

# Genski izražaj dejodinaze tipa 2 u karcinomskim fibroblastima na jednostaničnoj rezoluciji

---

**Stipetić, Mariela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:342000>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-05**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Mariela Stipetić**

**GENSKI IZRAŽAJ DEJODINAZE TIPA 2  
U KARCINOMSKIM FIBROBLASTIMA  
NA JEDNOSTANIČNOJ REZOLUCIJI**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2023.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Mariela Stipetić**

**GENSKI IZRAŽAJ DEJODINAZE TIPA 2  
U KARCINOMSKIM FIBROBLASTIMA  
NA JEDNOSTANIČNOJ REZOLUCIJI**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2023.**

Rad je ostvaren na Katedri za nuklearnu medicinu i onkologiju Medicinskog fakulteta Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Mario Štefanić, dr. med.

Rad ima 35 listova, 4 tablice i 8 slika.

## **Zahvale**

Zahvaljujem se svojem mentoru izv. prof. dr. sc. Mariju Štefaniću, dr. med. na prihvaćanju mentorstva, stručnom vodstvu, neizmjernej pomoći te uloženom vremenu i trudu tijekom izvođenja istraživanja i izrade ovog diplomskog rada.

Također, veliko hvala mojoj obitelji, prijateljima i kolegicama na pruženoj podršci, razumijevanju te neprestanoj pomoći za vrijeme studiranja.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Neoplazme .....	1
1.2. Tumorska stroma .....	1
1.3. Fibroblasti i neoplazme .....	2
1.4. Hormoni štitnjače .....	5
1.5. Sekvenciranje jednostanične RNK .....	6
2. HIPOTEZA .....	7
3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	8
4. MATERIJALI I METODE .....	9
4.1. Ustroj studije.....	9
4.2. Materijali .....	9
4.3. Metode .....	9
4.3.1. Grupiranje i klasifikacija CAF .....	9
4.3.2. Korelacijska analiza .....	10
4.3.3. Ortogonalna validacija .....	11
4.3.4. Funkcijska analiza.....	11
4.3.5. Statističke metode .....	11
5. REZULTATI .....	12
5.1. Deskriptivna analiza .....	12
5.2. Genski izražaj DIO2 u CAF .....	16
5.3. Analiza bioloških puteva u DIO2 modulu .....	19
6. RASPRAVA.....	22
7. ZAKLJUČAK .....	24

8. SAŽETAK .....	25
9. SUMMARY .....	26
10. LITERATURA .....	27
11. ŽIVOTOPIS .....	35

## POPIS KRATICA

U ovom su radu korištene sljedeće skraćenice:

CAF – karcinomski fibroblasti (eng. *cancer-associated fibroblasts*)

CCL – kemokinski C-C ligand

CGP – kemijske i genetske perturbacije (eng. *Chemical and Genetic Perturbations*)

CXCL – kemokinski C-X-C ligand

DIO1 – dejodinaza tip 1 (eng. *type 1 deiodinase*)

DIO2 – dejodinaza tip 2 (eng. *type 2 deiodinase*)

DIO3 – dejodinaza tip 3 (eng. *type 3 deiodinase*)

FC – omjer izražaja (eng. *fold change*)

FDR – stopa lažno pozitivnih (eng. *false discovery rate*)

GO – eng. *Gene Ontology*

HGNC – eng. *The Human Gene Organisation Gene Nomenclature Committee*

iCAF – imunoregulacijski CAF

KEGG – Kyoto enciklopedija gena i genoma (eng. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

LOESS – izgladivanje lokalnom regresijom (eng. *Local Regression Smoothing*)

LUAD – adenokarcinom pluća (eng. *lung adenocarcinoma*)

LUSC – karcinom pločastih stanica pluća ili planocelularni karcinom pluća (eng. *lung squamous cell carcinoma*)

MDSC – mijeloidne supresijske stanice (eng. *myeloid-derived suppressor cells*)

MSigDB – eng. *The Molecular Signatures Database*



myCAF – miofibroblastima slični CAF

NSCLC – nemikrocelularni karcinom pluća (eng. *non-small-cell lung cancer*)

PDAC – duktalni adenokarcinom gušterače (eng. *pancreatic ductal adenocarcinoma*)

PD-L1 – ligand programirane stanične smrti 1 (eng. *programmed death-ligand 1*)

RNK – ribonukleinska kiselina (eng. *ribonucleic acid – RNA*)

scRNA-seq – sekvenciranje jednostanične RNK (eng. *single-cell RNA sequencing*)

TCGA – Atlas genoma raka (eng. *The Cancer Genome Atlas*)

TPM – eng. *transcript-per-million*

TR – receptor za hormone štitnjače (eng. *thyroid hormone receptor*)

T3 – trijodtironin

T4 – tiroksin

UMAP – eng. *Uniform Manifold Approximation and Projection*

vCAF – vaskularni CAF

## POPIS TABLICA

Tablica 1. Biljezi različitih subpopulacija karcinomskih fibroblasta (CAF) .....	14
Tablica 2. Zastupljenost pojedinih klasa karcinomskih fibroblasta (CAF) u nemikrocelularnom karcinomu pluća (NSCLC) i duktalnom adenokarcinomu gušterače (PDAC, N = broj stanica) .....	15
Tablica 3. Apsolutne i relativne frekvencije DIO2 <sup>++</sup> stanica (genski izražaj) u pojedinim klasama karcinomskih fibroblasta (CAF) .....	16
Tablica 4. Kemijske i genetske perturbacije ( <i>Chemical and Genetic Perturbations</i> , CGP, <i>Human MSigDB Collections</i> ) za skup DIO2 <sup>+</sup> koreliranih gena iz Slike 6 .....	21

## POPIS SLIKA

Slika 1. Podrijetlo karcinomskih fibroblasta .....	4
Slika 2. Stanične populacije karcinomskih fibroblasta (CAF) .....	12
Slika 3. Točkasti dijagram ekspresije razlikovnih biljega u pojedinim populacijama karcinomskih fibroblasta (normalizirane, Z-vrijednosti) .....	13
Slika 4. Dvodimenzionalna (UMAP, <i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i> ) reprezentacija genskog izražaja pojedinih biljega karcinomskih fibroblasta .....	14
Slika 5. Dvodimenzionalna (UMAP, <i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i> ) reprezentacija genskih potpisa karcinomskih fibroblasta (CAF) .....	15
Slika 6. Dejodinaza tip 2 (DIO2), korelirani prijepisi (normalizirani izražaj glasničke RNK, 1 034 stanica, MMP11 <sup>+</sup> WNT5A <sup>+</sup> populacija karcinomskih fibroblasta) .....	17
Slika 7. Parne usporedbe izražaja gena u planocelularnom karcinomu pluća (LUSC) i adenokarcinomu pluća (LUAD, N = broj neovisnih uzoraka, <i>The Cancer Genome Atlas Program</i> ) .....	18
Slika 8. Dvodimenzionalna (UMAP, <i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i> ) reprezentacija, transkripcijski regulatori (STAT1, STAT2, IRF9) i efektori interferenskog odgovora (IFI30) .....	20

