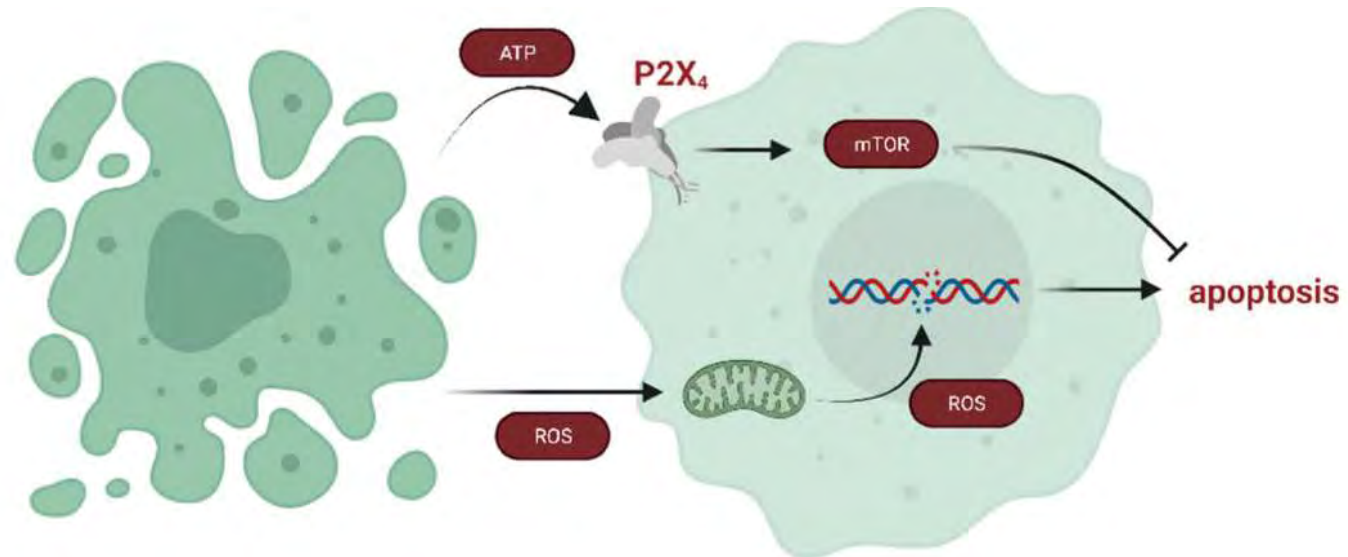
Copyright © 2019 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works

Science
AAAS

Parakrin kommunikáció a CRC sejtek között 5FU kezelés során

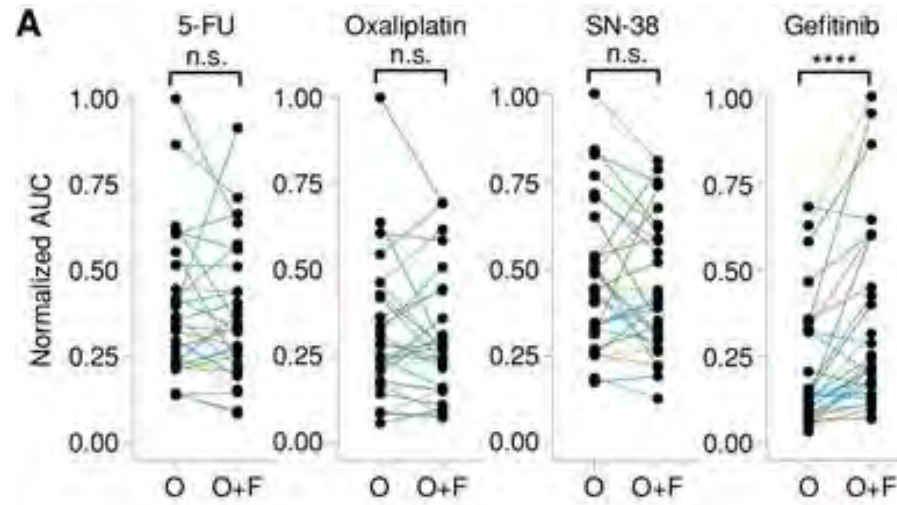
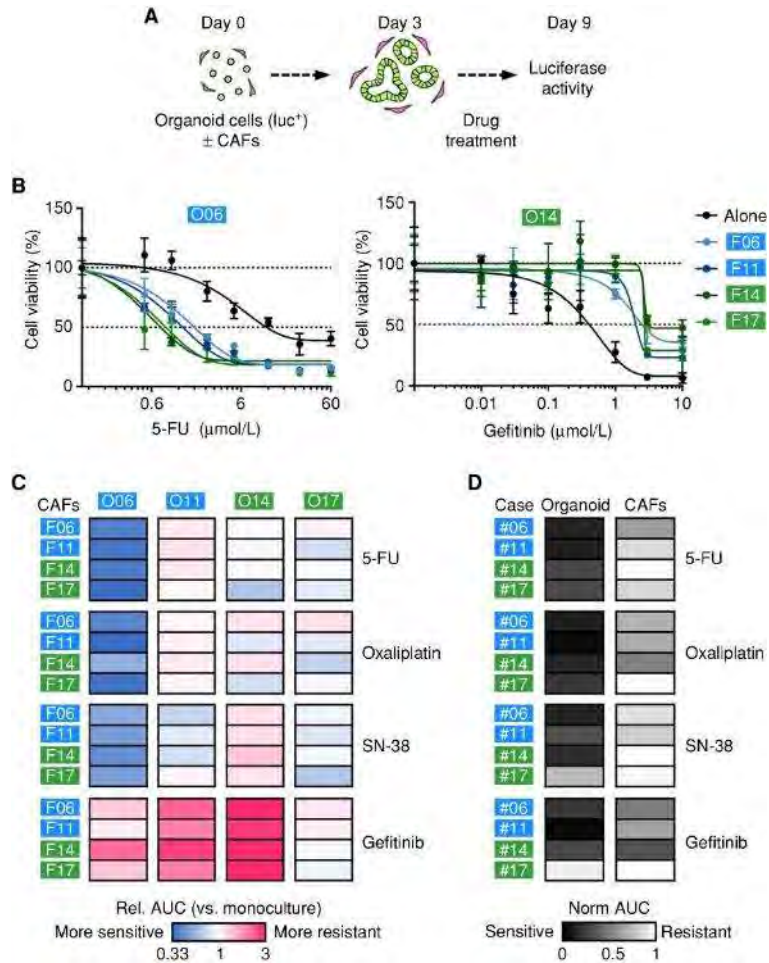


