

A humán H1975 tüdő- és MDA-MB-231 emlőadenokarcinóma-sejtes modellek egysejt-tömegcitometriás összehasonlító elemzése

NEUPERGER PATRÍCIA^{1,2}, PUSKÁS LÁSZLÓ G.^{3,4}, SZEBENI GÁBOR JÁNOS^{1,5,6}

¹Eötvös Loránd Kutatási Hálózat, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Funkcionális Genomika Laboratórium, ²Szegedi Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola, ³AstridBio Kft., ⁴Avidin Kft., ⁵Szegedi Tudományegyetem, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék, ⁶CS-Smartlab Devices Kft., Szeged

Finanszírozás: 2019-1.1.1-PIACI-KFI-2019-00444, NKFIH (Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal)

Levelezési cím:

Dr. Szabeni Gábor J. ELKH BRC, 6726 Szeged, Temesvári krt.
62. Tel.: 0662-599-782, e-mail: szabeni.gabor@brc.hu

Közlésre érkezett:

2021. április 12.

Elfogadva:

2021. április 28.

A fejlett világ leggyakrabban előforduló ráktípusai a tüdőrák és a mellrák. Míg a mellrák túlélési rátája javuló tendenciát mutat, a tüdőrák az egyik legnagyobb mortalitási rátával rendelkezik. A tumorok kezelését nagyban megnehezíti a heterogenitás ténye, ezért egyre fontosabbá válnak a multiplex és heterogenitást is figyelembe vevő, egysejt-szintű vizsgálatok. Munkánk elsődleges célja két különböző szöveti eredetű, női adenokarcinómasejtes modellrendszer, a H1975 tüdő- és az MDA-MB-231 tripla-negatív emlőadenokarcinóma-sejtvonalak egysejt-alapú, tömegcitometriás markerprofilozása és a komplex adatok kiértékelésének a bemutatása volt. Kimutattuk 13 marker egysejt-szintű kifejeződésének a profilozásával, hogy 9 marker mutat szignifikáns eltérést a két adenokarcinóma-sejtvonal között az adott markerre pozitív populációk százalékában. Jelen munkánk rávilágít egyaránt a humán tüdő H1975 és humán tripla-negatív MDA-MB-231 adenokarcinóma-sejtvonalak közötti, és az egyes sejtvonalakon belüli heterogenitásra. *Magy Onkol* 65:129-138, 2021

Kulcsszavak: egysejt-analízis, adenokarcinóma, PD-L1, epidermális növekedési faktor receptor, epithelialis sejtheadhéziós molekula

The most frequent cancer types are lung and breast cancer in the Western world. However, the prognosis of breast cancer patients shows an improved tendency, while lung cancer types remained with high mortality. Intratumor heterogeneity (ITH) frequently leads to the failure of treatments, so there is an unmet need revealing ITH at single cell resolution. Our aim was to study female-derived human H1975 lung and MDA-MB-231 triple-negative breast cancer adenocarcinoma cell line models using single cell mass cytometry. Nine of thirteen carcinoma markers showed significant differences in the percentage of cells. Our current work shed light on the intra- and inter cell line heterogeneity still preserved in the studied, widely-used adenocarcinoma laboratory models.

*Neuperger P, Puskás LG, Szabeni GJ. Single cell mass cytometric comparison of human H1975 lung and MDA-MB-231 breast adenocarcinoma cellular models. *Magy Onkol* 65:129-138, 2021*

Keywords: single-cell analysis, adenocarcinoma, PD-L1, epidermal growth factor receptor, epithelial cell adhesion molecule

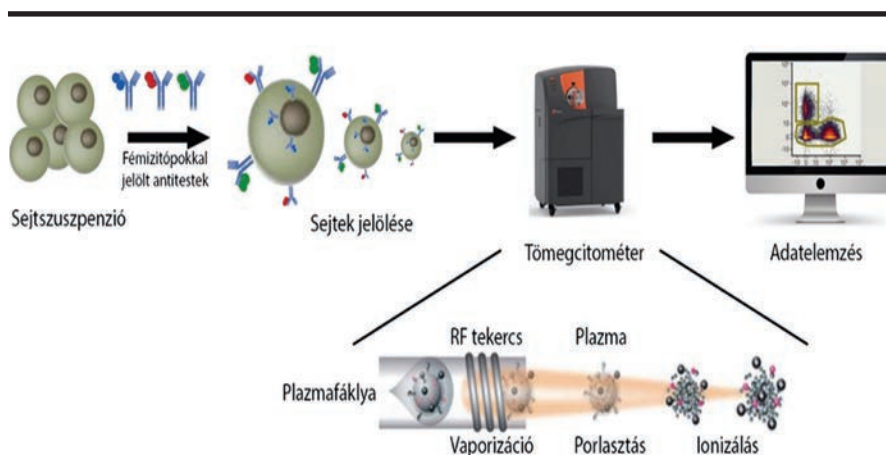
BEVEZETÉS

Európában 2018-ban 9,91 millió rákos megbetegedést regisztráltak, melyből 523 ezer volt az emlőrákok és 470 ezer a tüdőrákok gyakorisága (1). A modern terápiás lehetőségek ellenére 2018-ban Európában a tüdőrákok 388 ezer, míg az emlőrákok 138 ezer áldozatot követeltek (1). Magyarországon 2016-ban a tüdőrákok gyakorisága 100 ezer lakosra vetítve 72,6 volt a férfiakra, és 38 a nőkre nézve (2). Az emlőrákot tekintve hazánkban 8215 esetet regisztráltak és 2212 halálozás történt 2018-ban (3). A kemoterápiás szerek, specifikus gátló molekulák, terápiás monoklonális ellenanyagok eszköztárának a bővülése mellett további kutatások szükségesek, hogy újabb terápiás célpontokat tárjunk fel a tüdő- és emlőrák kezelésének javítása érdekében. A modern vizsgálati módszerek, az ún. „multi-omics” technológiák (transzkriptomika, metabolomika, proteomika, epigenomika stb.) fejlődése elősegíti, hogy a sejtek működésének, szabályozásának különböző szintjeit, azok összefonódó hálózatát jobban megértsük. Az egysejt-alapú technológiák lehetőséget nyújtanak arra, hogy a sejtek sokaságában feltárjuk a fenotipikusan, sejtfelszíni markereikben különböző altípusokat (4, 5). A sejtvonalmodellekre jellemző, hogy (i) viszonylag gyorsan és költséghatékonyan tenyészthetők, (ii) az *in silico* platformokkal szemben biológiai válaszfunkcióra képes élő rendszerek és (iii) ha nem is teljes mértékben, csak részlegesen, de reprezentálják az eredeti betegségre jellemző tulajdonságokat: jelátviteli folyamatok, genetikai/epigenetikai elváltozások, korlátlan osztódás, megfelelő állatmodellben tumorképzés. Az egysejt-tömegcitometria segítségével korábban kimutattuk, hogy a humán 3 dimenziós A549 nem kissejtes adenokarcinóma tüdőrák-sejtkultúrák karcinómamarker-mintázata közelebb áll az *in vivo* körülményhez, így gyógyszerfejlesztésben hatékonyabb rendszer, mint

a hagyományos Petri-csésze alapú sejtenyésztés (6). Szintén az egysejt-tömegcitometria segítségével meghatároztuk humán akut mieloid leukémia alpopulációk egy gyógyszerjelölt molekulára szenzitív alpopulációit (7), vagy kimutattuk az alacsony dózisu ciszplatin immunmoduláns hatását egér 4T1 tripla-negatív emlőkarcinómában (8). A tömegcitometria segítségével feltártuk rákban a JAK konstitutív aktiválódásával vagy egy tumorsuppresszor gén vesztésével járó változásokat a veleszületett immunitásban (9). Jelen munkánkban a H1975, egy nem dohányzó nőbetegből származó tüdő-adenokarcinóma és egy szintén női tripla-negatív emlő-adenokarcinóma, az MDA-MB-231 laboratóriumi sejtes modelljeit vizsgáltuk egysejt-tömegcitometriával. Elsődleges célunk a tömegcitometriában rejlő potenciál, a multiplex karcinómamarkerek egysejt-alapú vizsgálatának egyszerű modellben történő bemutatása volt.

