

**Inter- és intratumor heterogenitás egysejt szintű elemzése, valamint a  
TMEM45A fehérje vizsgálata humán nem-kissejtes tüdő adenokarcinómában**

Ph.D. értekezés

Neuperger Patrícia

Témavezető: Dr. Szebeni Gábor János  
Tudományos főmunkatárs

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biológia Doktori Iskola  
HUN-REN, Szegedi Biológiai Kutatóközpont



Szeged

2024

<b>Tartalomjegyzék</b> .....	2.
<b>Rövidítések jegyzéke</b> .....	4.
<b>1. Bevezetés</b> .....	7.
1.1. A tüdőrák .....	7.
1.2. A rákos sejtek jellemzői.....	8.
1.3. Tumoron és sejtvonalon belüli heterogenitás .....	10.
1.4. Rákos sejtek interakciója a mikrokönyezettel .....	12.
1.4.1. Hipoxiás mikrokönyezet .....	13.
1.4.2. Savas mikrokönyezet .....	15.
1.5. Terápiás lehetőségek.....	17.
1.5.1. Hagyományos módszerek .....	18.
1.5.2. Leggyakoribb célzott terápiák.....	19.
1.5.2.1. Epidermális eredetű növekedési faktor receptor (EGFR) mutáció... 19.	
1.5.2.2. Anaplasztikus limfóma kináz (ALK) átrendeződés .....	19.
1.5.2.3. Proto-onkogén 1 (ROS1), receptor tirozin-kináz átrendeződés .....	19.
1.5.2.4. Kristen patkány szarkóma virális onkogén (KRAS) mutáció .....	20.
1.5.3. Immunterápiák .....	20.
1.6. Technikai háttér .....	21.
1.6.1. Egysejt-tömegcitometria .....	21.
<b>2. Célkitűzés</b> .....	24.
<b>3. Anyagok és módszerek</b> .....	25.
3.1. Humán nem-kissejtes tüdőrák sejtvonalak .....	25.
3.2. Sejtautentikáció.....	25.
3.3. Sejtek életképesség mérése .....	25.
3.4. Kvantitatív valós idejű polimer láncreakció (qRT-PCR).....	26.
3.5. Etikai nyilatkozat .....	28.
3.6. Primer sebészeti adenokarcinóma homogenizálása .....	28.
3.7. Egysejt-tömegcitometria .....	28.
3.8. Immunhisztokémia.....	31.
3.9. Statisztikai analízis .....	32.
<b>4. Eredmények</b> .....	33.
4.1. NSCLC sejtvonalak inter-és intratumor heterogenitása .....	33.
4.1.1. Sejtek kapuzási stratégiája .....	33.
4.1.2. NSCLC sejtvonalak klonális heterogenitása.....	34.

4.1.3. A hipoxiás körülmények között megtartott klonális heterogenitás.....	40.
4.2. Humán primer tüdő adenokarcinóma intratumor heterogenitása .....	45.
4.3. TMEM45A expressziója humán primer tüdő adenokarcinómában .....	53.
<b>5. Diskusszió.....</b>	<b>56.</b>
<b>Irodalomjegyzék.....</b>	<b>60.</b>
<b>Összefoglaló .....</b>	<b>66.</b>
<b>Summary.....</b>	<b>70.</b>
<b>Publikációs lista.....</b>	<b>74.</b>
<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>77.</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACK	ammonium-chloride-potassium	ammónium-klorid-kálium
ACTB	actin beta	β-aktin
ALK	anaplasztikus limfóma kináz	anaplasztikus limfóma kináz
ATP	adenosine triphosphate	adenozin-trifoszfát
CA9	carbonic anhydrase 9	karbon anhidráz
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4	citotoxikus T-limfocita antigén 4
CUDA	computer unified device architecture	számítógépes egységes eszközarchitektúra
CXCL12	C-X-C motif chemokine ligand 12	C-X-C motívum kemokin ligand 12
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4	C-X-C motívum kemokin receptor 4
CytoF	cytometry by time-of-flight	repülési idő alapú citometria
DEF	deferoxamine	deferoxamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	sejttenyésztő médium
DNS	deoxyribonucleic acid	dezoxiribonukleinsav
EGFR	epidermal growth factor receptor	epidermális eredetű növekedési faktor receptor
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule	epitélikus sejtadhéziós molekula
FBS	fetal bovine serum	magzati borjúsérum
FCS	flow cytometry standard	áramlási citometriai szabvány
FDA	Food and Drug Administration	Élelmiszer-és Gyógyszerügyi Hivatal
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded	formalin fixált paraffinba ágyazott
FIH	factor-inhibiting hypoxia inducible factor	faktor-gátló hipoxia indukált faktor
FlowSOM	flow self-organizing map	áramlási önszerveződő térkép
FSMC	FlowSOM metacluster	FlowSOM metaklaszter
Gal-1	galectin-1	galektin-1

Gal-3	galectin-3	galektin-3
Glut1	glucose transporter 1	glükóz transzporter 1
HIF-1	hypoxia inducible factor-1	hipoxia indukált faktor-1
HLA	human leukocyte antigen	humán leukocita antigén
HRE	hypoxia response element	hipoxia válasz elem
HT	healthy tissue	egészséges szövet
ICI	immune checkpoint inhibitor	immunblokádt gátló
ICP	inductively coupled plasma	induktív csatolású plazma
IHC	immunohistochemistry	immunhisztokémia
ITH	intratumor heterogeneity	intratumor heterogenitás
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	Kristen patkány szarkóma virális onkogén
LDHA	lactate dehydrogenase A	laktát dehidrogenáz A
MCT4	monocarboxylate transporter 4	monokarboxilát transzporter 4
MCSB	Maxpar cell staining buffer	Maxpar sejtfestő puffer
MFI	median fluorescence intensity	medián fluoreszcencia intenzitás
MMI	median metal intensity	medián fémintenzitás
MMP2	matrix metalloproteinase 2	mátrix metalloproteináz 2
mRNS	messenger ribonucleic acid	hírvivő ribonukleinsav
MST	minimum spanning tree	minimális fa
NSCLC	non small cell lung cancer	nem-kissejtes tüdőrák
ODD	oxygen-dependent degradation domain	oxigénfüggő degradációs domén
OS	overall survival	teljes túlélés
PBS	phosphate-buffered saline	foszfátpufferelt sóoldat
PD-1	programmed cell death protein 1	programozott sejthalál fehérje 1
PDGFB	platelet-derived growth factor subunit B	vérlemezke eredetű növekedési faktor B
PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase 1	piruvát dehidrogenáz kináz 1
PD-L1	programmed death-ligand 1	programozott sejthalál ligand1
PFS	progression free survival	progressziómentes túlélés
PGK1	phosphoglycerate kinase 1	foszfoglicerát kináz 1
PHD	prolyl hydroxylase domain	prolil-hidroxiláz domén
PLAU	plasminogen activator, urokinase	plazminogén aktivátor, urokináz

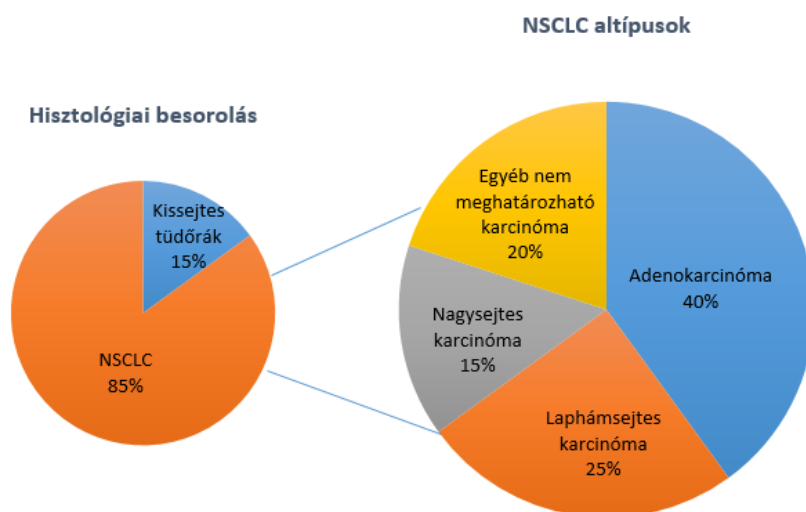
PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor	plazminogén aktivátor, urokináz receptor
ROS1	proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase	proto-onkogén 1, receptor tirozin-kináz
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute	sejttenyésztő médium
RT-qPCR	real-time quantitative polymerase chain reaction	kvantitatív valós idejű polimer lánreakció
SD	standard deviation	standard deviáció
STR	short tandem repeat	rövid tandem ismétlődés
TKI	tyrosine kinase inhibitor	tirozin-kináz gátló
TMEM	transmembrane protein	transzmembrán protein
TOF	time of flight	repülési idő
t-SNE	t-distributed stochastic neighbor embedding	t-elosztású sztochasztikus szomszéd beágyazás
TT	tumor tissue	tumorszövet
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	vaszkuláris endotéliális növekedési faktor A
VHL	von Hippel-Lindau	von Hippel-Lindau

# 1. BEVEZETÉS

## 1.1. A tüdőrák

A tüdőrák az egyik vezető elhalálozási ráktípus mindkét nemnél a magas mortalitási rátája, gyors növekedése és korai metasztázisa miatt. A rákos megbetegedések általi elhalálozás 27 %-át teszi ki [1]. Világszinten évente nagyjából 1,6 millió beteg hal meg tüdőrákban [2], a jelenlegi 5 éves túlélési esélye is csak 21% körülire tehető [3]. Hisztológiailag 2 fő csoportra osztható (1. ábra), a kissejtes tüdőrákra (15%) és a nem-kissejtes tüdőrákra (85%). A nem-kissejtes tüdőrákot további altípusokra lehet osztani: 40%-a adenokarcinóma, 25%-a laphámsejtes karcinóma, 15%-a nagysejtes karcinóma és a maradék 20% egyéb, kevert fenotípusú ill. szövettanilag nem osztályozható kategóriából adódik össze [4]. Az adenokarcinóma mirigyek hámjából alakul ki, amelyek felületaktív komponenseket szekretálnak. Lehet acináris, papilláris, szolid, mikropapilláris, kevert, valamint invazív nyálkahártya típusú [5].

Kialakulásában nagy szerepet játszik a dohányzás, ami a betegek 80-90%-ánál előfordul. Ennek a diagnosztizálás utáni elhagyása is nagyban segíti a túlélést, csökkenti az operáció utáni komplikációkat, javítja a gyógyszerekre adott reakciót és az életminőséget is [4], [6].



1. Ábra. A tüdőrák hisztológiai típusainak felosztása. A tüdőrák szövettanilag 2 nagy csoportra osztható, a kissejtes és a nem-kissejtes tüdőrákra. Utóbbi csoport 40%-a adenokarcinóma, mely a kutatásunk központi sejtípusa.

Újabb kutatások kiderítették, hogy a tüdőráknak nagy a heterogenitása, vagyis különböző tumoros sejttípusok egyvelegének tekinthető. Azonban a tüdőrák heterogenitás vezető genetikai és epigenetikai mechanizmusai, hogy miként lépnek egymással kölcsönhatásba különböző sejttípusok, valamint a heterogenitás és a gyógyszerekre adott rezisztencia kapcsolata még alig ismert [3].

## 1.2. A rákos sejtek jellemzői

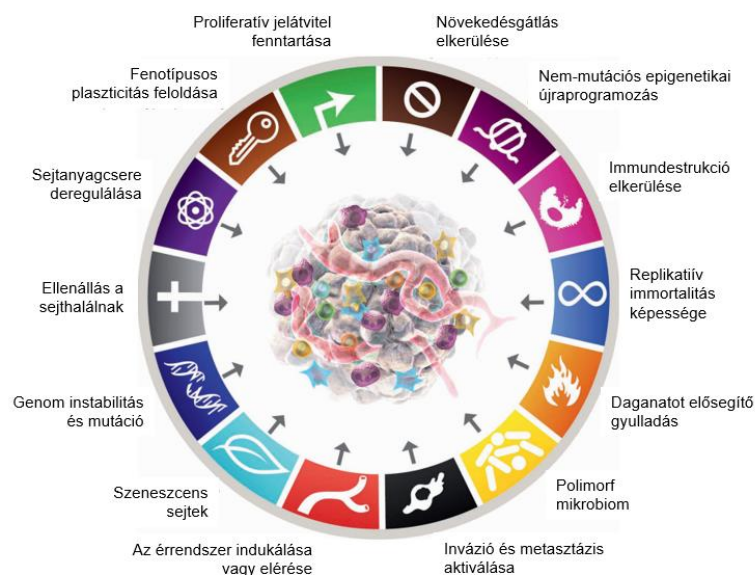
A rák egy dinamikus változásokkal járó betegség. Számos bizonyíték utal arra, hogy a tumorigenezis egy többlépcsős folyamat, ami genetikai változásokban nyilvánul meg, így egy progresszív folyamatként a normális sejtek sejtosztódási mechanizmusai felborulnak [7]. Hannahan és Weinberg korábban a rák ismérveit 6, majd később 8 folyamattal írta le, azonban a rákkutatás folyamatos fejlődésének és ismereteink bővülésének köszönhetően ma már 12 ismérvet különítenek el (2. ábra) [8]. Korábban a rákot a következő tulajdonságokkal jellemezték: növekedésgátlás elkerülése, immundestrukció elkerülése, replikatív immortalitás képessége, daganatot elősegítő gyulladás, invázió és metasztázis aktiválása, az érrendszer indukálása vagy elérése, genom instabilitás és mutáció, ellenállás a sejthalátnak, sejanyagcsere deregulálása, proliferatív jelátvitel fenntartása. Ezeket azonban újonnan kiegészítették a fenotípusos plaszticitás feloldásával, nem-mutációs epigenetikus újraprogramozással, polimorf mikrobiommal és a celluláris szenescenciával [8], [9].

A fenotípusos plaszticitás feloldása a rák patogenezisnek egy fontos komponense, mikor a progenitor sejtek nem a szigorúan meghatározott terminális differenciációt követik. Az organogenezis során normális esetben a sejtek egy szigorúan meghatározott fejlődési és érési folyamaton mennek keresztül. A progenitor sejtek celluláris differenciációjának végeredményeképpen a sejtek osztódása leáll. Éppen ebből kifolyólag a fenotípusos plaszticitás normális sejtosztódás korlátozó képességének feloldása és a terminális differenciáció elkerülése fontos része a rák patogenezisnek. A celluláris differenciációt megzavarhatja az érett sejt dedifferenciációja progenitor sejté, ha a terminális differenciáció blokkolva van, vagy ha különböző sejtvonalakba transzdifferenciálnak.

Régóta köztudott, hogy a gének mutációjának nagy szerepe van a rák kialakulásában, azonban van egy látszólag ettől független módja, ami csupán epigenetikailag szabályozza a génexpresszió változásokat. Ezt nem-mutációs epigenetikus újraprogramozásnak nevezzük [8]. A tumor mikrokörnyezetnek különösen nagy hatása lehet az epigenomra, ezen belül is a hipoxia egy fontos tényező, mivel hipermetilációt okozhat. A hipermetiláció viszont olyan folyamatokat gátolhat, mint a sejtciklus szabályozás, apoptózis, DNS javítómechanizmus és gyakran a tumorszuppresszor géneket is befolyásolja [10].

Egyre több bizonyíték mutatja azt is, hogy a mikrobiom polimorf változatossága is hatással lehet rák fenotípusokra. A bőr, bél, tüdő, hüvelyi, orális és tumor mikrobiomnak is tumor moduláló hatása lehet, mivel képesek a tumor növekedését, gyulladást, immunrendszer kikerülését, genom instabilitást és a terápiára adott rezisztenciát is befolyásolni.

A celluláris szenescenciát sokáig egy neoplázia elleni védekező mechanizmusnak tartották [11], azonban a folyamat bioaktív fehérjék, kemokinek, citokinek és proteázok felszabadulásával jár, amelyek megváltoztathatják a sejtek morfológiáját, metabolizmusát és tumorgenezist indukálhatnak [12].



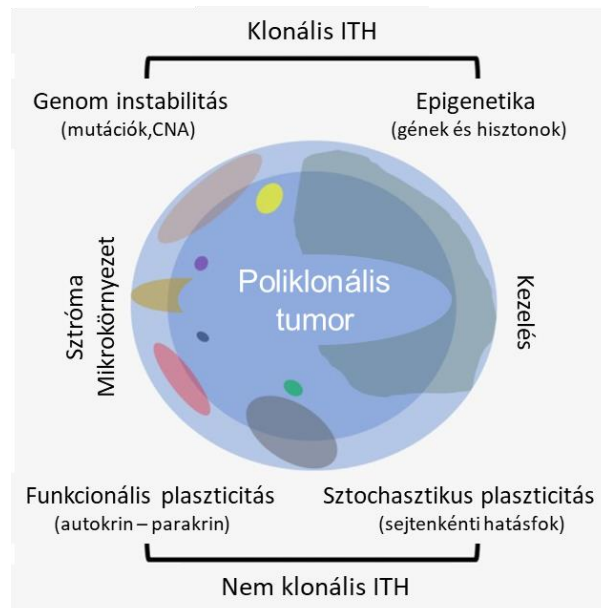
2. Ábra. A rákos sejtek 12 tulajdonsága. A daganatképződés egy többlépcsős, dinamikusan változó folyamatok összességévé írható le, melyhez a tumorsejteknek különböző tulajdonságokkal kell rendelkezniük [Hanahan, 2022].

### 1.3. Tumoron és sejtvonalon belüli heterogenitás

Már az 1800-as években Rudolf Vichow felfigyelt a tumoron belül a sejtek diverzitására. Majd az 1960-as és 70-es években citogenetikai vizsgálatokkal is kimutatták a tumoros sejtpopulációk genetikai és fenotipikus variációit [13].

A tumorok diagnosztikáját és terápiáját nagyban megnehezíti a heterogenitás ténye, mivel molekulárisan, fenotipikusan és funkcionálisan is különbözőek egy egyéneken belül az egyes tumor régiók (intratumor heterogenitás, ITH), valamint egyének között a különböző daganatok még ugyanolyan szövettani besorolású rák esetében is (inter-tumor heterogenitás) (3. ábra). A daganatok több millió rákos sejtből állnak, amelyek a neoplasztikus változások által torzított mikrokörnyezetben helyezkednek el és a tumor mikroevolúciója során az egyes tumor régiók eltérő mikrokörnyezetének eltérő szelektív nyomása eltérő tumorsejt alpopulációk kialakulásához vezet. A rákos sejtek és a tumor mikrokörnyezetét alkotó sejtek heterogenitása elősegíti a betegség progresszióját és a kezeléssel szembeni rezisztenciáját [14].

Morfológiai szinten különböző hisztológiai heterogenitás mintázatok eltérő szintű differenciációval és metasztatikus változásokkal figyelhetők meg ugyanabban a tumorban. Ezeknek a részterületeknek a tumoron belül más a génexpressziójuk és a mutációs mintázatuk [15].

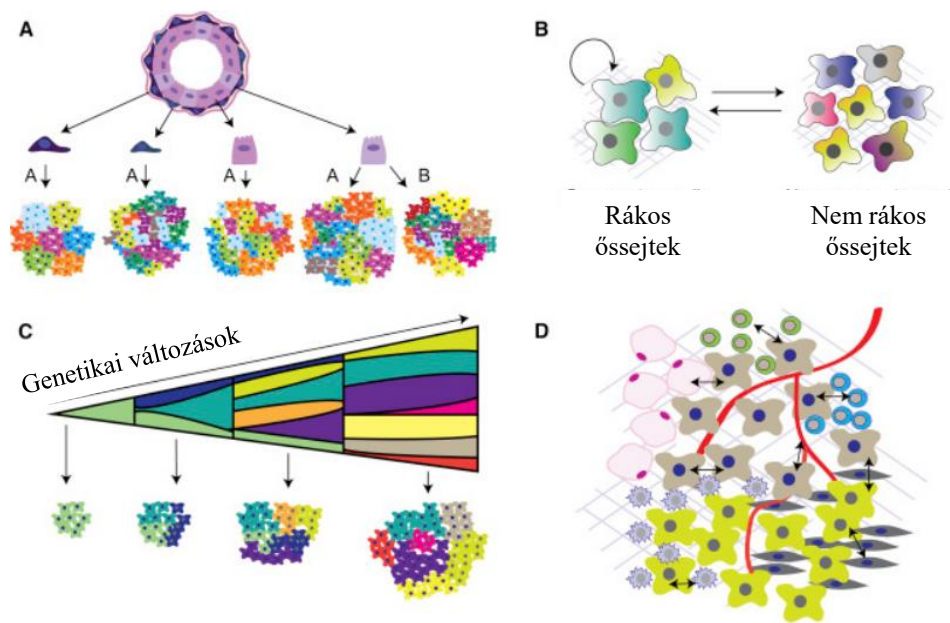


3. Ábra: Az intratumor heterogenitás (ITH) különböző fajtái és az őket befolyásoló hatások. Molekuláris szinten elkülöníthetjük a klonális valamint a nem klonális intratumor heterogenitást [Stanta és Bonin, 2018][16].

Molekuláris szinten két nagy csoportot kell elkülönítenünk, az egyik általában klonális ITH, ami továbbadja a leánysejteknek az információt. A genetikai klonális evolúció a DNS mutáción és a kópiaszám változáson, valamint az epigenetikai változásokon alapszik [17].

A másik a funkcionálisan nem klonális ITH, ami a genetikailag instabil rákos sejtek és a mikrokörnyezet interakciójából adódik (4. ábra). Ez az interakció régióként változhat a primer tumor körül, maga a sztróma pedig szintén heterogén lehet. Ez az összes komplex kapcsolat a funkcionális fenotípusos plaszticitás. Emellett még egy úgynevezett sztochasztikus plaszticitás is létezik, ami abból adódik, hogy minden sejt, még egy sejtvonalon belül is, különböző határfokú transzkripció és transláció szinttel rendelkezik [16], [18].

Ebből kifolyólag egy daganat több régiójából vesznek biopsziát, és a malignusabb régió alapján állítják fel a diagnózist, de a vizsgálatból a gyakorlatban további agresszív területek hiányozhatnak a topológiai heterogenitásuk miatt [19].



4. Ábra: (A) A származási sejt differenciálódási állapotának és a daganatot kiváltó genomi változásának (A vagy B) kombinációja a tumor fenotípusának meghatározója. (B) A sejtek plaszticitása hozzájárul a rák fenotípusos sokféleségéhez. Dinamikus kétirányú sejtkonverzió történik a rákos össejtek és a daganaton belüli nem rákos össejtek között. (C) A daganatképződés egy többlépcsős elágazó evolúciós folyamat. A klónok filogenetikai vonalai genomi változással és darwini szelekcióval alakulnak ki. Ez a genomi heterogenitás fenotípusos tumor heterogenitássá válik. (D) A tumorsejtek és mikrokoznyezetük közötti kölcsönhatás is befolyásolja a daganatok sokféleségét [Koren és Bentires-Alj, 2015].

#### 1.4. Rákos sejtek interakciója a mikrokoznyezettel

Az ITH egyik oka a genetikailag instabil rákos sejtek és a mikrokoznyezet interakciójából adódik, ami befolyásolja a fenotípust. Az interakció régióról régióra változhat [20]. A tumor mikrokoznyezet kritikus szerepet játszik a daganatok kialakulásában, beleértve az immunszuppressziót, daganatképződést, a rák

növekedését és a metasztázisokat. A tumor mikrokörnyezetnek nagy hatása van a tumorok metabolizmusára és növekedésére. Két fontos meghatározó tényezője a hipoxia és a laktátos acidózis. Ezeket a változásokat elsősorban a rossz szöveti perfúzió, abnormális tumor vaszkularizáció, kontrollálatlan proliferáció és a szabálytalan energiametabolizmus kombinációi idézik elő [21].

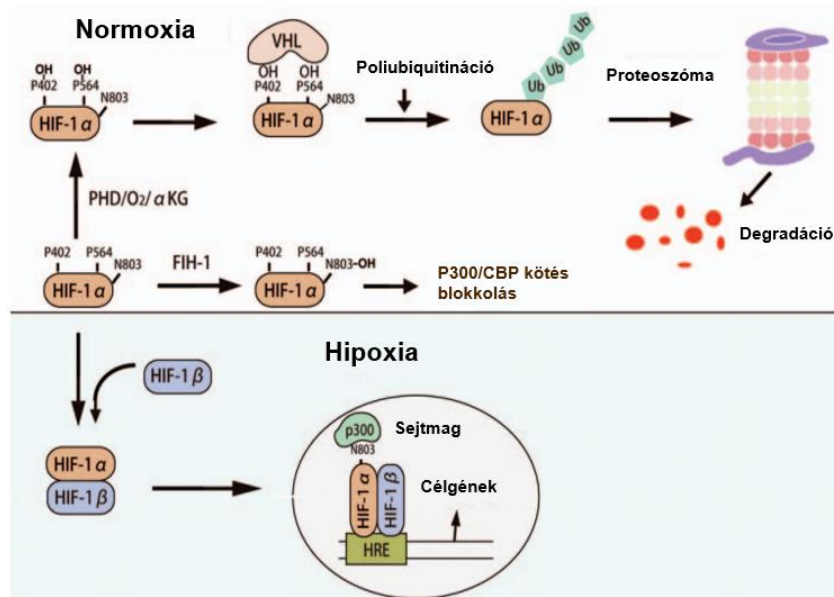
#### 1.4.1. Hipoxiás mikrokörnyezet

A tumor mikrokörnyezet egy gyakori jelensége a hipoxia, ami képes megváltoztatni a tumor metabolizmusát és hozzásegít a daganat progressziójához [22].

