

Multiplex immunfenotipizálás krónikus obstruktív tüdőbetegségben és nem kissejtes tüdőrákban

Gémes Nikolett

Doktori értekezés tézisei

Témavezető: Dr. Szebeni Gábor János

Tudományos főmunkatárs

HUN-REN, Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola



**HUN
REN**



Szeged

2024

Bevezetés

A tüdőrákos megbetegedés mellett a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) továbbra is a vezető halálozási okok egyike világszerte. A COPD olyan gyulladásoos tüdőbetegség, ahol a krónikus hörghurut és a tüdőtágulás egyszerre van jelen, súlyosbodása pedig tüdőrák kialakulásához vezethet. Habár a COPD legfőbb kockázati tényezőjének a dohányzást tartják, addig a dohányosok körülbelül 45-50%-a szenved COPD-ben, továbbá a tüdőrák kialakulásának kockázata ötször magasabb dohányos COPD-s betegeknel. Ezért az oxidatív stressz és a dohányzás által indukált krónikus, öfenntartó gyulladás kiemelt fontosságú szerepet játszik a COPD és a tüdőrák kialakulásában. Kutatásunk során a terápia naiv, dohányos, stabil és exacerbáló COPD-s (stCOPD, exCOPD) ill. nem kissejtes tüdőrákos (NSCLC) betegekén és dohányos, egészséges kontrollokon (DK) egysejttömegcitometriát (CyTOF), Luminex mérést és transzkriptomikai analízist alkalmaztuk a dohányfüst perifériás immunrendszer sejtes és molekuláris elemeire gyakorolt hatásának feltárásához.

Célkitűzések és alkalmazott módszerek

A Ph.D. munkám fő célkitűzése a dohányzás immunrendszerre gyakorolt hatásának multiplex jellemzése dohányos, egészséges kontrollok és dohányos, terápia naiv gyulladásos tüdőpathológiákban:

1. A kontrollokból és betegekből származó perifériás mononukleáris sejtek immunfenotipizálása egysejt-tömegcitometriával.
 - 1.1. Fő immunsejt populációk és alpopulációinak meghatározása felügyelet nélküli klaszterező algoritmussal, eloszlásuk összehasonlítása a vizsgálati csoportok között.
 - 1.2. A fő immunsejt populációk 29 sejtfelszíni marker expressziójának meghatározása és csoportok közötti összehasonlítása.
2. A CD4+ centrális memória (CM) és CD4+ effektor memória (EM) T-sejtek transzkriptomikai analízise MACE RNS szekvenálással.
3. A csoportok vérplazma mintáiból 17 immun-onkológiai ellenőrzőpont fehérje koncentrációjának meghatározása Luminex xMAP (MAGPIX®) technológiával.

Eredmények

- **A perifériás immunsejt populációk és alpopulációik csoportok közötti százalékos eloszlása szignifikánsan eltért a DK, stCOPD, exCOPD és NSCLC csoportok között.**

Az statisztikai elemzés során 5 fő immunpopuláció eloszlása mutatott szignifikáns különbségeket. A CD4+ T sejtek aránya stCOPD és exCOPD-ben csökken, NSCLC-ben a legmagasabb, a CD8+ T-sejtek aránya exCOPD-ben volt a legalacsonyabb, stCOPD-ben a legmagasabb. A CD4-/CD8- T-sejtek, pDC-k és mDC-k aránya szintén exCOPD-ben volt a legalacsonyabb, ellentétben a monociták aránya exCOPD-ben kétszerese, a CD11c^{dim} sejtek aránya pedig tízszerese a DK-nak stCOPD-ben és exCOPD-ben. A betegcsoportban szignifikánsan magasabb arányban megtalálható alpopulációk a DK-val összehasonlítva a következők voltak: CD4+ T-sejtek CD38^{bright} és CD183+ metaklasztereit, CD8+ sejtek CD45RA^{dim}, CD28+/CD194+, CD27+/CD183+/CD197^{dim} metaklaszterei, CD4-/CD8- sejtek CD38^{bright} és CD38^{bright}/CD183+/CD196+ alpopulációi. A

betegcsoportban szignifikánsan alacsonyabb arányban megtalálható alpopulációk a DK-val összehasonlítva a következő voltak: CD8⁺ sejtek a CD27⁺ és CD183⁺ metaklaszterei, $\gamma\delta$ T-sejtek CD183⁺ alpopulációi.

