

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem

**A nyelvőcső iontranszport rendszerének vizsgálata egér
nyelvőcső 3D organoid modell használatával**

Ph.D. értekezés

Korsós Marietta Margaréta



Témavezető:

Venglovecz Viktória Ph.D., D.Sc.

Gasztroenterológiai epitélisejt kutatócsoport
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem

2023

PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés alapját képező tudományos közlemények listája

1. Marietta Margaréta Korsós, Tamás Bellák, Eszter Becskeházi, Eleonóra Gál, Zoltán Veréb, Péter Hegyi, Viktória Venglovecz. Mouse organoid culture is a suitable model to study esophageal ion transport mechanisms. AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY – CELL PHYSIOLOGY; 321(5):C798-C811. doi: 10.1152/ajpcell.00295.2021. PMID: 34524930. (2021)

IF₂₀₂₁: 5.282 (Q1)

2. Eszter Becskeházi, Marietta Margaréta Korsós, Eleonóra Gál, Tizslavicz L, Hoyk Z, Deli MA, Zoltán Márton Köhler, Anikó Keller-Pintér, Attila Horváth, Kata Csekő, Zsuzsanna Helyes, Péter Hegyi, Viktória Venglovecz. Inhibition of NHE-1 Increases Smoke-Induced Proliferative Activity of Barrett's Esophageal Cell Line. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES; 22(19):10581. doi: 10.3390/ijms221910581. PMID: 34638919; PMCID: PMC8509038. (2021)

IF₂₀₂₁: 6.208 (Q2)

Az értekezés témájához kapcsolódó egyéb tudományos közlemények listája

3. Eszter Becskeházi*, **Marietta Margaréta Korsós***, Bálint Erőss, Péter Hegyi, Viktória Venglovecz. OEsophageal Ion Transport Mechanisms and Significance Under Pathological Conditions. FRONTIERS IN PHYSIOLOGY; 11:855. doi: 10.3389/fphys.2020.00855. PMID: 32765303; PMCID: PMC7379034. (2020)

IF₂₀₂₀: 4.566 (Q2)

*megosztott elsőszerző

Teljes publikációk száma: 3 (2 első szerző)

Publikációk kumulatív impakt faktora: 16,056

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

[Ca²⁺]_i	intracelluláris kalciumion koncentráció
[Cl⁻]_i	intracelluláris kloridion koncentráció
2D	2-dimenzionális
3D	3-dimenzionális
BCECF-AM	2.7-bisz-2-karboxietil-5-(és-6-)karboxifluoreszcein acetoximetil észter
BE	Barrett-nyelőcső
CBE	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ -kicserélő
cDNA	komplementer dezoxiribonukleinsav
CFTR	cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor
CK14	citokeratin 14
DRA	protein Down-regulated in adenoma (Slc26a3)
EAC	nyelőcső adenokarcinóma
EECs	nyelőcső epitélsejt
FACS	fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás
GERD	gastrooesophagealis refluxbetegség
HEPES	2-[4-(hidroxietil)-1-piperazinil]-etánszulfonsav
Hepes	HEPES-pufferelt oldat (munkacsoportunk által használt oldat)
HOE-642	cariporide, szelektív Na ⁺ /H ⁺ kicserélő inhibitor
IHC	immunohisztokémia
iPCS	indukált pluripotens őssejt
LGR5	leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
MQAE	N-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinolinium bromid
mRNA	messenger ribonukleinsav
NBC	Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ kotranszporter
NHE	Na ⁺ /H ⁺ kicserélő
PAT1	putatív anion transzporter 1 (Slc26a6)
PCR	polimeráz lánreakció
PFA	paraformaldehid
pH_i	intracelluláris pH
RT-PCR	reverz transzkripció-kapcsolt PCR

1. BEVEZETÉS

A nyelőcsövet a lumen felől többrétegű laphám borítja, az ezt felépítő epitél sejtek polarizáltak és egymáshoz szorosan kapcsolódnak. Míg a nyelőcső általános szerkezete hasonló az emberben és a rágcsálókban, az epitélium sejtes összetétele fajoként változik. Az epitél réteg fontos védő funkciót tölt be, azáltal, hogy védi az alsóbb rétegeket a mechanikai és vegyi sérülésektől. Az epiteliális rezisztencia számos strukturális és funkcionális mechanizmussal rendelkezik, melynek egyik fontos résztvevői az iontranszport fehérjék. Ezek megtalálhatóak a nyelőcső epitél sejtek apikális és bazolaterális oldalán, ahol szabályozzák az ionmozgásokat a sejtmembránon keresztül, és így segítenek fenntartani a sejtek homeosztázisát, így végsősoron az epitél réteg integritását. Eddig számos tanulmány azonosított iontranszport fehérjéket a nyelőcső epitél sejteken, direkt vagy indirekt módszerekkel, ezek az amilorid-szenzitív Na^+/H^+ kicserélő (NHE); a Na^+ -függő és a Na^+ -független $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő (CBE); a Ca^{2+} -függő Cl^- csatorna (CaCC); és a $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ kotranszporter 1 (NKCC1).