# 1. UVOD

## 1. UVOD

### 1.1. Neoplazme

Neoplazme (grč. *neos* – nov + *plasia* – rast, tj. novi rast), poznate i kao tumori ili novotvorine, predstavljaju izuzetno teško te kompleksno područje u medicini koje obuhvaća više od stotinu različitih bolesti. Gledajući molekularnu razinu, neoplazme nastaju kao rezultat poremećaja u genima za regulaciju rasta, protoonkogeni i tumor supresijskih gena, koji kolektivno vode u nekontroliranu diobu preobraženih stanica. Razvijaju se u više koraka tako da različite neoplazme, čak i one istog histološkog tipa, mogu imati različite genetske promjene (1). Osim genske, neoplazme također imaju i epigenetsku pozadinu čiji je nastanak rezultat djelovanja niza unutarnjih i vanjskih čimbenika koji potiču gubitak normalne fiziološke regulacije i kontrolnih mehanizama rasta stanica (2). Rezultat je neregulirana, klonalna proliferacija stanica i prekomjerni rast tumorskog tkiva. Prema obilježjima rasta, razlikujemo benigne (dobroćudne) i maligne (zloćudne) neoplazme što utječe na daljnje kliničke i terapijske potrebe. Temeljna razlika između njih je u tome što se benigne neoplazme zadržavaju na svom mjestu podrijetla, dok kod malignih neoplazmi dolazi do infiltracije zloćudnih stanica u susjedno (zdravo) tkivo domaćina i na cijelo tijelo (metastaze) razarajući strukturu zahvaćenog tkiva (1). Upravo su metastaze smrtonosno obilježje i najzabrinjavajući aspekt neoplazmi pri čemu većina oboljelih umire kao posljedica širenja stanica od početne lezije do udaljenih organa. Sukladno tome, danas su maligne neoplazme vodeći javnozdravstveni problem i prioritet u cijelom svijetu. Drugi su najčešći uzrok smrti u razvijenim zemljama, odmah nakon kardiovaskularnih bolesti. Broj osoba oboljelih od zloćudnih bolesti (raka) u stalnom je porastu te se očekuje i nastavak toga trenda što je u najvećoj mjeri rezultat povećanja očekivanog trajanja života, zdravstveno rizičnog ponašanja i okolišnih faktora (3).

### 1.2. Tumorska stroma

Tok i ishod malignih bolesti određen je mnogim čimbenicima čije bolje poznavanje može unaprijediti prevenciju, liječenje i ishode bolesti. Među njima je i tumorska stroma, jedinstveni mozaični mikrookoliš koji malignim stanicama pruža metaboličko, imunološko i strukturalno utočište (4 – 6). U patobiologiji tumora, riječ je o tkivu koje okružuje tumorske stanice i osigurava im funkcionalnu potporu, a samo je bogato prožeto izvanstaničnim

## 1. UVOD

matriksom koji pruža strukturnu potporu stanicama unutar tumora. Tumorska stroma građena je od fibroblasta (normalnih i aktiviranih), miofibroblasta, makrofaga, živaca te limfnih, endotelnih i upalnih stanica koje luče humoralne molekule poput čimbenika rasta, citokina i enzima koji pregrađuju izvanstanični matriks. Popis dopunjuju različite molekule koje imaju ulogu u prometovanju upalnih stanica, migraciji, angiogenezi te remodeliranju tkiva i metabolizmu tumora. Ravnoteža između ovih sastavnica i molekula izvanstaničnog matriksa nužna je za homeostazu strome normalnog tkiva (5 – 7). Stroma tumora, kao sastavni dio svake neoplazme, još uvijek nije dovoljno istražena i shvaćena, premda je mjesto zbivanja kritično važnih procesa u biologiji tumora. Raste broj dokaza koji ukazuju na to da tumorska progresija proizlazi iz uzajamnog međudjelovanja tumorskih stanica i stanica strome koja ih okružuje. Sudbina tumorskih stanica, njihovo preživljenje, migracija i diseminacija u bitnoj su mjeri određene njihovim okruženjem, u čijem preoblikovanju aktivno sudjeluju. Sva dosadašnja relevantna istraživanja potvrdila su utjecaj aktivirane okolne tumorske strome i imunoloških stanica na ponašanje tumora (8). Stroma kanalizira tumorogenezu različitim procesima koji uključuju remodeliranje izvanstaničnog matriksa, imunološko isključenje, metaboličku zaštitu matičnih stanica raka te poremećaj regulatornih puteva koji upravljaju pokretljivošću i agresivnošću tumorskih stanica (9). Među svim komponentama strome tumora, svojim mnogobrojnim ulogama u ovim procesima osobitu pažnju privlače fibroblasti povezani s tumorom, tzv. karcinomski fibroblasti (CAF, eng. *cancer-associated fibroblasts*) (10).

### 1.3. Fibroblasti i neoplazme

Fibroblaste je prvi otkrio i opisao njemački patolog Rudolf Virchow još 1858. godine kao poseban tip stanica smješten u vezivnom tkivu te ih sukladno tome nazvao „vretenaste stanice vezivnog tkiva”. Kasnije je pojam „fibroblast” prvi upotrijebio i predložio švicarski patolog Ernst Ziegler, a 1896. godine ponovio ga španjolski patolog i histolog Santiago Ramón y Cajal kako bi opisali stanice koje su odgovorne za stvaranje novog vezivnog tkiva nakon ozljede, tj. tijekom zacjeljivanja (11). Potječu iz embrionalnog mezenhima i prisutni su u svim tkivima kako bi obavljali bitne funkcije u razvoju, homeostazi, zacjeljivanju rana i održavanju arhitekture tkiva (12, 13). U patološkim procesima, sastavni su dio fibroze i upale tkiva te odgovora na prisutnost malignih bolesti za što posjeduju specijalizirane fenotipove i stanja aktivacije (11, 14). Brojnim istraživanjima potvrđena je njihova sposobnost diverzifikacije i

## 1. UVOD

visoka heterogenost, zbog čega populacija fibroblasta povezana s bolesti varira. U malignim tumorima, šarolika skupina aktiviranih stromalnih fibroblasta (CAF) glavna su i najobilnija sastavnica tumorskog mikrokruženja, iako njihovo podrijetlo i funkcije u začetku bolesti, napredovanju i odgovoru na liječenje ostaju nerazumljivi zbog naglašene heterogenosti (15). Pojavljuju se u odgovoru na parakrine signale iz tumorskih stanica, barem dijelom kao potomci rezidentnih homeostatskih fibroblasta u sijelu neoplazme. CAF mogu biti izvedeni iz različitih stanica, normalnih fibroblasta u peritumoralnoj stromi, mezenhimalnih i hematopoetskih matičnih stanica iz koštane srži te zvjezdastih, epitelnih i endotelih stanica. Drugi mogući prethodnici CAF jesu vaskularne glatke mišićne stanice, perivaskularne stanice, adipociti i masne matične stanice (12) (Slika 1). U skladu s tim, raznolikost i sastav CAF vjerno odražava tumorsku heterogenost, varirajući unutar istog tumora, među različitim osobama s istim tumorom i među različitim sijelima (16, 17). U najopćenitijem smislu, cijeli spektar CAF moguće je sažeti u nekoliko meta-grupa, među kojima su najpoznatiji matrisomski CAF, miofibroblastima slični CAF (myCAF), vaskularni CAF (vCAF) i imunoregulacijski CAF (iCAF). Pojedine meta-grupe međusobno se razlikuju izražajem karakterističnih biljega, funkcionalnom specijalizacijom u podjeli posla i tkivnim smještajem. U stvarnosti, granice među pojedinim grupama često su zamagljene, zahvaljujući pojavi hibridnih fenotipova CAF (18).