Az egysejt-tömegcitometria bemutatása

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 sejtkultúrából származó sejteket. A fémjelölt antitestek specifikusan kötnek az adott proteinekhez, és a tömegcitométer ezeknek a markereknek az expresszióját méri minden egyes különálló sejten a detektált fém atomi tömegének megfelelő csatornában. A jelenlegi harmadik generációs Helios tömegcitométer (Fluidigm, USA) 135 detekciós csatornát kínál, akár több mint 1000 sejt/perc mérési sebességgel. A fluoreszcens



1. ÁBRA. Az egysejt-tömegcitometria egyszerűsített folyamatábrája. A sejtszuspenzió nehézfémizotópokkal jelölt antitestekkel való inkubálását követően a Helios műszerbe porlasztódik egy sejt/csepp alapon. A sejtek ionizálódnak és az ionfelhőkből a nehézatomból repülési ideje alapján kirajzolódik sejtenként egy tömegcitometriás profil, ahol az egyes nehézfémizotópok detektált mennyisége korrelál annak a fehérjének a szintjével, amit az adott fémizotóppal jelölt antitest ismer fel (eredeti kép: Copyright Fluidigm Corp.)

áramlási citométernél előnyösebb a stabil fémmizotópok atomi tömegének a detektálása, ugyanis a fluorokrómok spektrális átfedéséhez képest a tömegcitometriában nincs átfedés és nem szükséges kompenzálni. A jelölő izotópoknak alacsony a természetes abundanciája biológiai rendszerekben, emiatt nem fognak interferálni az egysejt-analízissel. A riporter fémjelek az antitestekhez fémkelátoló polimerrel kapcsolódnak. A tömegcitométernak 5 fő komponense van, a mintabeviteli egység, az induktívan kapcsolt plazma (ICP), az ionoptika, ami a könnyű atomok kiszűrésére alkalmas kvadropól, végül a 'time of flight' (TOF) elvű tömegspektrométer és detektora (1. ábra). A vizsgálni kívánt sejtfelszíni és/vagy intracelluláris fehérjékre specifikus antitestkötéssel történő jelölés után a sejtszuspenzió bekerül a porlasztóba, amelyben argongáz áramlik. A sejtek áthaladnak a porlasztón, majd átmennek a spray-csatornán, ahol egysejtes cseppekké aeroszolizálódnak. A spray-kamrát a sejtek individuális sejt-ként hagyják el. Az ICP-be injektálódnak, vaporizálódnak, atomizálódnak és ionizálódnak. A létrejött ionfelhőből mért stabil fémmizotópok atomi tömege, ezeknek a jeleknek az intenzitása jelölt antitestként arányos az individuális sejtek adott antitestre specifikus proteintartalmával. A tömegcitometriás mérés során FCS kiterjesztésű fájlok keletkeznek, amit különböző, hagyományos (Kaluza) vagy tömegcitometriára kifejlesztett platformokon értékelhetünk ki (Cytobank, Astrolabe, Maxpar Pathsetter) (10).

Az általunk kiválasztott, karcinóma vizsgálati markerek bemutatása

CD326

Az epiteliális sejtadhéziós molekula (EpCAM, CD326) egy transzmembrán glikoprotein, amely epitélspecifikus intercelluláris sejtadhéziót közvetít, a legtöbb adenokarcinómában erősen expresszálódik. A legfrissebb adatok azt sugallják, hogy az EpCAM szintén részt vesz a sejtek jelátvitelében, migrációjában, proliferációjában és differenciálódásában. Diagnosztikai és prognosztikai szerepén túl az EpCAM széles expressziója, valamint a tumorigenezisben és az áttétekben való nyilvánvaló részvétele rámutat arra, hogy az immunterápiás stratégiák célpontja lehet (11).

EGFR

Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR, ErbB-1, HER1) egy transzmembrán glikoprotein, amely a proteinkináz szupercsalád tagja és a sejtnövekedés és a differenciálódás szabályozásában játszik szerepet. A ligandumkötés indukálja a receptor dimerizációját és a tirozin-autofoszforilációt, iniciálva a MAPK, Akt és JNK szignáltranszdukciós utakat a DNS-szintézis és a sejtproliferáció felé. Az EGFR túltermelődik vagy konstitutívan aktív különböző humán hámeredetű daganatokban (12).

CD274

A CD274 a programozott sejthalál ligandum 1 fehérje (PD-L1), amelyet hematopoetikus, például regulátor T- és B-sejtek és különféle tumorsejtek expresszálnak. I. típusú transzmembrán

rán fehérje, amely immunglobulin V- és C-szerű doménnel rendelkezik, de szekretálódhat is. A ligandum receptorával (PD-1) való kölcsönhatása gátolja a T-sejt-aktivációt és gyuladós citokinek termelését, valamint a citotoxikus T-sejtek inaktivációja révén a tumor-mikrokörnyezetben biztosítja a tumorsejtek túlélését (13).

Galektin-1

A galektin-1 (GAL-1) lektin sokrétű biológiai funkcióját meghatározza a szabályozott szöveti és időbeli expressziója. Termelődése a legtöbb rákos szövetben kimutatható. A tumor-, ill. tumorsztróma-eredetű GAL-1 hozzájárul a ráksejtek védettségéhez a tumorspecifikus immunválasszal szemben azáltal, hogy a tumorszövetbe vándorló T-sejtek apoptózisát okozza, mely folyamatnak a részletes molekuláris mechanizmusát csoportunkban tártuk fel (14). Az immunszuppresszió mellett vaszkularizációs, továbbá a sejtadhéziós funkciója révén a ráksejtek metasztatikus folyamataiban is részt vesz (15).

Galektin-3

A galektin-3 (GAL-3, Mac-2), egy 30 kDa-os béta-galaktozid-kötő protein. A galektin-3 tumorsejtekben, makrofágokban, aktivált T-sejtekben, oszteoklasztokban, hámsejtekben és fibroblasztokban expresszálódik. Számos sejt típusban hozzájárul a sejtek növekedéséhez és szaporodásához. A tumor-mikrokörnyezetben csendesíti az immunválaszt, fokozza a tumorsejtek osztódását, gátolja az apoptózist, elősegíti a sejtadhéziós, metasztatikus folyamatokat (16).