A nyelőcső epitélium nem kifejezetten szekretáló epitélium, illetve más epitéliumhoz viszonyítva kevés szakirodalom áll rendelkezésre az iontranszporterek szerepéről ezekben a sejtekben. Jelenleg különböző kísérleti modellek állnak rendelkezésre az iontranszport rendszer vizsgálatára a nyelőcsőben, de a legtöbbjüknek számos korlátja van, amelyek befolyásolhatják a kísérleti eredményeket. Ezek közül a háromdimenziós (3D) *in vitro* sejt- és szövetkultúrák a legkorszerűbb modellek. Az önszerveződő organoidok olyan 3D modellek, amelyeket tenyésztünk indukált pluripotens őssejtekből (iPSC) vagy felnőtt őssejtekből. Számos fajból - köztük human mintából -, és szövetből lehetővé vált az organoidok előállítása. Az organoidok számos előnnyel rendelkeznek a hagyományos 2D sejttenyészetekkel és kísérletes állatmodellekkel szemben, és korlátaik ellenére fontos eszközzé váltak a preklinikai- és alap kutatásoknak egyaránt.

Epitél organoidokat az emésztőrendszer számos szövetéből állították már elő, viszont kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésre a nyelőcső organoidokról. Néhány tanulmányban használtak nyelőcső organoidokat a nyelőcső fejlődésbiológiai kérdéseinek tisztázására, illetve a nyelőcsövet érintő betegségek tanulmányozására; viszont jelenleg nincs irodalmi adat, hogy kifejezetten az iontranszport rendszer vizsgálatára nyelőcső organoidokat használtak.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. számú publikáció:

Célunk azon a hipotézisen alapult, hogy a nyelőcső organoidok megfelelő *in vitro* modellek a nyelőcső epitél sejtek ion transzportrendszerének molekuláris és funkcionális szempontból történő vizsgálatához. Elsődleges célunk az volt, hogy két, széleskörben használt laboratóriumi egértörzs (vad típusú C57BL/6 és CD-1) nyelőcső epitél szövetéből organoidkultúrákat tenyészünk *in vitro*, majd összehasonlítsuk az organoidokat különböző szempontok alapján, különös tekintettel az iontranszport folyamatokra. Konkrét célkitűzéseink voltak:

- I. A nyelőcső organoidok jellemzése szövettanilag, és a szöveti őssejt eredetük bizonyítása
- II. A főbb sav-bázis transzporterek mRNS és fehérje kifejeződésének vizsgálata nyelőcső organoidokban
- III. Iontranszporterek közötti funkcionális kölcsönhatások vizsgálata.

2. számú publikáció:

A primer sejttenyészetek egy másik *in vitro* modell, amely használható a nyelőcső iontranszportrendszerének kutatására. Míg a tengerimalac nyelőcső epitélsejtek kiválóan alkalmasak *in vitro* funkcionális mérések elvégzésére, fontos megjegyezni, hogy ezek a sejtek korlátozott növekedési potenciált mutatnak kétdimenziós (2D) környezetben, és korlátozott az élettartamuk. Ebben a tanulmányban tengerimalac nyelőcső epitélsejteket használtunk funkcionális méréseinkhez; ezért a célunk volt:

- I. Annak vizsgálata, hogy a tengerimalac primer nyelőcső epitélsejtjei mennyi ideig őrzik meg életképességüket izolálás után *in vitro*, azaz mennyi ideig használhatóak funkcionális vizsgálatokra.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Állatok

A szövet izolálás a hazai (1998. XXVIII; 40/2013) és az Európai Unió (2010/63/EU) állatjóléti irányelvek szerint történt vad típusú C57BL/6 és CD-1 hím egerekből, illetve hím tengerimalacokból. A kísérleti protokollokat az Országos Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács és a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága hagyta jóvá (engedélyszám: XIII./1667/2020.).

Nyelőcső epitél sejtek izolálása

A 8-12 hetes hím egereket intraperitoneális (i.p.) nátrium-pentobarbitállal (80-100 mg/kg) túlaltattuk. A nyelőcső eltávolítása és hosszanti felnyitása után a szövetet diszpáz II oldattal (PluriSTEM™ 1 mg/ml) emésztettük, és az epitéliumot leválasztottuk. A szövetet tovább emésztettük 37°C-on 1X tripszin–EDTA oldatban 2 x 15 percig, majd az enzimet szójabab tripszin inhibitorral (STI 250 µg/ml) inaktiváltuk. A nyelőcső epitélsejteket 300 µl komplett organoid tápoldatban felszuszpendáltuk, és Neubauer-kamrában számoltuk meg. Hasonló izolálási technikát alkalmaztunk a tengerimalac nyelőcső epitélsejtek esetében. A tripszines emésztés időtartamát a nyelőcső szövet vastagságához igazítva 20 percre növeltük.

Sejtviabilitás vizsgálata

A frissen izolált tengerimalac nyelőcső epitélsejteket 300 µl KSBM tápoldatban felszuszpendáltuk, és poli-l-lizinnel előkezelt (0,01 %) üveglemezekre (Ø24 mm) helyeztük, majd Trypan Blue reagenssel megfestve (0,4 %-os oldat, 0,85 %-os NaCl-ban hígítva; Lonza, Svájc) vizsgáltuk óránként. A 37 °C-on végzett inkubálást követően a mintákról 10-szeres nagyításon képeket készítettünk, és a felvételeket Fiji ImageJ szoftverrel elemeztük.

Egér nyelőcső organoid kultúrák

A sejtszuspenziót összekevertük Matrigel® extracelluláris mátrixszal 40:60 arányban, és 24 lyukú tenyésztőedénybe pipettáztuk. Az organoidok tenyésztési körülményeit és a médiumot DeWard protokollja szerint (DeWard et al, *Cell Rep.* 2014) állítottuk be. A Wnt3A kondicionált tápot az L-Wnt3A (ATCC CRL-2647™) sejtekből állítottuk elő a gyártó protokollja szerint.