- 5FU-val szembeni rezisztencia a tumorsejtek közötti parakrin kommunikáción alapul
- mTOR útvonal gátlásának fontossága (Schmitt M, 2022, Nature)



Organoid és strómasejtek biobankja CRC-ben

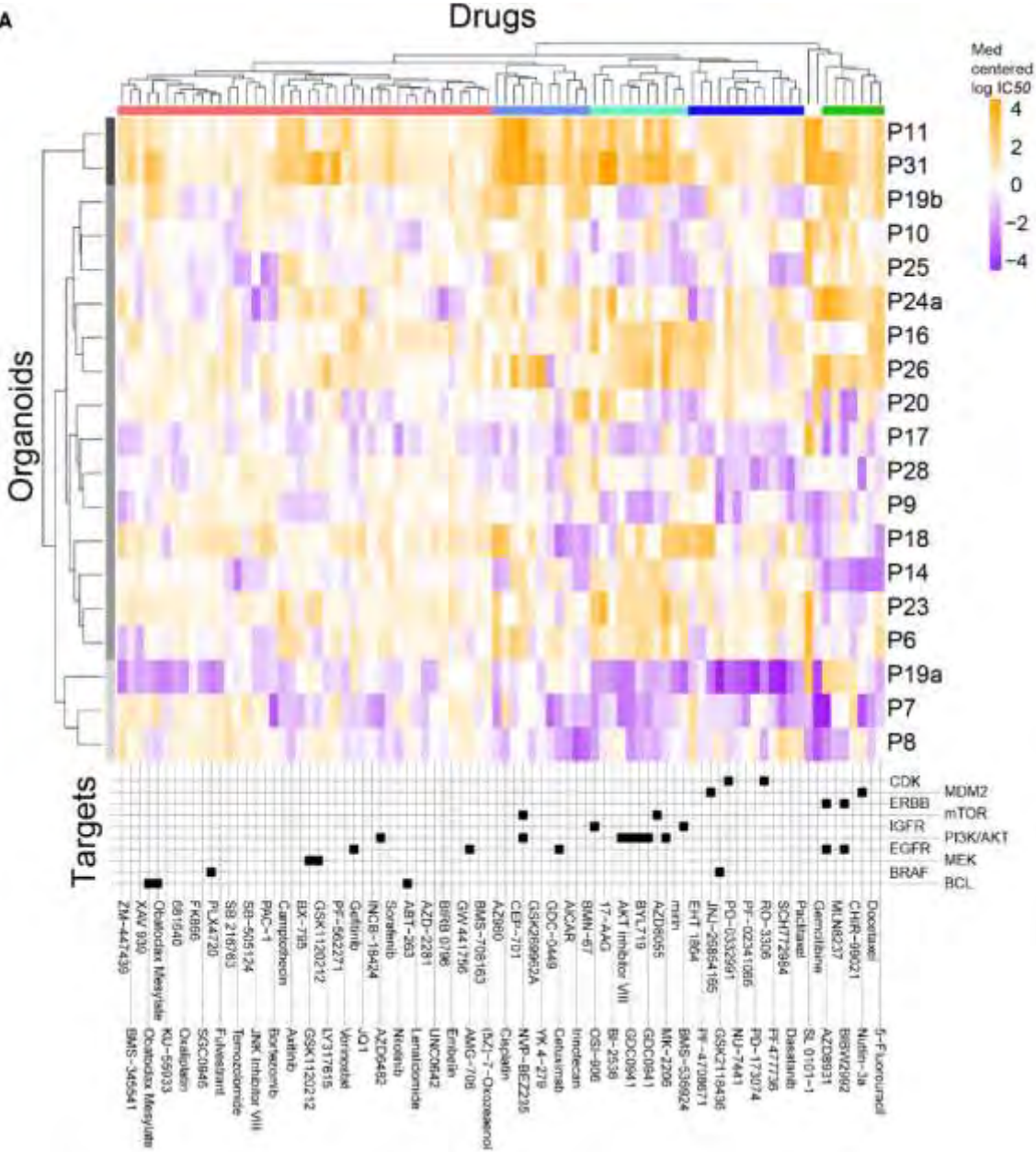
Farin HF et al. Cancer Discov. 2023 Oct 5;13(10):2192-2211.



- Gefitinibbel szemben általános rezisztencia
- A többi hatóanyagnál változatos különbségek

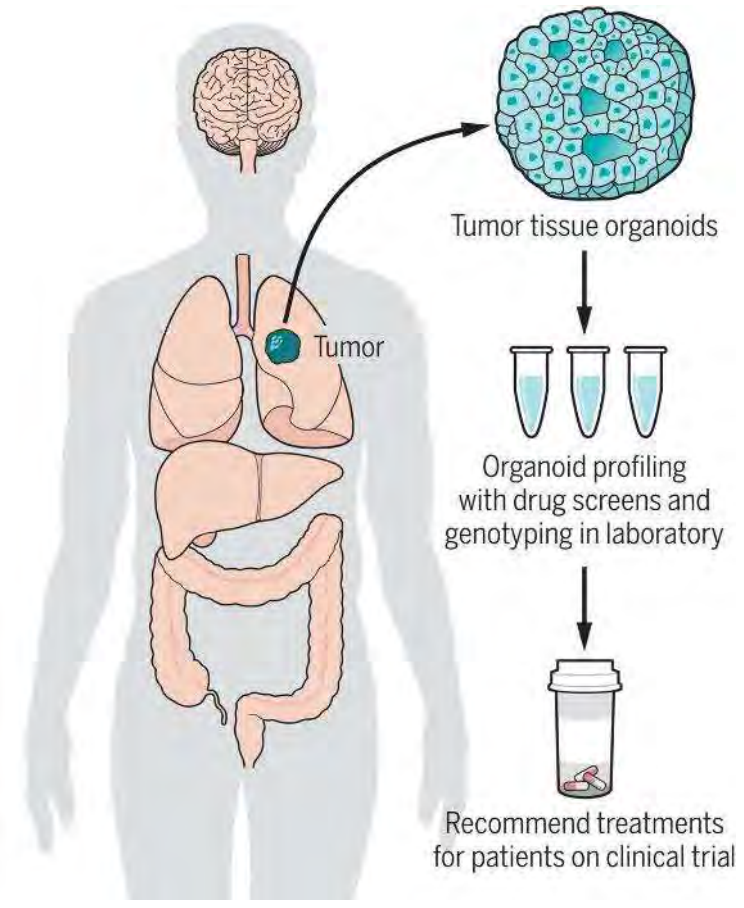
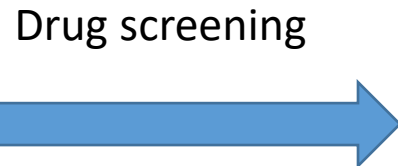
- A fibroblasztok származása nem befolyásol
- A fibroblasztok kevésbé szenzitívek