CD24

A CD24, hőstabil antigén (HSA, BA-1, Ly-52) egy glikozil-foszfátidil-inozitol (GPI) kapcsolt protein. B-sejtek, granulociták, follikuláris dendritikus sejtek és epiteliális sejtek felszínén expresszálódik, és szerepet játszhat a B-sejtek proliferációjának és érésének szabályozásában. A CD24 elfogadott rákossejtmarker, továbbá gátolja a tripla-negatív emlőráksejtek makrofágok általi fagocitózisát (17).

CD66a/c/e

A CD66 antigének a karcinoembrionális antigén (CEA, CD66) molekulák családjába tartoznak, amelyek szorosan összefüggő genek a glikoproteinek immunglobulin szupercsaládjával és számos karcinómában ektopikus expressziót mutatnak. A CEA család tagjai részt vesznek a transzmembrán jelátvitelben és a neutrofilek aktiválásában. A CD66a (CEACAM1) elsősorban granulocitákon, a CD66c (CEACAM6, NCA) mind a granulocitákon, mind az epiteliális sejteken, a CD66e (CEACAM5) pedig epiteliális sejteken expresszálódik (18).

TMEM45A

A transzmembrán fehérjéket kódoló TMEM családba tartozó TMEM45A nagymértékben expresszálódik epidermális keratinocitákon. Emlőrákban kimutatták a hipoxia indukálta kemorezisztenciában betöltött szerepét (19).

GLUT1

A glükóztranszporter 1 (GLUT1, SLC2A1) a sejtek fő energiaforrása, a glükóz leggyakoribb transzportere. A GLUT1 transzporter eltérően expresszálódik több tumortípusban. A vizsgálatok arra utaltak, hogy a GLUT1 expressziója prognosztikai és diagnosztikai markerként jelenik meg a daganatokban [20].

MCT4

A monokarboxilát transzporter 4 (MCT4, SLC16A3) széles körben expresszálódik, különösen a glikolitikus szövetekben, például a fehér vázizomrostokban, az asztrocitákban, a fehérvérsejtekben, a kondrocitákban és néhány emlőssejtvonalban. Az MCT4 a glikolízisből származó tejsav transzportere az extracelluláris térbe, ezzel hozzájárul a tumor-mikrokörnyezet acidózisához és a rákbetegek rossz prognózisához [21].

Pan-keratin

A keratinok (citokeratinok) közbenső filamentumos fehérjék egy csoportja, amelyeket főként epiteliális sejtek expresszálnak. A keratin-heterodimerek savas keratinból (vagy I. típusú keratin, 9–23. keratin) és egy bázikus keratinból (vagy II. típusú keratin, 1–8. keratin) állnak össze és alakítanak ki szálakat. A párok összetétele az epiteliális sejt típusától, a differenciálódás stádiumától, a sejtek növekedési környezetétől és a betegség állapotától függően változik. Ez a szövet- és differenciálódásspecifikus profil teszi őket hasznosíthatóvá kutatási biomarkerekként. A legtöbb karcinóma emelkedett pan-keratin-pozitivitást mutat [22].

TRA-1-60

A TRA-1-60 differenciálatlan emberi embrionális őssejteken, indukált pluripotens őssejteken, embrionális karcinómasejteken és embrionális csírasejteken expresszálódik. A TRA-1-60 a sejtek differenciálódásakor elvész, egy neuraminidázrezisztens glikozilált fehérje, a podokalixinen található az epitóp, amely a CD34-hez kapcsolódó szialomucinek családjának tagja. A podokalixin egy transzmembrán keratin-szulfatált glikoprotein, a glikokalix része, amely számos rák, köztük mellrák növekedésében és agresszivitásában is szerepet játszik [23].

CA9

A szénsav-anhidráz 9 (CA9), amely egy cinktartalmú metalloprotein, hatékonyan katalizálja a szén-dioxid reverzibilis hidratációját. Pericelluláris bikarbonát-ionokat hoz létre, ami az intracelluláris térbe való transzport után neutralizálja az alacsony pH-t. A CA9 magas expressziója általában korrelál a rossz prognózissal és a betegségmentes intervallum csökkenésével, ezért a rossz prognózis előrejelzőjének tekinthető [24].

ANYAGOK ÉS MÓDSZER**Sejtek**

Kísérleteinket két humán sejtvonalon végeztük, a H1975 tüdő-adenokarcinómán és az MDA-MB-231 tripla-negatív emlőkarcinómán, amelyek az ATCC (USA) sejtbankból

származnak. Mindkét sejtvonal letapadó, amelyeket henteente háromszor passzáltunk és exponenciális növekedési szakaszban tartottunk. A H1975-öt DMEM-ben (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 10% FCS-ben, az MDA-MB-231-et RPMI 1640 médiumban (Roswell Park Memorial Institute médium), 10% FCS-ben tenyésztettük (Thermo Fisher Scientific, USA) 10 mm-es Petri-csészében (Corning, USA). A sejteket 5% CO₂-tartalmú 37 °C-os inkubátorban növesztettük (Sanyo, Japán).

Egysejt-tömegcitometria

Az egysejt-tömegcitometriát az alábbiak szerint végeztük (6). Röviden, a sejteket akkutázal felemésztettük (Corning, USA), a tenyésztőcsészéket PBS-sel (phosphate-buffered saline) mostuk. Mivel a felülúszóban is voltak sejtek, azt is összegyűjtöttük és 350 g-n 5 percig centrifugáltuk a felémésztett sejtekkel együtt. A sejteket 1 ml Maxpar sejtfestő pufferrel (Maxpar Cell Stainig Buffer, MCSB, Fluidigm) átmostuk és centrifugáltuk 350 g-n 5 percig. A felülúszó eltávolítása után a sejteket 5 µM ¹⁹⁵Pt ciszplatinnal (Fluidigm, USA) inkubáltuk jégen 3 percig 300 µl MCSB-ben, majd 1200 µl MCSB-vel mostuk, centrifugáltuk 350 g-n 5 percig. A sejtpelletet 50 µl MCSB-ben szuszpendáltuk, majd 50 µl antitestmixet adtunk hozzá az 1. táblázatban szereplő antitestekből. Az antitesteket a Maxpar X8 Multimetal fémjelölő kit leírása szerint konjugáltuk. (A kereskedelmi antitesteket és az anti-galektin-1-et 5 µg/ml-ben, a többi konjugátumot 10 µg/ml koncentrációval használtuk.) 45 perc szobahőmérsékletű inkubáció után a mintákat két-

1. TÁBLÁZAT. A felhasznált antitestek listája az antitestforrás (gyártó), célfehérje és a konjugált fém feltüntetésével

Katalógus-szám	Gyártó/forgalmazó	Fehérje	Fémjel
3141006B	Fluidigm	CD326 (EpCam)	141_Pr
3148012B	Fluidigm	TRA-1-60	148_Nd
3149018B	Fluidigm	CD66a,c,e	149_Sm
3156026B	Fluidigm	CD274 (PD-L1)	156_Gd-et
3162027A	Fluidigm	pan-keratin	162_Dy
3166007B	Fluidigm	CD24	166_Er
3170009B	Fluidigm	EGFR	170_Er
3153026B	Fluidigm	GAL-3	153_Eu
MAB2188-100	R&D Systems	CA9	158_Gd
MAB1418	R&D Systems	GLUT1	154_Sm
sc-376140	Santa Cruz Biotech.	MCT4	171_Yb
orb357227	Biorbyt	TMEM45A	169_TM
2C1/6	Monostori Éva labor	GAL-1	175_Lu