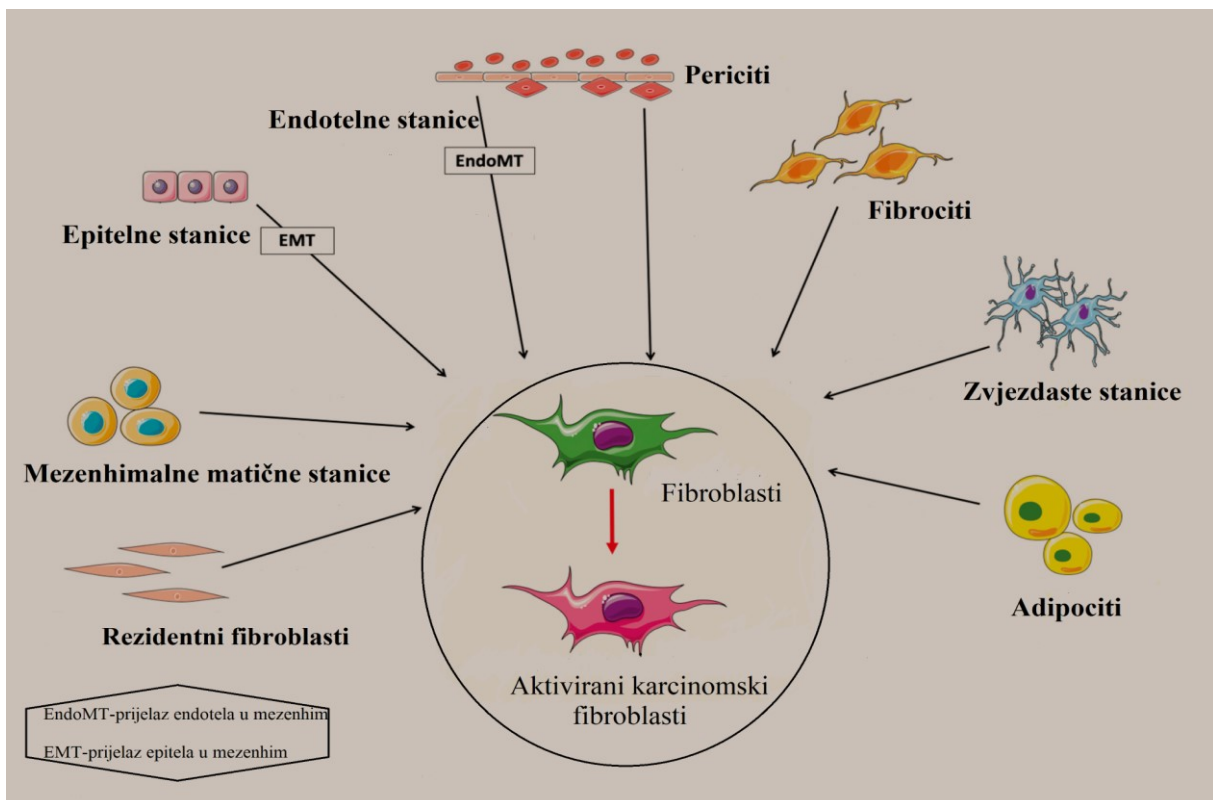
Matrisomski CAF odlikuju se izražajem širokog repertoara molekula izvanstaničnog matriksa, kolagenskih vlakana, lizil-oksidaza i proteaza, koje zajednički sudjeluju u umnažanju i umrežavanju strome (4, 14). Rezultat je avaskularna, gusta i neprohodna mreža kolagenskih vlakana u kojoj su otočići tumorskih stanica razasuti izvan domašaja imunološkog sustava. Aktivirane kontraktilne stanice, poput myCAF, bitno pridonose ovom procesu povećavajući lokalni tonus tkiva. Takva dezmostična stroma obilježje je nekih tumora, poput adenokarcinoma gušterače (19).

Vaskularni CAF imaju biljege muralnih stanica i proizvode molekule koje sudjeluju u angiogenezi, pupanju kapilara, aktivaciji endotela i pregradnji vaskulature (20).

Imunoregulacijski CAF dolaze u različitim oblicima, kao antigen-predočni CAF, proupalni CAF i imunosupresijski CAF (20, 21). Proupalni CAF izlučuju velike količine upalnih medijatora, citokina i kemokinskih liganda različitih klasa (CCL, CXCL) koji imaju dvojaku ulogu: aktivaciju sjedilačkih (rezidentnih) upalnih stanica i novačenje svježih upalnih stanica iz cirkulacije u tumor, gdje posreduju imunološko odbacivanje tumora. Imunosupresijski CAF, naprotiv, novače pretežito regulacijske T-stanice, M2 makrofage i mijeloidne

## 1. UVOD

supresijske stanice (MDSC), koje proizvodnjom inhibicijskih molekula (PD-L1, eng. *Programmed Death-ligand 1*, aktivator programirane smrti) i imunosupresijskih metabolita (kinurenin, laktat, prostaglandin E2, adenzin) posreduju funkcijsko iscrpljenje citotoksičnih limfocita (21). Krajnji ishod je imunološki povlašeno utočište za maligne stanice, u kojem matične stanice raka nalaze zaštitu pred terapijom. Upravo ta dvojaka funkcija iCAF predstavlja velike izazove u njihovoj kliničkoj translaciji: veći broj istraživanja dokazuje kako iCAF igraju presudnu ulogu u razvoju tumora kroz metaboličke interakcije kojima potiču angiogenezu i imunosupresiju, ali postoje i novi dokazi koji govore u prilog njihovom antitumorskom djelovanju u ranoj fazi te pozitivnoj povezanosti s boljom prognozom (22). Sveukupno, sastav i fenotip CAF varira unutar i između neoplazmi, kao i njihova uloga u strukturnim, upalnim i metaboličkim zbivanjima (20, 21). Među metaboličkim ulogama, nalazi se i jedan od najmanje istraženih aspekata biologije CAF, a to je metabolizam hormona, posebice hormona štitnjače.



Slika 1. Podrijetlo karcinomskih fibroblasta [prilagođeno prema referenci (23), sukladno međunarodnoj *Creative Commons Attribution 4.0* licenci (CC-BY 4.0), *Servier Medical Art*, smart.servier.com].