Az oxigénérzékelés képessége egy fontos alapvető biológiai jelenség, mivel a csökkent oxigénellátásnak erőteljes hatása van a fejlődésre és fiziológiai folyamatokra. Hipoxiára adott specifikus válaszként olyan gének upregulálódnak, melyek segítenek helyreállítani a homeosztázist sejtes, lokális és szisztémás szinten egyaránt.

Az oxigén homeosztázis egyik kulcsszereplője a hipoxia indukált faktor-1 (HIF-1), amely  $\alpha$  és  $\beta$  alegységből épül fel (5. ábra). A  $\beta$  alegység ugyan független az oxigén ellátottságtól, azonban az  $\alpha$  alegysége rendkívül érzékeny rá. Csak hipoxia vagy hipoxiát utánzó reagensek hozzáadása hatására képes a HIF-1 $\alpha$  szintje megnövekedni [23]. Az oxigénmennyiség csökkenése után azonnal stabilizálódik a HIF-1 $\alpha$ , heterodimert képez a konstitutívan termelődő  $\beta$  alegységgel és az így kialakult HIF-1 komplex transzlokálódik a sejtmagba majd egy konszenzus szekvenciához, a hipoxia válasz elemhez (HRE) kötődik és aktiválja a célgéneket. A legfontosabb enzimek, amelyek szabályozzák a HIF-1 $\alpha$  degradációs kaszkád oxigénfüggő lépéseit a prolin-hidroxilázok (PHD), melyeknek kofaktorként vasra ( $\text{Fe}^{2+}$ ), szubsztrátként pedig oxigénre van szükségük [24], [25]. Normoxiás körülmények között az oxigén dependens degradációs domén (ODD) hidroxilációja a HIF-1 $\alpha$  és a von Hippel-Lindau (VHL) E3 ubikvitin ligáz kölcsönhatását eredményezi, amely proteozomális degradációhoz vezet [23], [26]. Emellett a HIF-1 $\alpha$  szabályozásában a szintén oxigént igénylő faktor-gátló HIF (FIH) is részt vesz a C-terminálison lévő transzaktivációs domén hidroxilációjával, ezzel megakadályozva a transzkripciós kofaktorról történő interakciót. Így ha maradna

bármennyi fehérje, ami nem degradálódik, a transzkripció aktivitás gátlása biztosított a FIH közvetített hidroxiláción keresztül [27].



5. Ábra. A HIF-1 komplex szabályozása normoxia és hipoxiás állapot esetében. Oxigén hiányában a von Hippel-Lindau ligáz nem tud kapcsolódni a HIF-1 $\alpha$  alegységhez, ebből kifolyólag nem degradálódik és komplexet tud képezni a HIF-1 $\beta$ -val. A HIF heterodimer a sejtmagba transzlokálódik, majd a koaktivátorok, mint a P300 kötődése után a HRE-hez kapcsolódva aktiválja a célgéneket [Lin és mtsai., 2014].

Ellenkező esetben, amikor az oxigénszint csökken, vagy a kofaktorok bármelyike nem áll rendelkezésre, a prolin-hidroxiláció nem következik be, ezzel megakadályozva az ubiquitin molekulák kötődését és a HIF-1 $\alpha$  lebontását, így a HIF-1 $\alpha$  alegység szintje megemelkedik és aktiválhatja a géneket [7], [8].

### 1.4.2. Savas mikrokörnyezet

Annak ellenére, hogy rég tudják, hogy a laktátos savasodásnak fontos szerepe van a szervezetben, az továbbra is kérdés, hogyan válaszolnak rá a sejtek és ez a válasz hogyan hat a rákos fenotípusra. A mikrokörnyezetre jellemző az oxigénhiány, magas laktát mennyiség és extracelluláris acidózis, glükóz és energiahiány. Ezek a mikrokörnyezeti mintázatok nagyon sok különböző tumorban megfigyelhetőek, ami az individuális tumorok metabolikus státuszának heterogenitására reflektálnak [21].

1920-ban Otto Warburg német tudós abnormális metabolizmust írt le rákos sejteknél, amely új utat nyitott a rákkutatásban [28]. Az emlősök sejtjei ATP nyerés során a glükózt piruváttá alakítják, amelyet a mitokondrium tud metabolizálni a citromsavciklus és az oxidatív foszforiláció segítségével vagy anaerob glikolízis révén a citoplazmában laktáttá alakítja. Otto Warburg azonban megfigyelte, hogy a tumorsejtek az oxigén koncentrációtól függetlenül a piruvátot laktáttá alakítják. Ez az aerob glikolízis a Warburg effektus (6. ábra) [29].



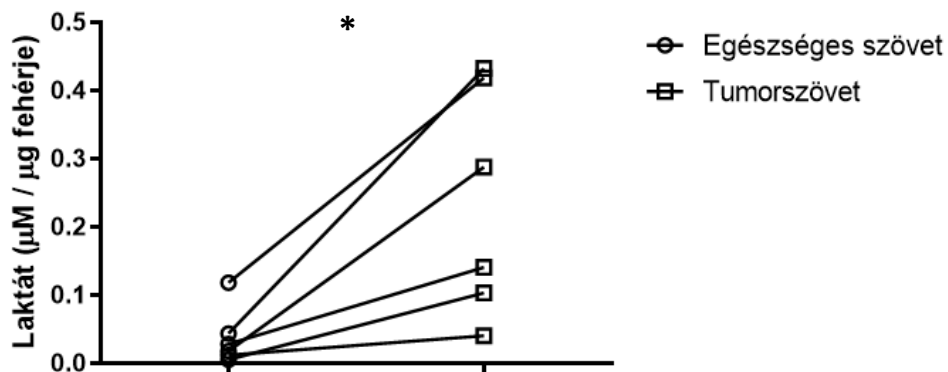
6. Ábra. A rákos sejtek glükózmétabolizmusának megváltozása. A sejtek oxigén jelenléte mellett is képesek laktátot termelni, ezzel savas extracelluláris teret létrehozva. Emellett a kevésbé hatékony energianyerés miatt több glükóz felvételére van szükségük [Lin és mtsai., 2014].

A tumorok nagy mennyiségben veszik fel a glükózt, aminek a hatására megnövekszik a glikolízis, ami szuppresszálja az oxidatív foszforilációs rendszert. Ezt a korai, avaszkularizált fázisban keletkező hipoxiás környezet okozza. Mivel az aerob glikolízis ATP nyerése jóval rosszabb, mint az oxidatív foszforilációé, a metabolikus átprogramozás egy megnövekedett glükóz felvételt von maga után, hogy elég energiát nyerjen a makromolekuláris bioszintézishez és redox szükségletéhez.

Emiatt a glükóz transzporter és a downstream glikolitikus enzimeinek 70%-nál emelkedett expressziót mutatnak [28].

Az aerob glikolízis közben laktát termelődik, amit laktát/ H<sup>+</sup> szimporterek, a monokarboxilát transzporterek (MCT) juttatnak ki a környezetbe. Néhány tumor jobban pumpálja ki a protonokat az extracelluláris térbe, ezzel egy fordított pH grádiens hoznak létre, így az extracelluláris tér lesz savas pH-jú, az intracelluláris pedig alkalikus [21]. A tumorokban jelenlévő laktát acidózist a 7. ábrán lévő saját mérésünk is alátámasztja humán primer tüdőtumorszövet és ugyanazon betegből származó nem-malignus tüdő szövet összehasonlításával.

A glikolitikus fenotípus és ezzel együtt a metabolikus savak ezután a jól oxigenizált környezetben is megmaradhatnak. A savas környezet darwini szelekcióként működik és azoknak a sejteknek kedvez, amelyek képesek adaptálni a mechanizmusait, hogy rezisztensek legyenek a sav-mediált apoptózisra. Mivel a krónikus acidózis toxikus lehet a normális sejtekre, csak az adaptálódott sejtek maradnak életben [30]. A savas mikrokörnyezet tumor progressziót promótál, metasztázist és inváziót stimulál, az extracelluláris mátrix degradációját és átrendeződését mediálja, serkenti a vaszkularizációt és gátolja az immunválaszt a tumor antigénekre [31].



7. Ábra. Hat sebészetileg eltávolított humán tüdőtumor laktát mennyisége a saját egészséges tüdőszövetéhez képest. A beteg szövetekben szignifikánsan nőtt a laktát mennyisége.  $p=0.017$ (\*).

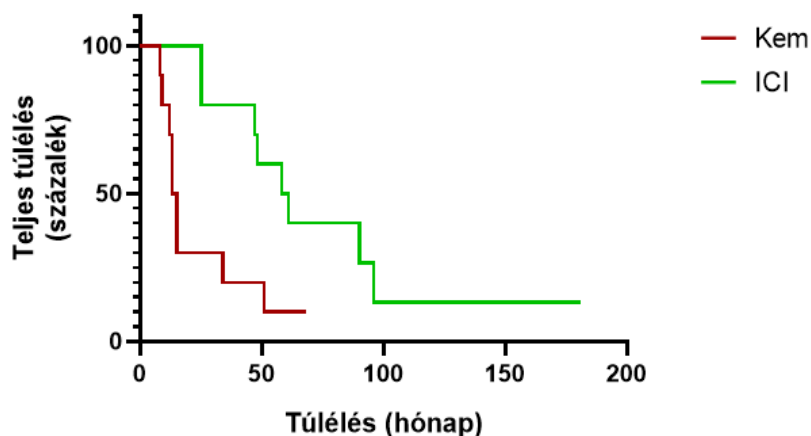
\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

## 1.5. Terápiás lehetőségek

Mivel a tüdőrák molekulárisan heterogén betegség, nagyon nehéz a kezelése is. A legbiztosabb módszer, ha sebészetileg ki tudják metszeni, azonban emellett sugárterápiával és kemoterápiával is kezelhetik. A molekuláris biológia fejlődésével egyre jobban megismerjük a betegséget, ebből adódóan a célzott terápiák is egyre nagyobb teret hódítanak, amikkel specifikusabb hatást érhetnek el [2]. Adenokarcinómában számos irnyító mutációt fedeztek fel, mint az epidermális eredetű növekedési faktor receptor (EGFR), anaplasztikus limfóma kináz (ALK), reaktív oxigéngyök 1 (ROS1). Ezen mutációk hatására konstitutívan aktívak lesznek a szignalizációs fehérjék, ami a fokozott proliferációhoz, angiogenezishez, metasztázishoz és csökkent apoptózishoz vezet [32].

Jelenleg előrehaladott NSCLC-s betegeknél első vonalon platina alapú kombinatórikus terápiát alkalmaznak. A citotoxikus terápiás módszereket viszont egyre inkább felváltják a személyre szabott célzott terápiák, amelyek a beteg egyéni genetikai változásait és a programozott sejthalál ligand 1 (PD-L1) státuszát veszik figyelembe. Ezek ellenére azonban a túlélési ráta még mindig nagyon alacsony [2], [33], aminek egyik oka, hogy a daganatsejtek plaszticitásuk miatt képesek olyan fenotípusos állapotba átalakulni, melyet már nem céloznak meg a korábbi gyógyszerek [5].

Kutatócsoportunk által végzett kutatás alatt vérvételtől számított 5 évnyi nyomon követés után az immunterápiával kezelt betegek túlélése sokkal kedvezőbb volt, mint a csak platina alapú kemoterápiás szerrel kezelt betegeké (8. ábra). A betegcsoportokban vegyesen voltak férfiak és nők, valamint adenokarcinómás és laphámsejtes karcinómás betegek. A kemoterápiás csoport ciszplatin + pemetrexed vagy karboplatin + gemcitabine kombinációt kapott. Mivel a mintagyűjtés időpontjában (2018. november – 2019. június) még csak másod vonalon engedélyezték az immunterápiákat, ez a betegcsoport is első vonalon platina alapú kezelést kapott, amit felváltott a PD-1 gátló pembrolizumab vagy nivolumab terápia [33].



8. Ábra. PD-1 gátló pembrolizumab/nivolumab kezelt (ICI = immun checkpoint inhibitor), valamint kemoterápiás (Kem) tüdő rákos betegek túlélése. Pirossal jelöltük a kemoterápiás, zölddel pedig az immunterápiás betegeket. Az immunterápiás betegek teljes túlélése jóval hosszabb, mint a csak kemoterápiát kapott betegeké. Statisztikát Log-rank (Mantel-Cox) teszttel végeztük,  $p=0,0104$  (\*). \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ . Kem.:  $n=10$ , életkor  $67,3 \pm 5,6$  év, medián PFS (progressziómentes túlélés) =11 hónap, OS (teljes túlélés) =14 hónap, ICI:  $n=10$ , életkor  $65,1 \pm 5$  év, medián PFS=14,5 hónap, OS=59,5 hónap.

### 1.5.1. Hagyományos módszerek

Továbbra is a kemoterápia az egyik első vonalú kezelési módszer, ha a beteg nem alkalmas immunterápiára. A nem laphám eredetű metasztatikus NSCLC kezelésére tipikusan karboplatin vagy ciszplatint és pemetrexedet adnak 4-6 ciklusig, amit csak pemetrexed követ a tumor progressziójáig vagy toxicitásig. Laphám eredetű NSCLC esetében a platínium dubbet terápia karboplatinból vagy ciszplatínból és paclitaxelből vagy gemcitabine-ból áll [6].

## 1.5.2. Leggyakoribb célzott terápiák

### 1.5.2.1. Epidermális eredetű növekedési faktor receptor (EGFR) mutáció

A fehér bőrű NSCLC-s betegekben az epidermális eredetű növekedési faktor receptor (EGFR) mutáció 10%-uknál van jelen [34], míg az ázsiaiaknál akár az 50%-ot is elérheti [35]. Ilyen mutációk esetében EGFR tirozin-kináz gátlók alkalmazhatóak első vonalban. Ha PD-L1 mutáció is fennáll, akkor is EGFR tirozin-kináz gátlót (TKI) ajánlanak, mivel az EGFR mutáció az immunterápia hatását negatívan befolyásolja. 2017 óta a leggyakrabban alkalmazott TKI az osimertinib [6]. Ez egy harmadik generációs irreverzibilis TKI, mely az EGFR T790M mutációt célozza meg [36], míg az első generációs TKI-k a TK domén ATP kötését gátolják [37]. Összehasonlítva a gefitinibbel és erlotinibbel 54%-os javulást figyeltek meg a progressziómentes túlélésben (PFS), valamint 6,8 hónappal hosszabb teljes túlélést (OS) [38], [39].

### 1.5.2.2. Anaplasztikus limfóma kináz (ALK) átrendeződés

Az ALK átrendeződés az NSCLC-s betegek 2-5%-át érinti [40]. Ezek a génátrendeződések ALK tirozin-kináz inhibitorokra érzékenyek. Az előrehaladott ALK pozitív betegek között gyakori az agyi metasztázis és a leptomeningeális betegség, emiatt a központi idegrendszeri aktivitást előtérbe helyező első vonalbeli kezelést részesítik előnyben. Első vonalbeli kezelésként az alectinib, brigatinib vagy lorlatinib javasolt, mivel mindegyik jobb PFS-t és központi idegrendszer aktivitást mutatott a korábbi ALK TKI-okkal szemben, mint a crizotinib [41].

### 1.5.2.3. Proto-onkogén 1 (ROS1), receptor tirozin-kináz átrendeződés

A ROS1 az inzulin receptorcsalád egyik tirozin-kináza, amely a betegek 1-2%-ában fordul elő. Az átrendeződések a ROS1 inhibitorra, a crizotinibre érzékenyek [42].

#### 1.5.2.4. Kristen patkány szarkóma virális onkogén (KRAS) mutáció

Ez a tüdőrákban leggyakrabban előforduló mutáció, ami az NSCLC-s betegek 27,5%-át érinti [43]. A KRAS mutációk 50%-át a 12-es kodon mutációja teszi ki (KRAS G12C mutáció) és általában a dohányzással hozható összefüggésbe [44]. A KRAS inhibitorok kedvező kimenetelt mutatnak metasztatikus tumorokban is. A sotorasib az első célzott terápia erre a mutációra, melyet csak nemrégiben kezdtek el alkalmazni, de eddigi adatok alapján ígéretesnek bizonyult [45].

#### 1.5.3. Immunterápiák

Az immunterápiák bevezetése nagymértékben megváltoztatta a metasztatikus NSCLC-s betegek kezelését. Ahogy folyamatosan fejlődött ez az ágazat, egyre hosszabb túlélési időt értek el vele. Az immunterápiák, mint az adaptív transzfer vagy az immunblokádi inhibitorok az immunrendszer komponenseit használja fel a rák elleni küzdelemben. A két leggyakoribb immunellenőrzőpont protein a programozott sejthalál fehérje 1 (PD-1) és a citotoxikus T limfocita antigén 4 (CTLA-4), melyek a T-sejt közvetített immunválasz gátlására szolgáló ko-inhibitor receptorok a T-sejtek felszínén. Azonban a daganatsejtek kihasználják ezeket a gátló molekulákat, hogy a tumor toleranciáját és T-sejtek kimerülését idézzék elő [46].

A kezelések sikeressége függ a ligandok expressziójától, amit PD-L1 esetében 3 kategóriára osztottak: PD-L1 negatív (a tumorsejtek kevesebb, mint 1%-a expresszálja), PD-L1 alacsony pozitív (1-49%) és PD-L1 pozitív (>50%). A PD-L1 pozitív betegek esetében sokkal jobb eredményt értek el toxicitás és túlélési idő szempontjából is, mint a kemoterápiával. A KEYNOTE-024 felmérésben a pembrolizumabbal 26,3 hónap volt a medián túlélési idő és az 5 éves túlélést is a betegek 31,9%-a elérte [6], [47].

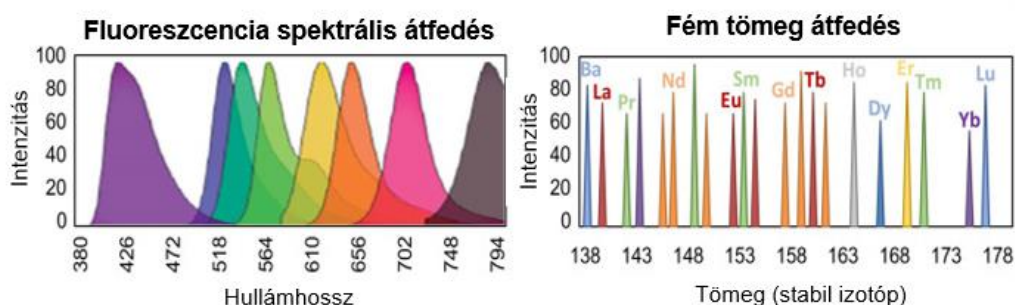
A CTLA-4 gátlása a helper T sejteken keresztül számos immunológiai válaszban szerepet játszik. Az Ipilimumabot 2011-ben használták legelőször melanóma kezelésére, ami gátolta a CTLA-4-et. 2020-ban az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (Food and Drug Administration, FDA) kijelentette, hogy első vonalon a nivolumab és ipilimumab kombinatórikus terápiaja előnyös kezelés az NSCLC-s betegek számára 1%-nál kisebb PD-L1 expresszió és EGFR/ALK aberráció nélküli esetben [46].

## 1.6. Technikai háttér

Az egysejt alapú technológiák új utat nyitnak a kutatásokban, mivel így nemcsak alaposabban megérthetjük az ugyanabban a szövetben lévő különböző sejttípusok molekuláris jellemzőit, hanem akár teljesen új sejttípusokat is meghatározhatunk [3].

### 1.6.1. Egysejt-tömegcitometria

Az áramlási citometria egy új generációját képviseli a tömegcitometria, amellyel multiplex immunfenotipizálást lehet végezni egysejt szinten. Az egysejt-tömegcitométerrel minden eddiginél összetettebben meg lehet határozni a sejtek fenotipikus és funkcionális profilját. A tömegcitométer riporter molekulákat, általában antitesteket használ, amelyek fémizotópokhoz vannak kötve, hogy jelöljék a vérből, szövetből vagy sejt kultúrából származó sejteket. A fémjelölt antitestek specifikusan kötnek az adott proteinekhez és a tömegcitométer ezeknek a markereknek az expresszióját méri minden egyes különálló sejtben a detektált fém atomi tömegének megfelelő csatornában. A laborunkban lévő harmadik generációs Helios tömegcitométer (Fluidigm) 135 detekciós csatornát kínál, akár több mint 1000 sejt/perc mérési sebességgel. A fluoreszcens áramlási citométernél előnyösebb a stabil fémizotópok atomi tömegének a detektálása, ugyanis a fluorokrómok spektrális átfedéséhez képest a tömegcitometriában nincs átfedés és nem szükséges kompenzálni (9. ábra).

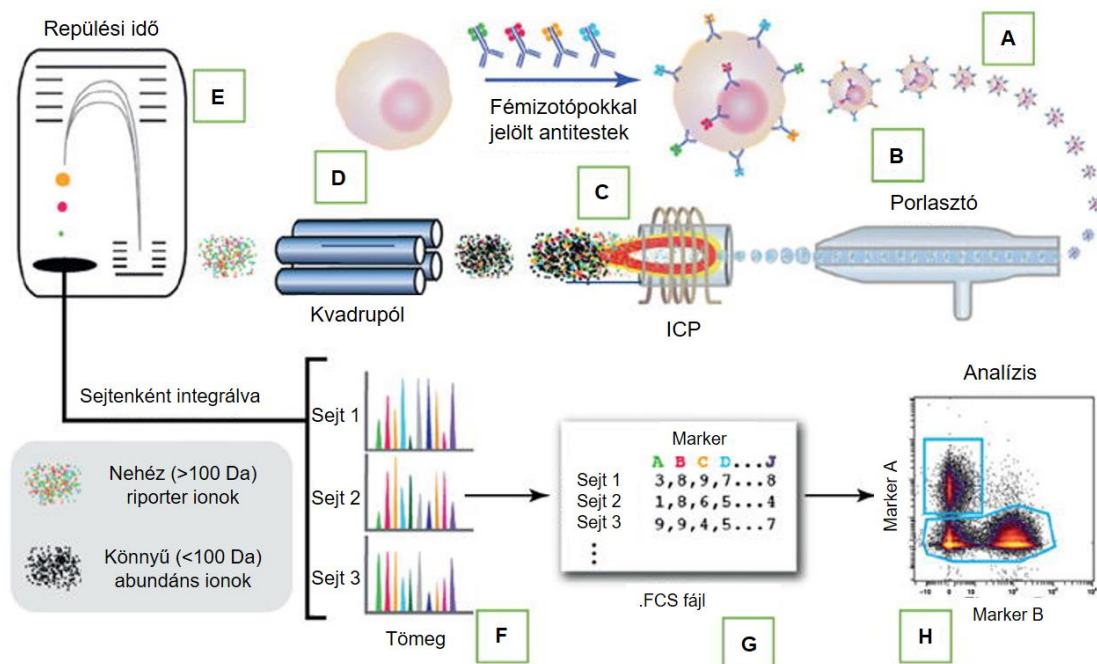


9. Ábra. Spektrális átfedés a hagyományos fluoreszcens citométereknél, illetve a fém izotóp jelek átfedésének hiánya az egysejt-tömegcitométer esetében [Lin és mtsai., 2014].

A jelölő izotópoknak alacsony a természetes előfordulási aránya biológiai rendszerekben, emiatt nem fognak interferálni az egysejt analízissel. A riporter fémjelek az antitestekhez fém-kelátoló polimerrel kapcsolódnak (10. ábra A). A tömegcitométernek 5 fő komponense van, a mintabeviteli egység, az induktívan kapcsolt plazma (ICP), az ion optika, végül a repülési idő ('time of flight'-TOF) analizátor és detektora. A vizsgálni kívánt sejtfelszíni és/vagy intracelluláris fehérjékre specifikus antitest koktéllal történő jelölés után, a sejtszuspenzió bekerül a porlasztóba, amelyen argon gáz folyik át (10. ábra B). A sejtek áthaladnak a porlasztón, majd átmennek a spray csatornán, ahol egysejtes cseppekké porlaszódnak. A spray kamra nagyjából 200 fokos, ami segíti a maradék víz eltávolítását, hogy a plazma hatékonyan ionizálhassa a mintákat. Ez azt eredményezi, hogy a spray kamrát a sejtek individuális sejt-ként hagyják el. Az ICP-be injektálódnak, vaporizálódnak, atomizálódnak és ionizálódnak (10. ábra C). A plazma az argongáz ütközések által indukált ionizációból keletkezik. A radiofrekvenciás tápellátás egy oszcilláló elektromos áramot hoz létre, ezzel egy erős elektromágneses mezőt generálva. Magas feszültségű szikrák leszakítják a szabad elektronokat a kamrából kilépő argongázzal. Ezek a szabadelektronok elektromágneses térben felgyorsulnak és kellő energiával összeütköznek, hogy az argongázt plazmává ionizálják. Mikor az aeroszolizált minták bekerülnek az injektoron keresztül a plazmához, a vízcseppek hamar elpárolognak. Az individuális sejtek ezután ionfelhőkké alakulnak.