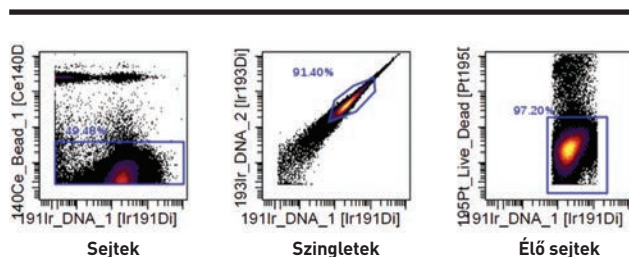
szer átmostuk 1 ml MCSB-vel, centrifugáltuk 350 g-n 5 percig. A sejteket 125 nM $^{190/193}$ irídium DNS-interkalátorral Maxpar Fix and Perm (Fluidigm) oldatban éjszakára 4 °C-on inkubáltuk 350 µl-ben. Másnap a sejteket kétszer mostuk és centrifugáltuk 800 g-n 5 percig, először 1 ml, majd 500 µl MCSB-vel. A sejt számnak megfelelően CAS-t (Cell Acquisition Solution, Fluidigm) adtunk a sejtekhez 10% EQ Calibration Bead-del (Fluidigm). A sejteket 30 µm-es steril filteren (Celltrics, Partec) szűrtük és lemértük a Helios 3. generációs tömegcitométeren (Fluidigm). Az adatok kiértékelését Cytobankban (Beckman Coulter, USA) végeztük el.

Statisztika

A vizsgálatokat külön-külön három biológiai párhuzamos mintán végeztük el a H1975 és MDA-MB-231 sejteken. A minták közötti statisztikai összehasonlítást párosával végeztük kétszélű, kétmintás, egyenlő varianciájú Student-féle t-teszt formájában Microsoft 365 Excel programban. A szignifikanciaszintet a következő módon határoztuk meg: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Az oszlopdigramokat GraphPad Prism szoftverrel készítettük el, az aritmetikai átlagok és a standard szórás feltüntetésével.

EREDMÉNYEK

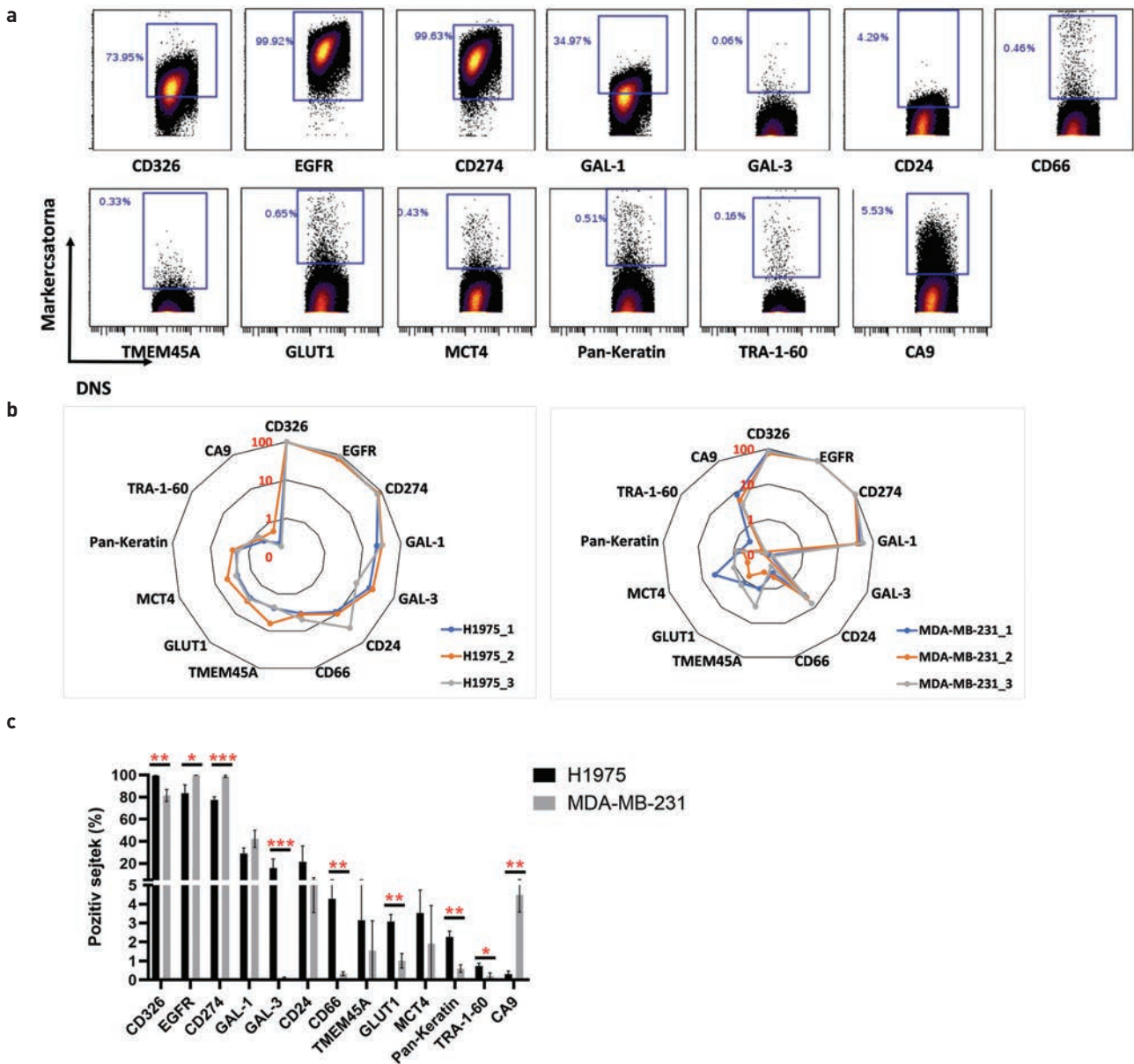
A sejtek azonosítására 191 Ir (irídium) interkaláló reagenst használunk, amely képes interkalálódni a DNS-be, ezzel megkülönböztetve a sejteket a kalibrációs gyöngyöktől (140 Ce+, cézium) és a gyöngy-sejt aggregátumoktól (140 Ce+/ 191 Ir+) (2. ábra). A továbbiakban az összetapadt sej-