## 1. UVOD

### 1.4. Hormoni štitnjače

Hormoni su značajni pokretači razvoja tumora, a promjena intratumorske koncentracije hormona štitnjače, trijodtironina (T3) i tiroksina (T4), zajednička je karakteristika mnogih ljudskih neoplazmi (24). Neizostavni su u regulaciji više metaboličkih procesa i potrošnje energije u organizmu te su kritični regulatori određenih fizioloških procesa kao što su embrionalni razvoj organa, diferencijacija, rast i apoptoza stanica te metabolizam u gotovo svim tkivima. Biološki učinak ostvaruju međudjelovanjem s nuklearnim receptorima (TR $\alpha$  i TR $\beta$ ) koji kontroliraju transkripciju gena u odgovoru na hormone štitnjače. Posljednjih nekoliko desetljeća, proveden je određeni broj istraživanja koji ukazuju da promjene u razinama T4 i T3 utječu na staničnu proliferaciju, diferencijaciju, preživljavanje i invaziju u različitim neoplazmama, i to na način specifičan za vrstu stanice. Hormoni štitnjače utječu na rast stanica tako da djeluju kao faktori rasta ili inhibitori rasta stanica kroz nekoliko koraka proliferacije te potiču diferencijaciju u procesu povezanom sa zaustavljanjem rasta i izlaskom iz staničnog ciklusa (25, 26).

Hormoni štitnjače cirkuliraju pretežito u inaktivnoj formi (T4), za čiju tkivnu aktivnost je potrebna lokalna konverzija iz prohormona, T4, u signalno aktivnu formu (T3). Načelno, ovaj korak posreduju dva enzima, dejodinaza tip 1 (DIO1) i tip 2 (DIO2), među kojima je aktivnost DIO1 uglavnom koncentrirana u epitelnim stanicama štitnjače, tubula bubrega i hepatocitima jetre. U većini ostalih tkiva, DIO2 je dominantni posrednik u konverziji T4 u T3. Gdje se u tkivu ovaj proces odvija, točnije u kojoj vrsti stanica, uglavnom nije jasno. Treća izoforma, dejodinaza tip 3 (DIO3), koja katalizira inaktivacijski korak, razgrađujući T3 u reverzni dijodtironin, ima sličnu distribuciju kao i DIO1 (27, 28). Na taj način, utjecaj dejodinaza osigurava čvrstu kontrolu dostupnosti T3 na unutarstaničnoj razini na vremenski i tkivno specifičan način, pri čemu sve veći broj dokaza ukazuje na promijenjenu ekspresiju dejodinaza (poglavito DIO2) u nekoliko tipova tumora (29). Na tom tragu, genski izražaj DIO2 lociran je nedavno u dijelu CAF, primjerice u nemikrocelularnom karcinomu pluća [myCAF, *non-small cell lung carcinoma*, NSCLC (30, 31)], kolorektalnom karcinomu [CXCL14<sup>+</sup>CAF (32)] i adenokarcinomu gušterače [myCAF (33 – 35)], bez bitnijeg učešća epitelne komponente u ukupnom izražaju DIO2 u tumoru. Povećani stromalni izražaj DIO2 u kolorektalnom karcinomu potvrđen je i imunohistokemijski, a kemijska inhibicija enzimske aktivnosti DIO2 u polipoidnoj stromi suprimira nastanak tumora u mišjem modelu adenomatozne polipoze kolona (Apc <sup>$\Delta$ 716</sup>) (36). Rasprostranjenost ovog fenomena među



## 1. UVOD

različitim klasama CAF nije poznata, kao niti povezanost izražaja DIO2 s funkcionalnim obilježjima CAF.

Popunjavajući tu prazninu, cilj ovog rada je detaljno ispitati genski izražaj DIO2 u različitim subpopulacijama CAF na jednostaničnoj rezoluciji. U tu svrhu, koristit ćemo reanalizu sirovih podataka sekvenciranja jednostanične RNK fibroblasta iz adenokarcinoma gušterače i nemikrocelularnog karcinoma pluća (37). Navedene dvije neoplazme izabrane su zbog svoje loše prognoze i visoke učestalosti, što ih čini najizdašnije proučavanim neoplazmama u sustavnoj biologiji.

### 1.5. Sekvenciranje jednostanične RNK

Samo jednostanično sekvenciranje RNK (scRNA-seq, eng. *single-cell sequencing*) osobito je podesebno za ovaj cilj. scRNA-seq pripada tehnikama sekvenciranja sljedeće generacije i predstavlja tehnološki inovativni alat za proučavanje stanične raznovrsnosti u normalnim i patološki promijenjenim tkivima (38). Također, snažno je sredstvo u istraživanju obrazaca ekspresije gena što ga čini vodećom tehnikom za proučavanje transkriptoma pojedinačnih stanica u sekvenciranim uzorcima (39). Upravo je napredak ovih tehnologija omogućio detaljnu karakterizaciju složenosti i heterogenosti CAF subpopulacija u više tipova tumora (31, 40). Pojava scRNA-seq tehnologija korjenito je izmijenila polje CAF i pronašla dodatne slojeve složenosti, poglavito analizom cjelogenomskog profila ekspresije staničnog transkriptoma, otkrivajući nove tipove stanica, složenost molekularnog sastava te do sada neistražene procese (38, 40). U kombinaciji s odgovarajućim bioinformatičkim alatima, metoda omogućava istodobno profiliranje genskog izražaja u tisućama pojedinačnih stanica, što ju čini vrlo podesebnim oruđem u analizi stanične raznolikosti složenih ekosustava (37, 39). Iz tih razloga, metoda je široko korištena u brojnim granama medicine poput onkologije, imunologije i razvojne biologije (41).

## 2. HIPOTEZA

### **2. HIPOTEZA**

Genski izražaj dejodinaze tipa 2 jedno je od razlikovnih obilježja između pojedinih skupina karcinomskih fibroblasta.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

#### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati genski izražaj dejodinaze tipa 2 u karcinomskim fibroblastima na jednostaničnoj rezoluciji na primjeru dvije različite neoplazme (duktalni adenokarcinom gušterače i nemikrocelularni karcinom pluća).
2. Ispitati biološki kontekst genskog izražaja dejodinaze tipa 2, i to funkcijskom analizom koreliranih gena koji prate izražaj DIO2 u karcinomskim fibroblastima.

### 4. MATERIJALI I METODE

#### 4.1. Ustroj studije

Cenzus stanica, bioinformatička analiza.

#### 4.2. Materijali

Sirovi cjelogenomski scRNA-seq podaci preuzeti su iz javnog repozitorija (<https://www.fibroxplorer.com/>, *Human Perturbed-State*). Svi podaci su anonimizirani i slobodno dostupni bez ograničenja (zadnji pristup 21. 12. 2022.). Tehnički i klinički detalji ranije su objavljeni (4) i dostupni su na <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03549-5#Sec36> (*Supplementary Table 3 i 6*, posljednji pristup 11. 07. 2023.). Za potrebe ove analize, fokusirali smo se na fibroblaste izolirane iz tkiva dukalnog adenokarcinoma gušterače (10X Genomics, PDAC) i nemikrocelularnog karcinoma pluća (Smart-Seq2, NSCLC).