Példa az organoid technológia használatára a személyre szabott medicinában I – colorectális tumor



van de Wetering M et al. [Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients.](#) Cell. 2015 May 7;161(4):933-45.

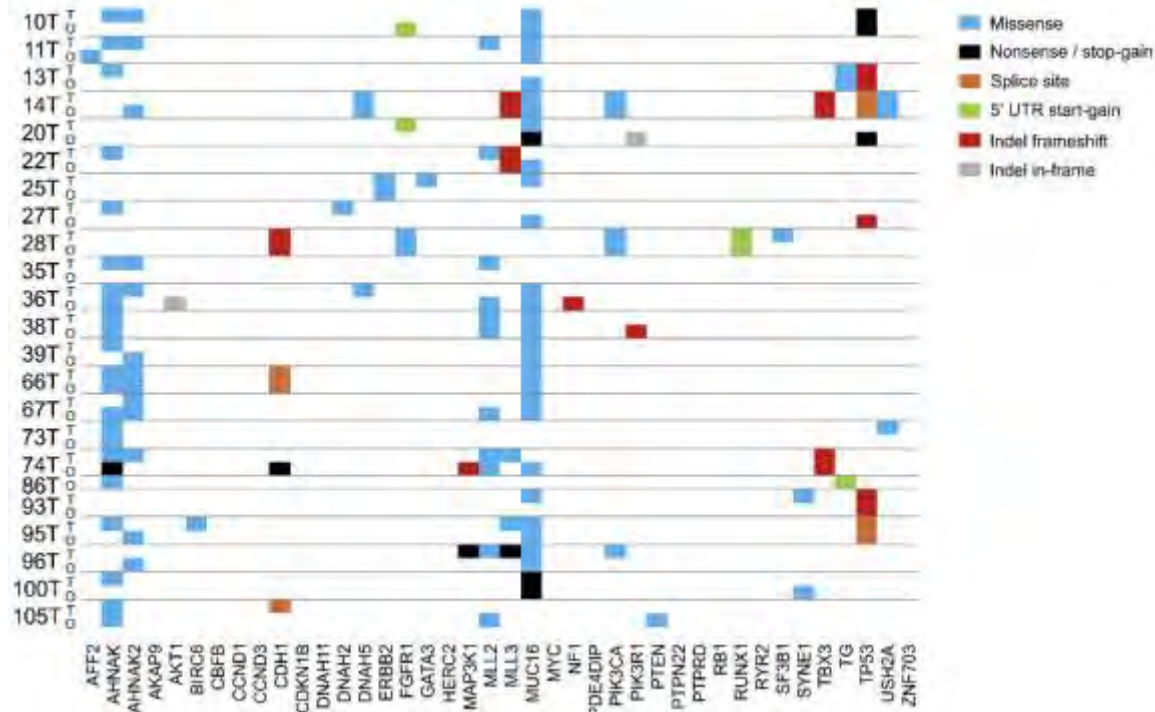
Cell. 2015 May 7;161(4):933-45.



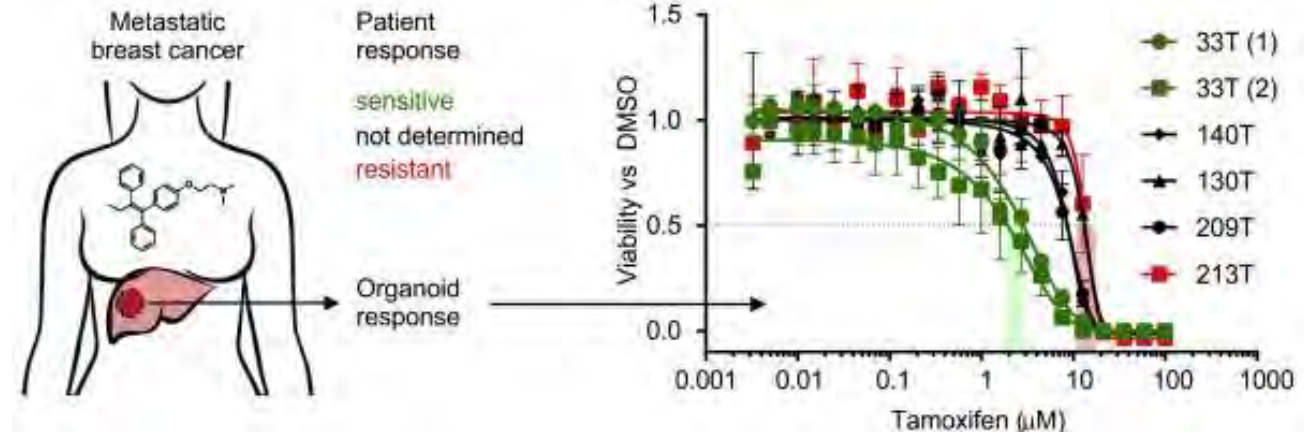
David Tuveson, and Hans Clevers Science 2019;364:952-955

Példa az organoid technológia használatára a személyre szabott medicinában II - mellrák