2. **ÁBRA.** Az egysejt-tömegcitometriában az élő szingletek kapuzása. Manuális kapuzással a kalibrációs gyöngyöket (DNS-mentes) és a sejt-gyöngy aggregátumokat (140 Ce és DNS kettős pozitív) kizárjuk. Csak a 191 Ir DNS-marker-pozitív eseményeket, a sejteket vizsgáljuk tovább. Kettős DNS-festés (193 Ir/ 191 Ir) alapján kizárjuk a sejt-törmelékét és a sejt-aggregátumokat, meghatározzuk a szingleteket. A halott sejtek aspecifikus antitestkötődésének kiküszöbölésére ciszplatin (195 Pt) segítségével elválasztjuk az élő és a sérült sejtmembránnal rendelkező sejteket

teket és a sejt-törmelékét zárjuk ki, két különböző izotópos irídiummal (191 Ir/ 193 Ir) jelölt DNS-interkalátor segítségével megkaphatjuk az individuális sejteket, a szingleteket. Mivel a halott sejtek az antitestek aspecifikus kötődését

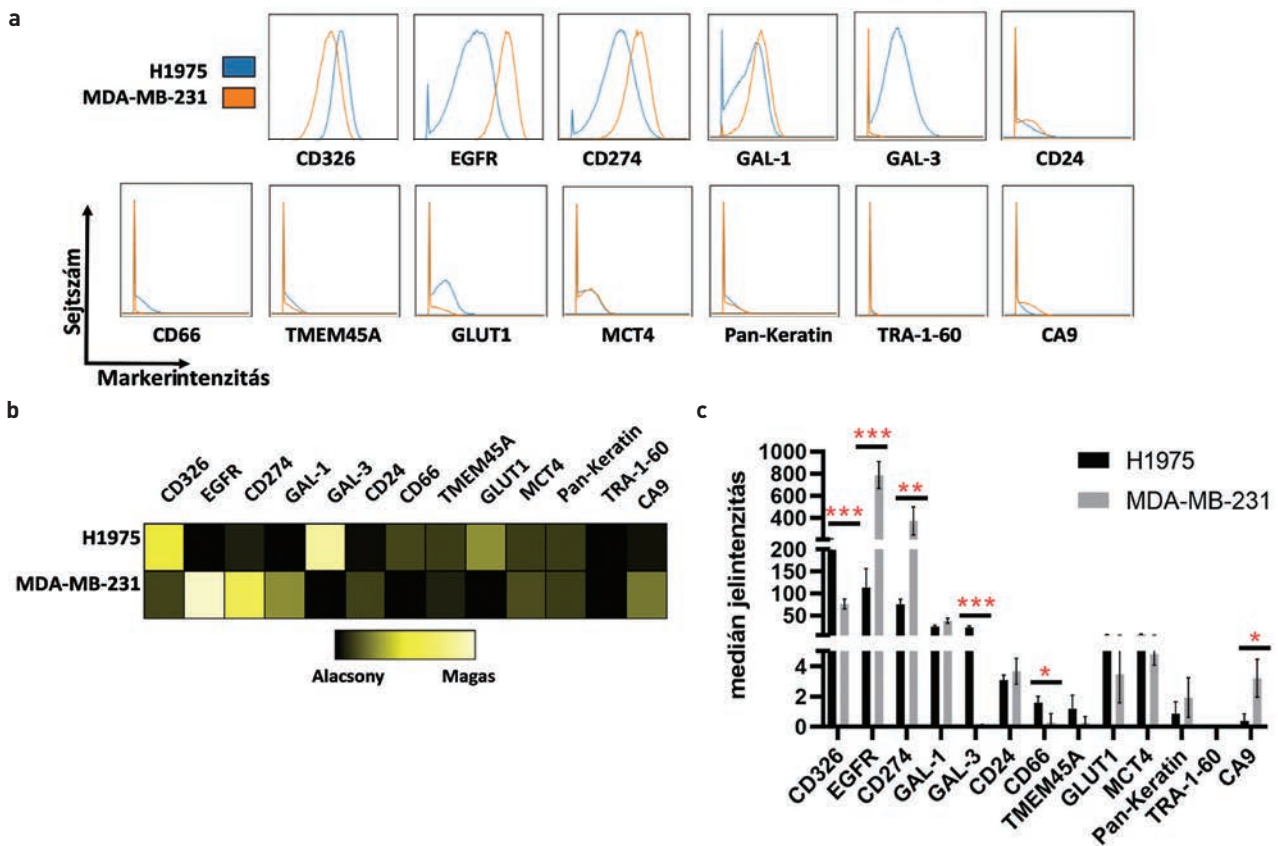
mutathatják, a permeábilisabb plazmamembránon a halódó sejtekbe bejutó ciszplatin (195 Pt) segítségével ezeket kizárjuk a következő analízisekből (2. ábra). Az élő szingleteken határozzuk meg az egyes markerekre pozitív sejtek százalékát. Mivel a fémszótópok különböző intenzitásúak, az egyes markerek pozitív kapuja külön beállítást igényel (3.a ábra). Annak érdekében, hogy bemutassuk a tömegcitometria reprodukálhatóságát, az adott markerekre pozitív sejtek százalékos eloszlását radarplot ábrán mutatjuk be, 3-3 biológiai párhuzamossal végzett mérésből (3.b ábra). A manuális kapuzásból származó adatok alapján készült radarplotokon egyértelműen kirajzolódik a kétféle szöveti eredetű sejt humán adenokarcinómamodellek eltérő profilja. Az abundáns markerek között vannak statisztikailag szignifikáns különbségek, melyek rendre a H1975 és MDA-MB-231 adenokarcinóma-sejtek között a CD326: 99,45 vs. 81,29% ($p=0,0088$); EGFR: 83,48 vs. 99,84% ($p=0,014$); CD274: 77,46 vs. 99,35% ($p=0,0003$) (3.c ábra). A markánsabb különbség a H1975 és MDA-MB-231 adenokarcinóma-sejtek között a galektin-3- (GAL-3) és a CD66-pozitív sejtek hiánya az MDA-MB-231 sejtekben és a CA9+ sejtek hiánya a H1975 sejtekben, GAL-3: 22,81 vs. 0,10% ($p=0,0011$); CD66: 4,28 vs. 0,34% ($p=0,0016$); CA9: 0,31 vs. 4,69% ($p=0,0015$) (3.c ábra). Mérsékelt szignifikáns különbséget mutatott a GLUT-1+, pan-keratin+ és TRA-1-60+ sejtek csökkent százaléka a H1975 sejtekben, GLUT1: 3,08 vs. 1,11% ($p=0,0042$), pan-keratin: 2,27 vs. 0,67% ($p=0,0024$), TRA-1-60: 0,73 vs. 0,24% ($p=0,03$) (3.c ábra). A vizsgált karcinómamarkerek denzitását a sejtek felszínén, az expressziós intenzitás és ehhez tartozó sejtszám ábrázolásával, a klasszikus hisztogramok mutatják (4.a ábra). A fehérjeexpressziós adatok egyszerűsített formában történő átláthatóságát hőtérképezéssel segíthetjük (4.b ábra). A H1975 és az MDA-MB-231 medián marker-jelintenzitása az abundáns értékek esetében is mutatott szignifikáns eltérést, rendre a H1975 és az MDA-MB-231 összehasonlításában CD326: 198,99 vs. 76,38 ($p=2,8E-06$); EGFR: 113,47 vs. 787,69 ($p=4,6E-05$), CD274: 76,02 vs. 371,07 ($p=0,003$). Összhangban a sejtek százalékos pozitívításával, az anti-galektin-3 és anti-CD66 nem adott jelet az MDA-MB-231 sejteken, GAL-3: 23,59 vs. 0,05 ($p=3,8E-05$), CD66: 1,58 vs. 0,29 ($p=0,01$), továbbá az anti-CA9 nem adott jelet a H1975 sejteken: 0,39 vs. 3,21 ($p=0,012$) (4.c ábra). A több fehérjemarker egysejt-szintű összehasonlítására vezették be a viSNE (visualisation of t-distributed Stochastic Neighbor Embedding) ábrázolást, egy olyan bioinformatikai technológiát, amely a sokdimenziós egysejtes adatok vizualizációját szolgálja (5. ábra). A viSNE elemzés alapját a t-SNE (t-distributed SNE) algoritmus adja (25). A viSNE az egyedi sejtek sokmarkeres analízisét hivatott megjeleníteni. Adott, n számú antitest esetén n dimenziós térbe helyezi a sejteket és az egyes sejtek közös markerexpressziója alapján szigeteket hoz létre. Az egyes sejtpopulációk szigetekként rajzolódnak ki,



