

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

**Neuperger Patrícia**

Doktori értekezés tézisei

Témavezető: Dr. Szabó Gábor János

Tudományos főmunkatárs

HUN-REN, Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola



**HUN  
REN**



Szeged

2024

## **Bevezetés**

A tüdőrák az egyik leggyakrabban diagnosztizált ráktípus, azonban a diagnosztika és terápiás fejlődések ellenére továbbra is alacsony a túlélési rátája. A kezelést megnehezíti a tumorok heterogenitásának ténye, ugyanis egyes betegek daganata is különbözik egymástól, illetve egy tumoron belül is a különböző régiók más-más fenotípust mutatnak. A heterogenitást értelmezhetjük tumoron belül, sejtvonalak között és sejtvonalon belül is. Az intratumor heterogenitás 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, ami képes megváltoztatni a tumor metabolizmusát. Kutatásunkban az egyik legkorszerűbb egysejt szintű technológiát, egysejt-tömegcitometert (CyTOF) alkalmaztuk a humán tüdő adenokarcinóma intratumor heterogenitás, sejtvonalak közötti és sejtvonalon belüli heterogenitás egysejt szintű fenotipizálásához.

## **Célkitűzés**

**A,** Első célkitűzésünk a klonális heterogenitás normoxiás és hipoxiás körülmények közötti fenotipizálása nem-kissejtes tüdő (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 immunhisztokémiával validáltuk nagyobb elemszámon humán NSCLC adenokarcinómában. Célunk volt megvizsgálni, hogy a TMEM45A mutat-e kolokalizációt a HIF-1 $\alpha$  fehérjével.

## **Alkalmazott anyagok és módszerek**

- Kísérleteinkhez humán nem-kissejtes tüdőrák sejtvonalakat, az A549, H1975 és H1650 sejtvonalat használtuk, melyeken Microsynth sejt autentikációt végeztettünk.
- A sejteket deferoxaminnal kezeltük a hipoxiás környezet létrehozásához. A kezelés szubletális koncentrációját rezaurin reagenssel határoztuk meg.
- Kvantitatív valós idejű polimer láncreakcióval igazoltuk a hipoxiás környezet létrejöttét hipoxiafüggő géneken.
- Az SZTE SZÁOK Mellkassebészeti osztályról primer sebészeti humán tüdő adenokarcinómát és kontrollént az adott beteg egy egészséges tüdőszövetét kaptuk. Etikai engedély projektazonosító kód: 163/2018-SZTE.
- A sejtvonalakat és a humán szöveteket Helios egysejt-tömegcitométerrel mértük egy 14 markeres karcinóma pannellel. Az adatokat Cytobank szoftveren keresztül t-SNE, FlowSOM és t-SNE-CUDA algoritmussal elemeztük.
- Az SZTE SZÁOK Patológia Intézetből 17 humán tüdő adenokarcinóma és 3 emfizémás kontroll immunhisztokémiás metszeteket kaptunk TMEM45A és HIF-1 $\alpha$  immunfestéssel.

## **Eredmények**

- A CyTOF-os kísérletünk szemléletesen ábrázolta, hogy a humán tüdő adenokarcinóma sejtvonalak, az A549, H1975 és H1650 az általunk választott markereket - GLUT1, MCT4, CA9, TMEM45A, CD66, CD274, CD24, CD326, pan-keratin, TRA-1-60, Gal-3, Gal-1, és EGFR - különböző mértékben expresszálják. A 3 sejtvonal populáció százalékban elsősorban a CA9, CD274, CD24 és kisebb mértékben a Gal-3 fehérjékben különböznek. A CD326 a H1975-ben és H1650-ben sejtvonalon 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 heterogenitás vizualizálásához t-SNE algoritmust használtunk, ami 3 külön felhőként választja el a sejteket, ezzel is jelezve a sejtvonalak közötti heterogenitást. Egy sejtvonalon belül a markereket a sejtek egy populációja erősen, míg a másik részük akár egyáltalán expresszálja, tehát a sejtvonalon belüli heterogenitás is megnyilvánul. A deferoxamin kezelés hatására a 12 hipoxia indukált gén és a TMEM45A expressziója megnövekedett. A sejtvonalak klonális heterogenitása hipoxia alatt is megtartott.