Áramlási citométer

A leucinban gazdag ismétlést tartalmazó G-protein kapcsolt receptor 5 (LGR5) és citokeratin 14 (CK14) fehérjék expresszióját áramlási citometriával mértük FACSCalibur áramlási citométeren. A nyelőcső epitélsejteket 30 percig jégen inkubáltuk, miközben LGR5-PE (Origene, TA400001) és CK14-FITC (Novusbio, NBP2-47720F) fluorokrómmal konjugált elsődleges antitestekkel, és az izotípus kontrollokkal (PE Mouse κ Isobody, IgG1 #400111 és FITC Mouse IgG3, κ Isotype Ctrl Antibody #401317) jelöltük. Az adatokat Flowing Software segítségével elemeztük, és a pozitív sejtek százalékos arányát átlag ± SD-ben fejeztük ki.

Szöveti festések

A hematoxilin és eozin (HE) festést a szegedi Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet protokollja szerint végeztük. A felvételek DP-74 digitális fényképezőgéppel, fénymikroszkóppal (BX-41) és CellSens szoftverrel (V1.18) készültek. Az utómunkálatokat és

a kiértékelést a GNU Image Manipulation Program (GIMP 2.10.0) és a NIH ImageJ elemző szoftver segítségével végeztük.

Immunfestés

A nyelőcső organoidokat 4%-os PFA-val fixáltuk, majd krioprotektív oldatba tettük (0.01%-os nátrium-azidot tartalmazó 30%-os szacharóz oldat). A Cryomatrix™-be történő beágyazás után a 16 µm vastag többszörös sorozatmetszeteket kriosztáttal (Leica CM 1850, Leica) lemetszettük, és zselatinnal bevont tárgylemezre gyűjtöttük. Az elsődleges antitestekkel egy éjszakán át 4 °C-on, az izotípus-specifikus másodlagos antitestekkel 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a metszeteket, végül Vectashield® (DAPI cc.: 1.5 µg/ml) fedőoldattal fedtük. A metszeteket DP-74 digitális kamerával és CellSens szoftverrel (V1.18, Olympus) felszerelt BX-41 epifluoreszcens, vagy Fluoview Fv10i szoftverrel (V2.1, Olympus) ellátott Olympus Fv-10i-W konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

Génexpresszió vizsgálat

A regenerált nyelőcső organoidokból totál RNS-t izoláltunk NucleoSpin RNA Kit segítségével. Két mikrogramm RNS-t írtunk cDNS-sé reverz transzkripció kit segítségével (Thermo Fisher). A PCR-t DreamTaq DNS polimeráz enzimmel (5 U/µl) végeztük. A PCR termékeket gélelektroforézissel választottuk el 2%-os agaróz gélen, és AlphaImager EC Gel Documentation System segítségével tettük láthatóvá. Pozitív kontrollként egér vese cDNS-t használtunk Slc9a1, Slc9a2, Slc26a6, Slc4a4 és CFTR esetében; egér hasnyálmirigy cDNS-t pedig Slc26a3 és ANO-1 esetében.

Fluoreszcens mikrofluorimetriás mérések

A fluoreszcens mikrofluorimetriás mérésekhez a nyelőcső organoidokat poli-l-lizinnel (0.09%) előkezelt üveglemezre (Ø24 mm) helyeztük. A méréseket inverz, fluoreszcens mikroszkóppal (Olympus IX71) és az xCellecence képalkotó szoftverrel végeztük.

Kezdő pH meghatározása

Az organoidokat BCECF-AM fluoreszcens festékkel (2 µM, 60 perc, 37 °C) inkubáltuk standard Hepes oldatban. Ezt követően a festéket 440 illetve 490 nm hullámhosszú fényel gerjesztettük majd a 490/440 emissziós arányt 535 nm hullámhosszon mértük. A fluoreszcens hányados kalibrációját és a kezdő pH értékének meghatározását a magas K⁺/nigericin technikával végeztük.

Pufferkapacitás és bázis efflux meghatározása

A nyelőcső organoidok saját pufferkapacitásának (β_i) meghatározásához az ammónium-pulzus technikát alkalmaztuk. A teljes pufferkapacitást ($\beta_{\text{totál}}$) a következő egyenlet segítségével számoltuk ki: $\beta_{\text{totál}} = \beta_i + \beta_{\text{HCO}_3^-} = \beta_i + 2.3 \times [\text{HCO}_3^-]_i$. A β_i -t a Henderson-Hasselbach egyenlet segítségével határoztuk meg. A pH_i -ban bekövetkező változásokat bázis árammá ($J(\text{B}^-/\text{min})$) konvertáltuk a következő egyenlet segítségével: $J(\text{B}^-/\text{min}) = (\Delta\text{pH}/\Delta t) \times \beta_{\text{totál}}$, ahol a $\Delta\text{pH}/\Delta t$ értékét lineáris regressziós analízissel számítottuk ki. A kifelé irányuló áramokat $-J(\text{B}^-/\text{min})$ -ként, míg a befelé irányuló áramokat $J(\text{B}^-/\text{min})$ -ként jelöltük.