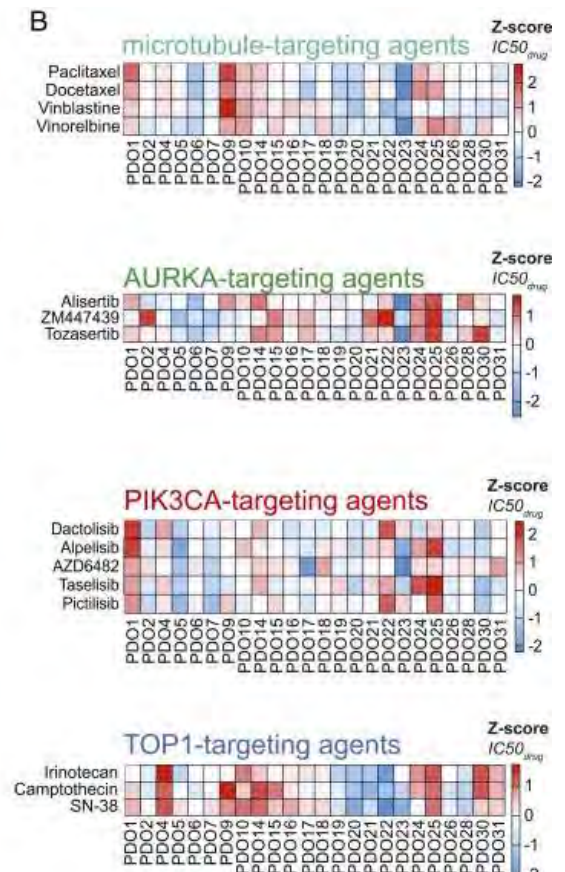
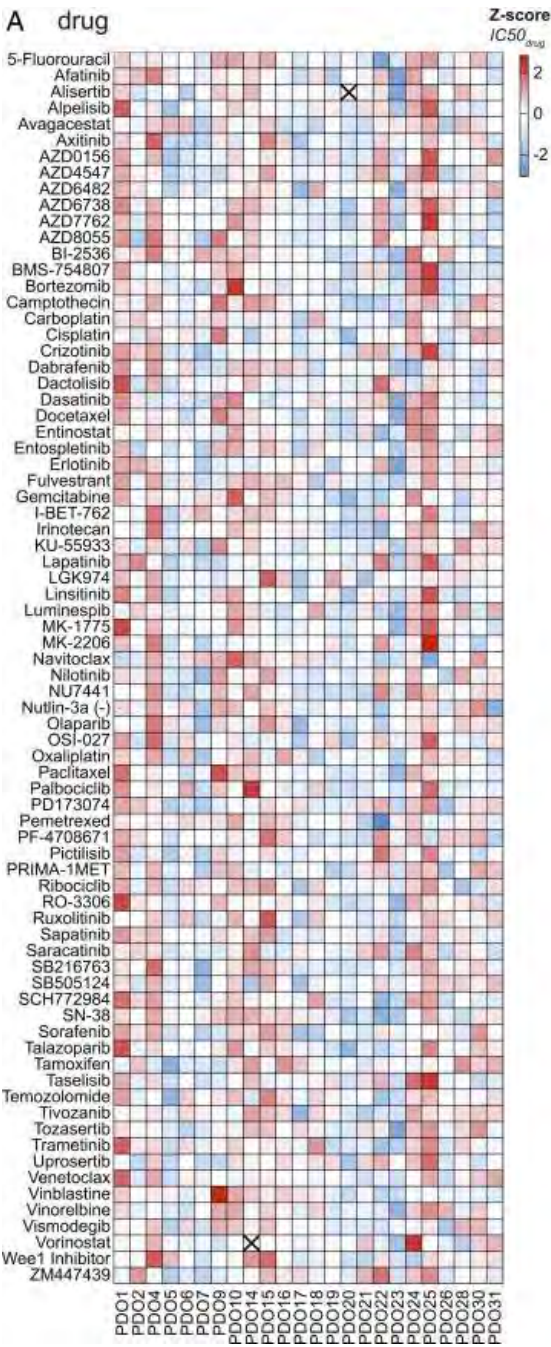
Mutációk jelenléte és típusa megegyezik az adott beteg tumorszövetében és az organoidokban



A tamoxifen hatása betegeknél és organoidokban



Példa az organoid technológia használatára a személyre szabott medicinában III - PDAC



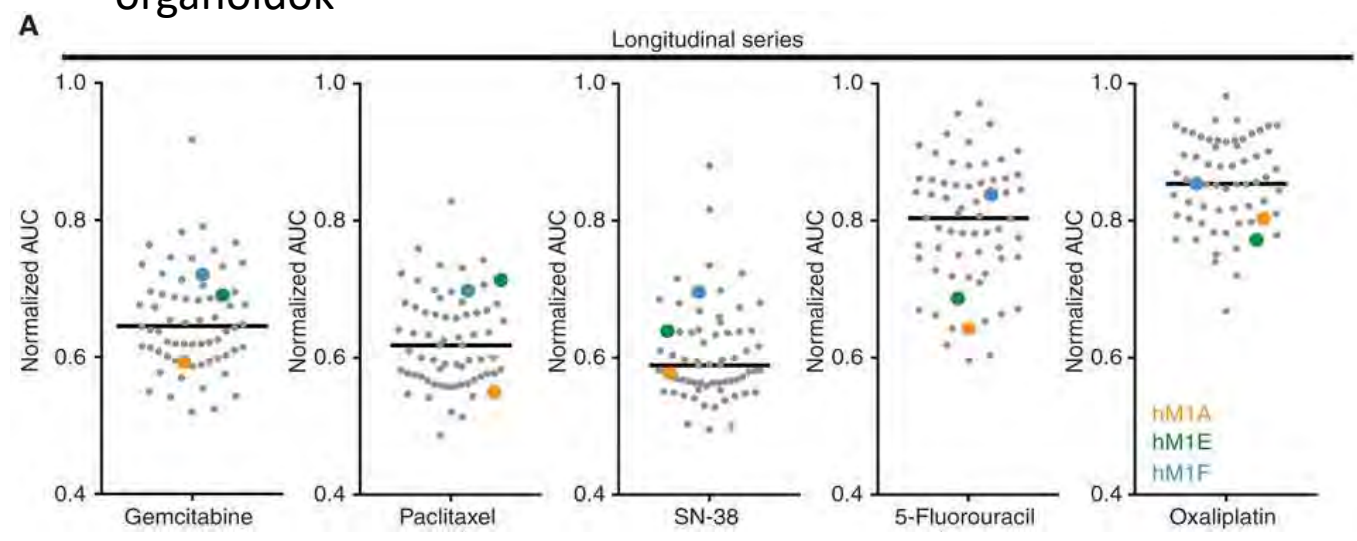
A PDO-k (betegből származó organoidok) kemoterápiás szenzitivitása

Driehuis E et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116:26580-90.