- A sejtvonalas kísérletek után lehetőségünk volt humán sebészeti tüdőtumort és ugyanabból a betegből származó egészséges tüdőszövetet is vizsgálni. A tumorban az egészséges szövethez képest a legjobban a GLUT1, MCT4, CA9, TMEM45A fehérjék növekedtek. A HLA fontos szerepet játszik az immunrendszer citotoxikus aktivitásában, így ennek elkerülése érdekében a tumorok gyakran alulreprezentálják a HLA-t. Ezt a mérésünk is igazolta, ugyanis a HLA-ABC mediánja a felére csökkent. Egy klaszterező algoritmussal 10 metaklasztert határoztunk meg. Az algoritmus a TMEM45A-t erősen expresszáló sejteket egy külön metaklaszterként azonosította, ahol ezen fehérje mellett a CD66, CD326, HLA-ABC és Gal-3 mennyisége is magas volt.
- 17 adenokarcinóma és 3 nem tumoros emfizémás kontroll tüdő immunhisztokémiás metszetét vizsgálva 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. Treatment is challenging because the tumours differ from patient to patient, and also regions to regions within the same solid tumour. That so called tumour heterogeneity represents different phenotypes. Heterogeneity can be interpreted at different levels, e.g. within the tumour (intra tumor heterogeneity (ITH)), between cell lines or within a cell line. ITH can originate from genomic instability, epigenetic changes, functional or stochastic plasticity, and in addition the microenvironment also exerts a continuous selective pressure on it. The most common microenvironmental stresses is hypoxia, which alters the tumour metabolism. The central method of our experiments was single-cell mass cytometry, which is capable of multiplex phenotyping at single-cell level. Our first aim was to investigate the inter- and intra-cell line heterogeneity of 3 human lung adenocarcinoma cell lines. The 3 cell lines differed in population percentages mainly based on the differential expression of CA9, CD274, CD24 and to a lesser extent in the production of Gal-3. To visualise the inter- and intra-cell

line heterogeneity we used t-SNE algorithm which presents the 13 marker expression intensities simultaneously. The algorithm separated the cells into 3 clouds, thereby indicating the heterogeneity between cell lines. Next, we were interested in the effect of hypoxia on clonal heterogeneity, one of the most common and most influential environmental stress. After the cell line experiments, we also had the opportunity to study human primary lung tumours and healthy lung tissue from the same patient. The frequency of subpopulations 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%). 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. We also investigated 17 patients with adenocarcinoma and 3 non-tumorous pneumothorax patient as a control by immunostaining. 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 összehasonlító elemzése, *MAGYAR ONKOLOGIA* 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. ; Tizslavicz, 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. ; Tizslavicz, 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, JA ; Furak, J ; Tizslavicz, L ; Szalontai, K ; Man, I ; Kotogany, E; Puskas, L ; Szebeni, GJ Intratumor heterogenitás vizsgálata egysejt tömeg citometriával. oral presentation, 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, Tiszlavicz 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, Tiszlavicz 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. Magyar 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. (2020) poster, 3rd German Mass Cytometry User Froum, Berlin
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)

## **Témavezetői nyilatkozat**

Alulírott Dr. Szebeni Gábor János, a jelölt, Neuperger Patrícia témavezetőjeként kijelentem, hogy az „Inter- és intratumor heterogenitás egysejt szintű elemzése, valamint a TMEM45A fehérje vizsgálata humán nem-kissejtes tüdő adenokarcinómában” című disszertáció a jelölt saját munkája, amelyet a témavezetésem mellett önállóan készített el. Kijelentem, hogy a disszertáció megfelel az SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola formai és tartalmi követelményeinek

.....

Dr. Szebeni Gábor János

Szeged, 2024.06.12.

## Társszerzői lemondó Nyilatkozat

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

- **Neuperger, P.**; Balog, J.Á.; Tiszlavicz, L.; Furák J.; Gémes, N.; Kotogány, E.; Szalontai, K.; Puskás, L.G.; Szebeni, G.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, 22p. (2022)
- **Neuperger P.**, Puskás L., Szebeni G.J. A humán H1975 tüdő- és MDA-MB-231 emlőadenokarcinóma-sejtes modellek egysejt-tömegcitometriás összehasonlító elemzése, *Magyar Onkológia* 65:2 pp. 129-138., 10 p. (2021)
- Balog, J.Á. ; Hackler, L. ; Kovács, A. K.; **Neuperger, P.**; Alföldi, R.; Nagy, L.I.; Puskás, L.G.; Szebeni, G.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)

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

.....

Dr. Szebeni Gábor János

Szeged, 2024.06.12.