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/23-08/03, URBROJ: 2158-61-46-23-30, datum: 23. veljače 2023.).

#### 4.3. Metode

##### 4.3.1. Grupiranje i klasifikacija CAF

Nakon rekonstrukcije izvorne matrice očitavanja (10 355 stanica), podaci su iznova reanalizirani u Seurat alatu (v4.0.3, [satijalab.org/seurat/](http://satijalab.org/seurat/)) uz sljedeće postavke (42):  $200 < nFeature\_RNA < 3\ 000$ , postotak mitohondrijske RNK  $< 10$ , 3 000 varijabilnih gena, prvih 30 glavnih komponenti. Potom su izdvojeni CAF podrijetla PDAC i NSCLC korištenjem *Subset* funkcije (3 835 stanica) i meta-podataka u Seurat objektu. U sljedećem koraku, sirova matrica očitavanja za izdvojene CAF podvrgnuta je ponovnom grupiranju i integraciji, uz sljedeće modifikacije:  $200 < nFeature\_RNA < 3\ 000$ , postotak mitohondrijske RNK  $< 10$ , 1 000 varijabilnih gena, prvih 20 glavnih komponenti. Normalizacija podataka provedena je logaritamskom transformacijom, uz stabilizaciju varijance "vst" metodom (42) i korekciju za postotak ribosomske RNK i broj detektiranih gena u stanici (*regress.out* funkcija, Seurat). Za integraciju podataka iz dva različita tumora (PDAC i NSCLC) korišten je Harmony (43) algoritam ( $\Lambda = 2$ ,  $\theta = 0,25$ , <https://portals.broadinstitute.org/harmony/>). Nakon harmonizacije,

## 4. MATERIJALI I METODE

grupiranje CAF provedeno je metodom K-najbližih susjeda (44). Za vizualizaciju rezultata upotrijebljena je nelinearna redukcija dimenzionalnosti [*Uniform Manifold Approximation and Projection*, UMAP, (45)], na rezoluciji 0,2 - 0,4. Nakon grupiranja, analiza razlikovno izraženih biljega u svakoj subpopulaciji CAF izvedena je Wilcoxonovim testom (*FindAllMarkers* funkcija) uz sljedeći filter: omjer izražaja  $|\log_2FC/fold\ change| > 0,25$ , dvostrani Bonferroni  $P < 0,05$  i izražaj u najmanje 25 % stanica. Za fenotipsku klasifikaciju CAF korištena je lista biljega iz Buechler i sur. (4), Luo i sur. (46), Foster i sur. (47) te Cords i sur. (48). Kompletna lista razlikovno izraženih gena ( $n = 3\ 231$ ) dostupna je na zahtjev.

Na temelju ovih podataka izračunata je:

- 1) zastupljenost (apsolutni broj i relativna frekvencija) pojedinih vrsta CAF u obje neoplazme (NSCLC i PDAC) i
- 2) relativna frekvencija DIO2<sup>+</sup> stanica u svakoj klasi CAF

Za vizualizaciju genskog izražaja DIO2 u pojedinim klasama CAF korištene su *FeaturePlot* i *DotPlot* funkcije u Seurat alatu. Dopunska vizualizacija rezultata učinjena je upotrebom Nebulosa knjižnice v1.11.0 (<https://github.com/powellgenomicslab/Nebulosa>) (49). U analizi biljega upalnih, matrisomskih, antigen-predočnih, pericitnih i protumorskih CAF (Seurat, *AddModuleScore* funkcija) korišteni su genski potpisi iz (48). Biljezi ranih CAF preuzeti su iz (50).

### 4.3.2. Korelacijska analiza

Geni koji tijesno prate izražaj DIO2 u CAF (ko-eksprimirani geni) identificirani su korelacijskom analizom (Pearson  $r$ ), zasebno u svakoj neoplazmi. U tu svrhu, korišteni su normalizirani i harmonizirani podaci (Seurat, `slot = "data"`) u `scrn` (51) i `scatter` knjižnici (52). Za potrebe funkcijske analize, padajući popis korelacijskih koeficijenata ograničen je na prvih 100 koreliranih gena.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.3.3. Ortogonalna validacija

U replikacijskom koraku ponovljena je korelacijska analiza za reprezentativne asocijacije, ali ovoga puta koristeći podatke sekvenciranja ukupne tkivne RNK (RNA-seq) iz TCGA projekta (*The Cancer Genome Atlas*, <https://portal.gdc.cancer.gov/>) u TIMER2.0 sučelju (<http://timer.comp-genomics.org/>) (53, 54). Analizom su obuhvaćeni uzorci adenokarcinoma pluća (n = 515) i planocelularnog karcinoma pluća (n = 501, ne-mikrocelularne neoplazme). Snaga povezanosti procijenjena je parcijalnim korelacijskim koeficijentom nakon prilagodbe za tumorsku čistoću (*Tumor Immune Estimation Resource*, <https://cistrome.shinyapps.io/timer>, posljednji pristup 11. 07. 2023.), i to koristeći TPM normalizaciju podataka (*transcript-per-million*) (55). Linije trenda u dijagramima raspršenja produkt su LOESS metode (*Local Regression Smoothing*).

### 4.3.4. Funkcijska analiza

Analizu bioloških putova koji su zastupljeni u listi prvih 100 koreliranih gena (scRNA-seq) napravili smo uporabom H (Hallmark), C2 (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, KEGG), C5 (*Gene Ontology*, GO) i CGP seta (*Chemical and Genetic Perturbations*) MSigDB zbirke v7.5.1 [*The Molecular Signatures Database* (56), University of California, San Diego, SAD]. Prag značajnosti definiran je kao FDR (*false discovery rate*,  $q$ ) < 0,05, i to za genske skupove s minimalno 10 gena (*Gene Set Enrichment algoritam*). Genska imena predstavljaju HGNC (*The HUGO Gene Nomenclature Committee*) simbole. DIO2 odgovara HGNC: 2884.