Az organoidok jelzik a betegek reakcióját

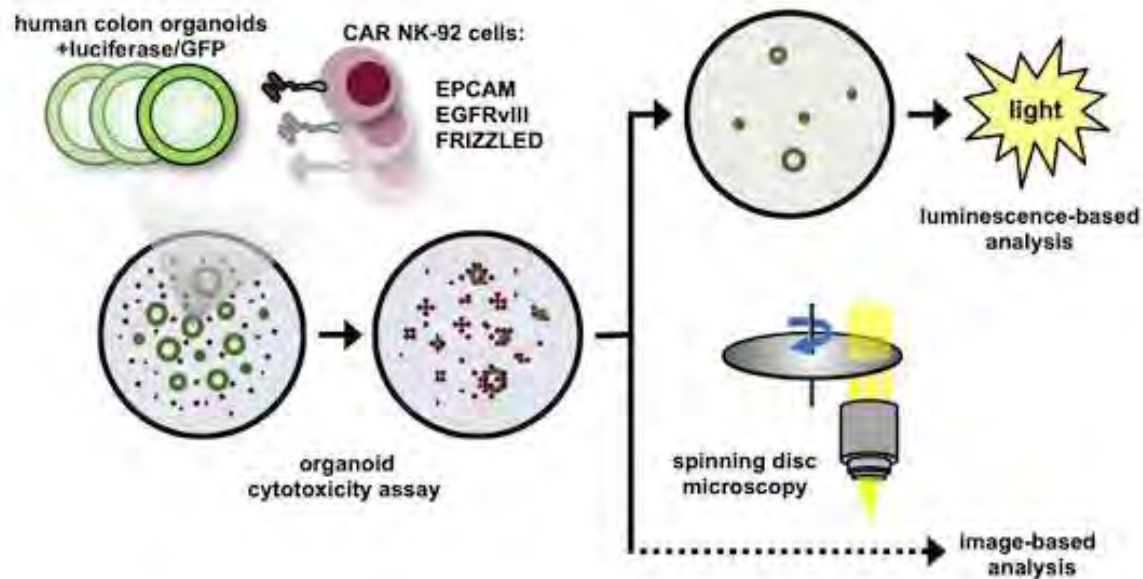
- Ugyanazon betegből különböző időpontokban kivett organoidok



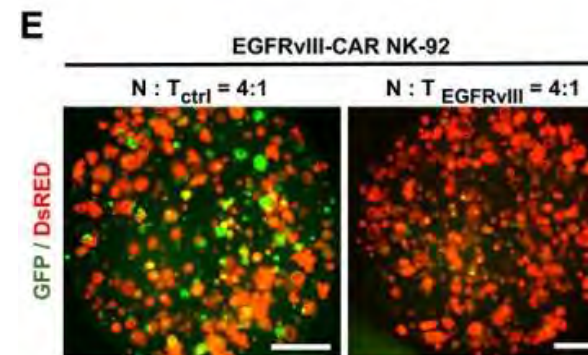
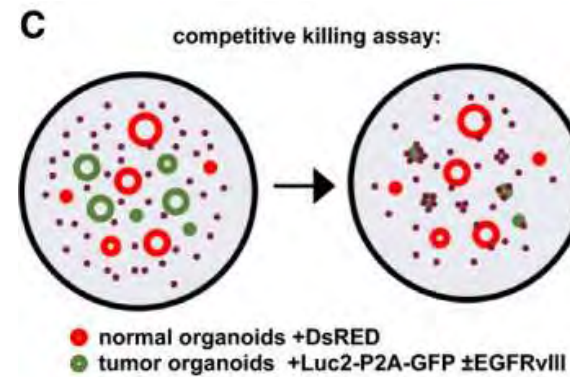
- Ugyanazon különböző metasztázisaiból kivett organoidok: eltérő rezisztencia profil

Példa az organoid technológia használatára –ko-kultúra CAR (chimeric antigen receptor) limfocitákkal