- **A fő immunsejt populációk 29 sejtfelszíni marker expressziója szignifikánsan különbözött a vizsgált csoportok között.**

A fő immunpopulációk markerexpressziójában 33 szignifikáns különbséget találtunk a betegcsoportok között. A tézisfüzetben csak a T-sejtekre jellemző eltéréseket ismertetjük. A CD4⁺ T-sejteken a CD27, CD127 kifejeződése, a CD8⁺ T-sejteken pedig a CD27, CD28, CD127, CD183 és CD197 expressziója mutatott különbséget. A CD4⁺/CD8⁺ T-sejteken a CD8, CD25 és CD27, amíg CD4⁻/CD8⁻ T-sejteken a CD28 és CD183 expressziós profilja tért el. A CD4⁺ NKT-sejtek a CD16, CD45 és CD197-et, a CD8⁺ NKT-sejtek pedig a CD16, CD56 és CD183-at fejezték ki eltérően.

- **Az exCOPD és NSCLC csoport CD4⁺ EM és CD4⁺ CM T-sejtek transzkriptomjában közösen eltérően magasan és közösen eltérően alacsonyan expresszált**

géneket azonosítottunk, melyek Pearson-korrelációt mutattak.

Az exCOPD és NSCLC csoport CD4+ CM populációjában, 203 közösen eltérően magasan és 167 közösen eltérően alacsonyan expresszált gént azonosítottunk 0,807 Pearson-korrelációval, továbbá, az exCOPD és NSCLC csoport CD4+ EM populációjában 234 közösen eltérően magasan és 90 közösen eltérően alacsonyan kifejeződő gént 0,747 Pearson-korrelációval. A HALLMARK és KEGG analízisekből azt az eredményt kaptuk, hogy az exCOPD és NSCLC CD4+ CM sejteiben főképp az angiogenezisben szerepet játszó útvonalak, addig az exCOPD és NSCLC CD4+ EM sejteiben a sejtosztódásban, fehérje szekrécióban, transzkripcióban, UV sugárzásra adott válaszban szerepet játszó gének up-reguláltak.

- **A 17 immun-onkológiai ellenőrzőpont fehérje koncentrációja szignifikánsan eltért a csoportok között, a klaszterezés a COPD-s és NSCLC-s betegek vegyes fenotípusát mutatta.**

Az exCOPD-s betegek plazmája gyulladásos fenotípust mutatott, ahol a gátló PD-L2 és TIM-3 alacsonyabb a ko-

stimulációs CD86 és GITRL pedig emelkedett koncentrációban volt detektálható. A további vizsgált 13 plazmaprotein esetében szignifikáns különbség nem, a DK csoporttal összehasonlítva emelkedett koncentráció volt jellemző a betegcsoportokban. A vizsgált plazmafehérjék klaszterezése során 3 csoportot határoztunk meg, az 1. gyulladásos klasztert, a 2. klaszterre a gyulladásos mediátorok legalacsonyabb koncentrációja jellemző és a 3. átmeneti klasztert.

Summary

Alongside lung cancer, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is still the leading cause of death worldwide. COPD is a chronic inflammatory lung disease that causes obstructed airflow from the lungs. Although smoking is considered the main risk factor for COPD, around 45-50% of smokers have COPD and the risk of developing lung cancer is five times higher in smokers with COPD. Therefore, oxidative stress and smoking-induced chronic, self-sustained inflammation play a major role in the development of COPD and lung cancer.