Sav-bázis transzporterek aktivitásának mérése

Az alkalikus terhelés vagy NH_4Cl pulzus technika alkalmazásával következtettünk a Na^+/H^+ kicserélő (NHE) és a $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) kotranszporter aktivitására. Standard Hepes oldatban, az acidózisból történő pH_i regeneráció sebessége ($\Delta\text{pH}/\Delta t$) az első 60 másodpercben az NHE aktivitását tükrözi, míg ugyanez az érték $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -pufferelt oldatban az NBC aktivitására is reflektál. A transzporterek aktivitásának gátlására Na^+ -mentes perfúziós oldatot alkalmaztunk. Az NHE izoformák azonosítását külön kísérletben, egy dóziszfüggő, szelektív gátlószerrel (HOE-642, 1 és 50 μM) végeztük. Az NBC-től függő pH_i változásokat egy NHE inhibitor, amilorid (0.2 mM) jelenlétében detektáltuk.

Klorid-bikarbonát kicserélő (CBE) aktivitásának mérése

Két független módszert használtunk a CBE aktivitás meghatározására. A NH_4Cl pulzus technika során, az alkalózisból történő regeneráció kezdeti szakasza (első 30 másodperc) a CBE aktivitását tükrözi, HCO_3^- -pufferolt oldatban. A klorid elvonásos technika alkalmazása során, az alkalózis kialakulásának sebessége ($\Delta\text{pH}/\Delta t$) az első 60 másodpercben tükrözi a CBE aktivitását.

$[\text{Cl}^-]_i$ mérése

A $[\text{Cl}^-]_i$ meghatározásához a klorid-érzékeny fluoreszcens festéket (MQAE; 5 μM) és a CFTR aktivátor, forskolint (10 μM) használtuk. Az organoidokat 340 nm hullámhosszúságú fényvel megvilágítottuk, majd az emissziót 380 nm hullámhosszon mértük. A detektált fluoreszcenciát a kezdő fluoreszcencia intenzitásra normalizáltuk (F/F_0), és relatív fluoreszcenciaként fejeztük ki.

Statisztikai analízis

Az eredményeket átlag \pm SD-ben fejezzük ki. A mikrofluorimetriás mérések esetében a statisztikai elemzéseket varianciaanalízissel, majd a Bonferroni többszörös összehasonlító post

hoc teszttel végeztük. A sejtvitalitási vizsgálatainkban a sejtek életképességét az élő sejtek és az összes sejtszám arányaként határoztuk meg. A többszörös összehasonlításhoz ismételt méréses ANOVA-t használtunk Holm-korrekciónal. $p \leq 0,05$ értéket fogadtuk el szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

Egér nyelőcső organoidok tenyésztése és jellemzése

A nyelőcső organoidok képződését az epitelsejtek kiültetése utáni 3. napon figyeltük meg, maximális méretüket a 7. és 9. nap között érték el. Kísérleteinkhez 50-150 μm átmérőjű organoidokat használtunk. Az organoidok HE festése azt mutatta, hogy a sejtek több rétegben helyezkednek el az organoidokon belül, és egyes organoidok központi részei üresek vagy keratinizált anyagokat tartalmaztak.

Nyelőcső organoidok összejt eredetének bizonyítása

Az áramlási citométerrel végzett vizsgálatunk kimutatta, hogy a C57BL/6 nyelőcső epitelsejtek $42,70 \pm 7,27\%$ -a és a CD-1 nyelőcső epitelsejtek $46,46 \pm 7,81\%$ -a volt LGR5-pozitív. Továbbá azt találtuk, hogy a C57BL/6 nyelőcső epitelsejtek $45,29 \pm 9,25\%$ -a volt CK14-pozitív, ez a CD-1 esetében $55,32 \pm 7,80\%$ volt. Érdekes módon a dupla pozitív (LGR5 és CK14) frakcióban különbség volt detektálható. Mindkét markerre pozitív sejtek aránya magasabb volt a CD-1 epitelsejt izolátumban ($35,37 \pm 1,24\%$), mint a C57BL/6 esetében ($19,34 \pm 2,03\%$). Az immunfestés erős LGR5 expressziót mutatott mind C57BL/6, mind CD-1 organoidokban. Az organoidok külső sejtrétege CK14-pozitív festődést mutatott.

Epiteliális iontranszporterek mRNS és fehérje kifejeződése organoidokban

Kimutattuk az *Slc9A1* (NHE-1), *Slc9A2* (NHE-2), *Slc26a6* (PAT1), *CFTR*, *Slc4a4* (NBCe1B), és az *ANO1* expresszióját mindkét nyelőcső organoid esetében. Ezen transzporterek jelenlétét fehérjeszinten immunhisztokémiával is igazoltuk. Vizsgálataink alapján az *Slc26a3* (DRA) expresszióját nem-specifikusnak ítéltük. A CFTR és az *Slc26a6* diffúz festődést mutatott az organoidokban anélkül, hogy az epitelsejtek apikális vagy bazális membránján speciális lokalizációt mutattak volna. Továbbá, az *Slc26a6* festődés jobban kimutatható volt az organoidok perifériás sejtjeiben, míg a CFTR esetében a központi sejtek is pozitív festődést mutattak.

Kezdő pH_i és pufferkapacitás meghatározása

A C57BL/6 organoidok kezdő pH_i értéke 7.61 ± 0.03 volt, ez a CD-1 organoidok esetében 7.58 ± 0.03 . Munkacsoportunk korábbi módszertani tapasztalatára alapozva, az organoidok teljes pufferkapacitását a NH₄Cl pulzus technika segítségével határoztuk meg.