Az ionfelhő egy alacsony nyomású optikai kamrába kerül. A kvadropól ionszűrő eltávolítja a nem szükséges kis molekulatömegű argont és endogén celluláris ionokat, így az izotóp ionpróbákat tartalmazó felhő jut el a TOF analizátorhoz (10. ábra D). Az ionfelhők egy elektrosztatikus erőnek lesznek kitéve, ami ortogonálisan gyorsítja a bejövő ionokat a detektor felé. Ez az ionok tömeg/töltés alapú elválasztását eredményezi (10. ábra E). A létrejött ionfelhő, ami tartalmazza az ionizált fémjeleket, az individuális sejtek proteintartalmát tükrözi (F) [48].

A tömegcitometriás mérés során FCS kiterjesztésű fájlok keletkeznek (10. ábra G), amit különböző, hagyományos (Kaluza, FlowJo) vagy tömegcitometriára kifejlesztett platformokon értékelhetünk ki (Cytobank, Astrolabe, Maxpar Pathsetter) (10. ábra H).



10. Ábra. Az egysejt-tömegcitometria folyamatábrája. A fémizotópokkal jelölt antitestekkel megjelöljük a mintákat (A), amelyek bekerülnek egy porlasztóba (B). Az ICP-nek (C), majd az ionszűrőnek (D) köszönhetően a mintából csak a megfelelő mérettartományú nehézfém ionok maradnak meg. Minden sejtől egy ionfelhő képződik, ahol a fémionok reprezentálják a jelölt fehérjéket. A TOF kamrában (E) tömeg/töltés alapján elkülönülnek az ionok, majd eljutnak a detektorig (F). Az így kapott eredményeket FCS fájlként (G) különböző módszerrel analizálhatjuk (H) [Lin és mtsai., 2014].

## 2. CÉLKITŰZÉS

**A,** Első célkitűzésünk a klonális heterogenitás normoxiás és hipoxiás körülmények közötti fenotipizálása NSCLC adenokarcinóma sejtvonalakban. A sejtvonalak közötti és sejtvonalon belüli heterogenitás vizsgálata 3 humán tüdő adenokarcinóma sejtvonallal történt, melyek az A549, H1975 és H1650.

**B,** Célunk volt humán primer NSCLC adenokarcinóma tüdőtumor intratumor heterogenitásának vizsgálata, egysejt felbontású, fehérje szintű elemzése.

**C,** A tömegcitometriával azonosított, humán adenokarcinómában kifejeződő TMEM45A fehérje expresszióját klasszikus IHC-val validáltuk nagyobb elemszámon humán NSCLC adenokarcinómában. Célunk volt megvizsgálni, hogy a TMEM45A mutat-e kolokalizációt a HIF-1 $\alpha$  fehérjével.

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **3.1. Humán nem-kissejtes tüdőrák sejtvonalak**

Sejtvonalas kísérleteinkhez 3 humán tüdő adenokarcinóma sejtvonalat használtunk, hogy átfogó következtetéseket vonhassunk le. Ezek az A549, H1975 és H1650 sejtvonalak, melyeket az American Type Culture Collection cégtől vásároltunk. A H1975 és H1650 sejteket DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) médiumban, az A549 sejteket DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Nutrient Mixure F-12) (DMEM, PAN-Biotech GMBH; F12 Nut mix, Gibco, Thermo Fisher Scientific) médiumban tenyésztettük, melyeket 4,5 g/l glükózzal, 10% magzati borjúsérummal (FBS) (Gibco), 2mM GlutaMAX-szal (Gibco), 100U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomycin antibiotikummal (penicillin G só és sztreptomycin szulfát só, Sigma-Aldrich) egészítettük ki. A sejteket hagyományos 10 mm átmérőjű sejtenyészítő Petri csészében növesztettük maximálisan 80% konfluenciával standard nyomáson 5% CO<sub>2</sub> tartalmú 37°C-os inkubátorban.

#### **3.2. Sejtautentikáció**

A sejtvonalakon a Microsynth céggel mikroszatellit alapú sejt autentikációt végeztünk. A bevizsgáláshoz 1 millió sejtet pelletként kétszer mostunk foszfát pufferelt sóoldatban (PBS, Lonza), 0,5 ml 90%-os etanollal felszuszpendáltuk és elküldtük a Microsynth AG cégnek (Balgach, Svájc) sejtautentikációra. A sejtvonalak profilozása erősen polimorf tandem ismétlődő szekvenciák (STR) alapján történt. Az STR-eket PowerPlex16 HS rendszerrel (Promega) amplifikálták. A fragment analízist ABI3730xl-lel (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) készítették, majd az adatokat GeneMarker HID szoftverrel (Softgenetics) elemezték.

#### **3.3. Sejtek életképesség mérése**

A sejtek életképességét fluoreszcens resazurin vizsgálattal határoztuk meg (Sigma-Aldrich). 96 lyukú sejtenyészítő csészébe (Corning Life Sciences) minden sejtípusból lyukanként 10.000 sejtet helyeztünk ki 80 µl sejtenyészítő

tápfolyadékba. Deferoxaminból (DEF) (Sigma-Aldrich) 10 mM-os törzsoldatot készítettünk tápfolyadékban oldva. A törzsoldatot sterilre szűrtük (0,22  $\mu\text{m}$ , alacsony kötésű filter, Merck). Ebből különböző koncentrációjú felező hígításokat készítettünk: 5 mM, 2.5 mM, 1.25  $\mu\text{M}$ , 625  $\mu\text{M}$ , 312.5  $\mu\text{M}$  és 156.25  $\mu\text{M}$ . A DEF kezeléseket 20  $\mu\text{l}$  törzsoldat hozzáadásával végeztük duplikátumokban. Így a végkoncentrációk a következők voltak: 1000  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 62,5  $\mu\text{M}$  és 31,5  $\mu\text{M}$ . A Resazurin reagensből (Sigma-Aldrich) PBS-ben (pH 7,4) feloldva 0,15 mg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítettünk, majd sterilre szűrtük egy 0,22  $\mu\text{m}$ -es membránon és porciózva  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk felhasználásig. A sejteket 72 óráig 5%  $\text{CO}_2$  tartalmú  $37^{\circ}\text{C}$ -os inkubátorban (Sanyo, Osaka, Japán) DEF-nal kezeltük, majd a 100  $\mu\text{l}$  sejtkultúrához 20  $\mu\text{l}$  resazurint adtunk. 2 óra inkubáció után mikrolemez-olvasóval (Cytofluor 4000, PerSeptive Biosystems) fluoreszcenciát (530 nm excitáció/ 580 nm emisszió) mértünk. A proliferációt a kezeletlen sejtekhez mértük, valamint minden értéket a sejt nélküli tápfolyadékhoz képest normalizáltunk.

### **3.4. Kvantitatív valós idejű polimer láncreakció (qRT-PCR)**

A sejteket 6 lyukú sejtenyésző csészébe (Corning Life Sciences) 2 ml tápfolyadékba helyeztük lyukanként 2 millió sejttel, majd 24 óráig hagytuk letapadni. A DEF-ből DMEM-F12 tápfolyadékkal 400  $\mu\text{M}$ -os oldatot készítettünk és egy 0,22  $\mu\text{m}$ -es filterrel (Merck) szűrtük. Miután leszívtuk a sejtekről a felülúszót, 2 ml 400  $\mu\text{M}$  DEF-nal kezeltük. 24 órás kezelés után PBS-sel mostuk, Accuzol-lal (Bioneer) felszedtük és  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az RNS-t a Direct-zol RNA Miniprep Kit-tel (ZymoResearch) a korábban leírtak szerint [49], a gyártó utasításai alapján izoláltuk. NanoDrop1000 spektrofotométerrel megmértük az RNS koncentrációját. A 3  $\mu\text{g}$  RNS cDNS-re fordított átírást 30  $\mu\text{l}$ -es végső térfogatban nagy kapacitású cDNS Reverse Transcription Kit-tel (Thermo Fisher Scientific) végeztük a gyártó utasítása szerint. Az átírás egy MyGenie 32 Thermal blokkban (Bioneer) történt a következő protokollal: 10 perc  $25^{\circ}\text{C}$ , 120 perc  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 perc  $0^{\circ}\text{C}$ , 10 perc  $75^{\circ}\text{C}$ , majd a gép  $8^{\circ}\text{C}$ -on tartotta a hőmérsékletet. A reverz transzkripció után a cDNS-t 130  $\mu\text{l}$  DNáz mentes vízzel (Thermo Fisher Scientific) hígítottuk, így a cDNS koncentrációja 18,75 ng/ $\mu\text{l}$  lett. A kvantitatív valós idejű polimer láncreakcióhoz (qRT-PCR) mintaként 5  $\mu\text{l}$  qPCRBIO SyGreen Mix enzimet, 3  $\mu\text{l}$  desztillált vizet, 1  $\mu\text{l}$  primert és 1  $\mu\text{l}$  cDNS-t adunk (18,75 ng), majd LightCycler 96 rendszerrel (Roche) mértük

[50]. A PCR protokoll a következő volt: enzim aktiváció 2 percig 95 °C-on, majd 45 cikluson keresztül denaturáció 95 °C-on 10 másodpercig, annealing 60 °C és extenzió 60 °C 10 másodpercig. A kapott Ct értékeket ACTB háztartási génre normalizáltuk. A relatív génexpresszió arányt génexpressziós változás vagy  $\Delta\Delta Ct$  (log2) értékkel ábrázoltuk  $\pm$  standard szórással. A kapott eredményeket GraphPad Prism programmal ábrázoltuk.

Gén	Termék	Forward Primer	Reverz Primer
VEGFA	Vaszkuláris endotéliális növekedési faktor	GCTCGGTGCTG GAATTTGATA	AAGTGGGGAAT GGCAAGCAA
PDGFB	Vérlemezke eredetű növekedési faktor-B	CTGAGTGACCA CTCGATCCG	CGGGTCATGTT CAGGTCCAA
SLC2A1	Glükóz transzporter 1	TGGCATCAACG CTGTCTTCT	AGCCAATGGTG GCATACACA
LDHA	Laktát dehidrogenáz	ACGTACTGCAT TTGCCCTT	CAGGATGTGAC TCACTGGGAA
PGK1	Foszfoglucérat kináz 1	CTGTGCCAAAT GGAACACGG	ATTGCTGAGAG CATCCACCC
PDK1	Piruvát dehidrogenáz kináz 1	AGATGAGTGAC CGAGGAGGT	GGAGGTCTCAA CACGAGGTC
MMP2	Márix metallopeptidáz 2	GGCGGTCACAG CTACTTCTT	GCCTAGCCAGT CGGATTTGA
CXCL12	C-X-C motívum kemokin ligand 12	CTACAGATGCC CATGCCGAT	CAGCCGGGCTA CAATCTGAA
CXCR4	C-X-C motívum kemokin receptor 4	ATCAGTCTGGA CCGCTACCT	CCAGACGCCAA CATAGACCA
PLAUR	Plazminogén aktivátor, Urokináz receptor	GGCTTGAAGAT CACCAGCCT	TGCATTCGAGG TAACGGCTT
CA9	Karbon anhidráz 9	GGAGCCTAGAG GCTGGATCT	GCAGGACAGGA CAGTTACCG
PLAU	Plazminogén aktivátor, Urokináz	CCGCTTTCTTGC TGGTTGTC	TGGCACAGGCA AATCCATCT
TMEM45A	Transzmembrán protein 45A	GGAGCTATTGC GGTCAAGTC	GGGGATACAGG ACAAATCCA
ACTB	$\beta$ -aktin	CCAACCGCGAC AACATGA	CCAGAGGCGTA CAGGGATAC

1. Táblázat. A kondíciók génexpresszióra gyakorolt hatását vizsgáló primerpanel a gének megnevezésével, forward és reverz primerekkel.

### **3.5. Etikai nyilatkozat**

Az vizsgálatba bevont páciensek tájékoztatást kaptak és beleegyeztek a kísérletekbe mielőtt részt vettek a kutatásban. A vizsgálat a Helsinkai Nyilatkozatnak megfelelően történt és a protokollt a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottsága hagyta jóvá. A vizsgálat címe: A PD-1 gátló kezelésre rosszul válaszoló és jól válaszoló nem-kissejtes tüdőkarcinómás betegek immunfenotipizálása. Projektazonosító kód: 163/2018-SZTE.

### **3.6. Primer sebészeti adenokarcinóma homogenizálása**

A humán tüdőszöveteket Dr. Furák Józseftől az SZTE SZÁOK Mellkassebészeti osztályáról kaptuk, aki sebészetileg távolította el a szöveteket. A mintákat közvetlenül a műtét után elhoztuk a laboratóriumunkba 4°C-os Rosewell Park Memorial Institute médiumban (RPMI), hogy feldolgozzuk. A nem érintett területet (egészséges tüdő, HT) és a malignus területet (TT) elkülönítettük, majd aseptikus sebészeti ollóval és csipesszel kis, kb 1 mm<sup>3</sup> –es darabokra vágtuk és enzimatikusan emésztettük 250 µg/ml liberázzal (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml DNázI-gyel (Sigma-Aldrich) FBS nélküli RPMI-ben szobahőmérsékleten rázatva egy órán keresztül. Az egysejt szuszpenziót steril gézen és 100 µm-es sejtszűrőn (Merck) átszűrtük. Ezek után centrifugáltuk 300 g-n 5 percig, a vörösvértesteket 5 ml ammónium-klorid káliummal (ACK) (0,15 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub> és 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,3, Molar Chemicals Ltd.) lizáltuk 3 percig. Majd 10 ml RPMI-vel mostuk és 300 g-n 5 percig centrifugáltuk, a sejteket Bürker kamrában megszámloltuk tripánkék (Sigma-Aldrich) életképesség festéssel az egysejt-tömegcitometriás festéshez.

### **3.7. Egysejt-tömegcitometria**

A sejtvonalakat (A549, H1975, H1650) PBS-sel mostuk és Accutázal (Corning Life Sciences) felemésztettük őket. A sejteket tripánkék életképesség festéssel megszámloltuk Bürker kamrában. Sejtvonalanként 3 biológiai replikátumból azonos mennyiségeket összemértünk és egy mintaként kezeltük tovább és előkészítettük a sejteket PBS-ben a tömegcitometriás festéshez. A

tüdőszövetek esetében ugyanazon páciens tumoros (TT=tumor tissue) és nem érintett tüdőterületét (HT=healthy tissue) hasonlítottuk egymáshoz. A sejtek életképességét ciszplatinnal (5  $\mu\text{M}$   $^{195}\text{Pt}$ , Fluidigm) határoztuk meg, melyhez 3 percig jégen inkubáltuk 500  $\mu\text{l}$  PBS-ben oldva ezerszer hígítva. Inkubálás után 2 ml PBS-sel hígítottuk Maxpar Sejtfestő Pufferben (MCSB, Fluidigm, San Francisco, CA, USA) és 350 g-n centrifugáltuk 5 percig. A sejteket 50  $\mu\text{l}$  MCSB-ben szuszpendáltuk, majd hozzáadtunk 50  $\mu\text{l}$  antitest koktélt.

Lista a tömegcitométerhez felhasznált antitestekről:

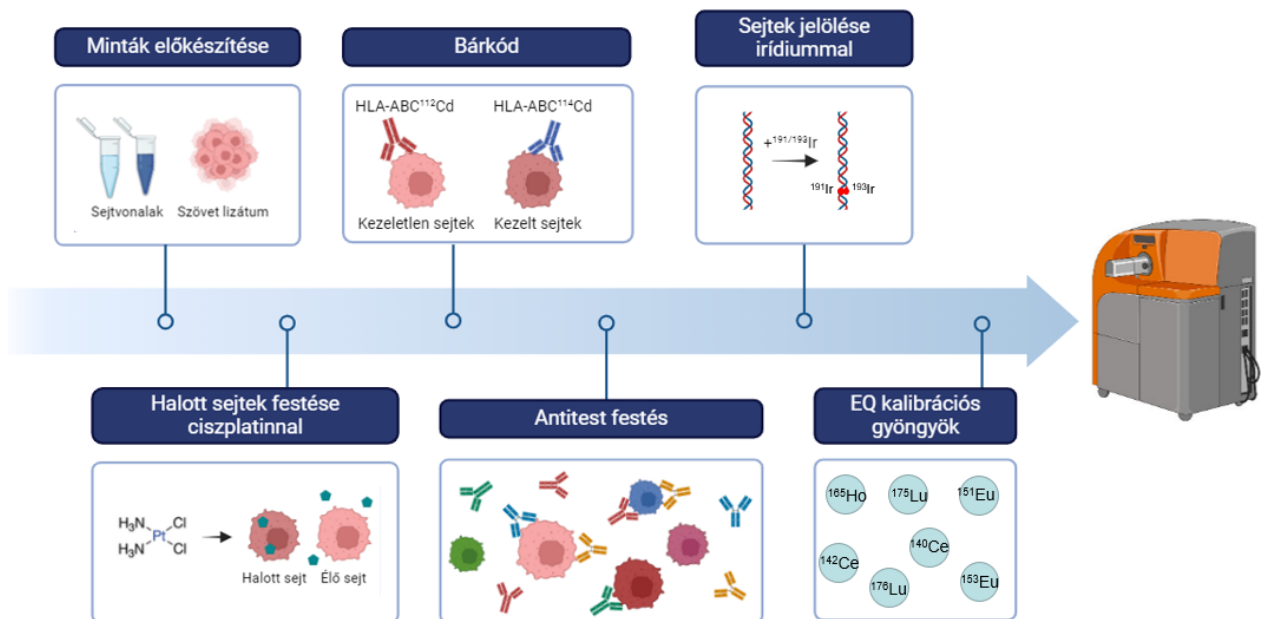
<b>Katalóguszám</b>	<b>Forgalmazó</b>	<b>Célgén</b>	<b>Fémjel</b>
3144017B	Fluidigm	HLA-A,B,C	$^{144}\text{Nd}$
3141006B	Fluidigm	CD326 (EpCam)	$^{141}\text{Pr}$
3148012B	Fluidigm	TRA-1-60	$^{148}\text{Nd}$
3149018B	Fluidigm	CD66-a,c,e	$^{149}\text{Sm}$
3156026B	Fluidigm	CD274 (PD-L1)	$^{156}\text{Gd}$
3162027A	Fluidigm	Pan-Keratin	$^{162}\text{Dy}$
3166007B	Fluidigm	CD24	$^{166}\text{Er}$
3170009B	Fluidigm	EGFR	$^{170}\text{Er}$
MAB2188-100	R&D Systems	CA9	$^{158}\text{Gd}$
MAB1418	R&D Systems	Glut1	$^{154}\text{Sm}$
sc-376140	Santa Cruz Biotech.	MCT4	$^{171}\text{Yb}$
orb357227	Biorbyt	TMEM45A	$^{169}\text{TM}$
2C1/6	Monostori labor	Gal1	$^{175}\text{Lu}$
3153026B	Fluidigm	Gal3	$^{153}\text{Eu}$

2. Táblázat. A felhasznált antitestek listája a forgalmazó, célfehérje és a konjugált fém feltüntetésével

Az anti-HLA-ABC, anti-CA9, anti-GLUT1, anti-MCT4, anti-TMEM45A és anti-Gal-1-et Maxpar fémjelölő kittel mi konjugáltuk a gyártó ajánlása alapján. A kísérletek előtt a megfelelő koncentráció érdekében titráltuk az antitesteket. A 3 sejtvonalat egyesével bárkódoltuk különböző fémmel jelölt HLA-ABC-vel az

antitest koktél festése előtt a következő kódok alapján: kezeletlen, HLA-ABC<sup>112</sup>Cd; DEF kezelt, HLA-ABC<sup>114</sup>Cd. Minden kondícióból 3 biológiai párhuzamost mértünk. A sejtvonalakat 4° C-on 30 percig inkubáltunk a HLA-ABC antitestekkel a bárkódoláshoz, majd mostuk kétszer 2 ml MCSB-vel és centrifugáltuk 5 percig 350 g-n. Ezután sejtvonalanként a kezelt és kezeletlen sejteket egy csőbe mértük össze és onnantól egy mintaként kezeltük. Tüdőszövet esetében a HLA-ABC <sup>144</sup>Nd fémjelölt antitestet a primer tüdőben lévő sejtekre használtuk és nem bárkódolásra.

A sejteket 45 percig inkubáltuk 4°C-on az antitest koktéllal, majd mostuk kétszer 2 mL MSCB-vel és centrifugáltuk 5 percig 350 g-n. A gyárilag konjugált antitesteket, valamint az anti-Gal-1-et 5 µg/ml-ben, a többi általunk konjugált antitesteket 10 µg/ml koncentrációval használtuk. A sejteket 1,6%-os formaldehiddel fixáltuk frissen hígítva 16%-os formaldehidből (Pierce) PBS-ben 10 percig. A fixált sejteket 800 g-n 5 percig centrifugáltuk, majd 500 µl <sup>191/193</sup>Ir DNS interkalátort (Fluidigm) adtunk hozzá ezerszeres hígításban (125 nM) Fix and Perm (Fluidigm) pufferben, majd egy éjszakára 4°C-on tároltuk felhasználásig.



11. Ábra. A CyTOF festés sematikus folyamatábrája. A minták megfelelő előkészítése után ciszplatint használunk az élő és halott sejtek elkülönítésére, ugyanis a ciszplatin képes penetrálni a halott sejtekbe. A bárkód segítségével összevegyíthetünk különböző sejttípusokat, így később az antitest koktéllal történő festésnél egy

mintaként tudjuk kezelni. Az irídium megjelöli a DNS két szálát, ezzel elkülöníthetőek lesznek az egyedi sejtek a törmeléktől és dupletektől. Közvetlenül mérés előtt EQ kalibrációs gyöngyöket adunk a mintához, aminek segítségével a CyTOF szoftver normalizálja az FCS file-okat.

Másnap a sejteket kétszer mostuk 2 ml MSCB-vel 800 g-n 5 percig, majd 1 ml Maxpar PBS-ben megszámloltuk. Újabb centrifugát követően a felülúszót leszívtuk és a szuszpenziót 500.000 sejt/ml-re állítottuk be Cell Acquisition oldattal (Fluidigm), végül kiegészítettük 10% EQ kalibrációs gyönggyel. Az EQ polisztirol gyöngyöket tartalmaz, belsejükben cérium ( $^{140/142}\text{Ce}$ ), európium ( $^{151/153}\text{Eu}$ ), holmium ( $^{165}\text{Ho}$ ) és lutécium ( $^{175/176}\text{Lu}$ ) lantanoid fémizotópokkal. A szuszpenziót mérés előtt átszűrtük 30  $\mu\text{m}$ -es sejtszűrőn (Celltrics).

### 3.8. Immunhisztokémia

Az IHC vizsgálatok az SZTE SZÁOK Patológia Intézetében történtek Dr. Tiszlavicz László vezetésével. A formalinnal fixált, parafinba ágyazott szövet blokkokból 4  $\mu\text{m}$ -es metszeteket készítettek, majd pozitívan töltött üveglemezre (Superfrost Plus, Thermo Fisher Scientific) helyezték. A metszeteket Bond Dewax oldattal (Leica) deparafinálták, leszálló alkoholsorral és desztillált vízzel rehidratálták. Az antigén feltárás Bond-Max gépben történt, pH 9 Bond Epitope Retrieval 2 oldatban (Leica) 20 percig inkubálva.

Az endogén peroxidáz aktivitás gátlására 3%-os  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal inkubálták 5 percig, amit egy mosás követett Bond Wash oldattal (Leica). A metszeteket anti-HIF-1 $\alpha$  antitesttel (monoklonális nyúl, EP118-as klón, Bio SB) 1:250-es hígítással vagy anti-TMEM45A-val 1:800 hígítással (poliklonális nyúl, Biorbyt) inkubálták 20 percig szobahőmérsékleten, majd Bond Wash oldattal mosták. Torma peroxidázzal és DAB-3-mal jelölt anti-nyúl másodlagos antitestet használtak kromogénként az antigén jel detektálására. Kontrasztanyagként hematoxin festést alkalmaztak. A vizualizációhoz Zeiss Axio Imager Z1 mikroszkópot (10 $\times$  okulár, 10 $\times$  és 40 $\times$  objektív) használtunk egy Zeiss AxioCam MRm kamerával és AxioVision SE64. 4.9.1 szoftverrel (Carl Zeiss).