The main goal of my Ph.D research was to examine the effects of tobacco smoking on the peripheral immune system in chronic inflammatory lung pathologies. The main methods of our experiments were single-cell mass cytometry, Luminex xMAP (MAGPIX®) technology and transcriptomic analysis by RNA sequencing. We defined 4 experimental groups: smoker healthy controls (SmHC), smoker, therapy naive stable COPD (stCOPD), smoker, therapy naive exacerbating COPD (exCOPD) and smoker, therapy naive non-small cell lung cancer (NSCLC)

patients. The DK group consisted of age- and sex-matched individuals.

Our first aim was to identify the immunophenotype of peripheral blood mononuclear cells by mass cytometry. We performed the immunophenotyping of the PBMCs of 9 SmHC, 8 stCOPD, 8 exCOPD and 8 NSCLC patients using the 29 antibodies containing Human Immune Monitoring Panel (Fluidigm). We identified 14 main immune cell populations and their subpopulations with unsupervised clustering algorithms, then examination groups were statistically compared. We found significant differences in the distribution of 5 immune populations, including CD4⁺ T-cell, CD8⁺ T cells, CD4⁻/CD8⁻ T cells, pDCs and mDCs and monocytes. All main populations were further subdivided into subpopulations. The subpopulations found in significantly higher rates in patient groups compared to SmHC were the following: Within CD4⁺ T cells CD38^{bright} and CD183⁺ metaclusters; within CD8⁺ cells CD45RA^{dim}, CD28⁺/CD194⁺, CD27⁺/CD183⁺/CD197^{dim} subpopulations, within CD4⁻/CD8⁻ cells CD38^{bright} and CD38^{bright}/CD183⁺/CD196⁺

subsets. The subpopulations with significantly lower rates in patient groups compared to SmHC were the following: within CD8⁺ cells CD27⁺ and CD183⁺ metaclusters; within $\gamma\delta$ T cells CD183⁺ metaclusters.

We found 33 significant differences in marker expression of the major immune populations between patient groups, CD27, CD127 on CD4⁺ T cells; CD27, CD28, CD127, CD183 and CD197 on CD8⁺ T cells; CD8, CD25 and CD27 on CD4⁺/CD8⁺ T cells; CD28 and CD183 on CD4⁻/CD8⁻ T cells; CD16, CD45 and CD197 on CD4⁺ NKT cells, CD16, CD56 and CD183, on CD8⁺ NKT cells were differentially expressed.

We selected the CD4⁺ central memory and CD4⁺ effector memory cell populations for further transcriptomic analysis. As a result of RNA sequencing in CD4⁺ CM cells of exCOPD and NSCLC groups, we identified 203 genes which were differentially upregulated and 167 genes which were differentially downregulated and showing 0,807 Pearson correlation. In the CD4⁺ EM cells of the exCOPD and NSCLC group, 234 differentially

upregulated and 90 differentially downregulated genes were identified, showing 0,747 Pearson correlation.

We measured the concentration level of 17 immunology checkpoint mediators. The concentrations of B7-2/CD86, which takes part in T cell activation and GITRL, were the highest in exCOPD, in contrast the inhibitor PD-L2/CD273 was the lowest in exCOPD. The amount of the inhibitor TIM-3/CD366 was the highest in stCOPD. Clustering of the plasma proteins was also performed and 3 clusters were identified. Cluster 1 was characterized by the highest concentration of inflammatory mediators, cluster 2 was characterized by the lowest concentration of the measured plasma proteins, cluster 3 was considered as a transition group with intermediate concentration of the investigated mediators, predominantly represented by NSCLC.