Na⁺/H⁺ kicserélő (NHE) aktivitás vizsgálata

Na⁺-mentes Hepes oldatos perfúziónál egy gyors intracelluláris acidifikáció volt megfigyelhető a nyelőcső organoidoknál, feltehetőleg az NHE gátlása miatt. Nem találtunk szignifikáns különbséget sem az acidifikáció sebességében [$-J(B^-)$] sem pedig a maximális pH változás mértékében (ΔpH_{max}) a két egértörzsből tenyésztett organoidok között. Az NHE jelenlétét a NH₄Cl-pulzus technikával is igazoltuk, amely során azt tapasztaltuk, hogy Na⁺ hiányában az acidózisból történő regeneráció mértéke elhanyagolható volt. Ebből arra következtettünk, hogy HCO₃⁻-mentes perfúzió során elsősorban az NHE felelős az epitelsejtek alkalizációjáért. A következő kísérleteinkben azonosítottuk az NHE aktív izoformáit az organoidokon. Ehhez cariporide-ot (HOE-642), egy szelektív NHE blokkolót használtunk, melynek hatása dóziszfüggő, 1 μM-os koncentrációban csak az NHE1-et gátolja, míg 50 μM-os koncentrációban az NHE-1 és -2 izoformát is. 1 μM HOE-642 alkalmazása lecsökkentette az acidózisból történő regenerációt (gátlás mértéke C57BL/6 esetében $87.81 \pm 1.17\%$; CD-1 esetében $82.37 \pm 7.32\%$), míg 50 μM koncentrációban alkalmazva további csökkenést tapasztaltunk (gátlás mértéke C57BL/6 esetében $97.54 \pm 0.52\%$; CD-1 esetében: $92.91 \pm 3.76\%$). Mindezek alapján elmondható, hogy az NHE-1 az elsődleges alkalizáló transzporter az organoidokon, de NHE-2 aktivitás is detektálható.

Na⁺/HCO₃⁻ kotranszporter (NBC) aktivitás vizsgálata

Az NBC aktivitásának vizsgálatára a korábban említett NH₄Cl-pulzus technikát alkalmaztuk. HCO₃⁻ jelenlétében a perfúzió kezdetekor egy gyors pH csökkenés figyelhető meg a CO₂ sejtekbe történő diffúziója miatt. A kezdeti acidózisból történő regeneráció jelentős volt az organoidokon, feltételezve ezáltal a funkcionálisan aktív NBC jelenlétét. A NH₄Cl pulzust követően, az acidózisból való regeneráció gyorsabb volt HCO₃⁻ jelenlétében, mint a Hepes-oldattal való perfúzió során. Ez azt mutatta, hogy az NHE mellett az NBC is aktív az organoidokon. Az NBC aktivitás további vizsgálatához gátoltuk az NHE aktivitását egy nem-szelektív NHE gátló alkalmazásával (amilorid). Ebben az esetben az acidózisból való regeneráció az C57BL/6 organoidok esetében $61.88 \pm 5.3\%$ -kal; CD-1 organoidok esetében pedig $62.18 \pm 7.3\%$ -kal csökkent. Megállapítottuk, hogy az acidózisból való regeneráció nagyobb részéért az NHE felelős, a fennmaradó regenerációért pedig az NBC. Szignifikáns

különbséget találtunk a Na⁺-perfúziót követő regeneráció mértékében a C57BL/6 és CD-1 organoidok között, ami arra utal, hogy az NBC nagyobb aktivitással rendelkezik a C57BL/6 egérben.

Cl⁻/HCO₃⁻-kicszerelő (CBE) aktivitás vizsgálata

Az Slc26 CBE fehérjecsald tagjai közül az Slc26a6 (PAT1) jelenlétét mind mRNS, mind fehérje szinten kimutattuk a C57BL/6 és CD-1 nyelőcső organoidokban. A Cl⁻-elvonás standard HCO₃⁻-pufferelt perfúzió során erős alkalózist indukált az organoidokban a CBE reverz működése miatt, ami arra utal, hogy az organoidok funkcionálisan aktív CBE-t expresszálnak. Ezzel ellentétben HCO₃⁻ hiányában a Cl⁻-elvonás minimális, reverzibilis alkalózist indukált. A funkcionálisan aktív Slc26a6 jelenlétét az alkalózisból történő regeneráció is megerősítette.

Cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) klorid csatorna aktivitás vizsgálata

A CFTR klorid csatornát mRNS -és fehérjeszinten egyaránt kimutattuk mindkét nyelőcső organoidban, majd a csatorna aktivitását a Cl⁻-szenzitív fluoreszcens MQAE festékkel és a CFTR aktivátor forskolinnal vizsgáltuk. 10 μM forskolin perfúziója kismértékben megemelte a Cl⁻ kiáramlás kezdeti sebességét (19.61 ± 4.52% a C57BL/6 organoidokban és 21.83 ± 9.72% a CD-1 organoidok esetén), és körülbelül 10 perc elteltével elérte a maximális egyensúlyi állapotot. 5 μM forskolin hatása elhanyagolható volt. A CFTR és a többi ion transzporter közötti feltételezett funkcionális kapcsolat vizsgálata érdekében a sav-bázis transzporterek aktivitását a CFTR inhibitor, CFTRinh-172 (10 mM) jelenlétében is vizsgáltuk NH₄Cl pulzus technika alkalmazásával. Azt találtuk, hogy a CFTR gátlása szignifikánsan csökkentette az alkalózisból való regenerációt, ami a CBE aktivitását jelzi (18.60 ± 3.34% a C57BL/6 organoidokban és 35.71 ± 11.77% a CD-1 organoidokban), míg az acidózisból való regeneráció csak a C57BL/6 organoidok esetén volt csökkent mértékű. (37,75 ± 2,69%).