### 3.9. Statisztikai analízis

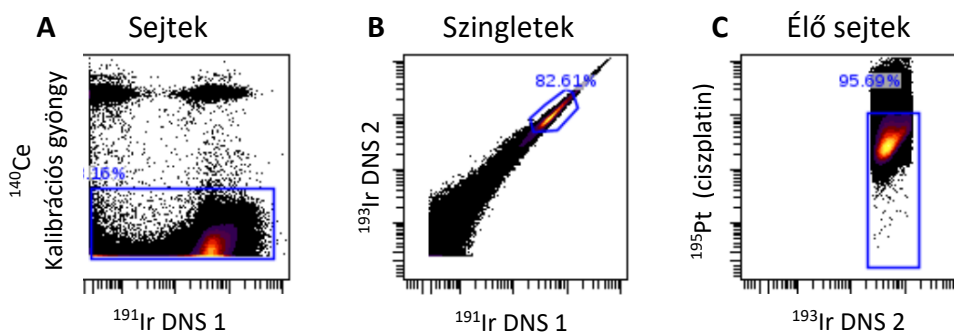
Az elemzések és ábrák GraphPad Prism 6 és 8-as verzióval, Cytobank Premium (Beckman Coulter) felhő alapú szoftverrel, valamint Microsoft Excel-lel készültek. 2 csoport között páros t-tesztet alkalmaztunk. Az adatokat számtani átlag  $\pm$  standard deviációval (SD) fejeztük ki. A szignifikanciaszinteket a következő módon határoztuk meg \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. NSCLC sejtvonalak inter-és intratumor heterogenitása

#### 4.1.1. Sejtek kapuzási stratégiája

A kalibrációs gyöngyök segítségével a CyTOF szoftveren keresztül tudjuk normalizálni a mérésünket. A polisztirol gyöngyökben található különböző nehézfém izotópokkal egy időfüggő korrekciós funkciót generál, így kivédve a rövid és hosszútávú műszerérzékenységi ingadozást. [51]. Ezeket a gyöngyöket azonban a kapuzás első lépésénél ki is kell zárni, hogy a továbbiakban csak a sejtekkel dolgozhassunk.



12. Ábra. A tumorsejtek kapuzási stratégiája. (A) A  $^{140}\text{Ce}$  kalibrációs gyöngy és a DNS-be interkalálódott  $^{191}\text{Ir}$  segítségével elkülönítjük a sejteket a kalibrációs gyöngyöktől. (B) A  $^{191}/^{193}\text{Ir}$  DNS jelölt dupla pozitív sejteket határoztuk meg szingletekként (egysejteként), így kizártuk a törmelékeket és a dupletteket. Végül az élő sejtek populációját a ciszplatinra negatív sejtekre kapuzva kaptuk meg (C).

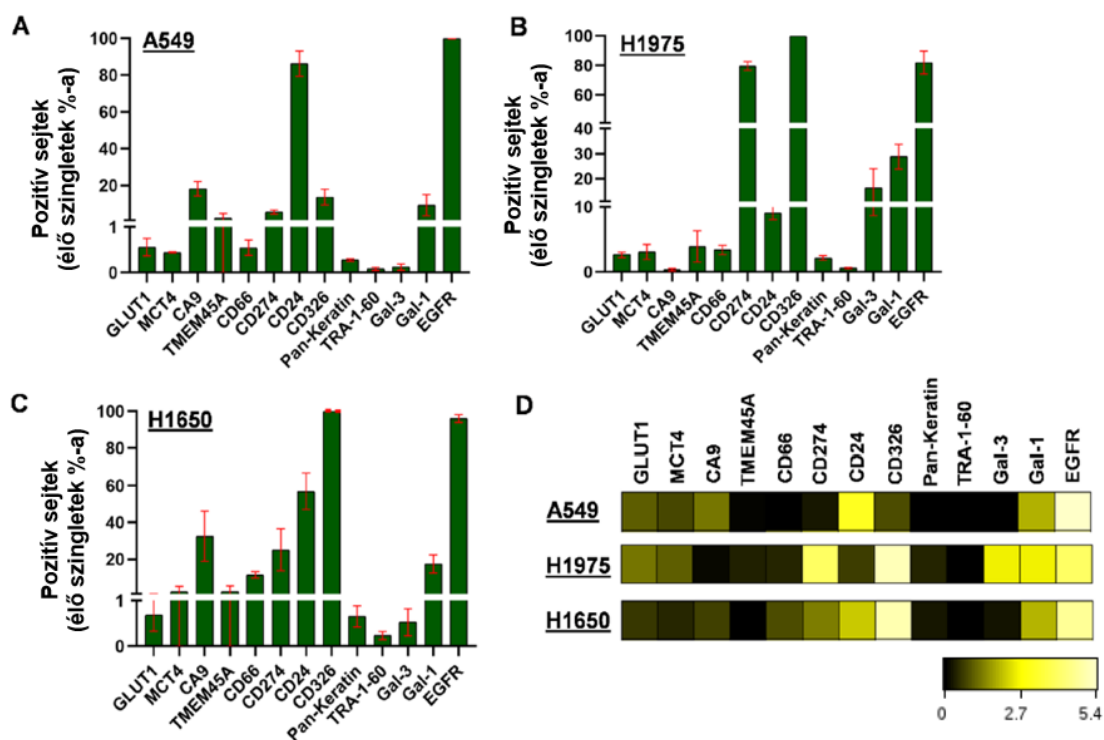
A gyöngyök kizárása után a következő lépés a törmelékek és az összetapadt sejtek kizárása  $^{191}/^{193}\text{Ir}$  DNS interkalátor segítségével. Az szingleteket a dupla pozitív,  $^{191}\text{Ir}$ -ot és  $^{193}\text{Ir}$ -ot is tartalmazó halmaz alapján határozzuk meg. Életképesség

mérésére  $^{195}\text{Pt}$  jelölt ciszplatint használtunk, ami képes bejutni a halott sejtekbe, így a ciszplatin negatív sejtek kapuzásával megkapjuk az élő sejteket.

#### 4.1.2. NSCLC sejtvonalak klonális heterogenitása

Kísérleteink során a rákkutatásban és gyógyszerfejlesztésben leggyakrabban használt humán adenokarcinóma sejtvonalak altípusait vizsgáltuk, az A549, H1975 és H1650 sejtvonalakot. Legelőször a lehetséges kontaminációkat szűrtük, ezért STR szekvenciák alapján sejt autentikációt végeztünk. A sejtvonalak klonális heterogenitását egysejt-tömegcitométerrel az alapján határoztuk meg, hogy a sejtek hány százaléka expresszálja a GLUT1, MCT4, CA9, TMEM45A, CD66, CD274, CD24, CD326, pan-keratin, TRA-1-60, Gal-3, Gal-1, és EGFR markereket.

Az A549 (12. ábra A), H1975 (12. ábra B) és H1650 (12. ábra C) sejtvonalak más mértékben fejezik ki a sejtvonalak közötti és sejtvonalon belüli heterogenitás körvonalazásához használt markereket annak ellenére, hogy mindegyik humán tüdő adenokarcinóma, tehát elméletileg szövettanilag egyféle tumorból származó sejt-típus. Mivel a populációk százalékos aránya nem reprezentálja a fehérjék expressziós intenzitását, ennek ábrázolásához hőterképet használtunk a sejtvonalak összehasonlításához (12. ábra D).



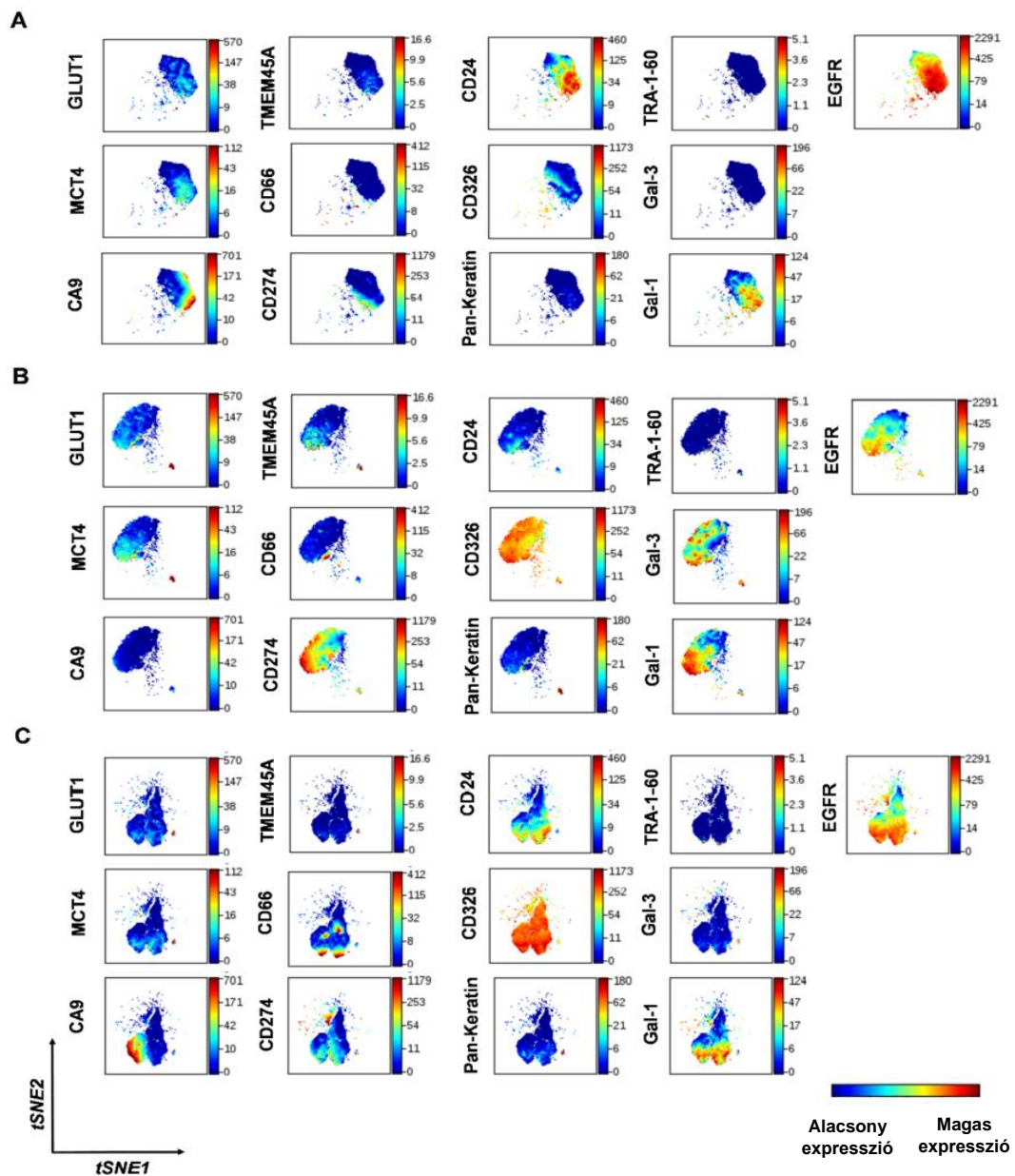
13. Ábra. Az A549, H1975, H1650 humán NSCLC sejtvonalak egysejt-tömegcitometriás elemzése. Az oszlopdiagramokon látható, milyen százaléokban expresszálják az adott sejtfelszíni fehérjét az élő szingleteken az (A) A549, (B) H1975, és (C) H1650 sejtvonalak. A tizenhárom fehérje markert - GLUT1, MCT4, CA9, TMEM45A, CD66, CD274, CD24, CD326, pan-keratin, TRA-1-60, Gal-3, Gal-1, és EGFR - egysejt szinten vizsgáltunk fémizotóppal jelölt antitestekkel egysejt-tömegcitométerrel. (D) A hőtésképen a 13 fehérje expressziós intenzitása látható, amelyet a táblázat minimum értékéhez viszonyított transzformált medián fejez ki. A fekete az alacsony, a fehér a magas expressziót ábrázolja.

A medián fémintenzitások megfelelnek a vizsgált 13 fehérje kifejeződésével és megmutatja a 3 sejtvonala közötti heterogén expressziót. A legnagyobb kifejeződést mutató markerek A549 esetében az EGFR és CD24, H1975 esetében a CD274, CD326 és az EGFR, valamint a H1650-nél a CD326 és EGFR.

A 3 sejtvonala populáció százaléokban elsősorban a CA9, CD274, CD24 és kisebb mértékben a Gal-3 fehérjékben különböznek. A CD326 a H1975 és H1650 sejtvonalaiban szinte minden sejten megtalálható, azonban az A549 sejtek csak 20 %-

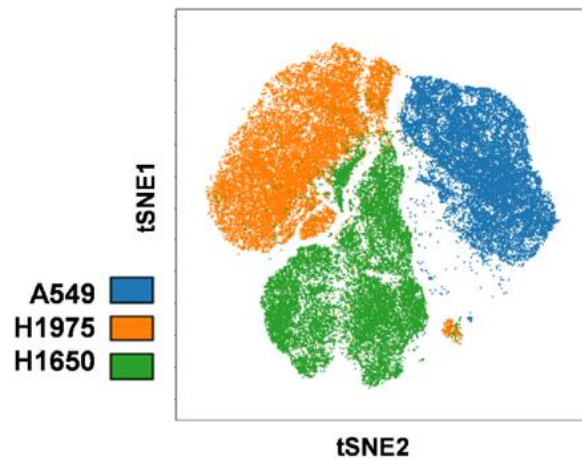
ában. A markerek intenzitása szempontjából a CD274, CD24, CD326 és Gal-3 fehérjében térnek el legjobban.

A klonális alpopulációk vizualizálásához t-elosztású sztochasztikus szomszéd beágyazása (t-SNE) analízist alkalmaztunk mindhárom sejtvonalon. Az algoritmus közös marker expresszió alapján egy többdimenziós térben helyezi el a sejteket, majd dimenzionálisan redukálja [52]. Itt 13 marker expressziós mintázata nyilvánul meg egyszerre, azaz 13 dimenziós teret redukál 2 dimenzióvá. Színskála jelzi az intenziást, kézzel az alacsonyat, pirossal a magasat. A vizualizációhoz a Cytobank platform t-elosztású sztochasztikus szomszéd beágyazás vizualizációt (viSNE) használ, ami a t-SNE algoritmus Barnes-Hut implementációja. A t-SNE térképeken található morfológiai szegmentációk lehetővé teszik a minták heterogenitásának vizualizálását, a nagy felbontású sejttérképezést és a magasan expresszált közös markerek meghatározását. A 13. ábrán jól látható sejtvonalon belüli heterogenitás, ugyanis a markereket a sejtek egy populációja magas szinten, egy másik részük pedig egyáltalán nem is expresszálja, annak ellenére, hogy ugyanolyan szövettani tüdőrák típusból származó sejtekről van szó. Illetve a sejtvonalak közötti heterogenitás is kirajzolódik, mivel az 3 sejtvonalon egyszerre futtatott algoritmus külön felhőként választja szét az A549 (13. ábra A), H1975 (13. ábra B) és H1650 (13. ábra C) sejtvonalakat.



14. Ábra. NSCLC sejtvonalak inter- és intratumor heterogenitás vizsgálata viSNE algoritmussal. Reprezentatív viSNE analízis 13 markeren az A549 (A), H1975 (B), és H1650 (C) sejteken egysejt szinten. Az analízist 100.000 sejten futtattuk egyenlő elosztásban (iteráció = 2000, perplexitás = 30, theta = 0.5).

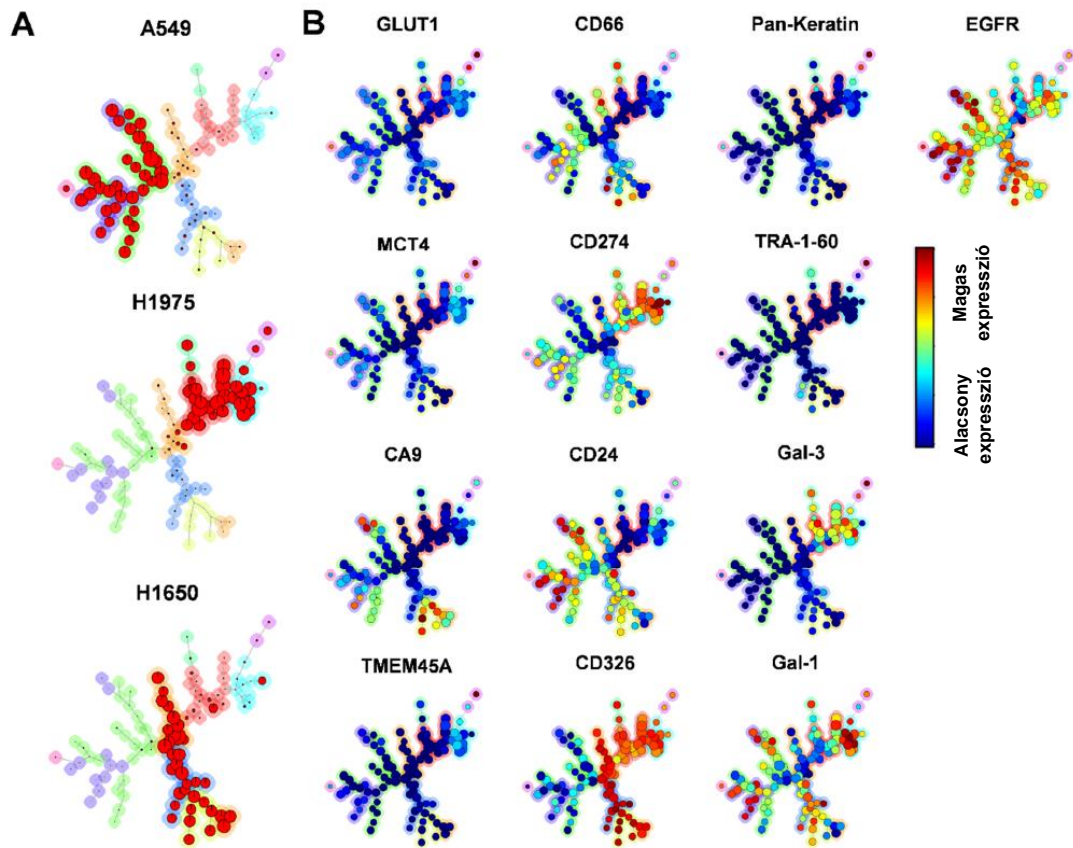
A sejtvonalon belüli heterogenitás ábrázolásánál a színintenzitás arányos a sejtfelszínen kimutatott fehérjék mennyiségével. Az expresszált fehérjék alapján a színek és a felhők mintázata is különböző alpopulációkat mutat. A sejtvonalak közötti heterogenitás szemléltetésére összevontuk a 3 sejtvonal viSNE felhőjét (14. ábra). A 13 marker alapján a sejtvonalak egymástól elkülöníthetőek a mutidimenzionális térben és 3 különálló szigetet alakítanak ki. A H1975 és H1650 sejtvonalak között némi átfedés fedezhető fel, tehát mindkettőnek van olyan alpopulációja, ami hasonlóan fejezi ki a fehérjéket, azonban javarészüket teljesen különböző.



15. Ábra. A 3 humán NSCLC sejtvonalak közötti heterogenitás. Átfedő kép a 3 sejtvonal viSNE analiziséről, ahol 13 fehérjét elemeztünk egyidejűleg egysejt felbontásban. Az A549 (kék), H1975 (narancssárga) és H1650 (zöld) sejtvonalak különbözőképpen nyilvánulnak meg és teljesen elkülöníthetőek egymástól.

Egy másik, szintén algoritmus vezérelt felügyelet nélküli bioinformatikai elemzést is elvégeztünk, mely az áramlási önszerveződő térkép (FlowSOM) (15. ábra). A FlowSOM egy olyan új, áramlási és tömegcitométer analíziséhez alkalmazható vizualizációs technika, melynek alapja az önszerveződő térkép (Self-Organizing Map) algoritmus. A FlowSOM képes az adatokat automatikusan klaszterezni, az  $n$  vizsgált marker adatait 2 dimenzióra redukálni és markerenként több minta, jelen esetben 3 sejtvonal átfogó ábrázolását is lehetővé teszi. A mintában

lévő sejttípusoknál nagyobb klaszterszámot megadva, információt nyújt az alpopulációkról is. Első lépésként az FCS fájlból egy mátrixot képez, melyben minden egyes sejthez soronként hozzárendeli a mért marker értékeket. A mátrixból egy csomópontokból álló rácshálót alkot, melyben minden csomópont egy multidimenzionális pontot reprezentál. Az egyes csomópontokat kördiagramként ábrázolja, amely a markerek átlagáról ad információt. Majd ebből egy térben minimális „fát” (minimum spanning tree, MST) alkot a klasztereknek megfelelően, ahol a csomópontok közti távolság arányos az egymáshoz viszonyított hasonlósághoz. Az algoritmus képes a 3 sejtvonalat megkülönböztetni, így 3 különböző ágra bontani (15. ábra A). A 3 sejtvonal együttes, összevont ábrázolása markerenként kirajzolja egy ábrán a vizsgált sejtvonalak eltérő marker profilját (15. ábra B). A csomópontok mögötti háttérszín a meta-klasztereket jelöli. [53], [54]. Az ágakon szereplő nodulusok a sejtek egy-egy csoportját mutatják, ahol a szín megegyezik a fehérje kifejeződésének intenzitásával.

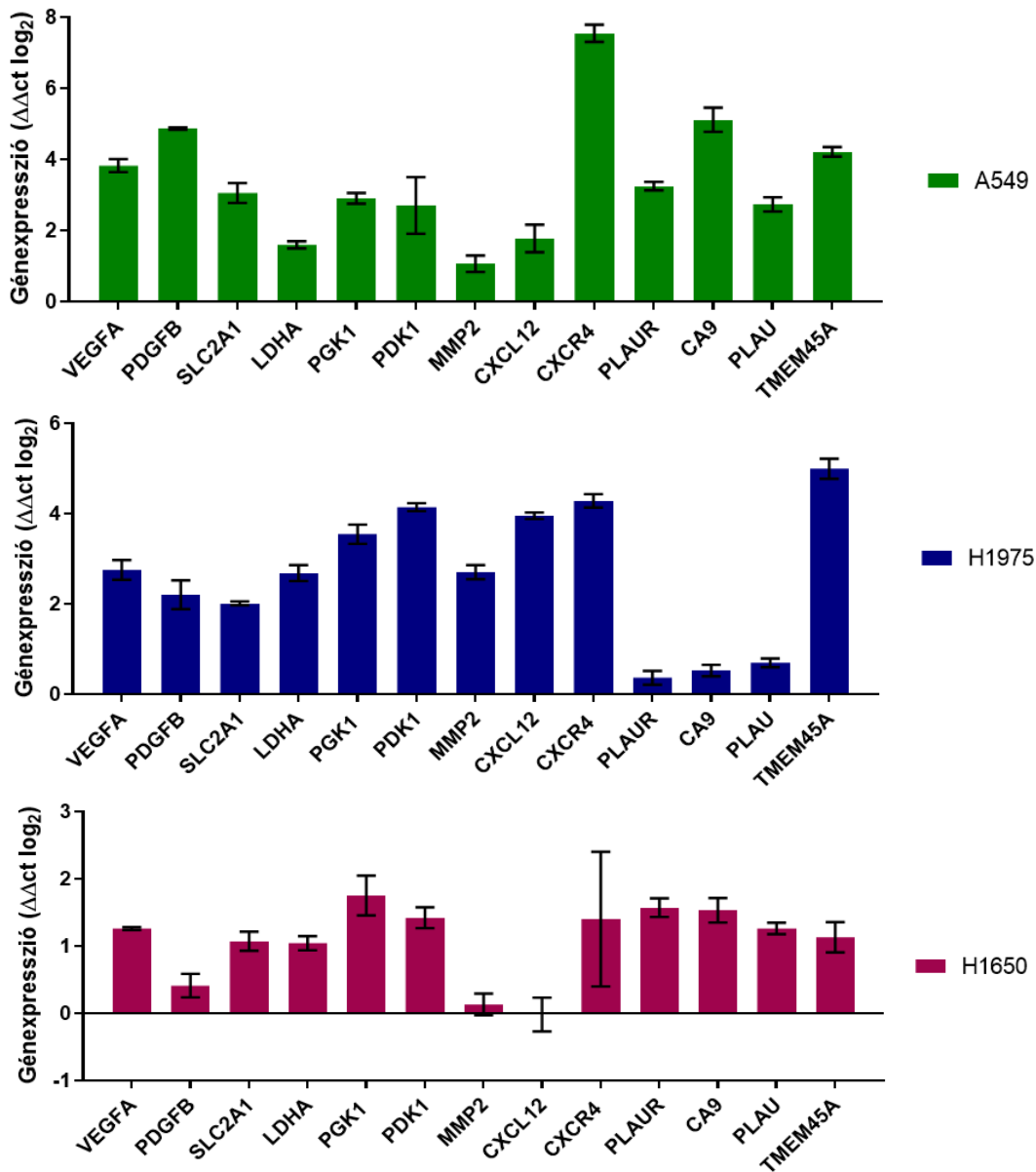


16. Ábra. Az A549, H1975 és H1650 sejtvonalak FlowSOM analízise a sejtvonalak közötti és sejtvonalon belüli heterogenitás vizsgálatára. A tumorsejtvonalak alpopulációit egy felügyelet nélküli FlowSOM klaszterező algoritmussal vizsgáltuk a Cytobank felületén keresztül. (A) A 3 sejtvonala markerexpresszió alapján 3 különböző ágra bontható. Piros szín jelzi az adott sejtvonalkhoz tartozó alpopulációkat. (B) A sejtvonalak fehérjeexpressziója az összesített MST-n. A hasonló sejtek egy nodulusba csoportosulnak és a nodulus nagysága függ a klaszter sejtmenységétől. Az adott sejtvonalkhoz tartozó sejtcsoportokat az A ábra mutatja. Az expresszió intenzitását színskála jelzi kéktől (alacsony expresszió) pirosig (magas expresszió).