Publikációs lista

MTMT azonosító: 10081633

Kumulatív impakt faktor: 79,811

A dolgozat alapjául szolgáló közlemény:

Gémes Nikolett, Balog József Á., Neuperger Patrícia, Schlegl Erzsébet, Barta Imre, Fillinger János, Antus Balázs, Zvara Ágnes, Hegedűs Zoltán, Czimmerer Zsolt, Manczinger Máté, Balogh Gergő M., Tóvári József, Puskás László G., Szebeni Gábor J., *Single-cell immunophenotyping revealed the association of CD4+ central and CD4+ effector memory T cells linking exacerbating chronic obstructive pulmonary disease and NSCLC*. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, (2023), **IF (2023): 5,7/Q1**

A fokozatszerzési eljárás alapját képező tudományos közlemények:

1. **Gémes Nikolett**, Balog József Á., Neuperger Patrícia, Schlegl Erzsébet, Barta Imre, Fillinger János, Antus Balázs, Zvara Ágnes, Hegedűs Zoltán, Czimmerer Zsolt, Manczinger Máté, Balogh Gergő M., Tóvári József, Puskás László G., Szebeni Gábor J., *Single-cell immunophenotyping revealed the association of CD4+ central and CD4+ effector memory T cells linking exacerbating chronic obstructive pulmonary disease and NSCLC*. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, (2023), **IF (2023): 5,7/Q1**

2. Szebeni Gábor J. *, **Gémes Nikolett***, Honfi Dániel , Szabó Enikő, Neuperger Patrícia, Balog József Á., Nagy Lajos I., Szekanecz Zoltán, Puskás László G., Toldi Gergely, Balog Attila, *Humoral and cellular immunogenicity and safety of five different SARS-CoV-2 vaccines in patients with autoimmune rheumatic and musculoskeletal diseases in remission or with low disease activity and in healthy controls: a single center study*, FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, (2022), **IF (2022): 7,3/Q1**

Egyéb közlemények listája:

1. Szalontai Klára, **Gémes Nikolett**, Furák József, Varga Tünde, Neuperger Patrícia, Balog József Á., Puskás László G., Szebeni Gábor J.*, *Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Epidemiology, Biomarkers and Paving the Way to Lung Cancer*, Journal of Clinical Medicine 2021, Special issue: Living with Chronic Obstructive Pulmonary Disease, JOURNAL OF CLINICAL MEDICINE (2020), **IF (2021): 4,964/Q1**
2. Brunner Szilvia , Varga Dániel , Bozó Renáta , Polanek Róbert , Tőkés Tünde , Szabó Emília Rita , Molnár Réka , **Gémes Nikolett** , Szebeni Gábor J. , Puskás László G., Erdélyi Miklós, Hideghéty Katalin, *Analysis of Ionizing Radiation Induced DNA Damage by Superresolution dSTORM Microscopy*, PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH, (2021), **IF (2021): 2,847/Q2**
3. Neuperger Patrícia, Balog József Á., Tiszlavicz László, Furák József, **Gémes Nikolett**, Kotogány Edit, Szalontai Klára, Puskás László G., Szebeni Gábor J., *Analysis of the Single-Cell Heterogeneity of Adenocarcinoma Cell Lines and the Investigation of Intratumor Heterogeneity Reveals the Expression of Transmembrane Protein 45A (TMEM45A) in Lung Adenocarcinoma Cancer Patients*, CANCERS (2022), **IF (2022): 5,2/Q1**
4. Honfi Dániel*, **Gémes Nikolett***, Szabó Enikő, Neuperger Patrícia, Balog József Á., Nagy Lajos I., Toldi Gergely, Puskás László G., Szebeni Gábor J., Balog Attila, *Comparison of Homologous and Heterologous Booster SARS-CoV-2 Vaccination in Autoimmune Rheumatic and Musculoskeletal Patients*, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, (2022), **IF (2022): 5,6/Q1**

5. **Gémes Nikolett**, Makra Zsófia, Neuperger Patrícia, Szabó Enikő, Balog József Á., Flink Lili Borbála, Kari Beáta, Hackler László, Puskás László G., Kanizsai Iván, Szebeni Gábor J., A cytotoxic survey on 2-amino-1H-imidazol based synthetic marine sponge alkaloid analogues., DRUG DEVELOPMENT RESEARCH, (2022), **IF (2022): 3,8/Q3**