Sejtviabilitás vizsgálata

A tengerimalacok nyelőcső epitelsejtek izolálása után a sejtek életképessége 88,72 ± 3,41% volt, amelyet kontroll értéknek tekintettünk. A sejtek életképessége szignifikánsan csökkent a harmadik óráig (62,96 ± 9,75% és 39,01 ± 6,87%). A harmadik és negyedik órában mért eredmények között nem volt szignifikáns különbség. Az ötödik órában már alig volt kimutatható élő sejt a mintában (7,41 ± 9,43%). Arra a következtetésre jutottunk, hogy 4 óra az

a maximális időtartam, amely alatt a nyelőcső epitelsejtek az izolálás után még felhasználhatók funkcionális mérésekre.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A nyelőcső epitélium iontranszportrendszere kulcsfontosságú a megfelelő pH_i -egyensúly fenntartásában. A pH_i -ban bekövetkező változások jelentős hatással lehetnek a biológiai folyamatok széles skálájára, kóros állapotban gastrooesophagealis reflux betegséget és nyelőcsőgyulladást eredményezhetnek. A nyelőcső epitélium iontranszport folyamatainak pontos szerepe még nem teljesen tisztázott, melynek feltételezhetően az élettanilag releváns kísérleti rendszer hiánya a fő oka. Az egyes szervek és szövetek vizsgálatában jelentős áttörést jelentett az organoid kultúrák tenyésztése. Az organoidok 3D sejtkultúrák *in vitro*, amelyek felnőtt szöveti, embrionális vagy indukált pluripotens őssejtekből származhatnak és képesek önszerveződni háromdimenziós kultúrában. A nyelőcső epitélium őssejt populációja az epitélium bazális sejtrétegben található, rágsáló és emberi nyelőcsőben egyaránt. Megfelelő tenyésztési körülmények között az őssejtekből tenyésztett organoidok a primer szövethez hasonló szerkezetet alakítanak ki, így megfelelő kísérleti modellként használhatóak a funkcionális vizsgálatok elvégzéséhez.

Munkánk kezdeti lépéseként átvettük és optimalizáltuk DeWard és munkatársai protokollját a nyelőcső organoidok egérszövetből történő előállításához, és ehhez két, gyakran használt laboratóriumi egértörzset (C57BL/6 és CD-1) használtunk. Az egér nyelőcső epitelsejtek izolálása és kiültetése utáni 3. napon az organoidok képződését figyeltük meg, és a következő napokban az organoidok mérete folyamatosan nőtt, amely a 7. és 9. nap között érte el a maximális méretet. 50 és 150 μm közötti organoidokat használtunk a kísérleteinkhez. Annak bizonyítására, hogy az érett nyelőcső organoidok epiteliális őssejtekből származnak, sejtfelszíni markerek alapján meghatároztuk a frissen izolált sejtszuspenzió összetételét, melyhez az Lgr5 őssejtmarkert és a CK14 epiteliális markert használtuk. A FACS elemzés kimutatta, hogy a nyelőcső epitelsejtek több mint fele mindkét esetben Lgr5- és CK14-pozitív, ami azt jelzi, hogy a belőlük fejlődő organoidok epiteliális őssejtekből származnak. Az immunfestés mindkét esetben hasonló eredményeket mutatott: mindkét organoidban erős LGR5 expressziót detektáltunk, ami azt jelzi, hogy az organoidok szöveti őssejteket tartalmaznak. Érdekes módon a CK14 expressziója az organoidok külső sejtrétegében mutatja a legerősebb jelet, ahogy az a primer szövet bazális sejtsoraiban is látható.

Jelenlegi szakirodalmi ismereteink szerint egyetlen tanulmány sem használt kifejezetten nyelőcső organoidokat az iontranszport folyamatok vizsgálatára *in vitro*. Funkcionális

méréseinkhez kezdő lépésben meghatároztuk az organoidok kezdő pH_i értékét (C57BL/6: 7.61 ± 0.03 ; CD-1: 7.58 ± 0.03) és teljes pufferkapacitását.

Funkcionális és molekuláris biológiai technikák segítségével azonosítottuk a fő iontranszportereket az egér nyelőcső organoidokon. Eredményeink egy funkcionálisan aktív Na^+ -függő H^+ efflux mechanizmus jelenlétét tárta fel az organoidokon, ami valószínűleg az NHE-nek köszönhető. A HOE-642 dóziszfüggő módon jelentősen csökkentette az NHE aktivitását, ami arra utal, hogy az NHE-1 és az NHE-2 a funkcionálisan leginkább aktív izoformák az organoidokon. Feltételezésünk szerint más NHE izoformák vagy a protonpumpa felelősek a maradék aktivitásért. Az NHE-1 és NHE-2 immunlokalizációja azt mutatta, hogy az NHE-1 túlnyomórészt az organoidok perifériás, bazális sejtrétegében expresszálódik, míg az NHE-2 festődés a belső sejtrétegekben volt hangsúlyosabb. Az a tény, hogy az organoidok különböző mértékben differenciálódott epitélisejtekből állnak, megmagyarázza, hogy az NHE-1 és az NHE-2 miért találhatóak különböző sejtrétegekben.