#### 4.1.3. A hipoxiás körülmények között megtartott klonális heterogenitás

A sejtvonalak heterogenitását deferoxamine (DEF) kezelés után is megvizsgáltuk. DEF kelátolja a vasat, így gátolja a PHD aktivitását, ami a HIF1- $\alpha$  stabilizáláshoz vezet és egy hipoxiát imitáló környezetet hoz létre [55]. A DEF

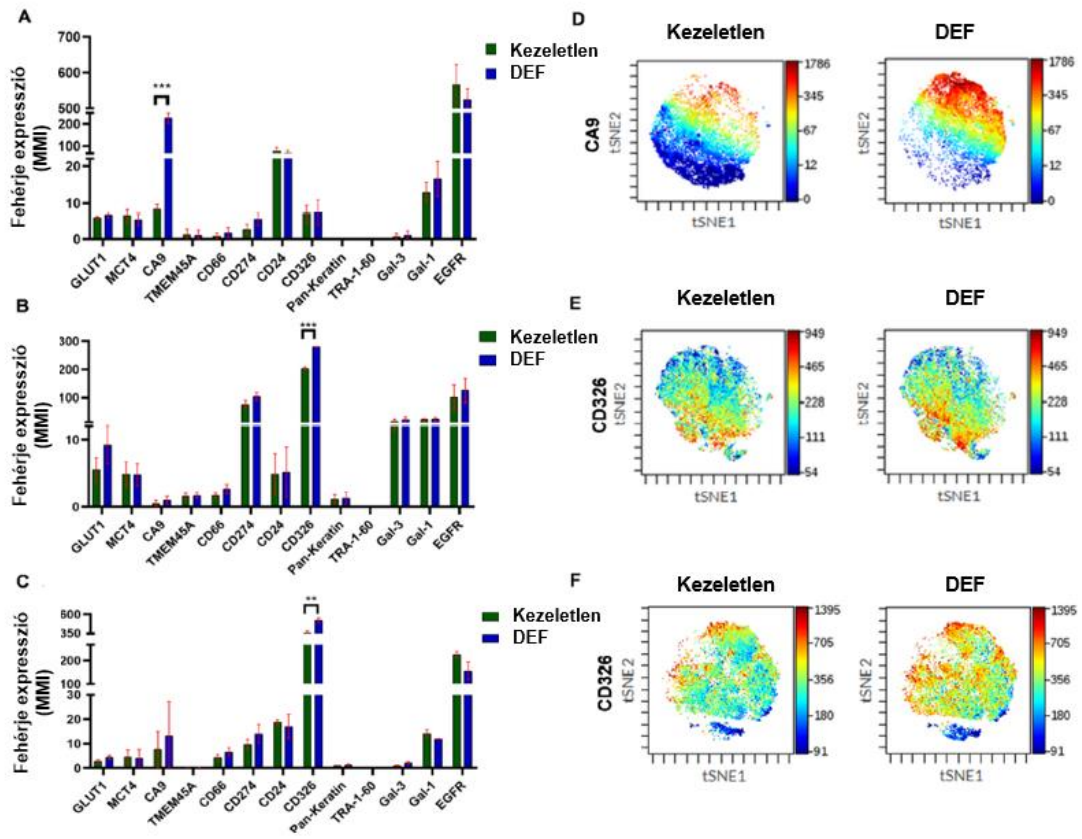
szubletális koncentrációját egy hígítási sorral resazurin alapú életképesség vizsgálattal állapítottuk meg. A hipoxia-válaszelemet tartalmazó gének expressziójának növeléséhez a 400  $\mu\text{M}$ -os koncentrációt tartottuk megfelelőnek 24 órás inkubációs idővel. Kvantitatív valós idejű polimer láncreakció-val (qPCR) igazoltuk, hogy a hipoxiafüggő gének DEF kezelésre emelkedést mutattak. A kiválasztott fehérjék részt vesznek az angiogenezisben (VEGFA, PDGFB), metabolizmusban (SLC2A1, LDHA, PGK1, PDK1), metasztázisban (MMP2, CXCL12, CXCR4, PLAUR) és acidózisban (CA9, PLAU) [56], [57], [58]. Mivel egy kollégánk korábbi munkájában a TMEM45A fehérjére felfigyeltünk, ezen gén változását is megvizsgáltuk hipoxiás körülmények hatására [59].



17. Ábra. A hipoxiás környezet igazolása qPCR-rel. A génexpresszió változása a kontrollhoz képest mindegyik sejtvonalban más-más mértékben változik, ami a sejtvonalak diverzitását mutatja.

A géneket az aktinra normalizáltuk és 3 biológiai párhuzamost mértünk. A qPCR igazolta, hogy a DEF kezelés hatására megnövekedett HIF1- $\alpha$  érzékeny gének transzkripciója, tehát a hipoxiás modell működött. A sejtvonalak azonban különböző karakterisztikus génexpressziós profilt mutattak, ami alátámasztja a biológiai diverzitásukat és a sejtvonalak közötti heterogenitást NSCLC adenokarcinómán belül is.

Ezután a CyTOF-ra tervezett tumormarker panelünkkel fehérje szinten megvizsgáltuk a hipoxiás környezet hatását. Szignifikánsan azonban csak az A549 sejtvonalon belül a CA9 (MMI = 8.49 vs 226.35), a H1975 (MMI = 194.13 vs 279.56) és H1650-nél (MMI = 350.84 vs. 517.94) pedig a CD326 mennyisége változott (17. ábra).



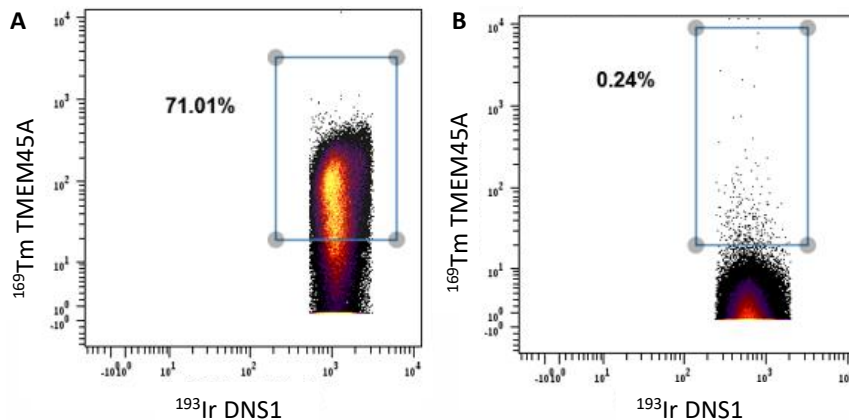
18. Ábra. Az NSCLC sejtvonalak heterogenitásának fennmaradása 24 órás hipoxiás kezelés hatására. Az oszlopdiagrammok az A549 (A), H1975 (B), valamint a H1650 (C) sejtvonalak a sejtfelszíni fehérjék expresszió intenzitását mutatják (MMI, medián fémintenzitás) az élő szingleteken DEF kezelés hatására a kezeletlen kontrollokhoz viszonyítva. A viSNE ábrákon látható az adott sejtvonalaknál szignifikánsan változó markerek, színintenzitással jelölve a fehérjék kifejeződését. A kézzel jelölt sejtek alacsonyán expresszálnak, a pirossal jelölt sejtek magasan fejezik ki az adott fehérjét. Az A549 estében a CA9 (D), A H1975-nél (E) és a H1650 (F) sejtvonalnál a CD326 fehérje mennyisége nőtt meg. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

A hipoxiára egy adaptív válaszként a tumorok emelkedetten expresszálják és funkcionálisan aktiválják a cink metalloenzimek családjába tartozó karbon-anhidráz IX-et (CA9), ami egy tumor-asszociált sejtfelszíni enzim. A CA9-et kódoló gént a HIF1 stabilizálódása és HRE elemhez kötődése aktiválja. Ez az egyik alacsony oxigénszintre leginkább érzékeny fehérje [60]. Feladata a szén-dioxid bikarbonát ionná és protonná történő reverzibilis konverziója. A katalitikus aktivitásának köszönhetően az intra- és extracelluláris pH szabályozásában játszik szerepet és hipoxia hatására savas mikrokörnyezetet hoz létre [61]. A CA9 gén transzkripciója növeli a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) és a foszfoinozitol 3-kináz (PI3K) útvonalakat [62], valamint az Src onkogént [63].

Az epitélikus sejtadhéziós molekula (CD326, EpCAM) egy transzmembrán glikoprotein, amely epitél specifikus intercelluláris sejtadhézióban játszik szerepet. Annak ellenére, hogy tumor markerként fedezték fel, funkciója még nem teljeskörűen tisztázott [64]. Túlnyomó többségében a laterális és a bazális membránban koncentrálódik, azonban a nem epitéliális szövetekben nem található meg. Egyes ráktípusokon kívül a rákos szövetben gyakran túltermelődik, elsősorban a bél-, mell-, tüdő- és prosztatákban [65]. Tumor asszociált funkcióját a sejtadhézióban, proliferációban, migrációban és szöveti plaszticitásban fejt ki, esszenciális szerepet játszik az embrionális morfogenezisben és az intesztinális homeosztázisban is [66].

A TMEM45A fehérje minden esetben alacsony szinten volt csak jelen, ami abból is adódhat, hogy elsősorban az Golgi apparátusban, valamint az endoplazmatikus retikulumban van jelen, mi azonban arra voltunk kíváncsiak, hogy hipoxia hatására megjelenik-e a sejtfelszínen is.

Ellenőrzésképpen az A549 sejtvonalon megvizsgáltuk CyTOF-fal, hogy intracellulárisan valóban jelen van-e a fehérje. Így a sejtek 71%-a pozitív jelet adott, tehát a TMEM45A intracellulárisan kifejeződik, azonban sejtfelszínen kezelés nélkül nem.



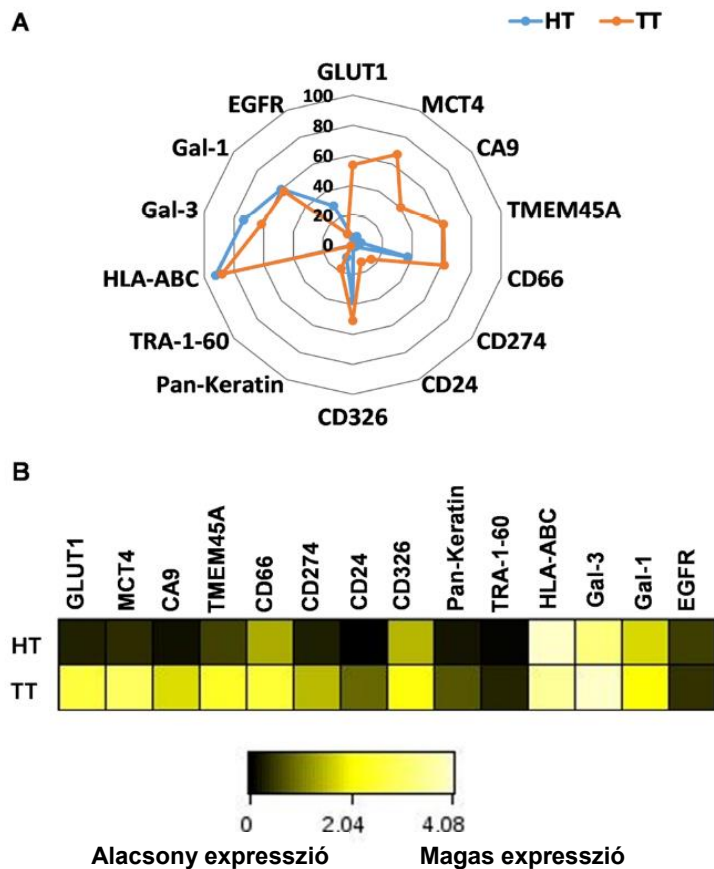
19. Ábra. A TMEM45A kifejeződése intracellulárisan és sejtfelszínen CyTOF méréssel. (A) A TMEM45A az A549 humán tüdő sejtvonalon intracellulárisan a sejtek 71,01%-ában expresszálódott, míg sejtfelszínen (B) csak 0,24%-ban, tehát szinte egyáltalán nem.

A TMEM45A glioblasztómában proliferációt, migrációt és inváziót eredményez [67], kolorektális karcinómában pedig epitéliális-mezenchimális tranzíciót figyeltek meg [68]. A vélhetően 7 transzmembrán doménből álló fehérje elsődlegesen a Golgi apparátusban található meg [69], de megjelenését az ER-ben is feltételezik, munkánk során a sejtfelszínen kifejezett TMEM45A expressziót követtük nyomon egysejt-tömegcitometriával.

#### 4.2. Humán primer tüdő adenokarcinóma intratumor heterogenitása

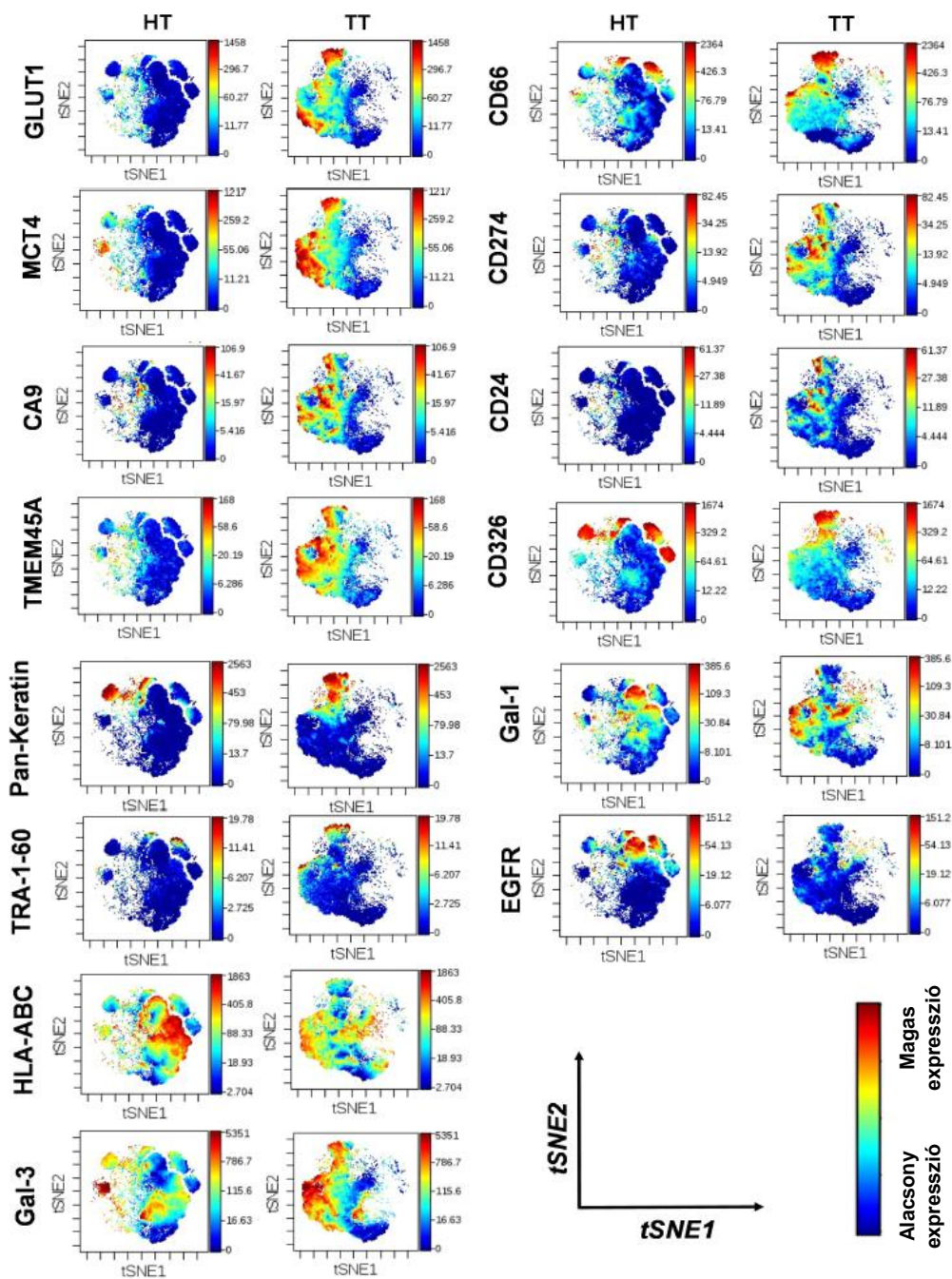
Kimutattuk, hogy mind a sejtvonalon belüli, mind a sejtvonalak közötti egysejtű heterogenitás jelen van az elemzett humán tüdő adenokarcinóma sejtvonalakban, de az, hogy ez a heterogenitás az eredeti daganatból öröklődik, vagy genetikai eltolódás és mikroevolúció révén szerzett-e a laboratóriumi sejttenyésztés során, nem ismert. Ezen kérdés kutatására sebészeti klinikáról származó páciens eredetű primer tüdő adenokarcinómát vizsgáltunk, melyet műtét után frissen rögtön a laborunkba szállítottunk a feldolgozáshoz. A tumorszövetet (TT) és a közeléből származó egészséges tüdőszövetet (HT) a sebészeti beavatkozás után 1 órán belül feldolgoztuk az egysejt tömegcitométeres vizsgálathoz. Az egysejteket  $^{191}\text{Ir}+$ / $^{193}\text{Ir}+$

DNS interkalátorral jelöltük és kikapuztuk a dupla pozitív sejteket. Mivel a rákos sejtekbe könnyen bejut az itt életképességre használt ciszplatin, nem a ciszplatin negatív sejteket vettük figyelembe, hanem a szingleteket elemeztük. A nem immuneredetű sejtekre szerettünk volna fókuszálni, ezért az infiltráló immunsejteket CD45 antitesttel kizártuk. Az anti-HLA-ABC antitestet is hozzáadtuk a panelhez, mivel az alacsonyabb HLA-ABC expresszió jelezheti a daganatok csökkent immunfelügyeletét. A tumor és az egészséges tüdőszövet szingleteken a populáció százalékok a következők: GLUT1 (53% vs. 4.8%), MCT4 (67.3% vs. 6.0%), CA9 (40.4% vs. 3.6%), TMEM45A (61.1% vs. 5.6%), CD66 (61.7% vs. 37.1%), CD274 (15.6% vs. 2.4%), CD24 (12.8% vs. 0.9%), CD326 (50.7 vs. 37.4%), pan-keratin (17.8% vs. 9.5%), TRA-1-60 (1.5% vs. 0.9%), HLA-ABC (88.1% vs. 92.4%), Gal-3 (61.5% vs. 73.6%), Gal-1 (57.7% vs. 60.1%), és EGFR (7.8% vs. 28.9%). A sejtek pozitivitása a GLUT1, MCT4, CA9, TMEM45A, CD66, CD274, CD24, CD326 és pan-keratinra összefüggésbe hozható a tumoros szövetrel, így a radardiagramon jól elkülöníthető az egészséges szövegtől.



20. Ábra. A vizsgált 14 fehérje expressziós mintázata humán primer adenokarcinómában. (A) A radardiagramon egyértelműen kirajzolódik, hogy a sejtek hány százaléka pozitív az adott markerre és milyen mértékben változott a betegség során. A tumorszövetben a legerőteljesebben a GLUT1, MCT4, CA9, TMEM45A, CD66, CD274, CD24, CD326 és pan-keratin fehérjék populáció %-a növekedett a legjobban az egészséges szövethez képest. (B) A fehérjék expressziójának intenzitását (medián fémintenzitás) hőtérképpel ábrázoltuk. A mediánok a táblázat minimum értékéhez számított transzformált arányok. HT=egészséges szövet, TT=tumorszövet.

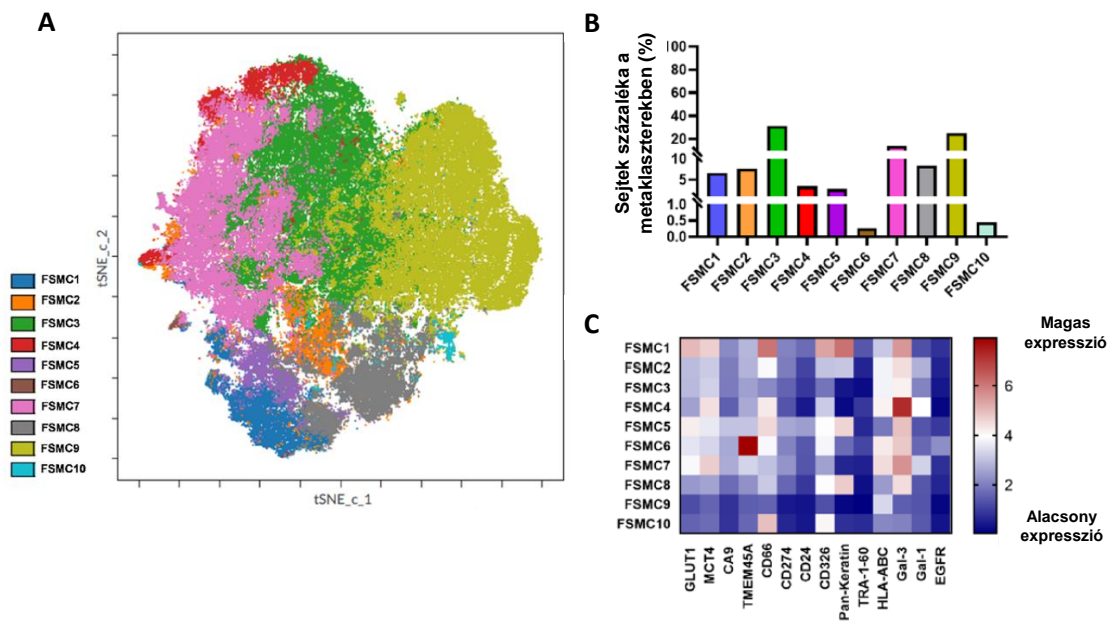
A tumorból emésztett sejtek sejtfelszínén a kontrol szövethez képest a GLUT1, MCT4, CA9, TMEM45A, CD66, CD274, és CD326 fehérjék fehérje expressziója növekedett meg legjobban, melyet hő térképpel (19. ábra B) vizualizáltunk. Annak ellenére, hogy a Gal-3 és a Gal-1 populáció százaléka szinte nem változott (19. ábra A), a TT-ben expresszió intenzitásuk növekedett (19. ábra B). Az irodalmi adatokkal megegyezően, miszerint a tumorsejtek képesek alul modulálni az antigén prezentációt, a mérésünk alapján a HLA-ABC a tumoros szövetben csökkent intenzitással jelent meg az egészségeshez képest. A HLA-ABC marker medián fémintenzitása a 176-ról (HT) 87-ra (TT) csökkent. A humán szövetek intratumor heterogenitását egysejt szinten sokdimenziós t-SNE analízissel boncoltuk Cytobankban (20. ábra). A viSNE ábrákon a sejtek eloszlása a minták markereinek klonális vagy diffúz expresszióját mutatja. A színskála arányosan jelzi a sejtfelszínen található fehérjék denzitását (mennyiségüket).



21. Ábra. Humán primer tüdő adenokarcinoma egysejt intratumor heterogenitása. viSNE analízis megmutatja a GLUT1, MCT4, CA9, TMEM45A, CD66, D274, CD24, CD326, pan-keratin, TRA-1-60, HLA-ABC, Gal-3, Gal-1, és EGFR fehérje expresszió változását az egészséges szövet és a tumoros szövet között ugyanabból a betegből.