Organoid citotoxicitási teszt lumineszcencia és mikroszkópos elemzés alapján

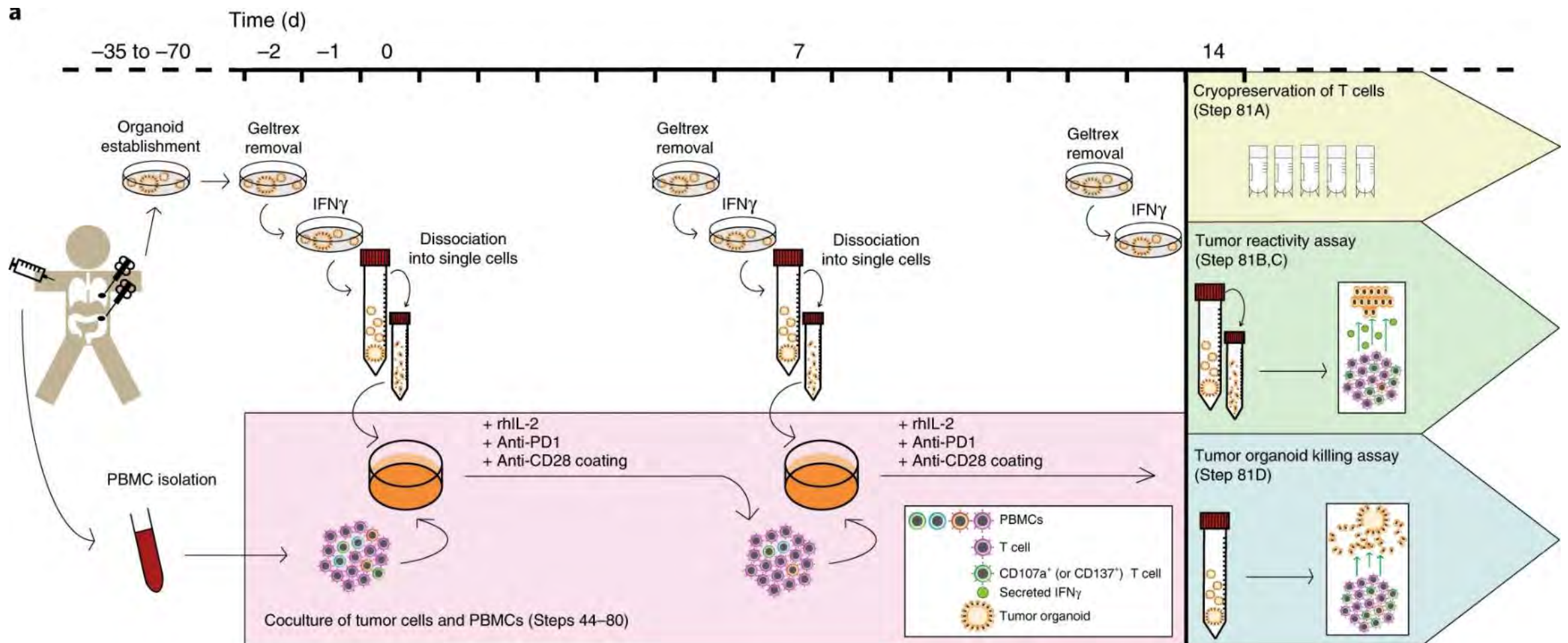


Kompetitív killing teszt



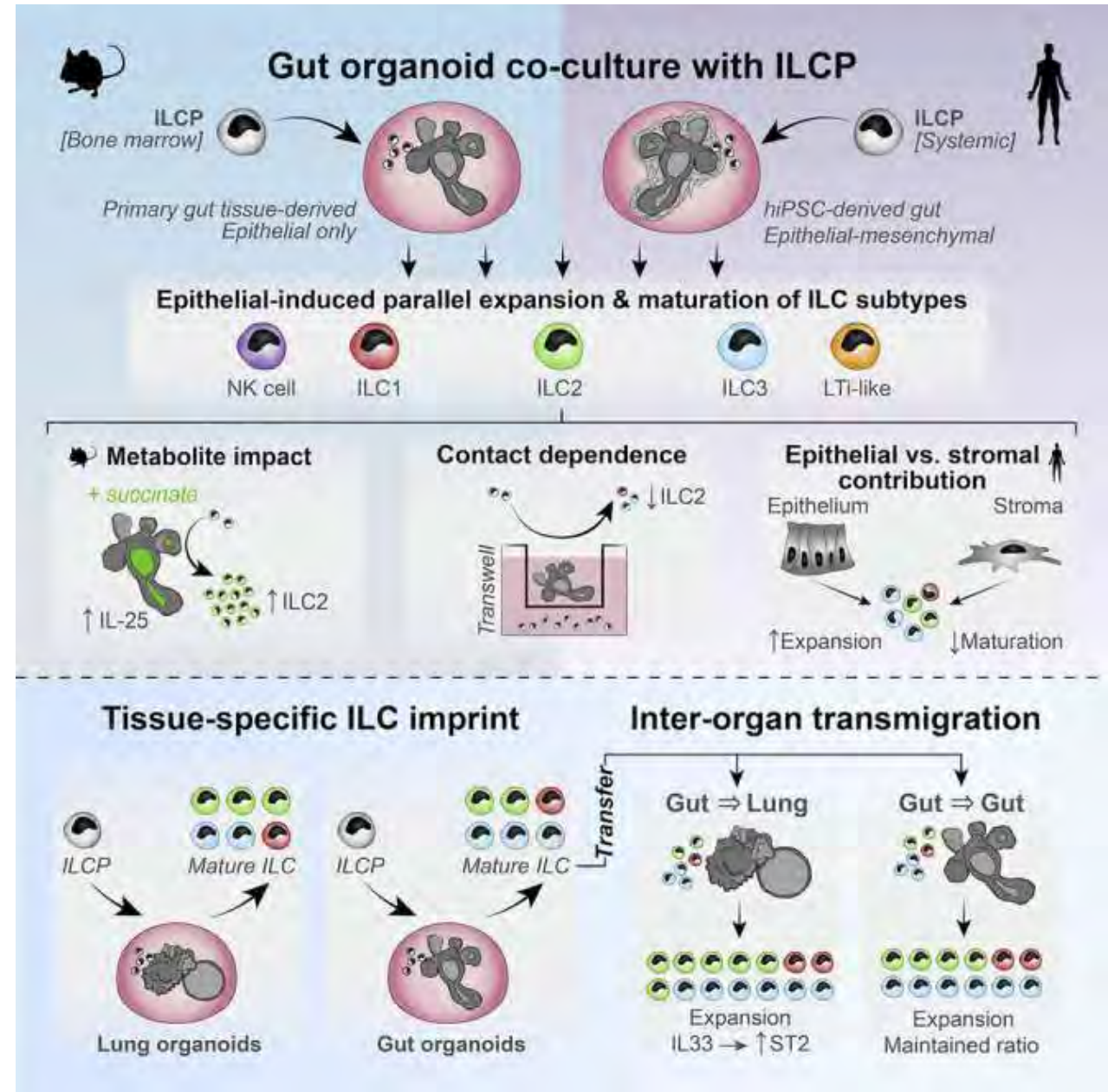
Példa az organoid technológia használatára – tumorsejtekre specifikus T-sejtek szelekciója organoidok segítségével

Perifériás vérből mononukleáris sejtek (PBMC) és ugyanazon betegből tumor organoidok ko-kultúrája