### 4.3.5. Statističke metode

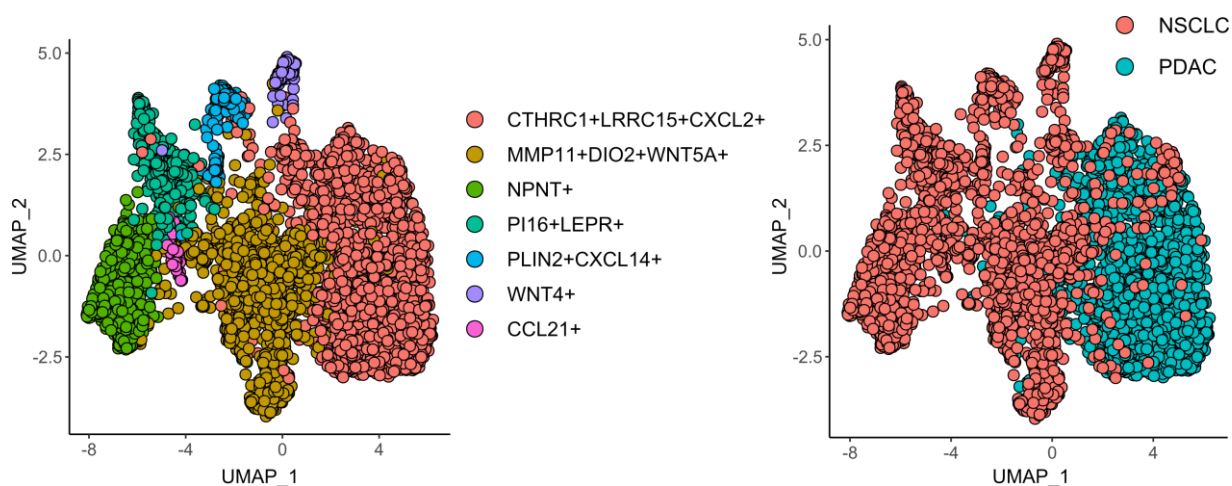
Deskriptivna analiza slijedi uobičajena pravila prikaza podataka za scRNA-seq (37, 57). Kategoričke varijable sažete su upotrebom apsolutnih i relativnih frekvencija (postotak). Za prosječni izražaj gena, korištena je aritmetička sredina. U ostalim detaljima, analiza scRNA-seq podataka slijedi preporučene smjernice (58). Ukoliko nije drugačije naznačeno, redukcija, procesiranje i vizualizacija podataka provedeni su u R4.0.3 programu (*The R Project for Statistical Computing*, Vienna, Austria, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Svi kodovi nužni za ponovljivost rezultata i slika dostupni su na razuman zahtjev.

## 5. REZULTATI

### 5. REZULTATI

#### 5.1. Deskriptivna analiza

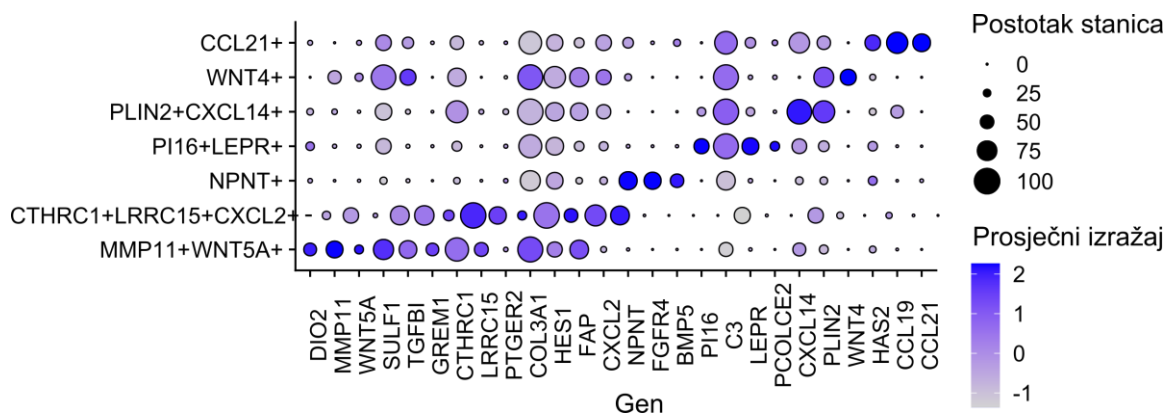
Filtriranjem fibroXplorer kataloga (10 353 stanice) izdvojeno je 2 055 fibroblasta podrijetlom iz NSCLC i 1 852 fibroblasta podrijetlom iz PDAC (ukupno 3 907 stanica, Slika 2). Na temelju izražaja razlikovnih biljega (Tablica 1), izdvojeni CAF razdijeljeni su u 7 populacija (Slika 2 – 4). Općenito, zapažena je veća raznolikost CAF u NSCLC nego u PDAC (Tablica 2, Slika 2). Dvije dominantne populacije matrisomskih CAF,  $MMP11^+WNT5A^+$  (NSCLC > PDAC) i  $CTHRC1^+LRRC15^+$  (PDAC > NSCLC), prisutne su u obje neoplazme, uz još 5 manjih populacija CAF ograničenih na NSCLC (Slika 4, Tablica 2). U usporedbi s PDAC (Slika 2), NSCLC sadrži veću populaciju  $PI16^+LEPR^+$  i upalnih CAF (*inflammatory*, iCAF;  $NPNT^+$ ,  $PLIN2^+CXCL14^+$  stanice).



Slika 2. Stanične populacije karcinomskih fibroblasta (CAF).

UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) reprezentacija. Razdioba CAF prema primarnom sijelu. NSCLC = nemikrocelularni karcinom pluća, PDAC = duktalni adenokarcinom gušterače. Svaki kružić predstavlja jednu stanicu. Za sve slike, rječnik genskih simbola dostupan je na [www.genecards.org](http://www.genecards.org) (*GeneCards: The Human Gene Database*, v5.14, 03. 01. 2023, Weizmann Institute of Sciences, Rehovot, Izrael).

## 5. REZULTATI



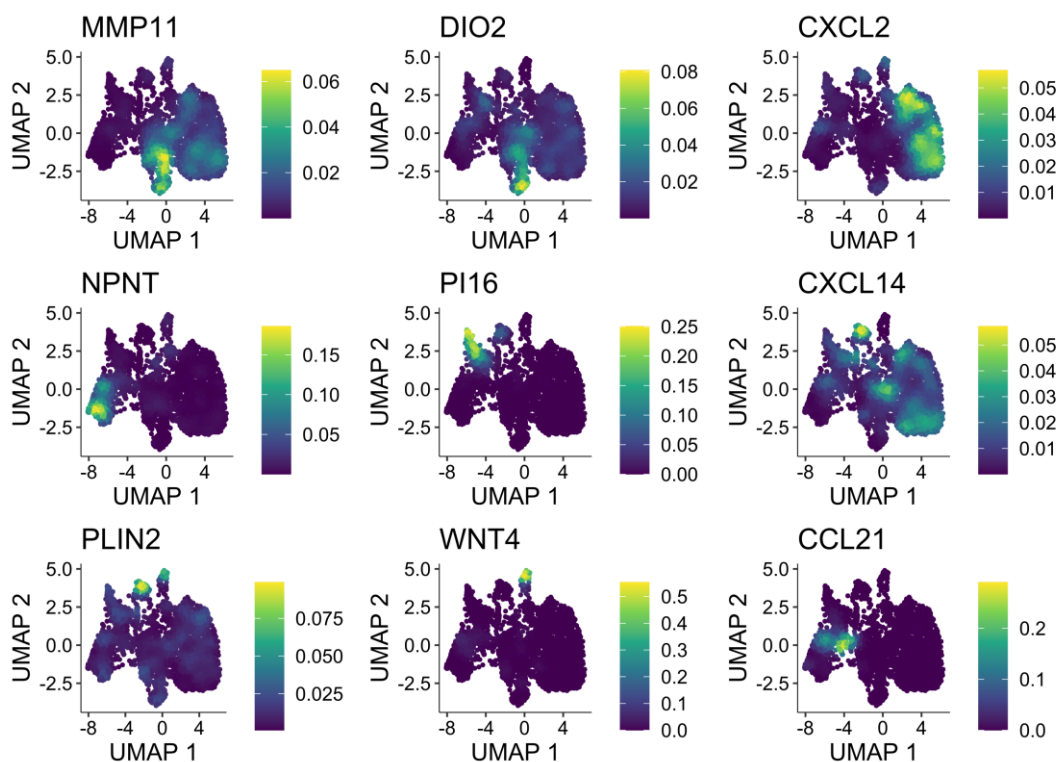
Slika 3. Točkasti dijagram ekspresije razlikovnih biljega u pojedinim populacijama karcinomskih fibroblasta (normalizirane, Z-vrijednosti).