3. ÁBRA. A vizsgált 13 markerre pozitív adenokarcinóma-sejtek meghatározása manuális kapuzással. Reprezentatív dot plotok az MDA-MB-231 tripla-negatív emlő-adenokarcinóma sejtek adott markerekre pozitív populációinak a manuális kapuzásáról (a). A radarplotokon a három biológiai párhuzamos (H1975 vagy MDA-MB-231) egysejt-tömegcitológiai profilját látjuk az adott markerre pozitív sejtek százalékában (0–100%) (b). A H1975 tüdő- és MDA-MB-231 emlőadenokarcinóma-sejtes modellek egysejt-alapú eltérése karcinómamarker-pozitivitásban (c). Az egyes markerekre pozitív sejtek aritmetikai átlaga és a standard hiba látható az oszlopdiaagramon. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

így a viSNE-profil megmutatja egy minta heterogenitását egysejt-szinten, jelen esetben a H1975 és MDA-MB-231 sejtes adenokarcinóma-modellrendszerek viSNE-profilja kirajzolja az adott sejtvonalra jellemző alpopulációkat (5. ábra). Az egyes markerek expressziós intenzitása színekódolással van bemutatva, a piros a legmagasabb és a kék a legalacsonyabb fehérjeexpresszióval korrelál. Az

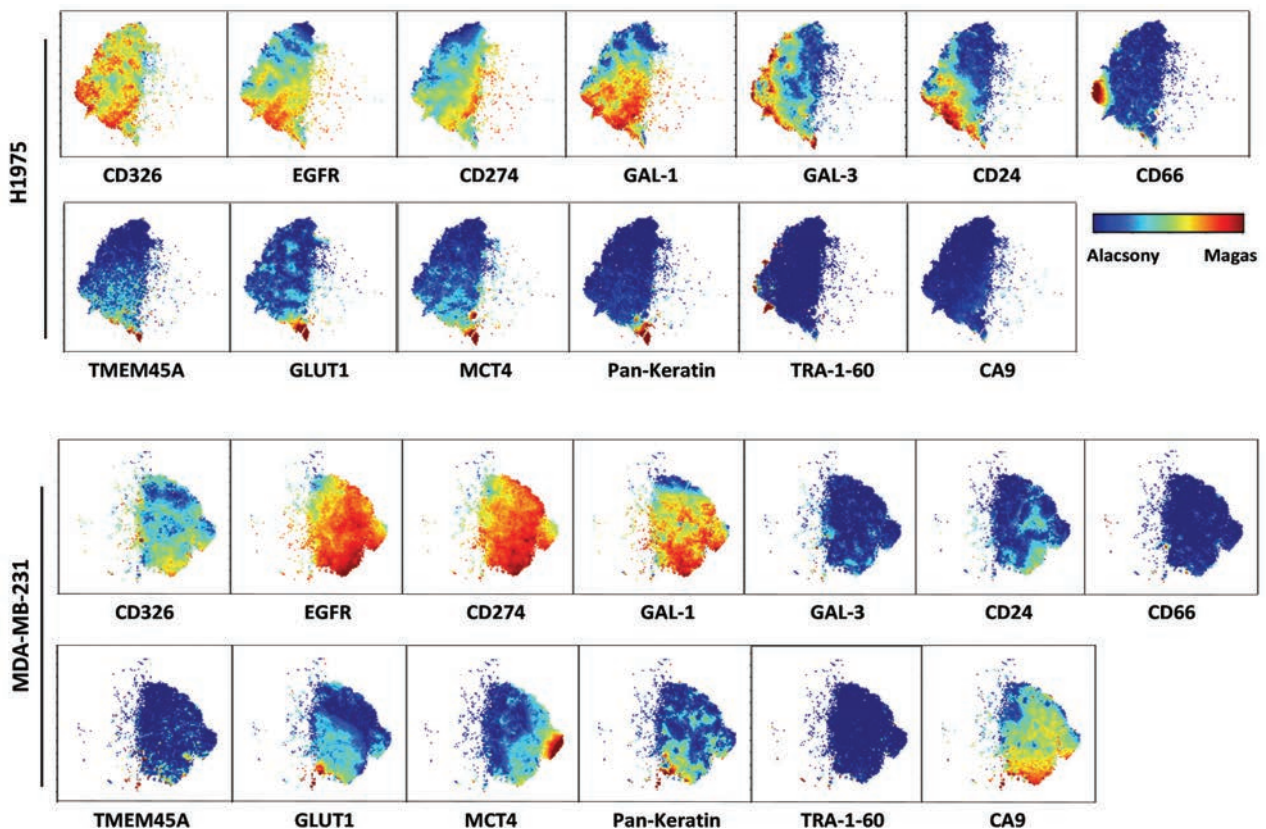
algoritmusnak több előnye is van. Szenzitív a kisebb alpopulációkra, ami lehetővé teszi, hogy kisebb sejtszámok mellett ezeket külön értékeljük. Figyelembe veszi az egyedi sejtek közös markerexpresszióját, így a fehérjeexpressziós mintázatot tekintve hasonló sejtek is egymáshoz rendelhetők. Továbbá minden sejt egy pontként jelenik meg, amely láthatóvá teszi a populáció sokféleségét, és ez adja