Az NBC funkciója a nyelőcső epitélisejtegekben jelenleg nem ismert, de feltételezhető, hogy fontos szerepet játszik a pH_i szabályozásában és a HCO_3^- transzcelluláris szállításában. Kísérletünk során a nyelőcső organoidok CO_2 által kiváltott acidózisa szinte teljesen regenerálódott, ami a HCO_3^- sejtbe áramlásával magyarázható az NBC-n keresztül. Jelentős különbséget fedeztünk fel az acidózis felépülésében HCO_3^- jelenlétében és hiányában, valamint meglehetősen jelentős pH_i regenerációt detektáltunk amilorid jelenlétében. Ezek az eredmények határozottan arra utalnak, hogy funkcionálisan aktív NBC található a nyelőcső organoidokon.

Mivel az NBC közvetíti a HCO_3^- beáramlását a sejtekbe, ezért a csatorna jelenléte feltételezi CBE jelenlétét is a nyelőcső organoidokon. Ennek megfelelően sikeresen detektáltunk egy Cl^- függő HCO_3^- efflux mechanizmust az organoidokon. HCO_3^- jelenlétében a Cl^- elvonása a perfúziós oldatból erős alkalózist váltott ki, a CBE fordított üzemmódján keresztül. Emellett a HCO_3^- jelenléte a NH_4Cl pulzus technika alkalmazása során jelentősen megnövelte az alkalózisból való felépülés sebességét. Az RT-PCR és az immunhisztokémia kimutatta, hogy az Slc26a6 CBE szignifikánsan expresszálódik nyelőcső organoidokban, míg az Slc26a3 expressziója mérsékelt és nem specifikus.

Munkánk további részében kimutattuk, hogy a CFTR Cl^- csatorna expresszálódik egér nyelőcső organoidokon. Az immunhisztokémiai eredményeink azt mutatták, hogy mind a perifériás, mind a centrális sejtek erősen expresszálják a CFTR-t. A CFTR és az Slc26a6 immunjelölése bizonyos kolokalizációt mutatott ki, főleg az organoidok perifériáján lévő sejtekben, ami azt jelzi, hogy a két transzporter egymással kölcsönhatásban működhet.

Mikrofluorimetriás funkcionális mérést alkalmaztunk a CFTR és az Slc26a6 közötti funkcionális kapcsolat tanulmányozására. A CFTR aktivátor forskolin koncentráció függő módon növelte a csatorna aktivitását. A forskolinra adott választ szakirodalmi adatok alapján viszonylag alacsonynak ítéltük meg, még szupramaximális koncentrációk esetén is, ami azt jelzi, hogy a CFTR aktivitása alacsonyabb, mint a szekréciós epitéliumokban jellemzően megfigyelhető. A CFTR-inhibitor, CFTRinh-172 jelenléte csökkentette az alkalózisból való regeneráció sebességét mind a C57BL/6, mind a CD-1 nyelőcső organoidok esetében, ezzel bizonyítva, hogy a csatorna kölcsönhatásba lép a CBE-vel. Tovább, azt találtuk, hogy a CFTR gátlása szintén jelentősen csökkentette az acidózisból való felépülést C57BL/6 organoidokban. Mivel mind az NBC, mind az NHE részt vesz az acidózisból való felépülésben HCO_3^- jelenlétében, a CFTR kölcsönhatásba léphet ezen transzporterek egyikével, bár ezt a fajta interakciót korábban soha nem írták le.

Emellett kimutattuk a Ca^{2+} -aktivált Cl^- csatorna ANO1 (vagy TMEM16A) expresszióját mindkét nyelőcső organoidban. Szakirodalmi adatok alapján, eddig csupán egyetlen tanulmányban vizsgálták az ANO1 jelenlétét a nyelőcső epitéliumban.

Kutatócsoportunkban számos kísérleti modellel dolgozunk, beleértve a különböző állatmodellekből izolált primer nyelőcső epitelsejteket. A tengerimalac nyelőcső epitéliumából is nagyszámú epitelsejt izolálható, mely kiválóan alkalmas *in vitro* funkcionális mérések elvégzésére. Annak tesztelésére, hogy a primer nyelőcső epitelsejtek mennyi ideig őrzik meg életképességüket 2D környezetben, és így mennyi ideig használhatóak funkcionális mérésekre, sejtvitalitási tesztet végeztünk. Eredményeink alapján az izolálást követő 4 óra az a maximális időtartam, amely alatt a primer epitelsejtek még felhasználhatók funkcionális mérésekre. Legfőbb megállapításunk, hogy annak ellenére, hogy a tengerimalac nyelőcső epitelsejtek könnyen és nagy számban izolálhatók, a velük való munkavégzést limitált életképességük korlátozza.

Összefoglalva eredményeinket, elmondható, hogy első alkalommal jellemeztük sikeresen a fő epiteliális iontranszporterek jelenlétét és aktivitását egér nyelőcső organoidok használatával. Megállapítottuk, hogy az egér nyelőcső organoidok fiziológiailag releváns és megfelelő modellrendszerek a nyelőcső epitelsejtek iontranszport mechanizmusainak tanulmányozására, valamint akár preklinikai eszközként is felhasználhatók különböző vegyületek nyelőcső iontranszport rendszerére gyakorolt hatásának vizsgálatára.