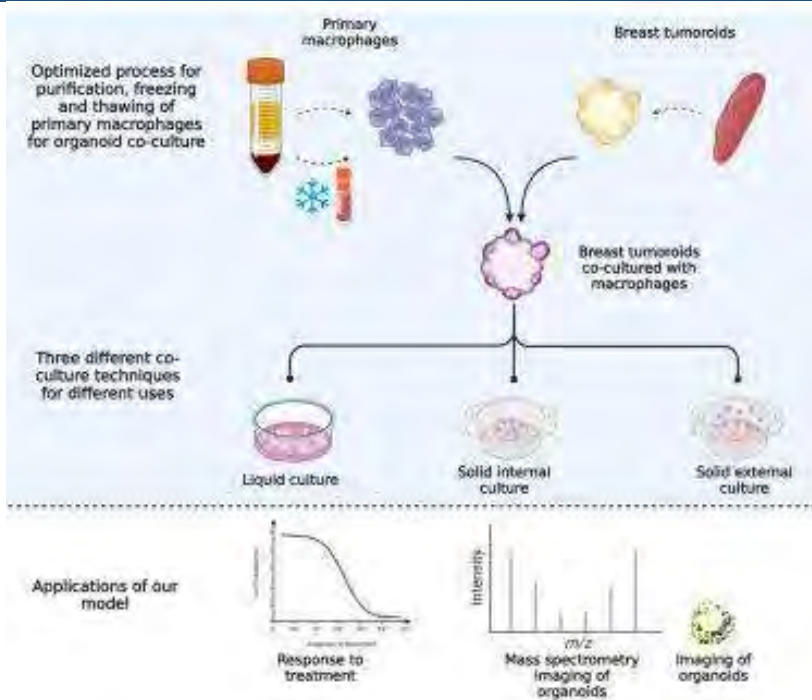


Az innate lymphoid sejtek (ILC) alcsoportjainak kialakulása

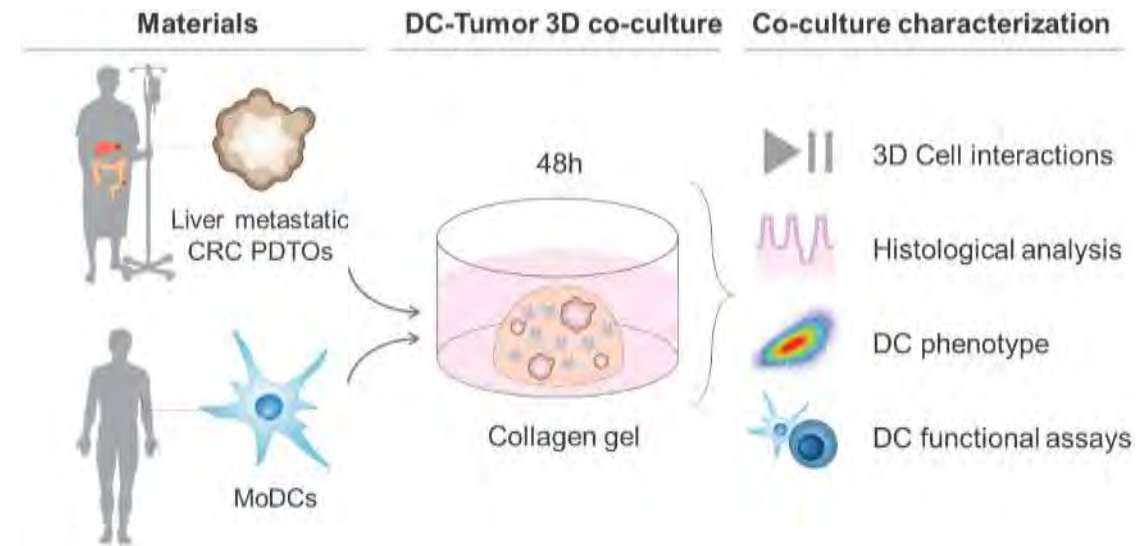
- Az egyes ILC altípusok kialakulása függ az epitéllel való közvetlen kapcsolattól, illetve a mikrokönyezettől



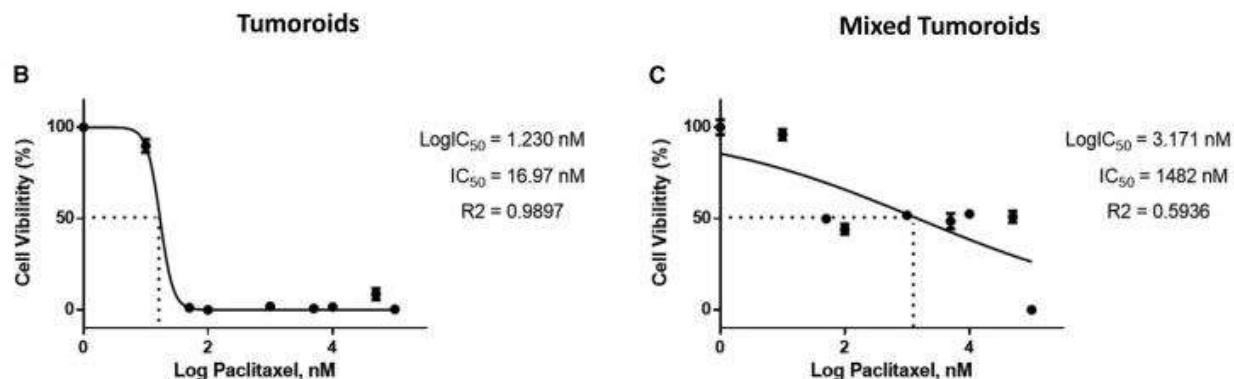
A tumorsejtek és az immunsejtek közötti interakció modellezése –makrofágok és dendritikus sejtek