4. ÁBRA. A H1975 tüdő- és az MDA-MB-231 emlőadenokarcinóma-sejteken a vizsgált 13 karcinómamarker expressziós intenzitása elkülöníti a két sejtes adenokarcinómamodellt. A vizsgált 13 marker expressziós intenzitása reprezentatív hisztogramokon (a) H1975 (kék) és MDA-MB-231 sejtek esetében (narancs) vagy hő térképen (b). A H1975 tüdő- és MDA-MB-231 emlőadenokarcinóma-modellek egyesjt-alapú eltérése karcinómamarker-expressziós intenzitásában (c). Az egyes markerek medán jelintenzitásának aritmetikai átlaga és a standard hiba látható az oszlopdiaagramon. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

a részletes felbontást is. A kiértékelő szoftver a kapott eredményeket sokdimenziós, esetünkben 13 dimenziós térben helyezi el, minden markert figyelembe véve. A közös markerek alapján szigeteket különít el, ami alpopulációkat jelöl. A H1975 humán tüdő-adenokarcinóma esetében az abundáns markerek részleges koexpressziót mutatnak, melyek a CD326, EGFR, CD274, GAL-1, GAL-3 és CD24 (5. ábra). A H1975 sejteknél a TMEM45-, GLUT1-, MCT4- és pan-keratin-pozitív alpopulációk átfednek, koexpressziót mutatnak. Ezekről jól elkülönül az a néhány sejt, ami magasan CD66-pozitív. Az MDA-MB-231 humán tripla-negatív emlő-adenokarcinóma sejtek esetében a sejtek különbözőségét demonstráló módon eltérő szigetek rajzolódnak ki. Az MDA-MB-231-ben megfigyelhető az alacsonyabb CD326- és a magasabb EGFR-, CD274-expresszió. A vizsgált két adenokarcinóma-modellben a galektin-1 esetében nincs termelődésbeli különbség. Az MDA-MB-231-nél a TMEM45A-, GLUT1-, MCT4- és pan-keratin-pozitív sejtek alacsonyabb mértékben vannak jelen és nem mutatnak koexp-

ressziót. Az MDA-MB-231 sejtekben, szemben a H1975 adenokarcinóma-sejtekkel, kifejeződik a CA9 (5. ábra). Egy másik, szintén algoritmusvezérelt („unsupervised”) bioinformatikai elemzést is elvégeztünk, mely a FlowSOM (6. ábra). A FlowSOM egy olyan új, áramlási és tömegcitológiás analízishez alkalmazható vizualizációs technika, melynek alapja a „Self-Organizing Map” algoritmus (26). A FlowSOM képes az adatokat automatikusan klaszterezni, az n vizsgált marker adatait 2 dimenzióra redukálni és markerenként több minta, jelen esetben sejtvonal átfogó ábrázolását is lehetővé teszi. A mintában lévő sejtípusoknál nagyobb klaszterszámot megadva, információt nyújt az alpopulációkról is. Első lépésként az FCS fájlból egy mátrixot képez, melyben minden egyes sejthez soronként hozzárendeli a mért markerértékeket. A mátrixból egy csomópontokból álló rácshálót alkot, melyben minden csomópont egy multidimenziós pontot reprezentál. Az egyes csomópontokat kördiagramként ábrázolja, amely a markerek átlagáról ad információt. Majd ebből egy tér-



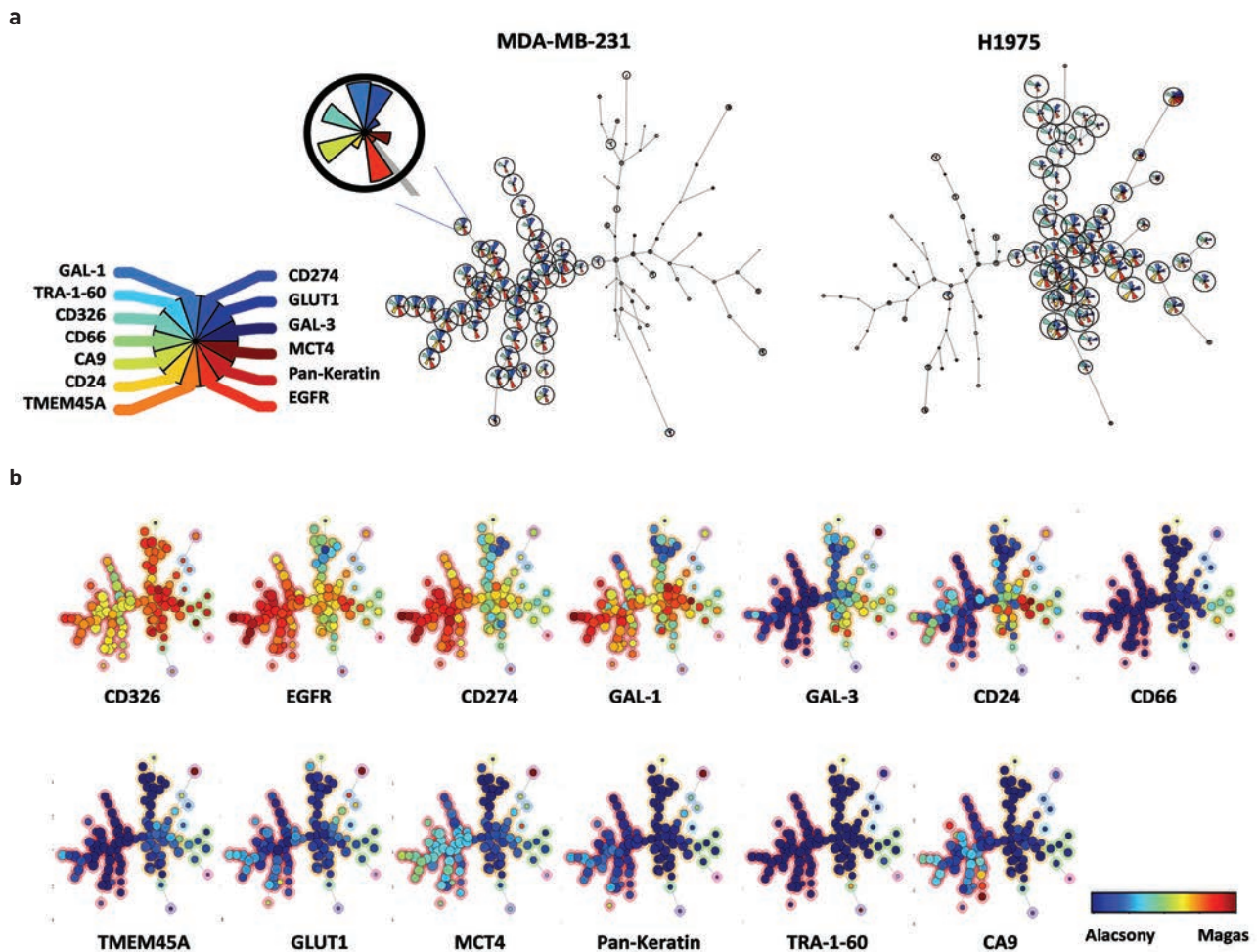
5. ÁBRA. A visNE 13 dimenziós, t-SNE algoritmus által vezérelt („unsupervised”) elemzése a vizsgálati markerek együttes figyelembevételével kirajzolja a humán H1975 és MDA-MB-231 sejtes adenokarcinómamodellek karcinómamarker-térképét

ben (spanning tree) minimális „fát” alkot a klasztereknek megfelelően, ahol a csomópontok közti távolság arányos az egymáshoz viszonyított hasonlósággal. Az algoritmus képes a 2 sejtvonalat megkülönböztetni, így 2 különböző ágra bontani (6.a ábra). A kördiagramok reprezentálják az adott csomópontra eső sejtek markerexpresszióját, a kördiagramok nagysága pedig arányos a sejtek mennyiségével. A 2 sejtvonal együttes, összevont ábrázolása markerenként kirajzolja egy ábrán a vizsgált tüdő- és emlő-adenokarcinómák eltérő markerprofilját (6.b ábra). A csomópontok mögötti háttérszín a meta-klasztereket jelöli.