6. Ali Hazhmat, Traj Péter, Szebeni Gábor J., **Gémes Nikolett**, Resch Vivien, Paragi Gábor, Mernyák Erzsébet, Minorics Renáta, Zupkó István, *Investigation of the Antineoplastic Effects of 2-(4-Chlorophenyl)-13 α -Estrone Sulfamate against the HPV16-Positive Human Invasive Cervical Carcinoma Cell Line SiHa*, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, (2023), **IF (2023): 4,9/Q1**

7. Nagy Viktória, Mounir Raji, Szebeni Gábor J., Szakonyi Zsolt, Gémes Nikolett, Minorics Renáta , Germán Péter, Zupkó István, *Investigation of Anticancer Properties of Monoterpene-Aminopyrimidine Hybrids on A2780 Ovarian Cancer Cells*, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, (2023), **IF (2023): 4,9/Q1**

8. Szabó Enikő , Modok Szabolcs* , Rónaszéki Benedek , Faragó Anna , **Gémes Nikolett** , Nagy Lajos I. , Hackler László , Farkas Katalin , Neuperger Patrícia , Balog József Á., Balog Attila, Puskás László G., Szebeni Gábor J., *Comparison of humoral and cellular immune responses in hematologic diseases following completed vaccination protocol with BBIBP-CorV, or AZD1222, or BNT162b2 vaccines against SARS-CoV-2*, FRONTIERS IN MEDICINE, (2023), **IF (2023): 3,1/Q1**

9. Szebeni Gábor J., Alföldi Róbert, Nagy Lajos I., Neuperger Patrícia, **Gémes Nikolett**, Balog József Á., Tiszlavicz László, Puskás László G., *Introduction of an Ultraviolet C-Irradiated 4T1 Murine Breast Cancer Whole-Cell Vaccine Model*, VACCINES (BASEL), (2023), **IF (2023): 5,2/Q1**

10. Seyyed Ashkan Senobar Tahaei, Kulmány Ágnes, Minorics Renáta, Kiss Anita, Szabó Zoltán, Germán Péter, Szebeni Gábor J., **Gémes Nikolett**, Mernyák Erzsébet, Zupkó István, *Antiproliferative and antimetastatic properties of 16-azidomethyl substituted 3-O-benzyl estrone analogs*, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES (2023.), **IF (2023): 4,9/Q1**

11. Neuperger Patrícia, Szalontai Klára, **Gémes Nikolett**, Balog József Á., Tiszlavicz László, Furák József, Lázár György, Puskás László G, Szebeni Gábor J., *Single-Cell Mass Cytometric Analysis of Peripheral Immunity and Multiplex Plasma Marker Profiling of Non-Small Cell Lung Cancer Patients Receiving PD-1 Targeting Immune Checkpoint Inhibitors in Comparison with Platinum-Based Chemotherapy*, FRONTIERS IN IMMUNOLOGY (2023), **IF (2023):5,7/Q1**

12. Szabó Enikő, Faragó Anna, Bodor Gergely, **Gémes Nikolett**, Puskás László G., Kovács László, Szebeni Gábor J., *Identification of immune subsets with distinct lectin binding signatures using multi-parameter flow cytometry: correlations with disease activity in systemic lupus erythematosus*, FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, (2024), **IF (2023): 5,7/Q1**

13. Ruppert Zsófia, Neuperger Patrícia, Rákóczi Bettina, **Gémes Nikolett**, Dukay Brigitta, Hajdu Petra, Péter Mária, Balogh Gábor, Tiszlavicz László, Vigh László, Puskás László G, Szebeni Gábor J., Tóth E. Melinda, *Characterization of obesity-related diseases and inflammation using single cell immunophenotyping in two different diet-induced obesity models*, INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY, (2024), **IF (2023): 4,2/Q1**

14. Inczeffi Orsolya, Eutamene Hélène, Placide Fanny, Tondereau Valérie, Pallagi Petra, Bagyánszki Mária, Bódi Nikolett, **Gémes Nikolett**, Szebeni Gábor, Molnár Tamás, Theodorou Vassilia, Róka Richárd, *Translational evaluation of Gelsectan® effects on gut barrier dysfunction and visceral pain in animal models and irritable bowel syndrome with diarrhoea*, UNITED EUROPEAN GASTROENTEROLOGY JOURNAL, (2024), **IF (2023): 5,8/Q1**