A viSNE analízishez egyszerre futtattuk az algoritmussal a két mintát, így jól látszódik, hogy az egészséges tüdőszövettel szemben a tumorokban legerősebb változást mutató markerek az MCT4, GLUT1, CA9 és TMEM45A és a Gal-3. Ezek részben átfedő régióban vannak, tehát van egy sejtpopuláció, ami ezek közül mindegyik markert erőteljesebben expresszálja, azonban az intratumor heterogenitás is megnyilvánul.

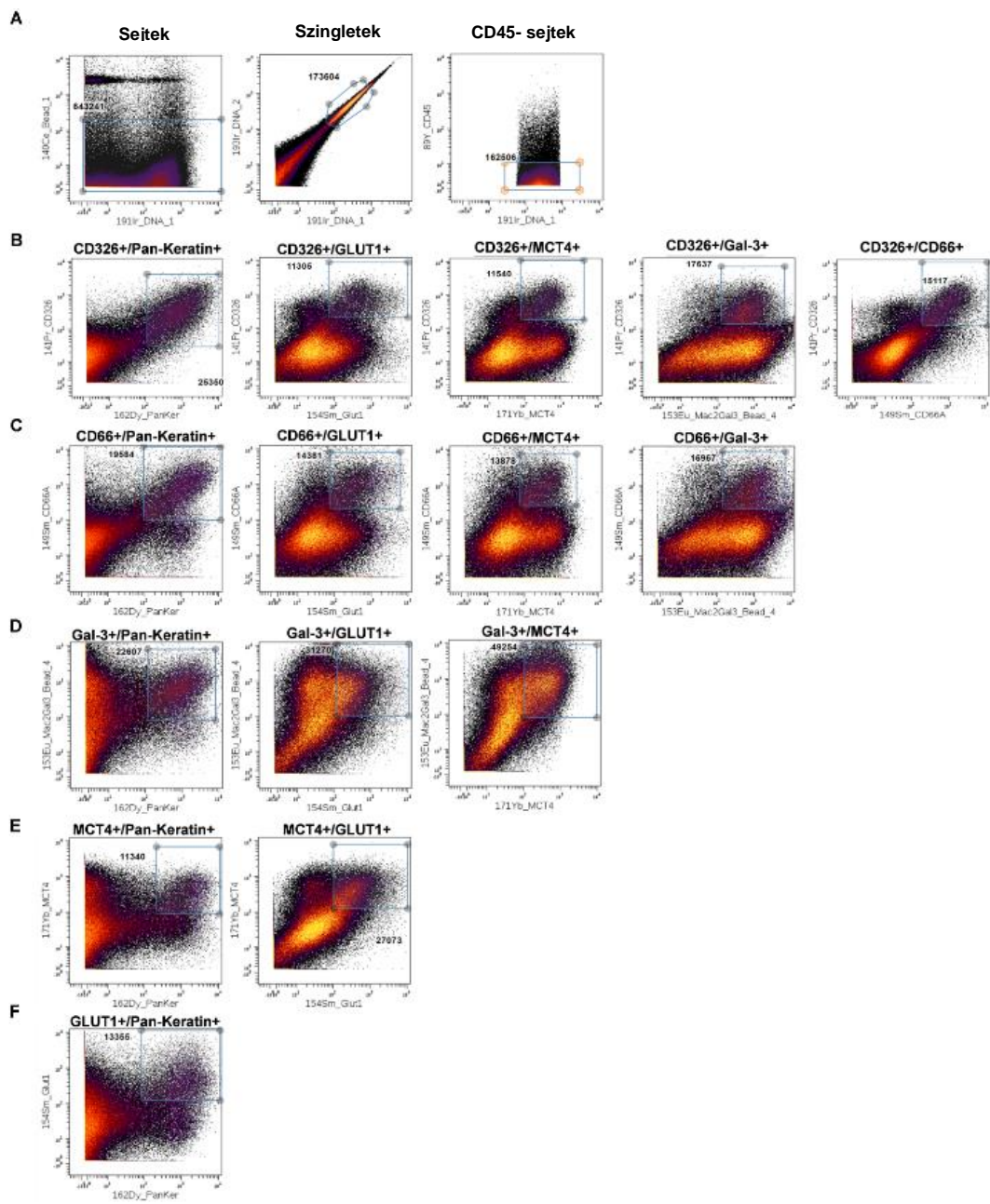
A FlowSOM metaklaszterek (FSMC) a FlowSOM futtatása közben egy felügyelet nélküli analízis, a t-SNE számítógépes egységes eszközarchitektúra (CUDA, Computer Unified Device Architecture) térkép alapján készültek a Cytobankban. Az FSMC-k a viSNE-n egysejtekből alkotott populációk. Ez a 10 FSMC 10 elkülöníthető sejtpopulációt jelöl a mért humán tüdőtumoron belül (21. ábra).



22. Ábra. A tumorszövet felügyelet nélküli populáció analízis 10 FSMC-t mutató feltérképezése. (A) FlowSOM metaklaszterek elosztása t-SNE CUDA térképen. (B) A sejtek százalékos eloszlása az egyes FSMC-kben. (C) Hőtérkép a mért 14 fehérje expressziós intenzitásáról a metaklasztereken belül inverz szinus hiperbolikus (arcsinh) transzformációval 5-ös kofaktorról.

Az algoritmus a TMEM45A-t erősen expresszáló sejteket egy külön alpopulációként, FSMC6-ként jelöli, míg a többi klaszter közepesen expresszálja. Továbbá ebben a klaszterben a CD66, CD326, HLA-ABC és a Gal-3 is nagyobb mennyiségben van jelen.

A koexpressziós mérést kézi kapuzással is véghezvittük. Azonosítottuk az együtt expresszáló sejtek százalékos arányát. CD326+/pan-keratin+ (15.6%); CD326+/GLUT1+ (6.9%); CD326+/MCT4+ (7.1%); CD326+/Gal-3+ (10.8%); CD326+/CD66+ (9.3%) (22. ábra B); CD66+/pan-keratin+ (12.1%); CD66+/GLUT1+ (8.8%); CD66+/MCT4+ (8.53%); CD66+/Gal-3+ (10.4%) (22. ábra C); Gal-3+/pan-keratin+ (13.9%); Gal-3+/GLUT1+ (19.2%); Gal-3+/MCT4+ (30.3%) (22. ábra D); MCT4+/pan-keratin+ (6.9%); MCT4+/GLUT1+ (16.6%) (22. ábra E); GLUT1+/pan-keratin+ (8.2%) (22. ábra F).

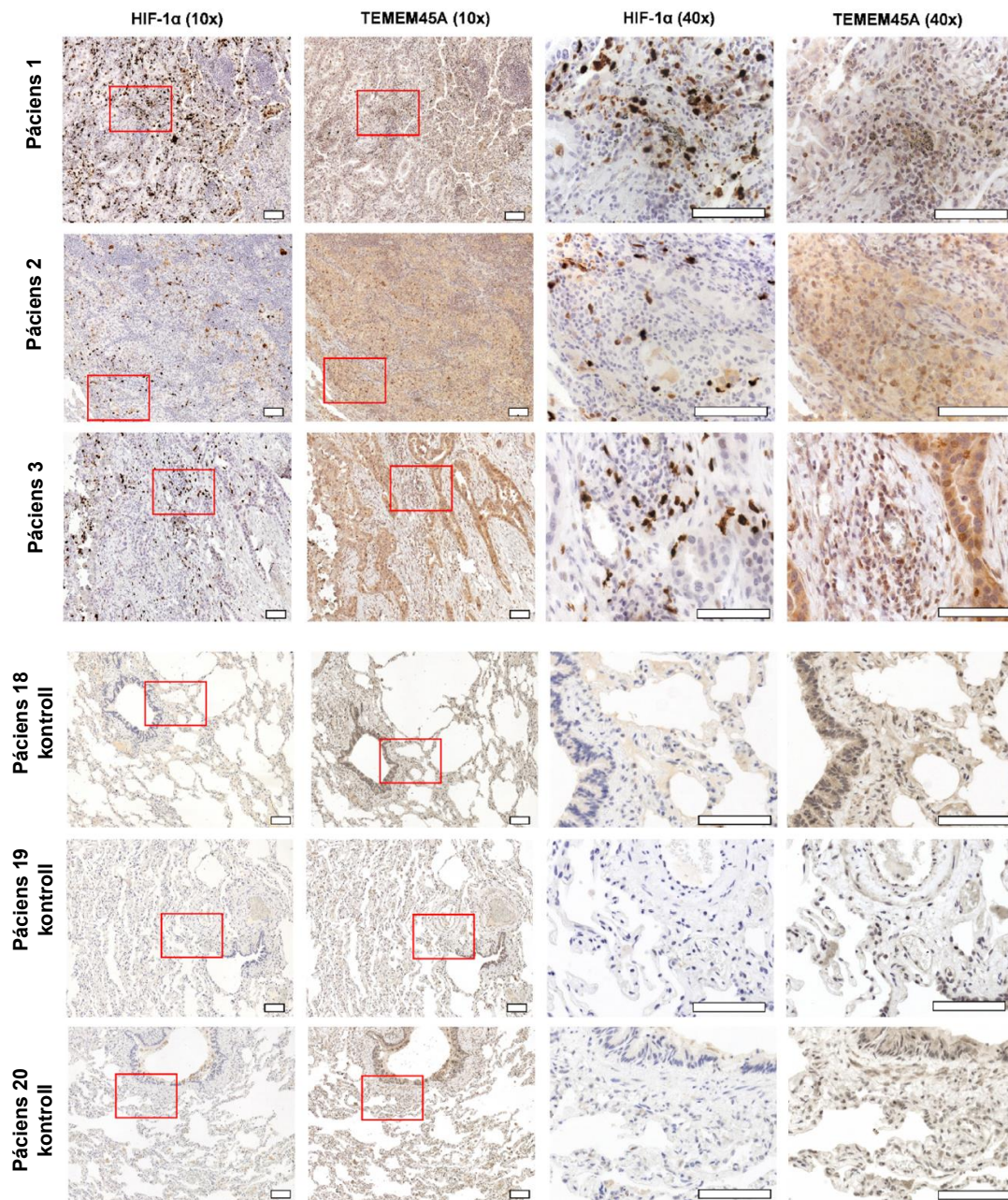


23. Ábra. A koexpresszáló sejtcsoportok kézi kapuzási stratégiája. (A) A szingletek meghatározása után kizártuk az immunsejteket. (B) Ezután a CD326 pozitív sejtek, (C) a CD66 pozitív sejtek, (D) Gal-3 pozitív sejtek, (E) MCT4 pozitív sejtek és a (F) GLUT1 pozitív sejtek segítségével koexpresszáló sejtpopulációkat határoztunk meg.

### 4.3. TMEM45A expressziója humán primer tüdő adenokarcinómában

Mivel a TMEM45A pozitivitást mutatott primer tüdő adenokarcinómában és korábbi irodalmi adatok nem igazán jellemezték tüdő rákban, az érdeklődésünk ezen fehérje felé fordult. A friss sebészeti tumormintákhoz és a hozzájuk tartozó egészséges szövethez azonban nehéz hozzájutni, így a TMEM45A kifejeződésének vizsgálatához immunhisztokémiai metszeteket használtunk 17 adenokarcinomás betegből, valamint 3 nem tumoros pneumothoraxos páciensből. A formalin-fixált paraffinba ágyazott (FFPE) tüdőbiopsziák egymást követő metszetét anti-HIF-1 $\alpha$  vagy anti-TMEM45A antitestekkel festettük.

Csoportunkban végzett kutatás volt az első, ahol bemutatásra került a TMEM45A fehérje expressziójának összehasonlítása humán tüdő adenokarcinomás és nem tumoros tüdő szöveti mintán. Annak ellenére, hogy több közelmény is van a TMEM45A és a hipoxia kapcsolatáról, szinte mindegyik transzkriptomikai eredményeken alapszik [57], [59]. Az IHC a HIF-1 $\alpha$  sporadikus festődését mutatta (+), miközben a TMEM45A erősen (+++) fejeződött ki mind a 17 beteg szövetén (23. ábra).



24. Ábra. Az immunhisztokémia a TMEM45A magas expresszióját mutatja és a HIF1- $\alpha$  sporadikus kifejeződését invazív acináris karcinómában. A piros négyzetek malignusabb szövetrészt mutatnak, melyekről 40-es objektívvel is készült fénykép (jobb oldal). Ezen betegek tumorstátuszai a következők: Páciens 1: T1bN2M0, páciens 2: T3N0M0 és páciens 3: T2bN2M0. Összesen 17 rákos beteg tüdejét vizsgáltuk. A kontroll szövetek légmelles betegek nem-tumoros tüdejéből származnak. Nagyítási lépték: 100  $\mu$ m.

A hipoxia függő HIF-1 $\alpha$  lokálisan szuppresszálja a veleszületett és adaptív tumorellenes immunválaszt. Az emelkedett HIF-1 $\alpha$  aktiválja az immunszuppresszív hatásokat (immun szuppresszorok, mint a regulátor T-sejtek és a mieloid eredetű szuppresszor sejtek toborzása, 2-es típusú segítő Th2-es citokinek szekréciója) és gátolja a tumorellenes immunválaszokat (természetes ölősejtek, természetes ölő T-sejtek, CD4 és CD8 immunsejtek működésének gátlása), gátolja az antigén prezentáló sejteket (dendritikus sejtek), és csökkenti az immunrendszer stimuláló Th1 citokinek termelését [70].

## 5. DISZKUSSZIÓ

A tüdőrák az egyik leggyakrabban diagnosztizált ráktípus, különösen a fejlett országokban, azonban a diagnosztika, besorolás és terápiás fejlődések ellenére továbbra is alacsony a túlélési rátája. A tumor heterogenitást számos tumorban leírták és többféle szinten is értelmezhető: hisztológiailag, cellulárisan, molekulárisan és genetikailag. Az ITH a tumorok egy olyan jellemzője, ami nagymértékben hozzájárul a gyógyszerekre adott rezisztenciához, immunrendszer elkerüléséhez és végül a visszaeséshez [71]. Ebből kifolyólag az ITH foka olyan biomarkerré vált, amely fordítottan arányos a betegség prognózisával [72]. Egy nemrégiben készült teljes genom szekvenálási tanulmány 38 ráktípust lefedve 2658 tumormintát szekvenálva alátámasztotta az ITH mögötti szubklonális driver mutációk pozitív szelekcióját [73]. Az ITH alapvetően tumoros sejtek tömegének a változó genomikai, transzkriptomikai, epigenetikai és proteomikai státuszából származhat [74].

Kutatásunkban az egyik legkorszerűbb egysejt szintű technológiát, a CyTOF-ot alkalmaztuk a humán tüdő adenokarcinóma sejtvonalak közötti és sejtvonalon belüli heterogenitás fehérje szintű vizsgálatához. Először három humán NSCLC sejtvonalat, az A549, H1975 és H1650 adenokarcinóma sejteket elemeztük, hogy ezek a sejtvonalak vajon homogén sejtekből állnak-e vagy valamilyen jellegzetes sejtvonal heterogenitást hordoznak-e. Korábbi irodalmi adatokat nem találtunk, amelyekben egysejt szinten vizsgálták volna a humán tüdő adenokarcinóma sejtvonalak fehérjeexpresszióját. Mindhárom sejtvonal heterogenitást mutatott a 13 vizsgált marker esetében, és megőrizték azok eredendő klonális heterogenitását hipoxiás körülmények alatt is. A sejtvonalak közötti, illetve sejtvonalon belüli heterogenitás mindegyik vizsgált marker: GLUT1, MCT4, CA9, TMEM45A, CD66, CD274, CD24, CD326, pan-keratin, TRA-1-60, galektin-3, galektin-1 és EGFR esetében is megmutatkozott. A legnagyobb kifejeződést mutató markerek A549 esetében az EGFR és CD24, H1975 esetében a CD274, CD326 és az EGFR, valamint a H1650-nél a CD326 és EGFR.

Tehát a kutatásunk megerősítette, hogy a rákkutatásban alkalmazott A549, H1975 és H1650 NSCLC sejtvonalak megfelelő modellrendszerek a ráksejtek heterogenitás vizsgálatához. A hipoxia a tumor mikroevolúció egyik legismertebb hajtóereje, ezért az NSCLC sejteket szubletális dózisú DEF-fel kezeltük, hogy stabilizáljuk a HIF-1 $\alpha$ -t a vas kelátolásával. qRT-PCR-rel validáltuk a hipoxiát

imitáló környezet létrejöttét olyan génekkel, amelyek köztudottan HRE elemet tartalmaznak. Ezek az angiogenezisben (VEGFA, PDGFB), metabolizmusban (SLC2A1, LDHA, PGK1, PDK1), metasztázisban (MMP2, CXCL12, CXCR4, PLAUR) és savasodásban (CA9, PLAU) szerepet játszó gének, valamint a TMEM45A igazolta a 400  $\mu$ M DEF hipoxiát imitáló hatását mRNS szinten. Azonban a CyTOF mérésünk fehérje szinten csak az A549 esetében a CA9-ben, a H1975 és H1650 esetében pedig a CD326 fehérjében mutatott jelentősebb változást. Összességében elmondható, hogy a 3 különböző vizsgált humán tüdő adenokarcinóma sejtvonal – A549, H1975 és H1650 – nem ugyanolyan sejtek tömkelege, hanem különböző mértékben reprezentálják egysejt szinten a heterogenitást, így megfelelő kísérleti modellek a ráksejtek heterogenitására fókuszáló kutatásokban.

2023 végén megjelent egy cikk Zhu és társaitól, ahol transzkriptomikai és epigenetikai heterogenitást vizsgáltak 42 humán sejtvonalon. Kimutatták, hogy a transzkriptom sokféleségét befolyásolhatja a szubklónok jelenléte, valamint a sejtvonal belső plaszticitása. Felmerült, hogy a heterogenitások statikusak-e vagy inkább plasztikusak különböző körülmények között. 24 órás hipoxiás kezelés ellenére a különböző alklaszterek eltérő tulajdonságai normál és hipoxiás körülmények között is megmaradtak. Eredményül 2 korrelációs mintázatot figyeltek meg: egyik esetben teljesen megegyeztek a klaszterek a 2 körülmény alatt, a másik esetben az egy klaszterből több klaszterre osztódtak, ami azt jelenti, hogy az egy klaszter alá tartozó sejtek is különbözőképpen reagálhatnak a hipoxiás körülményre. A leszármazási vonal nyomon követésével és hipoxiás kezeléssel azt találták, hogy a transzkriptomikus heterogenitás dinamikus, és a környezeti stressz átalakíthatja [75]. Ezzel összecseng a mi fehérje szintű eredményünk is, ugyanis 24 órás DEF kezelésre javarészt hasonló maradt a sejtek fenotípusa, azonban egyes populációk másként válaszoltak és a sejtvonalak egymáshoz képest is különbözően reagáltak.

Továbbá a humán primer adenokarcinóma heterogenitását is vizsgáltuk egysejt szinten CyTOF-fal. Kimutattuk a GLUT1, MCT4, CA9, TMEM45A, CD66 és Gal-3 fehérjék emelkedett kifejeződését tumorban az ugyanabból a betegből származó nem érintett, egészséges tüdőszövethez viszonyítva. A GLUT1, MCT4 és CA9 a hipoxiához és acidózishoz való metabolikus alkalmazkodás markerei, ami hozzájárul a tumor agresszivitásához, recidívához és a betegek rossz prognózisához [76], [77], [78]. NSCLC-ben a rák metabolizmusának célbavétele egy bevált módszer lett [79],

főleg a GLUT1 célzásával, mely elősegíti a glikolízist és az NSCLC-t az integrin  $\beta$ 1/Src/FAK jelátvitelen keresztül [80]. A laktát effluxon keresztül aerob glikolízist támogató MCT4 gátlószere [81], valamint a hipoxás adaptáció során a savas extracelluláris pH fő szabályozója, a CA9 inhibitora fejlesztés alatt áll [82]. A CD66-a/c/e-t már 1965 óta használják epiteliális tumor markerként, mivel ezek a fehérjék hozzájárulnak a proliferációhoz, migrációhoz valamint a karcinóma sejtek terápiára adott rezisztenciájához [83], [84]. A korábbi egysejt szintű proteomikai vizsgálatok elsősorban a tüdő adenokarcinóma immunkomponenseire fókuszáltak [85]. Mistry a munkatársaival írt egy átfogó tanulmányt a szolid tumorok CyTOF-fal való méréseinek előnyeiről, nevezetesen egyes sejtekben lévő fehérjék kvantitatív kimutatásáról. A CyTOF kifejezetten multiplex és viszonylag torzítatlan mennyiségi fehérje méréseket kínál a szövetekben és szolid tumorokban lévő sejtek fenotípusos, funkcionális és térbeli sokféleségének megértéséhez [86]. A CyTOF-ot használva a CD24-et korábban petefészekrák osztályozására alkalmazták [87], citokeratint alkalmaztak a melanomasejtek jelölésében [88], és az EpCAM-et nemrégiben választották ki a petefészek karcinóma sejtek vizsgálatához [89]. Kutatásunk alatt egysejt szinten profiloztuk CyTOF-fal a humán primer tüdő adenokarcinóma nem immunkompartmentjeit a 14 kiválasztott fehérje expressziójának vizsgálatával.

Az egysejt szintű markerexpresszió profilok megértésével feltárhatóak a tüdőtümoros betegek potenciális célponjai, támogathatja a gyógyszerfejlesztést és a személyre szabott terápiát [90]. Tavernali és munkatársai kimutatták humán adenokarcinóma minták térbeli heterogenitását, ahol az ITH mozgatórugóinak az epigenetikus és transzkripció újraprogramozást vélték [91].

Kutatásaink alatt a fókuszunk az alig ismert TMEM45A fehérjére felé irányult. Az NSCLC-ben betöltött szerepe még szinte feltáratlan, azonban azt már leírták, hogy ezen fehérje gátlása növelheti a rákos sejtek kemoszenzitivitását [92]. Emellett CD133+ köldökzsinórvérsejtet vizsgálva kimutatták a TMEM45A mRNS kifejeződését is hipoxiás körülmények között [57]. Benita és munkatársai *in silico* vizsgálattal HIF-1 $\alpha$  célpontként azonosította [56]. Végül Flamant leírta a TMEM45A mRNS expresszióját hipoxiás MDA-MB-231 humán mellrák sejtekben valamint HepG2 humán májrák sejtekben [59]. Hayez volt az első, aki megmutatta a TMEM45A fehérje mennyiségének növekedését a Golgi apparátus közelében hipoxiás állapotban eger embrionális fibroblasztokban [69]. Ezzel szemben az IHC

eredményeinknél humán tüdő adenokarcinómában a TMEM45A expressziója nem kifejezetten a HIF-1 $\alpha$  indukciótól függött.

Korábbi munkánkban a TMEM45A megnövekedett sejtfelszíni expressziójáról számoltunk be A549 sejtek háromdimenziós tenyészetében és egér A549 xenograftban daganatokban, melyet szintén CyTOF-fal vizsgáltunk [93]. Jelenlegi kutatásunk az első, amely CyTOF-fal leírja a TMEM45A sejtfelszíni fehérje megnövekedett mennyiségét páciens eredetű tüdő adenokarcinóma mintában. Az emelkedett expressziót 17 beteg tüdő adenokarcinóma IHC-jával demonstráltuk [94]. Bár az IHC a sejtfelszíni és intracelluláris TMEM45A expressziót is detektálja, azt feltételezzük, hogy a CyTOF által kimutatott sejtfelszíni fehérje jelenléte kondicionális körülményektől függ és a fehérje szabályozásának, valamint funkciójának feltárásához további kutatások szükségesek.