MEGBESZÉLÉS

Korábban, 2017-ben az egysejt-tömegcitometriát alkalmazva Levin és mtsai sikeresen tárták fel humán adenokarcinómában a tumorinfiltráló immunsejtek fenotipikus jellemzőit („immune landscape”), habár a karcinómasejteket nem vizsgálták (27). Később a karcinómamarkerek tömegcitometriás profilozása is teret nyert. Csoportunkban 2019-ben az egysejt-tömegcitometria segítségével kimutattuk az A549 adenokarcinóma-sejtvonalon, hogy markerprofilukat tekintve a háromdimenziós sferoidok

átmenetet képeznek az *in vivo* és a hagyományos egyrétegű sejtenyésztés között, továbbá igazoltuk, hogy több potenciális terápiás célpont nem fejeződik ki az egyrétegű sejtkultúrákban (6). Bodenmiller és csoportja 2020-ban számolt be 352 emlőkarcinómás páciens tumormintáinak a képkalkító tömegcitometriás elemzéséről, feltárva a nagyfokú intratumorális heterogenitást az egyes metaszeteken (28). Azonban a klinikai minták hozzáférhetősége a kutatóintézetekben korlátozott, illetve a mechanisztikus vizsgálatok nagyfokú reprodukálhatóságot biztosító modellrendszerek alkalmazhatóságát kívánják meg. Ezért a sejtvonalas modellrendszerek továbbra is a kutatók napi használatos eszköztárához tartoznak. Dolgozatunk elsődleges célja két különböző szöveti eredetű, női adenokarcinómasejtes modellrendszerek, a H1975 tüdő- és az MDA-MB-231 tripla-negatív emlőadenokarcinóma-sejtvonalak egysejt-alapú tömegcitometriás markerprofilozása és a komplex adatok kiértékelésének a bemutatása volt. Kimutattuk 13 marker egysejt-szintű kifejeződésének a profilozásával, hogy 9 marker mutat szignifikáns eltérést a két adenokarcinóma-sejtvonal között az adott markerre pozitív populációk százalékában. Egyes kondicionális



6. ÁBRA. A FlowSOM analízis a H1975 és MDA-MB-231 sejtvonalak markerexpresszió alapján történő algoritmus által vezérelt („unsupervised”) megkülönböztetése klaszterezéssel. Az algoritmus képes a két adenokarcinóma-sejtvonalat megkülönböztetni, így 2 különböző ágra bontani. A kördiagramok reprezentálják az adott csomópontra eső sejtek markerexpresszióját, a nagyságuk pedig arányos a sejtek mennyiségével (a). A két sejtes adenokarcinómamodell együttes ábrázolása markerenként. A csomópontok mögötti háttérszín a meta-klasztereket jelöli (b)

markerek csak a H1975 sejtek kisebb csoportjaiban, pl. a GAL-3 [22%] és a CD66 [4%], míg a CA9 csak az MDA-MB-231 sejtek alpopulációiban fejeződött ki [4%]. Az alábbi abundáns markerek közül a H1975-ben CD326-ra pozitív sejtek százaléka volt szignifikánsan magasabb (100% vs.

80%), míg ezzel szemben az EGFR (99% vs. 80%) és CD274 (99% vs. 77%) dominált az MDA-MB-231 sejtekben. Jelen munkánk rávilágít egyaránt a H1975 humán tüdő- és MDA-MB-231 humán tripla-negatív adenokarcinóma-sejtvonalak közötti, és az egyes sejtvonalakon belüli heterogenitásra.

IRODALOM

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer* 103:356–387, 2018
2. Bogos K, Kiss Z, Gálffy G, et al. Lung cancer in Hungary. *J Thorac Oncol* 15:692–699, 2020
3. Reményi Kissné D, Gede N, Szakacs Z, Kiss I. Breast cancer screening knowledge among Hungarian women: a cross-sectional study. *BMC Womens Health* 21:69, 2021
4. Kelly RT. Single-cell proteomics: progress and prospects. *Mol Cell Proteomics* 19:1739–1748, 2020
5. Vistain LF, Tay S. Single-cell proteomics. *Trends Biochem Sci* 2021, doi: 10.1016/j.tibs.2021.01.013
6. Alföldi R, Balog JÁ, Faragó N, et al. 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* 8:1093, 2019
7. Kotogány E, Balog JÁ, Nagy LI, et al. 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* 21:5135, 2020
8. Balog JÁ, Hackler L, Jr., Kovács AK, et al. 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. *Int J Mol Sci* 21:170, 2019
9. Balog JÁ, Honti V, Kurucz E, et al. Immunoprofiling of *Drosophila* hemocytes by single-cell mass cytometry. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2021, doi: 10.1016/j.gpb.2020.06.022
10. Nassar AF, Ogura H, Wisniewski AV. Impact of recent innovations in the use of mass cytometry in support of drug development. *Drug Discov Today* 20:1169–1175, 2015
11. Keller L, Werner S, Pantel K. Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell Stress* 3:165–180, 2019
12. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol* 12:3–20, 2018
13. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* 10:727–742, 2020
14. Kovács-Sólyom F, Blaskó A, Fajka-Boja R, et al. Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by galectin-1. *Immunol Lett* 127:108–118, 2010
15. Cousin JM, Cloninger MJ. The role of galectin-1 in cancer progression, and synthetic multivalent systems for the study of galectin-1. *Int J Mol Sci* 17:1566, 2016
16. Ruvolo PP. Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta* 1863:427–437, 2016
17. Altevogt P, Sammar M, Huser L, et al. Novel insights into the function of CD24: A driving force in cancer. *Int J Cancer* 148:546–559, 2021
18. Han ZW, Lyv ZW, Cui B, et al. The old CEACAMs find their new role in tumor immunotherapy. *Invest New Drugs* 38:1888–1898, 2020
19. Schmit K, Michiels C. TMEM proteins in cancer: a review. *Front Pharmacol* 9:1345, 2018
20. Ancey PB, Contat C, Meylan E. Glucose transporters in cancer – from tumor cells to the tumor microenvironment. *FEBS J* 285:2926–2943, 2018
21. Payen VL, Mina E, Van Hee VF, et al. Monocarboxylate transporters in cancer. *Mol Metab* 33:48–66, 2020
22. Sharma P, Alsharif S, Fallatah A, et al. Intermediate filaments as effectors of cancer development and metastasis: a focus on keratins, vimentin, and nestin. *Cells* 8:497, 2019
23. Snyder KA, Hughes MR, Hedberg B, et al. Podocalyxin enhances breast tumor growth and metastasis and is a target for monoclonal antibody therapy. *Breast Cancer Res* 17:46, 2015
24. Pastorekova S, Gillies RJ. The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 38:65–77, 2019
25. Amir et AD, Davis KL, Tadmor MD, et al. viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol* 31:545–552, 2013
26. Van Gassen S, Callebaut B, Van Helden MJ, et al. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry A* 87:636–645, 2015
27. Lavin Y, Kobayashi S, Leader A, et al. Innate immune landscape in early lung adenocarcinoma by paired single-cell analyses. *Cell* 169:750–765, 2017
28. Jackson HW, Fischer JR, Zanotelli VRT, et al. The single-cell pathology landscape of breast cancer. *Nature* 578:615–620, 2020