6. ÚJ EREDMÉNYEK

Összefoglalva, doktori munkám az első olyan tanulmány, amely a nyelőcső iontranszport mechanizmusokat vizsgálta egér organoidok segítségével, és amelyben főbb megállapításaink a következők:

- I. Sikeresen állítottunk elő nyelőcső organoidot 2 különböző, széles körben használt laboratóriumi egértörzsből, és leírtuk, hogy az egér nyelőcső organoidok epiteliális szöveti őssejtekből jönnek létre. Eredményeink szerint nincs szignifikáns különbség a két egértörzs nyelőcső organoid között a tenyésztési körülmények, az iontranszport rendszer vagy a laboratóriumi hasznosíthatóság tekintetében.
- II. Igazoltuk a főbb sav-bázis transzporterek jelenlétét és működését az organoidokon. Ezek az NHE, NBC és CBE.
- III. Elsőként azonosítottuk a funkcionálisan aktív CFTR csatornát az egér nyelőcső organoidokon, és eredményeink alapján funkcionális kölcsönhatást feltételezünk a CFTR és CBE között
- IV. Megállapítottuk, hogy a tengerimalac primer nyelőcső epitélisejtek az izolálást követően legfeljebb 4 óráig életképesek, így *in vitro* felhasználásuk csak korlátozott ideig lehetséges.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék elsőként köszönetet mondani **Dr. Venglovecz Viktória** egyetemi docensnek és témavezetőmnek, aki lehetővé tette számomra, hogy a kutatócsoportjában dolgozzak. Szeretném megköszönni **Prof. Dr. Baczkó István** tanszékvezető egyetemi tanárnak és **Prof. Dr. Varró András** egyetemi tanárnak, a Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet jelenlegi és volt vezetőjének, hogy biztosították számomra a kutatásom elvégzéséhez szükséges feltételeket. Hálás vagyok a **Multidiszciplináris Orvostudományi Doktori Iskolának**, hogy lehetővé tették számomra a kutatásom elvégzését.

Köszönetnyilvánítással tartozom **Dr. Tamás Bellák** egyetemi adjunktusnak az organoid immunhisztokémiában végzett munkájáért. Nagyon köszönöm **Gál Eleonóranak** és **Dr. Veréb Zoltának** a FACS kísérletek lebonyolításában és kiértékelésében nyújtott segítségüket. Szeretnék köszönetet mondani **Elekes Grétának** és **Dr. Szarka Dórának**, hogy segítettek a kísérleti állatok genotipizálásában. Külön köszönetet mondok **Horesnyiné Pritz Tündének**, hogy munkájával biztosította a sejtlaborunkban a munkához szükséges feltételeket. Köszönöm **Kőrös Anikónak** és **Fritz Reának**, hogy biztosították a munkámhoz szükséges adminisztratív háttérrel. Köszönöm **Dr. Ébert-Molnár Rékának**, **Dr. Becskeházi Eszternek**, **Ébert Attilának** és **Német Kristófnak**, a munkacsoportunk korábbi munkatársainak, a doktori munkámban nyújtott segítségüket. Hálás vagyok továbbá a Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet és az I. sz. Belgyógyászati Klinika Pankreász Laboratórium minden kollégájának a munkám során nyújtott támogatásukért.

Emellett nagyon hálás vagyok **Jósvay Katalinnak** és **Dr. Vizler Csabának**, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézet munkatársainak, akik megtanítottak a tudományos kutatás alapjaira. Végül, de nem utolsósorban nagyon sok köszönettel tartozom páromnak, **Dr. Zahorán Szabolcsnak**, és barátaimnak **Bukva Mátyásnak**, **Elekes Grétának**, **Dr. Szentgyörgyi Avarka Leának** és **Dr. Tóth Krisztinának**, akik mindvégig mellettem álltak és támogattak a munkám során.

PÉNZÜGYI TÁMOGATÁS

A kutatómunkához nélkülözhetetlen anyagi forrásokat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH_FK123982 és EFOP 3.6.2-16-2017-00006), és az EFOP 3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 PhD ösztöndíj biztosította.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Co-author certification

Alulírott Dr. Venglovecz Viktória (felelős társszerző) kijelentem, hogy Korsós Marietta Margaréta (pályázó) PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott - közösen publikált - tudományos eredmények elérésében a pályázónak meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más a PhD fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemény(ek):

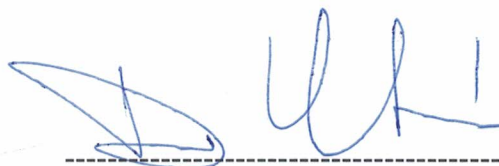
Publikáció 1.

Marietta Margaréta Korsós, Tamás Bellák, Eszter Becskeházi, Eleonóra Gál, Zoltán Veréb, Péter Hegyi, Viktória Venglovecz. Mouse organoid culture is a suitable model to study esophageal ion transport mechanisms. AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY – CELL PHYSIOLOGY; 321(5):C798-C811. doi: 10.1152/ajpcell.00295.2021. PMID: 34524930. (2021)

Publikáció 2.

Eszter Becskeházi, Marietta Margaréta Korsós, Eleonóra Gál, Tiszlavicz L, Hoyk Z, Deli MA, Zoltán Márton Köhler, Anikó Keller-Pintér, Attila Horváth, Kata Csekő, Zsuzsanna Helyes, Péter Hegyi, Viktória Venglovecz. Inhibition of NHE-1 Increases Smoke-Induced Proliferative Activity of Barrett's Esophageal Cell Line. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES; 22(19):10581. doi: 10.3390/ijms221910581. PMID: 34638919; PMCID: PMC8509038. (2021)

Szeged, 2023.08.04.



Dr. Venglovecz Viktória
felelős társszerző, témavezető