## IRODALOMJEGYZÉK

- [1] I. D. Rosero és mtsai., „Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials on Preoperative Physical Exercise Interventions in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer”, *Cancers*, köt. 11, sz. 7, o. 944, júl. 2019, doi: 10.3390/cancers11070944.
- [2] R. S. Herbst, D. Morgensztern, és C. Boshoff, „The biology and management of non-small cell lung cancer”, *Nature*, köt. 553, sz. 7689, o. 446–454, jan. 2018, doi: 10.1038/nature25183.
- [3] X.-X. Fan és Q. Wu, „Decoding Lung Cancer at Single-Cell Level”, *Front. Immunol.*, köt. 13, o. 883758, máj. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.883758.
- [4] M. B. Schabath és M. L. Cote, „Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer”, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, köt. 28, sz. 10, o. 1563–1579, okt. 2019, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0221.
- [5] X. Liang, A. Lin, Q. Wang, J. Zhang, és P. Luo, „Cell plasticity in patients with NSCLC: The controversial origins of transformed SCLC”, *Biomed. Pharmacother.*, köt. 149, o. 112909, máj. 2022, doi: 10.1016/j.biopha.2022.112909.
- [6] H. Mithoowani és M. Febbraro, „Non-Small-Cell Lung Cancer in 2022: A Review for General Practitioners in Oncology”, *Curr. Oncol.*, köt. 29, sz. 3, o. 1828–1839, márc. 2022, doi: 10.3390/curroncol29030150.
- [7] D. Hanahan és R. A. Weinberg, „The Hallmarks of Cancer”, *Cell*, köt. 100, sz. 1, o. 57–70, jan. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [8] D. Hanahan, „Hallmarks of Cancer: New Dimensions”, *Cancer Discov.*, köt. 12, sz. 1, o. 31–46, jan. 2022, doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- [9] D. Hanahan és R. A. Weinberg, „Hallmarks of Cancer: The Next Generation”, *Cell*, köt. 144, sz. 5, o. 646–674, márc. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [10] B. Thienpont, L. Van Dyck, és D. Lambrechts, „Tumors smother their epigenome”, *Mol. Cell. Oncol.*, köt. 3, sz. 6, o. e1240549, nov. 2016, doi: 10.1080/23723556.2016.1240549.
- [11] S. Lee és C. A. Schmitt, „The dynamic nature of senescence in cancer”, *Nat. Cell Biol.*, köt. 21, sz. 1, o. 94–101, jan. 2019, doi: 10.1038/s41556-018-0249-2.
- [12] J. Birch és J. Gil, „Senescence and the SASP: many therapeutic avenues”, *Genes Dev.*, köt. 34, sz. 23–24, o. 1565–1576, dec. 2020, doi: 10.1101/gad.343129.120.
- [13] A. Biswas és S. De, „Drivers of dynamic intratumor heterogeneity and phenotypic plasticity”, *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, köt. 320, sz. 5, o. C750–C760, máj. 2021, doi: 10.1152/ajpcell.00575.2020.
- [14] A. Marusyk, M. Janiszewska, és K. Polyak, „Intratumor Heterogeneity: The Rosetta Stone of Therapy Resistance”, *Cancer Cell*, köt. 37, sz. 4, o. 471–484, ápr. 2020, doi: 10.1016/j.ccell.2020.03.007.
- [15] M. Gerlinger és mtsai., „Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing”, *N. Engl. J. Med.*, köt. 366, sz. 10, o. 883–892, márc. 2012, doi: 10.1056/NEJMoa1113205.
- [16] G. Stanta és S. Bonin, „Overview on Clinical Relevance of Intra-Tumor Heterogeneity”, *Front. Med.*, köt. 5, o. 85, ápr. 2018, doi: 10.3389/fmed.2018.00085.
- [17] G. Stanta és S. Bonin, „A Practical Approach to Tumor Heterogeneity in Clinical Research and Diagnostics”, *Pathobiology*, köt. 85, sz. 1–2, o. 7–17, 2018, doi: 10.1159/000477813.
- [18] G. Stanta, S. W. Jahn, S. Bonin, és G. Hoefler, „Tumour heterogeneity: principles and practical consequences”, *Virchows Arch.*, köt. 469, sz. 4, o. 371–384, okt. 2016, doi: 10.1007/s00428-016-1987-9.
- [19] S. Koren és M. Bentires-Alj, „Breast Tumor Heterogeneity: Source of Fitness, Hurdle for Therapy”, *Mol. Cell*, köt. 60, sz. 4, o. 537–546, nov. 2015, doi: 10.1016/j.molcel.2015.10.031.

- [20] C. Yang és mtsai., „Multi-region sequencing with spatial information enables accurate heterogeneity estimation and risk stratification in liver cancer”, *Genome Med.*, köt. 14, sz. 1, o. 142, dec. 2022, doi: 10.1186/s13073-022-01143-6.
- [21] J. L.-Y. Chen és mtsai., „The Genomic Analysis of Lactic Acidosis and Acidosis Response in Human Cancers”, *PLoS Genet.*, köt. 4, sz. 12, o. e1000293, dec. 2008, doi: 10.1371/journal.pgen.1000293.
- [22] J. Jin és G. Yu., „Hypoxic lung cancer cell-derived exosomal miR-21 mediates macrophage M2 polarization and promotes cancer cell proliferation through targeting IRF1”, *World J. Surg. Oncol.*, köt. 20, sz. 1, o. 241, dec. 2022, doi: 10.1186/s12957-022-02706-y.
- [23] T. Hofer, R. Wenger, és M. Gassmann, „Oxygen sensing, HIF-1 $\alpha$  stabilization and potential therapeutic strategies”, *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.*, köt. 443, sz. 4, o. 503–507, febr. 2002, doi: 10.1007/s00424-001-0759-8.
- [24] U. R. Jewell, I. Kvietikova, A. Scheid, C. Bauer, R. H. Wenger, és M. Gassmann, „Induction of HIF-1 $\alpha$  in response to hypoxia is instantaneous”, *FASEB J.*, köt. 15, sz. 7, o. 1312–1314, máj. 2001, doi: 10.1096/fj.00-0732fje.
- [25] L. Fan, J. Li, Z. Yu, X. Dang, és K. Wang, „The Hypoxia-Inducible Factor Pathway, Prolyl Hydroxylase Domain Protein Inhibitors, and Their Roles in Bone Repair and Regeneration”, *BioMed Res. Int.*, köt. 2014, o. 1–11, 2014, doi: 10.1155/2014/239356.
- [26] D. Bandarra, J. Biddlestone, S. Mudie, H. A. Muller, és S. Rocha, „HIF-1 $\alpha$  restricts NF- $\kappa$ B dependent gene expression to control innate immunity signals”, *Dis. Model. Mech.*, o. dmm.017285, jan. 2014, doi: 10.1242/dmm.017285.
- [27] S.-C. Lin, W.-L. Liao, J.-C. Lee, és S.-J. Tsai, „Hypoxia-regulated gene network in drug resistance and cancer progression”, *Exp. Biol. Med.*, köt. 239, sz. 7, o. 779–792, júl. 2014, doi: 10.1177/1535370214532755.
- [28] I. Marchiq és J. Pouysségur, „Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H<sup>+</sup> symporters”, *J. Mol. Med.*, köt. 94, sz. 2, o. 155–171, febr. 2016, doi: 10.1007/s00109-015-1307-x.
- [29] J. Doyen és mtsai., „Expression of the hypoxia-inducible monocarboxylate transporter MCT4 is increased in triple negative breast cancer and correlates independently with clinical outcome”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, köt. 451, sz. 1, o. 54–61, aug. 2014, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.050.
- [30] R. A. Gatenby és R. J. Gillies, „Why do cancers have high aerobic glycolysis?”, *Nat. Rev. Cancer*, köt. 4, sz. 11, o. 891–899, nov. 2004, doi: 10.1038/nrc1478.
- [31] M. Damaghi és mtsai., „Chronic acidosis in the tumour microenvironment selects for overexpression of LAMP2 in the plasma membrane”, *Nat. Commun.*, köt. 6, sz. 1, o. 8752, dec. 2015, doi: 10.1038/ncomms9752.
- [32] R. Griffin és R. A. Ramirez, „Molecular Targets in Non-Small Cell Lung Cancer”, köt. 17, sz. 4, 2017.
- [33] P. Neuperger és mtsai., „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”, *Front. Immunol.*, köt. 14, o. 1243233, okt. 2023, doi: 10.3389/fimmu.2023.1243233.
- [34] E. Castellanos, E. Feld, és L. Horn, „Driven by Mutations: The Predictive Value of Mutation Subtype in EGFR -Mutated Non-Small Cell Lung Cancer”, *J. Thorac. Oncol.*, köt. 12, sz. 4, o. 612–623, ápr. 2017, doi: 10.1016/j.jtho.2016.12.014.
- [35] S. V. Sharma, D. W. Bell, J. Settleman, és D. A. Haber, „Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer”, *Nat. Rev. Cancer*, köt. 7, sz. 3, o. 169–181, márc. 2007, doi: 10.1038/nrc2088.
- [36] A. Leonetti, S. Sharma, R. Minari, P. Perego, E. Giovannetti, és M. Tiseo, „Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer”, *Br. J. Cancer*, köt. 121, sz. 9, o. 725–737, okt. 2019, doi: 10.1038/s41416-019-0573-8.

- [37] N. Karachaliou, M. Fernandez-Bruno, J. W. P. Bracht, és R. Rosell, „EGFR first- and second-generation TKIs—there is still place for them in EGFR-mutant NSCLC patients”, *Transl. Cancer Res.*, köt. 8, sz. S1, o. S23–S47, jan. 2018, doi: 10.21037/tcr.2018.10.06.
- [38] S. S. Ramalingam és mtsai., „Overall Survival with Osimertinib in Untreated, *EGFR* - Mutated Advanced NSCLC”, *N. Engl. J. Med.*, köt. 382, sz. 1, o. 41–50, jan. 2020, doi: 10.1056/NEJMoa1913662.
- [39] J.-C. Soria és mtsai., „Osimertinib in Untreated *EGFR* -Mutated Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer”, *N. Engl. J. Med.*, köt. 378, sz. 2, o. 113–125, jan. 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1713137.
- [40] L. A. Pikor, V. R. Ramnarine, S. Lam, és W. L. Lam, „Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications”, *Lung Cancer*, köt. 82, sz. 2, o. 179–189, nov. 2013, doi: 10.1016/j.lungcan.2013.07.025.
- [41] N. H. Hanna és mtsai., „Therapy for Stage IV Non–Small-Cell Lung Cancer With Driver Alterations: ASCO and OH (CCO) Joint Guideline Update”, *J. Clin. Oncol.*, köt. 39, sz. 9, o. 1040–1091, márc. 2021, doi: 10.1200/JCO.20.03570.
- [42] K. Bergethon és mtsai., „*ROS1* Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers”, *J. Clin. Oncol.*, köt. 30, sz. 8, o. 863–870, márc. 2012, doi: 10.1200/JCO.2011.35.6345.
- [43] J. Judd és mtsai., „Characterization of *KRAS* Mutation Subtypes in Non–small Cell Lung Cancer”, *Mol. Cancer Ther.*, köt. 20, sz. 12, o. 2577–2584, dec. 2021, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0201.
- [44] D. Cai és mtsai., „The prevalence and prognostic value of *KRAS* co-mutation subtypes in Chinese advanced non-small cell lung cancer patients”, *Cancer Med.*, köt. 9, sz. 1, o. 84–93, jan. 2020, doi: 10.1002/cam4.2682.
- [45] D. S. Hong és mtsai., „*KRAS*<sup>G12C</sup> Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors”, *N. Engl. J. Med.*, köt. 383, sz. 13, o. 1207–1217, szept. 2020, doi: 10.1056/NEJMoa1917239.
- [46] Y. Shiravand és mtsai., „Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy”, *Curr. Oncol.*, köt. 29, sz. 5, o. 3044–3060, ápr. 2022, doi: 10.3390/curroncol29050247.
- [47] M. Reck és mtsai., „Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer”, *N. Engl. J. Med.*, köt. 375, sz. 19, o. 1823–1833, nov. 2016, doi: 10.1056/NEJMoa1606774.
- [48] A. F. Nassar, H. Ogura, és A. V. Wisniewski, „Impact of recent innovations in the use of mass cytometry in support of drug development”, *Drug Discov. Today*, köt. 20, sz. 10, o. 1169–1175, okt. 2015, doi: 10.1016/j.drudis.2015.06.001.
- [49] E. Kotogány és mtsai., „Imidazo[1,2-b]pyrazole-7-Carboxamide Derivative Induces Differentiation-Coupled Apoptosis of Immature Myeloid Cells Such as Acute Myeloid Leukemia and Myeloid-Derived Suppressor Cells”, *Int. J. Mol. Sci.*, köt. 21, sz. 14, o. 5135, júl. 2020, doi: 10.3390/ijms21145135.
- [50] G. J. Szebeni és mtsai., „The Anti-Inflammatory Role of Mannich Curcuminoids; Special Focus on Colitis”, *Molecules*, köt. 24, sz. 8, o. 1546, ápr. 2019, doi: 10.3390/molecules24081546.
- [51] R. Finck és mtsai., „Normalization of mass cytometry data with bead standards”, *Cytometry A*, köt. 83A, sz. 5, o. 483–494, máj. 2013, doi: 10.1002/cyto.a.22271.
- [52] E. D. Amir és mtsai., „viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia”, *Nat. Biotechnol.*, köt. 31, sz. 6, o. 545–552, jún. 2013, doi: 10.1038/nbt.2594.
- [53] K. Quintelier, A. Couckuyt, A. Emmaneel, J. Aerts, Y. Saeys, és S. Van Gassen, „Analyzing high-dimensional cytometry data using FlowSOM”, *Nat. Protoc.*, köt. 16, sz. 8, o. 3775–3801, aug. 2021, doi: 10.1038/s41596-021-00550-0.
- [54] S. Van Gassen és mtsai., „FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data”, *Cytometry A*, köt. 87, sz. 7, o. 636–645, júl. 2015, doi: 10.1002/cyto.a.22625.

- [55] K. Hirota, „HIF- $\alpha$  Prolyl Hydroxylase Inhibitors and Their Implications for Biomedicine: A Comprehensive Review”, *Biomedicines*, köt. 9, sz. 5, o. 468, ápr. 2021, doi: 10.3390/biomedicines9050468.
- [56] Y. Benita, H. Kikuchi, A. D. Smith, M. Q. Zhang, D. C. Chung, és R. J. Xavier, „An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia”, *Nucleic Acids Res.*, köt. 37, sz. 14, o. 4587–4602, aug. 2009, doi: 10.1093/nar/gkp425.
- [57] E. Martin-Rendon és *mtsai.*, „Transcriptional Profiling of Human Cord Blood CD133+ and Cultured Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Response to Hypoxia”, *Stem Cells*, köt. 25, sz. 4, o. 1003–1012, ápr. 2007, doi: 10.1634/stemcells.2006-0398.
- [58] D. Ciarlillo, C. Celeste, P. Carmeliet, D. Boerboom, és C. Theoret, „A hypoxia response element in the Vegfa promoter is required for basal Vegfa expression in skin and for optimal granulation tissue formation during wound healing in mice”, *PLOS ONE*, köt. 12, sz. 7, o. e0180586, júl. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0180586.
- [59] L. Flamant és *mtsai.*, „TMEM45A is essential for hypoxia-induced chemoresistance in breast and liver cancer cells”, *BMC Cancer*, köt. 12, sz. 1, o. 391, dec. 2012, doi: 10.1186/1471-2407-12-391.
- [60] S. Pastorekova és R. J. Gillies, „The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond”, *Cancer Metastasis Rev.*, köt. 38, sz. 1–2, o. 65–77, jún. 2019, doi: 10.1007/s10555-019-09799-0.
- [61] J. Pastorek és S. Pastorekova, „Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: From biology to clinical use”, *Semin. Cancer Biol.*, köt. 31, o. 52–64, ápr. 2015, doi: 10.1016/j.semcancer.2014.08.002.
- [62] J. Kopacek és *mtsai.*, „MAPK pathway contributes to density- and hypoxia-induced expression of the tumor-associated carbonic anhydrase IX”, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.*, köt. 1729, sz. 1, o. 41–49, máj. 2005, doi: 10.1016/j.bbaexp.2005.03.003.
- [63] M. Takacova, T. Holotnakova, M. Barathova, S. Pastorekova, J. Kopacek, és J. Pastorek, „Src induces expression of carbonic anhydrase IX via hypoxia-inducible factor”, *Oncol. Rep.*, 2010.
- [64] U. Schnell, V. Cirulli, és B. N. G. Giepmans, „EpCAM: Structure and function in health and disease”, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, köt. 1828, sz. 8, o. 1989–2001, aug. 2013, doi: 10.1016/j.bbamem.2013.04.018.
- [65] L. Keller, S. Werner, és K. Pantel, „Biology and clinical relevance of EpCAM”, *Cell Stress*, köt. 3, sz. 6, o. 165–180, jún. 2019, doi: 10.15698/cst2019.06.188.
- [66] F. Fagotto, „EpCAM as Modulator of Tissue Plasticity”, *Cells*, köt. 9, sz. 9, o. 2128, szept. 2020, doi: 10.3390/cells9092128.
- [67] M. Zhu, B. Jiang, D. Yan, X. Wang, H. Ge, és Y. Sun, „Knockdown of TMEM45A overcomes multidrug resistance and epithelial–mesenchymal transition in human colorectal cancer cells through inhibition of TGF- $\beta$  signalling pathway”, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, köt. 47, sz. 3, o. 503–516, márc. 2020, doi: 10.1111/1440-1681.13220.
- [68] L. Zhang, F. Wu, és J. Zhao, „Transmembrane protein 45A regulates the proliferation, migration, and invasion of glioma cells through nuclear factor kappa-B”, *Anticancer. Drugs*, köt. 31, sz. 9, o. 900–907, okt. 2020, doi: 10.1097/CAD.0000000000000890.
- [69] A. Hayez és *mtsai.*, „TMEM45A Is Dispensable for Epidermal Morphogenesis, Keratinization and Barrier Formation”, *PLOS ONE*, köt. 11, sz. 1, o. e0147069, jan. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0147069.
- [70] P. Vaupel és G. Multhoff, „Hypoxia-/HIF-1 $\alpha$ -Driven Factors of the Tumor Microenvironment Impeding Antitumor Immune Responses and Promoting Malignant Progression”, in *Oxygen Transport to Tissue XL*, köt. 1072, O. Thews, J. C. LaManna, és D. K. Harrison, Szerk., in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1072., Cham: Springer International Publishing, 2018, o. 171–175. doi: 10.1007/978-3-319-91287-5\_27.

- [71] V. M. L. de Sousa és L. Carvalho, „Heterogeneity in Lung Cancer”, *Pathobiology*, köt. 85, sz. 1–2, o. 96–107, 2018, doi: 10.1159/000487440.
- [72] M. Li, Z. Zhang, L. Li, és X. Wang, „An algorithm to quantify intratumor heterogeneity based on alterations of gene expression profiles”, *Commun. Biol.*, köt. 3, sz. 1, o. 505, szept. 2020, doi: 10.1038/s42003-020-01230-7.
- [73] S. C. Dentro és *mtsai.*, „Characterizing genetic intra-tumor heterogeneity across 2,658 human cancer genomes”, *Cell*, köt. 184, sz. 8, o. 2239-2254.e39, ápr. 2021, doi: 10.1016/j.cell.2021.03.009.
- [74] N. El-Sayes, A. Vito, és K. Mossman, „Tumor Heterogeneity: A Great Barrier in the Age of Cancer Immunotherapy”, *Cancers*, köt. 13, sz. 4, o. 806, febr. 2021, doi: 10.3390/cancers13040806.
- [75] Q. Zhu és *mtsai.*, „Single cell multi-omics reveal intra-cell-line heterogeneity across human cancer cell lines”, *Nat. Commun.*, köt. 14, sz. 1, o. 8170, dec. 2023, doi: 10.1038/s41467-023-43991-9.
- [76] D. Ambrosetti és *mtsai.*, „The two glycolytic markers GLUT1 and MCT1 correlate with tumor grade and survival in clear-cell renal cell carcinoma”, *PLOS ONE*, köt. 13, sz. 2, o. e0193477, febr. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0193477.
- [77] M. Bonatelli és *mtsai.*, „The Warburg Effect Is Associated With Tumor Aggressiveness in Testicular Germ Cell Tumors”, *Front. Endocrinol.*, köt. 10, o. 417, jún. 2019, doi: 10.3389/fendo.2019.00417.
- [78] E. Panisova és *mtsai.*, „Lactate stimulates CA IX expression in normoxic cancer cells”, *Oncotarget*, köt. 8, sz. 44, o. 77819–77835, szept. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.20836.
- [79] P. Farhadi, R. Yarani, S. Dokaneheifard, és K. Mansouri, „The emerging role of targeting cancer metabolism for cancer therapy”, *Tumor Biol.*, köt. 42, sz. 10, o. 101042832096528, okt. 2020, doi: 10.1177/1010428320965284.
- [80] H. Zhao és *mtsai.*, „Glucose Transporter 1 Promotes the Malignant Phenotype of Non-Small Cell Lung Cancer through Integrin  $\beta$ 1/Src/FAK Signaling”, *J. Cancer*, köt. 10, sz. 20, o. 4989–4997, 2019, doi: 10.7150/jca.30772.
- [81] T.-C. Kuo és *mtsai.*, „Monocarboxylate Transporter 4 Is a Therapeutic Target in Non-small Cell Lung Cancer with Aerobic Glycolysis Preference”, *Mol. Ther. - Oncolytics*, köt. 18, o. 189–201, szept. 2020, doi: 10.1016/j.omto.2020.06.012.
- [82] S.-H. Lee és J. R. Griffiths, „How and Why Are Cancers Acidic? Carbonic Anhydrase IX and the Homeostatic Control of Tumour Extracellular pH”, *Cancers*, köt. 12, sz. 6, o. 1616, jún. 2020, doi: 10.3390/cancers12061616.
- [83] X. Zhang, X. Han, P. Zuo, X. Zhang, és H. Xu, „CEACAM5 stimulates the progression of non-small-cell lung cancer by promoting cell proliferation and migration”, *J. Int. Med. Res.*, köt. 48, sz. 9, o. 030006052095947, szept. 2020, doi: 10.1177/0300060520959478.
- [84] F. Gebauer és *mtsai.*, „Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecules (CEACAM) 1, 5 and 6 as Biomarkers in Pancreatic Cancer”, *PLoS ONE*, köt. 9, sz. 11, o. e113023, nov. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0113023.
- [85] T. Zhang, A. R. Warden, Y. Li, és X. Ding, „Progress and applications of mass cytometry in sketching immune landscapes”, *Clin. Transl. Med.*, köt. 10, sz. 6, o. e206, okt. 2020, doi: 10.1002/ctm2.206.
- [86] A. M. Mistry, A. R. Greenplate, R. A. Ihrie, és J. M. Irish, „Beyond the message: advantages of snapshot proteomics with single-cell mass cytometry in solid tumors”, *FEBS J.*, köt. 286, sz. 8, o. 1523–1539, ápr. 2019, doi: 10.1111/febs.14730.
- [87] V. D. Gonzalez és *mtsai.*, „Commonly Occurring Cell Subsets in High-Grade Serous Ovarian Tumors Identified by Single-Cell Mass Cytometry”, *Cell Rep.*, köt. 22, sz. 7, o. 1875–1888, febr. 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.01.053.
- [88] N. Leelatian és *mtsai.*, „Single cell analysis of human tissues and solid tumors with mass cytometry”, *Cytometry B Clin. Cytom.*, köt. 92, sz. 1, o. 68–78, jan. 2017, doi: 10.1002/cyto.b.21481.

- [89] S. Anandan és *mtsai.*, „Phenotypic Characterization by Mass Cytometry of the Microenvironment in Ovarian Cancer and Impact of Tumor Dissociation Methods”, *Cancers*, köt. 13, sz. 4, o. 755, febr. 2021, doi: 10.3390/cancers13040755.
- [90] D. C. Wang, W. Wang, B. Zhu, és X. Wang, „Lung Cancer Heterogeneity and New Strategies for Drug Therapy”, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, köt. 58, sz. 1, o. 531–546, jan. 2018, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104523.
- [91] D. Tavernari és *mtsai.*, „Nongenetic Evolution Drives Lung Adenocarcinoma Spatial Heterogeneity and Progression”, *Cancer Discov.*, köt. 11, sz. 6, o. 1490–1507, jún. 2021, doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-1274.
- [92] K. Schmit és C. Michiels, „TMEM Proteins in Cancer: A Review”, *Front. Pharmacol.*, köt. 9, o. 1345, dec. 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.01345.
- [93] Alföldi és *mtsai.*, „Single Cell Mass Cytometry of Non-Small Cell Lung Cancer Cells Reveals Complexity of In vivo And Three-Dimensional Models over the Petri-dish”, *Cells*, köt. 8, sz. 9, o. 1093, szept. 2019, doi: 10.3390/cells8091093.
- [94] P. Neuperger és *mtsai.*, „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*, köt. 14, sz. 1, o. 144, dec. 2021, doi: 10.3390/cancers14010144.

## ÖSSZEFOGLALÓ

A világ egyik vezető elhalálozási oka férfiak és nők körében is a tüdőrák. Legnagyobb rizikófaktora a dohányzás, melynek letétele bármikor javíthat a kialakulás esélyén vagy akár a kezelés hatékonyságán is. Világszinten évente 1,6 millióan esnek áldozatul és a jelenlegi túlélési esély is csak 21%-ra tehető. Két nagy csoportra lehet elkülöníteni, a kissejtes tüdőrákra, valamint a nem-kissejtes tüdőrákra. Utóbbi további alosztályokra is bontható, melynek döntő többségét, 40%-át az adenokarcinóma teszi ki. Éppen ezért vizsgálatunk központi sejttípusának ezt jelöltük ki.

A tumorképzés egy többlépcsős, dinamikus változásokkal járó folyamatként írható le, mialatt a rákos sejtek különböző tulajdonságokat sajátítanak el.