Konferencia előadás:

Gémes Nikolett, Balog József Á., Neuperger Patrícia, Schlegl Erzsébet, Fillinger János, Szalontai Klára, Tóvári József, Puskás G. László, Szebeni Gábor J., Egysejt Tömegcitometriás Multiplex Immunfenotipizálás COPD-ben és Adenokarcinómában, Magyar Immunológiai Társaság 50. vándorgyűlése, Kecskemét (2021)

Konferencia poszter:

Gémes Nikolett, Szabó Enikő, Neuperger Patrícia, Balog József Á., Nagy Lajos I., Honfi Dániel, Szekanecz Zoltán, Puskás László G., Toldi Gergely, Balog Attila, Szebeni Gábor J., Vakcinálás utáni SARS-CoV-2 specifikus humorális és celluláris immunitás összehasonlító vizsgálata egészséges egyéneken valamint autoimmun betegekben, membrán-transzport Konferencia, Sümeg (2022)

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott, Dr. Szebeni Gábor János, mint a jelölt, Gémes Nikolett témavezetője kijelentem, hogy a „Multiplex immunfenotipizálás krónikus obstruktív tüdőbetegségben és nem kissejtes tüdőrákban” című doktori értekezés a jelölt saját munkája, amelyet témavezetésem mellett önállóan készített el. Kijelentem, hogy a disszertáció megfelel az SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola formai és tartalmi követelményeinek.

.....

Dr. Szebeni Gábor János

Szeged, 2024.09.05.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott Dr. Szebeni Gábor János, mint a fokozatszerzési eljárás alapjául szolgáló

Gémes N., Balog J.Á., Neuperger P., Schlegl E., Barta I., Fillinger J., Antus B., Zvara Á., Hegedűs Z., Czimmerer Zs., Manczinger M., Balogh G.M., Tóvári J., Puskás L.G., Szebeni G.J., *Single-cell immunophenotyping revealed the association of CD4⁺ central and CD4⁺ effector memory T cells linking exacerbating chronic obstructive pulmonary disease and NSCLC*, Front. Immunol., 14:1297577 (2023)

tudományos közlemény felelős szerkesztője nyilatkozom, hogy a publikációhoz kapcsolódó eredmények elérésében a jelölt, Gémes Nikolett nélkülözhetetlen szereppel bírt, továbbá nyilatkozom, hogy a publikációt más fokozatszerzési eljárásban nem használtuk fel és a jövőben sem fogjuk.

.....

Dr. Szebeni Gábor János

Szeged, 2024.09.05.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott Dr. Szebeni Gábor János és Dr. Balog Attila,
mint a fokozatszerzési eljárás alapjául szolgáló

Szebeni Gábor J. *, **Gémes Nikolett***, Honfi Dániel ,
Szabó Enikő, Neuperger Patrícia, Balog József Á., Nagy
Lajos I., Szekanecz Zoltán, Puskás László G., Toldi
Gergely, Balog Attila, *Humoral and cellular
immunogenicity and safety of five different SARS-CoV-2
vaccines in patients with autoimmune rheumatic and
musculoskeletal diseases in remission or with low disease
activity and in healthy controls: a single center study*,
FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, (2022)

tudományos közlemény felelős szerkesztői nyilatkozunk,
hogy a publikációhoz kapcsolódó, a SARS-CoV-2 elleni
T-sejtes immunválasz mérésére szolgáló módszer
beállításában a jelölt, Gémes Nikolett nélkülözhetetlen
szereppel bírt, továbbá nyilatkozom, hogy a publikáció
áramlási citometriás módszertani részét más eljárásban
nem használtuk fel és a jövőben sem fogjuk.

.....
Dr. Szebeni Gábor János

.....
Dr. Balog Attila

Szeged, 2024.09.05.