Intenzitet boje i veličina kruga proporcionalni su razini ekspresije (Prosječni izražaj) i postotnom udjelu stanica koje prepisuju gen (% stanica).

MMP11<sup>+</sup>WNT5A<sup>+</sup> CAF odlikuju se izražajem biljega miofibroblasta (ACTA2, TAGLN, TPM1) i adventicijskih fibroblasta (pericita), a PI16<sup>+</sup>LEPR<sup>+</sup> CAF obilježjima angiogenih i ranih CAF (Tablica 1, Slika 5). CCL21<sup>+</sup> CAF imaju obilježja retikularnih fibroblasta, odnosno stromalnih organizatora limfnih čvorova i sudjeluju u aktivnoj prezentaciji antigena (apCAF, FC = 11,44, q = 1,33 x 10<sup>-7</sup>, KEGG). CTHRC1<sup>+</sup>LRRC15<sup>+</sup> CAF odlikuju se snažnim izražajem biljega protumorskih FAP<sup>+</sup> CAF (Slika 5, Tablica 1), a PLIN2<sup>+</sup> CAF obilježjima lipofibroblasta (FC = 5,55, q = 1,1 x 10<sup>-11</sup>, Hallmark) i metabolizmom arahidonata (FC = 4,65, q = 0,0067, KEGG). WNT4<sup>+</sup> CAF odgovaraju najvjerojatnije mezotelnim (WT1<sup>+</sup>KRT19<sup>+</sup>EFEMP1<sup>+</sup>EZR<sup>+</sup>) i subpleuralnim (HAS1<sup>+</sup>) stanicama.



## 5. REZULTATI



Slika 4. Dvodimenzionalna (UMAP, *Uniform Manifold Approximation and Projection*) reprezentacija genskog izražaja pojedinih biljega karcinomskih fibroblasta.

Okomita vrpca kodira intenzitet izražaja. Svaka točka odgovara jednoj stanici.

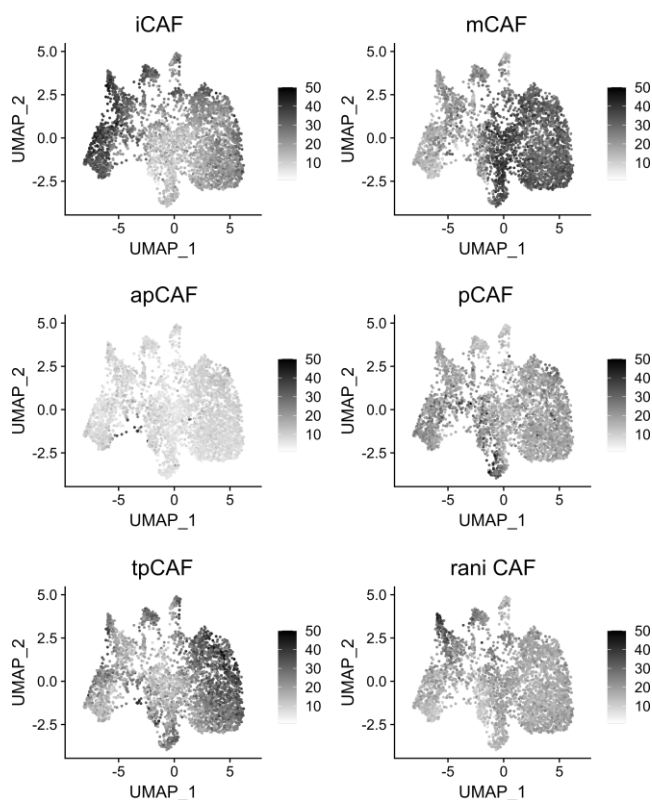
Tablica 1. Biljezi različitih subpopulacija karcinomskih fibroblasta (CAF).

CAF, skupina	Karakteristični biljezi*
CTHRC1 <sup>+</sup> LRRC15 <sup>+</sup> CXCL2 <sup>+</sup>	COL3A1, SFRP2, PRSS23, FAP, TGFBI, PTGER2, IGF2, CDKN1A
MMP11 <sup>+</sup> WNT5A <sup>+</sup>	THY, POSTN, NOTCH3, DIO2, SULF1, PDGFRB, ACTA2, TAGLN, TPM1, ASPN, TGFBI, COL1A2, COL15A1
NPNT <sup>+</sup>	WNT2, FGFR4, BMP5, APOE, FRZB
PI16 <sup>+</sup> LEPR <sup>+</sup>	DCN, RSPO3, C3, C7, SCARA5, SFRP2, SFRP4, CPE, HAS1
PLIN2 <sup>+</sup> CXCL14 <sup>+</sup>	RARRES1, TGFBR2, CXCL12
WNT4 <sup>+</sup>	WT1, TGFBI, KRT8, KRT18, HAS1
CCL21 <sup>+</sup>	CCL19, HLA-DRB5, HLA-DQA1, CXCL9, CXCL13

\* Genska imena predstavljaju HGNC (*The HUGO Gene Nomenclature Committee*) simbole.

Rječnik simbola dostupan je na [www.genecards.org](http://www.genecards.org) (*GeneCards: The Human Gene Database*, v5.14, 03. 01. 2023, Weizmann Institute of Sciences, Rehovot, Izrael).

## 5. REZULTATI



Slika 5. Dvodimenzionalna (UMAP, *Uniform Manifold Approximation and Projection*) reprezentacija genskih potpisa karcinomskih fibroblasta (CAF).

Okomita vrpca kodira intenzitet izražaja. Biljezi upalnih (iCAF), matrisomskih (mCAF), antigen-predočnih (apCAF), pericitnih (pCAF) i protumorskih (tp, *tumor-promoting* CAF) preuzeti su iz (48). Biljezi ranih CAF dostupni su u (50). Svaka točka odgovara jednoj stanici.

Tablica 2. Zastupljenost pojedinih klasa karcinomskih fibroblasta (CAF) u nemikrocelularnom karcinomu pluća (NSCLC) i duktalnom adenokarcinomu gušterače (PDAC, N = broj stanica).