A kezelést megnehezíti, hogy általában csak későn diagnosztizálják, amikor már metasztázis is kialakul, valamint a tumor heterogenitásának ténye, ugyanis egyes betegek tumora is különbözik, illetve egy tumoron belül is a különböző régiók más-más fenotípust mutatnak. Emellett a kezeléseknél könnyebben maradhat, majd szaporodhat túl rezisztens alpopuláció. A heterogenitást értelmezhetjük tumoron belül, sejtvonalak között és sejtvonalon belül is. Az ITH adódhat genomikai instabilitásból, epigenetikai változásokból, funkcionális vagy sztochasztikus plaszticitásból, ezek mellett a mikrokörnyezet is egy folyamatos nyomást gyakorol rá.

A leggyakoribb mikrokörnyezeti stressz a hipoxia és a savasodás. Tumorképzésnél hirtelen egy nagyobb sejttömeg alakul ki sok millió sejtből, azonban ennek a tömegnek a belseje nem lesz kellőképpen vaszkularizált, így oxigénhiányos állapot alakul ki. Normoxia alatt a HIF-1 $\alpha$ -hoz képes hozzákapcsolódni a VHL ubikvitin ligáz, ami a degradációját eredményezi. Azonban oxigénhiányos környezetben ez az interakció nem történik meg, kialakul a HIF-1 komplex, ami a sejtmagba transzlokálódva aktiválja a hipoxiára érzékeny fehérjék termelődését.

Kísérleteink központi módszere az egysejt-tömegcitométer volt, amely multiplex fenotipizálásra képes egysejt szinten. Detektáláshoz lantanoid fém izotópokkal konjugált antitesteket használ, ezzel kizárva a hagyományos áramlási citometria korlátját, a spektrális átfedést.

Első célunk 3 humán tüdő adenokarcinóma sejtvonala, az A549, H1975 és H1650 sejtvonala közötti és sejtvonalon belüli vizsgálata volt. A heterogenitást egy általunk felépített karcinóma panellel - GLUT1, MCT4, CA9, TMEM45A, CD66, CD274, CD24, CD326, pan-keratin, TRA-1-60, Gal-3, Gal-1, és EGFR - vizsgáltuk egysejt-tömegcitométerrel. A CyTOF-os kísérletünk szemléletesen ábrázolta, hogy annak ellenére, hogy mindhárom sejtvonala humán adenokarcinóma, az általunk választott markereket különböző mértékben expresszálják. Az A549 sejtek nagyjából 86%-a expresszálja a CD24-t és szinte az összes sejt az EGFR-t. Az összes H1975 kifejezi a CD326 fehérjét és a sejtek döntő többsége a CD274-et, valamint EGFR-t is. Szintén az összes H1650-en megnyilvánul a CD326, a sejtek 96%-án az EGFR és 56%-án a CD24. Mindhárom sejtvonalnál a magas EGFR expresszió abból adódik, hogy EGFR mutáns adenokarcinómák. A 3 sejtvonala populáció százalékban elsősorban a CA9, CD274, CD24 és kisebb mértékben a Gal-3 fehérjékben különböznek. A CD326 a H1975-ben és H1650-ben sejtvonalaiban szinte minden sejten megtalálható, azonban az A549 sejtek csak 20 %-ában. A markerek intenzitása szempontjából a CD274, CD24, CD326 és Gal-3 fehérjében térnek el legjobban.

Az sejtvonala közötti, illetve sejtvonalon belüli heterogenitás vizualizálásához t-SNE algoritmust használtunk, ami szemléletesen ábrázolja a 13 marker expressziós intenzitását egyszerre, valamint az így kapott sokdimenziós teret képes 2 dimenzióvá redukálni. A sejteket közös markerexpresszió alapján helyezi egymáshoz közel vagy távol. Minél közelebb helyezkednek el egymástól, annál jobban hasonlítanak, nagy különbség esetében pedig külön sejtcsoportként, populációként jeleníti meg. Emellé színskála jelzi az expresszió intenzitását is. A 3 sejtvonalaikon egyszerre futtatott algoritmus 3 felhőként különíti el a sejteket, ezzel is jelezve a sejtvonala közötti heterogenitást (14. ábra). A hőkép rámutat arra is, hogy az egyes sejtvonalaikon belül is a markereket különböző mértékben fejezik ki a sejtek, akár teljes alpopulációt elkülönítve (13. ábra). Ezt egy másik felügyelet nélküli algoritmussal is bemutattuk, a FlowSOM analízissel, ami a markerek alapján klaszterekre bontja a sejtvonalaikat és lehetővé teszi az expressziós intenzitásokat egyszerre bemutatni minhárom sejtvonalon (15. ábra).

Ezután kíváncsiak voltunk, hogy az egyik leggyakoribb, legbefolyásosabb környezeti stressznek, a hipoxiának milyen hatása van a klonális heterogenitásra. Egy fémkelátoló ágenssel, a deferroxaminnal stabilizáltuk a HIF-1 komplexet, ezzel indukálva a hipoxiára érzékeny fehérjék termelődését. A hipoxiát imitáló környezet

meglétének validálására HRE-t tartalmazó géneket vizsgáltunk qPCR-rel; VEGFA, PDGFB, SLC2A1, LDHA, PGK1, MMP2, CXCL12, CXCR4, PLAUR, CA9, PLAU. Mivel egyes cikkekben a TMEM45A-t hipoxia indukált kemorezisztenciával hozták összefüggésbe, ezt is bevettük a vizsgált fehérjék közé. DEF kezelés után azonban fehérje szinten csupán néhány fehérje expressziója emelkedett. Az A549 sejtvonalon a CA9 fehérje termelése növekedett (MMI = 8,49 vs. 226,35), a H1975-nél (MMI = 194,13 vs. 279,56) és a H1650-nél (MMI = 350,84 vs. 517,94) pedig a CD326 expressziója nőtt.

A sejtvonalas kísérletek után volt alkalmunk humán sebészeti tüdőtumort is vizsgálni. A frissen kiműtött tumort és az ugyanazon betegből származó egészséges tüdőszövetet laborunkban azonnal feldolgoztuk és liberáz segítségével egysejt szuszpenziót készítettünk. A karcinóma panelünket ebben az esetben kiegészítettük a HLA-ABC-vel, valamint a CD45 antitesttel. Utóbbi annak érdekében, hogy az infiltráló immunsejteket ki tudjuk kapuzni és csak az egyéb sejtekre fókuszáljunk. A tumorban az egészséges szövethez képest a populáció százalék legjobban a GLUT1 (53% vs. 4.8%), MCT4 (67.3% vs. 6.0%), CA9 (40.4% vs. 3.6%), TMEM45A (61.1% vs. 5.6%), CD66 (61.7% vs. 37.1%), CD274 (15.6% vs. 2.4%), CD24 (12.8% vs. 0.9%), CD326 (50.7 vs. 37.4%), pan-keratin (17.8% vs. 9.5%) markereknél növekedett. Annak ellenére, hogy a Gal-1 és Gal-3 populáció százaléka szinte nem változott, a tumoros szövetben az intenzitásuk növekedett. A HLA fontos szerepet játszik az immunrendszer citotoxikus aktivitásában, így ennek elkerülése érdekében a tumorok gyakran alulreprezentálják a HLA-t. CyTOF-os vizsgálatunk alapján a HLA-ABC medián fémintenzitása az egészséges tüdőszövethez képest a tumorban 176-ról 87-re csökkent, tehát ez a jelenség itt is jól megnyilvánult. A viSNE ábrák alapján jól látható, hogy a szövetek sejtjei különböző mértékben fejezik ki ezeket a fehérjéket és alpopulációk is elkülöníthetőek. A TT és a HT sejtípusai között van átfedés is, de jórészt különböző sejtekből állnak.

A tumorszövet alpopulációinak szeparálásához felügyelet nélküli FlowSOM algoritmussal 10 metaklasztert határoztunk meg és jellemeztünk. A TMEM45A-t egy alpopuláció, az FSMC6 kiemelkedően magasán fejezi ki. Továbbá ebben a klaszterben a CD66, CD326, HLA-ABC és a Gal-3 is nagyobb mennyiségben van jelen.

A TMEM45A egy eddig alig jellemzett fehérje, és a korábbi kutatások főleg transzkriptomikán alapszanak. A TMEM45A elsősorban a Golgi apparátusban és az endoplazmatikus retikulumban figyelhető meg, azonban korábbi eredményeink alapján a sejtfelszínen is megjelenhet. CyTOF-fal megvizsgálva az A549 sejtvonalat csak intracellulárisan volt jelen a fehérje (71,01%), sejtfelszínen azonban szinte egyáltalán nem fejeződött ki. Ennek ellenére humán tüdőtumor mintában sikerült sejtfelszínen is kimutatnunk, ahol a populáció százaléka a tumorban 61,1% volt, míg az egészséges szövetben csak 5,6%.

Mivel sebészeti tumorhoz nehéz hozzáférni, 17 adenokarcinómás beteg formalin-fixált paraffinba ágyazott mintáját vizsgáltuk immunfestéssel, mikroszkóppal, mellé 3 nem tumoros pneumothoraxos páciens tüdő mintáját néztük kontrollként. A metszetek a HIF-1 $\alpha$  sporadikus festődését mutatta (+), miközben a TMEM45A erősen (+++) fejeződött ki mind a 17 beteg szövetén. A két fehérje között teljes kolokalizációt nem találtunk.

## SUMMARY

Lung cancer is one of the leading causes of death among men and women worldwide. The biggest risk factor is tobacco smoking, but quitting smoking at any time can improve the chance of survival. Globally, 1.6 million people die from lung cancer each year and the current survival rate is only 21%. It can be divided into two major groups, small cell lung cancer and non-small cell lung cancer. The latter can be further divided into subclasses, the vast majority (40%) is adenocarcinoma. Therefore, we focus on the adenocarcinoma subtype in our study.

Tumour formation is a multistep process with dynamic changes where cancer cells acquire different functional capabilities.

Treatment is complicated since it is usually diagnosed late, when metastasis has already developed. Treatment is challenging because the tumours differ from patient to patient, and regions to regions within a solid tumour that so called tumour heterogeneity represents different phenotypes. In addition, tumor heterogeneity may underlie resistance to therapies. Heterogeneity can be interpreted at different levels, e.g. within the tumour, between cell lines or within a cell line. ITH can originate from genomic instability, epigenetic changes, functional or stochastic plasticity, in addition the microenvironment also exerts a continuous selective pressure on it.

The most common microenvironmental stresses are hypoxia and acidification. In tumour development, a large cell mass is suddenly formed from many millions of cells, however, the interior of this mass will not be sufficiently vascularised, thus an oxygen deficient state develops. During normoxia, HIF-1 $\alpha$  is able to bind to the VHL ubiquitin ligase, resulting in its degradation. However, under oxygen deprivation the HIF-1 complex can form, which translocates to the nucleus and activates the production of hypoxia-sensitive proteins.

The central method of our experiments was single-cell mass cytometry, which is capable of multiplex phenotyping at the single-cell level. For detection, we used antibodies conjugated with lanthanide metal isotopes, thus eliminating the limitation of traditional flow cytometry, the spectral overlap.

Our first aim was to investigate the inter- and intra cell line heterogeneity of 3 human lung adenocarcinoma cell lines, namely A549, H1975 and H1650. The heterogeneity with a carcinoma panel we constructed - GLUT1, MCT4, CA9, TMEM45A, CD66, CD274, CD24, CD326, pan-keratin, TRA-1-60, Gal-3, Gal-1,

and EGFR - were examined by single-cell mass cytometry. First of all, an STR-based cell authentication was requested from Microsynth to validate our cell lines. Despite the fact that all three cell lines are human adenocarcinomas, the CyTOF experiment with our chosen markers showed different expression levels. Roughly 86% of A549 cells expressed CD24 and almost all cells expressed EGFR. All H1975 cells expressed CD326 protein and the vast majority of cells also expressed CD274 and EGFR. Similarly all H1650 cells expressed CD326, 96% of cells EGFR and 56% the CD24. The high expression of EGFR in all three cell lines was due to EGFR mutant adenocarcinomas. The 3 cell line differed in population percentages mainly is CA9, CD274, CD24 and to a lesser extent in Gal-3 proteins. CD326 in the H1975 and H1650 cell lines was expressed in almost all cells, but only in 20% of A549 cells. In terms of the intensity of the markers, CD274, CD24, CD326 and Gal-3 differed mostly.

To visualise the inter- and intra cell line heterogeneity we used t-SNE algorithm which presents the 13 marker expression intensities simultaneously, and can reduce the multidimensional space into 2 dimensions. Cells are classified based on common marker expression placed cells close to or far away from each other. The closer they are located to each other, the more similar they are, and in the case of large differences, it displays it as a separate group of cells, as a distinct population. In addition, a colour scale indicates the intensity of expression. The algorithm run simultaneously on our 3 cell lines separated the cells into 3 clouds, thereby indicating the heterogeneity between cell lines. The heat map also showed that markers were expressed to different degrees within each cell line, even isolating entire subpopulations. This was also demonstrated by another unsupervised algorithm, the FlowSOM analysis, which divides cells in clusters based on markers and allows to present expression intensities in all three cell lines simultaneously.

Next, we were interested in the effect of hypoxia on clonal heterogeneity, one of the most common and most influential environmental stress. Using a metal chelating agent, deferoxamine, we stabilized the HIF-1 complex, thereby inducing the production of hypoxia-sensitive proteins. To validate the existence of hypoxia imitating environment, the following HRE containing genes were tested by qPCR: VEGFA, PDGFB, SLC2A1, LDHA, PGK1, MMP2, CXCL12, CXCR4, PLAUR, CA9, PLAU. Since in some articles TMEM45A was associated with hypoxia induced chemoresistance, we also included this among the investigated proteins. However,

after DEF treatment, at protein level only CA9 increased significantly in the A549 cell line, and the CD326 expression both in H1975 and in H1650.

After the cell line experiments, we also had the opportunity to study human primary lung tumours. The freshly operated tumours and healthy lung tissue from the same patient were processed immediately in our laboratory and single-cell suspension was made by using liberase. To this measurements our carcinoma panel was expanded with HLA-ABC and CD45 antibody. The latter in order to exclude infiltrating immune cells and focus only on other cells. The population percentage in the tumour compared to healthy tissue increased the most in GLUT1 (53% vs. 4.8%), MCT4 (67.3% vs. 6.0%), CA9 (40.4% vs. 3.6%), TMEM45A (61.1% vs. 5.6%), CD66 (61.7% vs. 37.1%), CD274 (15.6% vs. 2.4%), CD24 (12.8% vs. 0.9%), CD326 (50.7 vs. 37.4%), pan-keratin (17.8% vs. 9.5%) markers. Although the Gal-1 and Gal-3 population percentage did not change, their intensity increased in the tumor tissue. The HLA-ABC plays an important role in the cytotoxic activity of the immune system to escape this, tumors often underrepresent HLA-ABC. Based on our CyTOF analysis, the median metal intensity of HLA-ABC of the healthy lung tissue compared to tumour decreased from 176 to 87, so this phenomenon was also well manifested here. The viSNE analysis clearly showed that the cells of the tumor tissues differently expressed these proteins compared to the healthy tissue. There was only a slight overlap between TT and HT cell types, but they are largely made up of different cells.

For the separation of subpopulations of tumour tissue by unsupervised FlowSOM algorithm, 10 metaclusters were defined and characterized. TMEM45A was highly expressed by a subpopulation, FSMC6. Furthermore, CD66, CD326, HLA-ABC and Gal-3 were also highly expressed in this cluster.

TMEM45A is a poorly characterized protein, and previous studies have mainly focused on transcriptomics. It is especially expressed in the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum, however, based on our previous results it can also appear on the cell surface. With CyTOF examining the A549 cell line, the protein was only present intracellularly (71.01%), but almost not expressed at all on the surface of cultured cell lines. Nevertheless, we also managed to detect it on the cell surface in human primary lung tumor sample, where the population percentage in the tumour was 61.1% compared to 5.6% in healthy tissue.

Since the access to native primary tumour is difficult, we examined further the formalin-fixed paraffin-embedded samples of 17 patients with adenocarcinoma by immunostaining. In addition, we looked at the lungs of 3 non-tumorous pneumothorax patients as a control. The sections showed sporadic staining of HIF-1 $\alpha$  (+), while TMEM45A was strongly (+++) expressed in the tissues of all 17 patients, but no perfect colocalization was found between the two proteins.

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

MTMT azonosító: 10071441

Kumulatív impakt faktor: 70,873

### 1. A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények

1. **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* 14 : 1 Paper: 144 , 22 p. (2022) **IF:5,2/Q1**
2. **Neuperger Patrícia**, Puskás László, Szebeni Gábor János. A humán H1975 tüdő- és MDA-MB-231 emlőadenokarcinóma-sejtes modellek egysejt-tömegcitometriás összehaonlító elemzése, *MAGYAR ONKOLÓGIA* 65 : 2 pp. 129-138. , 10 p. (2021) Q4
3. Balog, József Á ; Hackler, László ; Kovács, Anita K ; **Neuperger, Patrícia** ; Alföldi, Róbert ; Nagy, Lajos I ; Puskás, László G ; Szebeni, Gábor J Single Cell Mass Cytometry Revealed the Immunomodulatory Effect of Cisplatin Via Downregulation of Splenic CD44+, IL-17A+ MDSCs and Promotion of Circulating IFN- $\gamma$ + Myeloid Cells in the 4T1 Metastatic Breast Cancer Model. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES* 21 : 1 Paper: 170 (2020) **IF:5,924/Q1**

### 2. Egyéb közlemények listája

4. Nikolett Gémes, József Á. Balog, **Patrícia Neuperger**, Erzsébet Schlegl, Imre Barta, János Fillinger, Balázs Antus, Ágnes Zvara, Zoltán Hegedűs, Zsolt Czimmerer, Máté Manczinger, Gergő Mihály Balogh, József Tóvári, László G. Puskás, Gábor J. Szebeni 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* 14 Paper: 1297577 , 16 p. (2023) **IF:7,3/Q1**
5. **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* 14 Paper: 1243233 , 14 p. (2023) **IF:7,3/Q1**

6. 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) 11 : 7 p. 1254 (2023) **IF:7,8/Q1**
  
7. Szabó, Enikő ; Modok, Szabolcs; Rónaszéki, Benedek ; Faragó, Anna ; Gémes, Nikolett ; Nagy, Lajos I. ; Hackler, László ; Farkas, Katalin ; **Neuperger, Patrícia** ; Balog, József Á. et al. 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 10 Paper: 1176168 , 11 p. (2023) **IF:3,9/Q1**
  
8. Gémes, Nikolett ; Makra, Zsófia ; **Neuperger, Patrícia** ; Szabó, Enikő ; Balog, József Á ; Flink, Lili Borbála ; Kari, Beáta ; Hackler, László ; Puskás, László G ; Kanizsai, Iván et al. A cytotoxic survey on 2-amino-1H-imidazol based synthetic marine sponge alkaloid analogues. DRUG DEVELOPMENT RESEARCH 83 : 8 pp. 1906-1922. , 17 p. (2022) **IF:3,8/Q3**
  
9. 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 23 : 19 Paper: 11411 , 15 p. (2022) **IF:5,6/Q1**
  
10. Szebeni, G; Gemes, N ; Honfi, D ; Szabo, E ; **Neuperger, P** ; Balog, JA ; Nagy, LI ; Szekanecz, Z ; Puskas, LG ; Toldi, G. 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 13 Paper: 846248 , 11 p. (2022) **IF:7,3/Q1**
  
11. 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 10 : 13 Paper: 2889 , 20 p. (2021) **IF:4,964/Q1**
  
12. Ágnes E. Kulmány, Éva Frank, Dóra Kovács, Kerstin Kirisits, Róbert Alföldi, Georg Krupitza, **Patrícia Neuperger**, László G. Puskás, Gábor J. Szebeni and István Zupkó Antiproliferative and Antimetastatic Characterization of an Exo-heterocyclic Androstane Analog Against Human Breast Cancer Cell Lines BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY, 140 Paper: 111728 , 17 p. (2021) **IF:7,419/Q1**

13. Alföldi, R ; Balog, JÁ ; Faragó, N ; Halmai, M ; Kotogány, E ; **Neuperger, P** ; Nagy, LI ; Fehér, LZ ; Szebeni, GJ ; Puskás, LG Single Cell Mass Cytometry of Non-Small Cell Lung Cancer Cells Reveals Complexity of In vivo And Three-Dimensional Models over the Petri-dish, CELLS 8 : 9 Paper: 1093 , 19 p. (2019) **IF:4,366/Q1**

#### Konferencia előadások

1. **Neuperger P**, Balog JÁ, Furák J, Tizslavicz L, Szalontai K, Mán I, Kotogány E, Puskas, L ; Szebeni, GJ Intratumor heterogenitás vizsgálata egysejt tömeg citometriával, II. Áramlási Citometria Nap, Hematológia-Onkológia Napjainkban, Semmelweis Egyetem, ÁOK, I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet (2019)

#### Konferencia poszterek

1. **Neuperger Patrícia**, Szalontai Klára, Gémes Nikolett, Balog József Á., Tizslavicz László, Furák József, Lázár György, Puskás G. László, Szebeni Gábor J. NSCLC-s betegek perifériás immunitásának profilozása PD-1 gátló immunterápiában és platina alapú kemoterápiában, Membrán-Transzpont Konferencia. Sümeg (2024)
2. **Neuperger Patrícia**, Honfi Dániel, Gémes Nikolett, Szabó Enikő, Balog József Á., Nagy Lajos I., Toldi Gergely, Puskás László G., Balog Attila, Szebeni Gábor J.A SARS-CoV-2 ismétlődő oltások hatása reumás és mozgásszervi betegekre, Magyar Immunológiai Társaság 51. Vándorgyűlése (2022)
3. **Neuperger Patrícia**, Balog József Ágoston, Furák József, Tizslavicz László, Szalontai Klára, Mán Imola, Kotogány Edit, Puskás László és Szebeni Gábor János. Intratumor heterogenitás és a TMEM45A fehérje vizsgálata tüdő adenokarcinómában egysejt tömeg citometriával. Membrán-Transzpont Konferencia. Sümeg (2022)
4. **Neuperger Patrícia**, Balog József Ágoston, Furák József, Tizslavicz László, Szalontai Klára, Mán Imola, Kotogány Edit, Puskás László, Szebeni Gábor János. Intratumor heterogenitás vizsgálata egysejt tömeg citometriával azonosította a TMEM45A-t, mint tüdő adenokarcinómában kifejeződő fehérjét. The Hungarian Society of Oncologists XXXIV. Congress. Szeged. Magy Onkol 65:1–66 (2021)
5. **Neuperger, P** ; Balog, JA ; Furak, J ; Kotogany, E ; Szalontai, K ; Man, I ; Puskas, LG ; Szebeni, GJ Intrinsic heterogeneity of human non-small cell lung cancer cells under the hand-glass of single cell mass cytometry pp. 25-25. , 1 p. poster, 3rd German Mass Cytometry User Froum, Berlin (2020)
6. **Neuperger, P** ; Balog, JA ; Furak, J ; Kotogany, E ; Szalontai, K ; Man, I ; Puskas, LG ; Szebeni, GJ Intrinsic Heterogeneity of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells Under the Hand-Glass of Single Cell Mass Cytometry Magyar Immunológiai Társaság 48. Vándorgyűlése, Bükkfürdő 2019 október 16-18. IMMUNOLÓGIAI SZEMLE XI : 3 p. 34 (2019)

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm **Dr. Puskás Lászlónak**, hogy a Funkcionális Genomika csoportban dolgozhattam. Témavezetőmnek, **Dr. Szebeni Gábor Jánosnak** a bizalmat, hogy felvett, a szakmai irányítást és hogy a sok általa szerzett kollaboráción keresztül széleskörű betekintést nyerhettem többféle kutatási irányzatba.

Köszönöm **Dr. Tizlavicz Lászlónak** a metszeteket és a mikroszkópok használatát, **Dr. Furák Józsefnek** a sebészeti mintákat. **Dr. Szalontai Klárának** az immunterápiás mintákat és minden egyéb segítségét.

Köszönöm a csoportunk jelenlegi és korábbi tagjainak **Balog Józsefnek**, **Szabó Enikőnek**, **Gémes Nikolettnek**, hogy mindenben próbáltak segíteni, a közös ötleteléseket és a csoportos maratoni kísérleteket. **Kotogány Editnek** a FACS-os segítséget. Asszisztensünknek, **Szabó Cynthiának**, hogy a laborban minden rendelkezésünkre állt és lelkesen segített akármikor csak kellett. Az egész csoportnak a szakmai és emberi hozzáállását.

**Dr. Deák Ferencnek** a TMEM45A-val folytatott küzdelmünket és a molekuláris biológiai segítségét.

**Családomnak és barátaimnak**, hogy mindenben támogattak az évek során. Nélkülük nem jutottam volna el idáig.