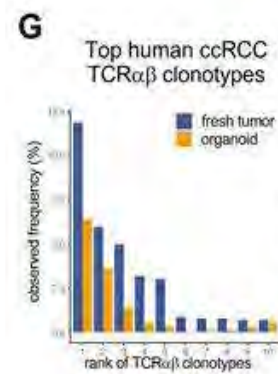
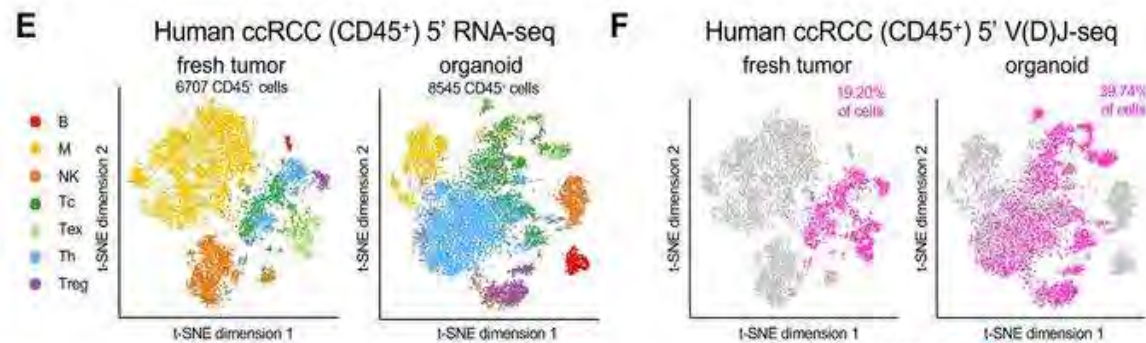
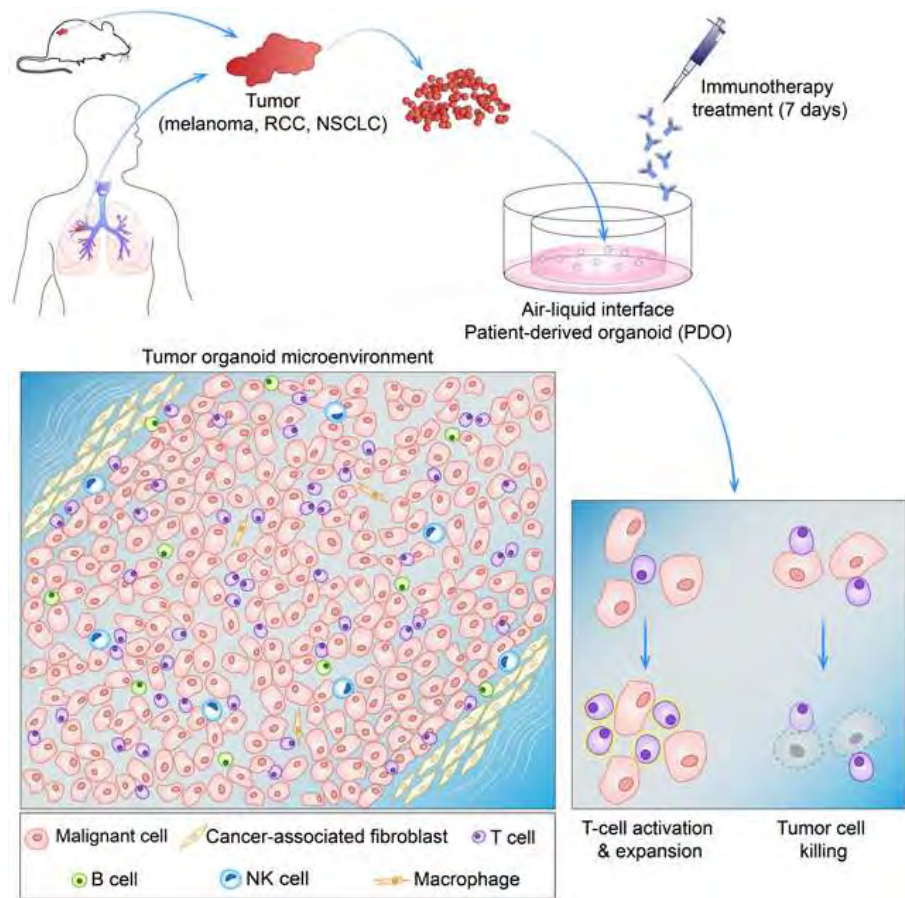
- 3 eltérő ko-kultúra összehasonlítása
- HLA-DR expresszió, makrofág funkció
- Makrofágok jelenléte rezisztenciát biztosíthat



- DC-k funkcionalitása megmarad 3D kokultúrában
- DC-k felveszik a tumorsejt fragmentumokat
- Ko-kultúrából való izolálásuk után a DC-k megtartják jellegzetességeiket

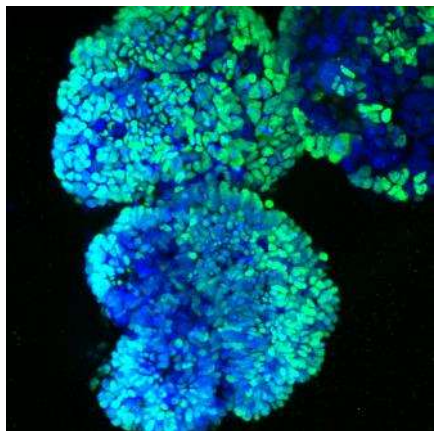


Air-liquid interface tenyészetek alkalmazása a komplex tumor mikro környezet modellezésére



- A tumor modellezése a komplex mikro környezetével együtt
- A különböző immunsejt populációk megléte (a makrofágok arányában eltérés)
- A TCR klonotípus összetétele megmarad
- A legnagyobb TCR klónok azonosak

Köszönöm a figyelmet!



Molekuláris Onkobiológiai
Kutatócsoport, SE

Dr. Kelemen Andrea
Dr. Zeöld Anikó
Dr. Soós András Áron
Dr. Idan Carmi
Dr. Szvicsek Zsuzsanna
Dr. Sándor Gyögyvér Orsolya
Dr. Oszvald Ádám
Orosz Adrián
Szász Regina
Kormány Réka
Dr. Hajdó Szabolcs

Uzsoki Kórház

Prof. Bursics Attila
Dr. Dede Kristóf
Dr. Tölgyes Tamás

Sebészeti, Transzplantációs és
Gasztroenterológiai Klinika, SE

Dr. Szűcs Ákos
Dr. Benke Márton

TKP2021-EGA-24

HURIZONT



NKFIH OTKA 137554