CAF, skupina	NSCLC		PDAC		Ukupno
	N	%	N	%	
CTHRC1 <sup>+</sup> LRRC15 <sup>+</sup> CXCL2 <sup>+</sup>	191	10,6	1614	89,4	1805
MMP11 <sup>+</sup> WNT5A <sup>+</sup>	800	77,4	234	22,6	1034
NPNT <sup>+</sup>	478	99,4	3	0,6	481
PI16 <sup>+</sup> LEPR <sup>+</sup>	311	99,7	1	0,3	312
PLIN2 <sup>+</sup> CXCL14 <sup>+</sup>	155	100	0	0	155
WNT4 <sup>+</sup>	86	100	0	0	86
CCL21 <sup>+</sup>	34	100	0	0	34
Ukupno, sve skupine	2055	52,6	1852	47,4	3907

## 5. REZULTATI

### 5.2. Genski izražaj DIO2 u CAF

Genski izražaj DIO2 zabilježen je u 358 stanica (~ 9 % svih CAF). U cjelini, 87 % svih DIO2<sup>++</sup> CAF pripada NSCLC (313 od ukupno 358 stanica, Tablica 3). Izražaj DIO2 obilježje je prvenstveno dijela MMP11<sup>+</sup>WNT5A<sup>+</sup> miofibroblasta (logFC = 1,28, q = 1,10 x 10<sup>-50</sup>, Slika 3 – 4) iz NSCLC, uz nekolicinu DIO2<sup>+</sup> stanica prisutnih u PI16<sup>+</sup>LEPR<sup>+</sup> i CTHRC1<sup>+</sup>LRRC15<sup>+</sup> populaciji, također u NSCLC. U PDAC, vidljiv je vrlo sporadičan genski izražaj DIO2 u MMP11<sup>+</sup>WNT5A<sup>+</sup> i CTHRC1<sup>+</sup>LRRC15<sup>+</sup> populaciji CAF (Tablica 3). Izražaj drugih dejodinaza nije zabilježen.

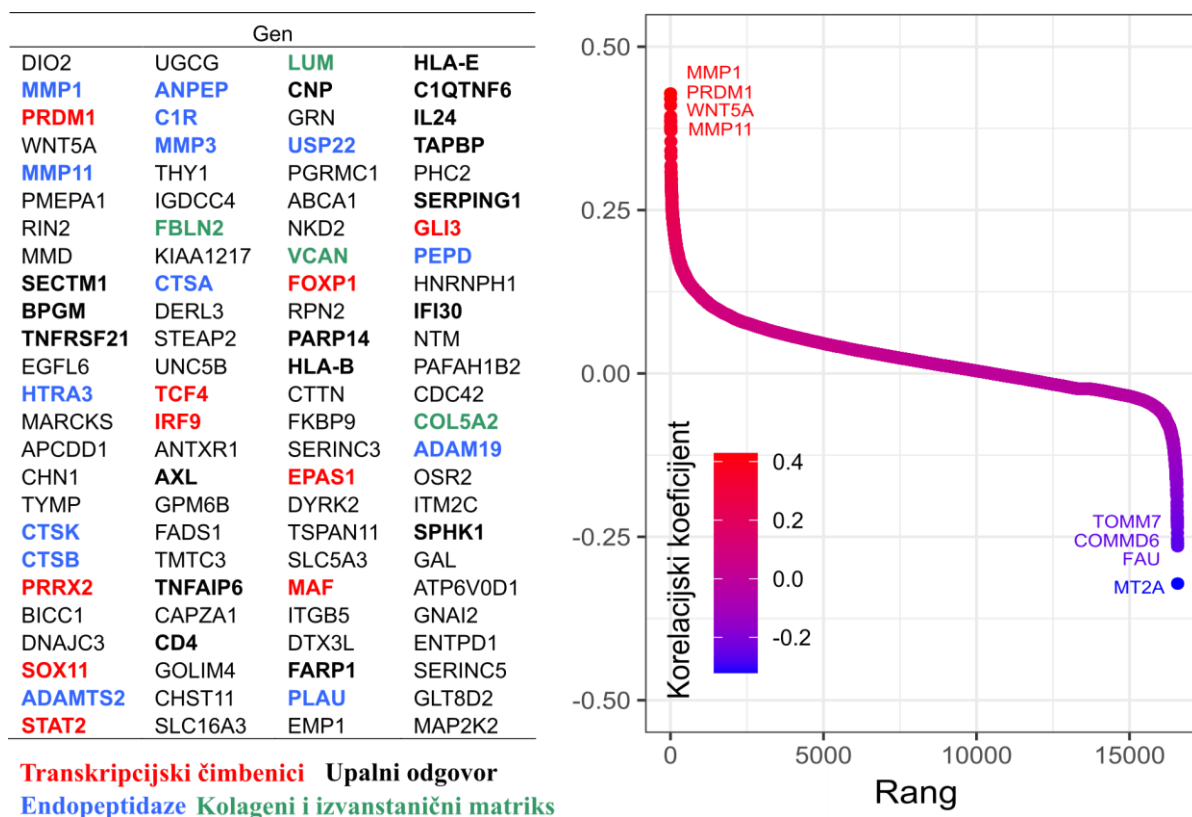
Tablica 3. Apsolutne i relativne frekvencije DIO2<sup>++</sup> stanica (genski izražaj) u pojedinim klasama karcinomskih fibroblasta (CAF).

CAF, skupina	Tkivo	N <sub>DIO2+</sub> /N <sub>UK</sub>	%
CTHRC1 <sup>+</sup> LRRC15 <sup>+</sup> CXCL2 <sup>+</sup>	PDAC	33/1614	2
	NSCLC	25/191	13,1
MMP11 <sup>+</sup> WNT5A <sup>+</sup>	PDAC	12/234	5,1
	NSCLC	<b>231/800</b>	<b>28,9</b>
NPNT <sup>+</sup>	PDAC	0/3	0
	NSCLC	16/478	3,3
PI16 <sup>+</sup> LEPR <sup>+</sup>	PDAC	0/1	0
	NSCLC	38/311	12,2
PLIN2 <sup>+</sup> CXCL14 <sup>+</sup>	PDAC	0/0	-
	NSCLC	1/155	0,6
WNT4 <sup>+</sup>	PDAC	0/0	-
	NSCLC	0/86	0
CCL21 <sup>+</sup>	PDAC	0/0	-
	NSCLC	2/34	5,9

DIO2 dejodinaza tip 2, nemikrocelularni karcinom pluća = NSCLC, duktalni adenokarcinom gušterače = PDAC, N = broj stanica. Konzervativni prag, > 2 očitavanja/stanici.

U sljedećem koraku, genski kontekst koji okružuje izražaj DIO2 u CAF istražen je korelacijskom analizom. Na taj način, definiran je skup funkcionalno koordiniranih gena čiji izražaj slijedi sličan obrazac kao i DIO2 (DIO2 modul, prvih 100 gena). Obzirom na maleni broj DIO2<sup>++</sup> stanica u ostalim klasama CAF, korelacijska analiza fokusirana je na izražaj DIO2 u MMP11<sup>+</sup>WNT5A<sup>+</sup> populaciji (Slika 6).

## 5. REZULTATI

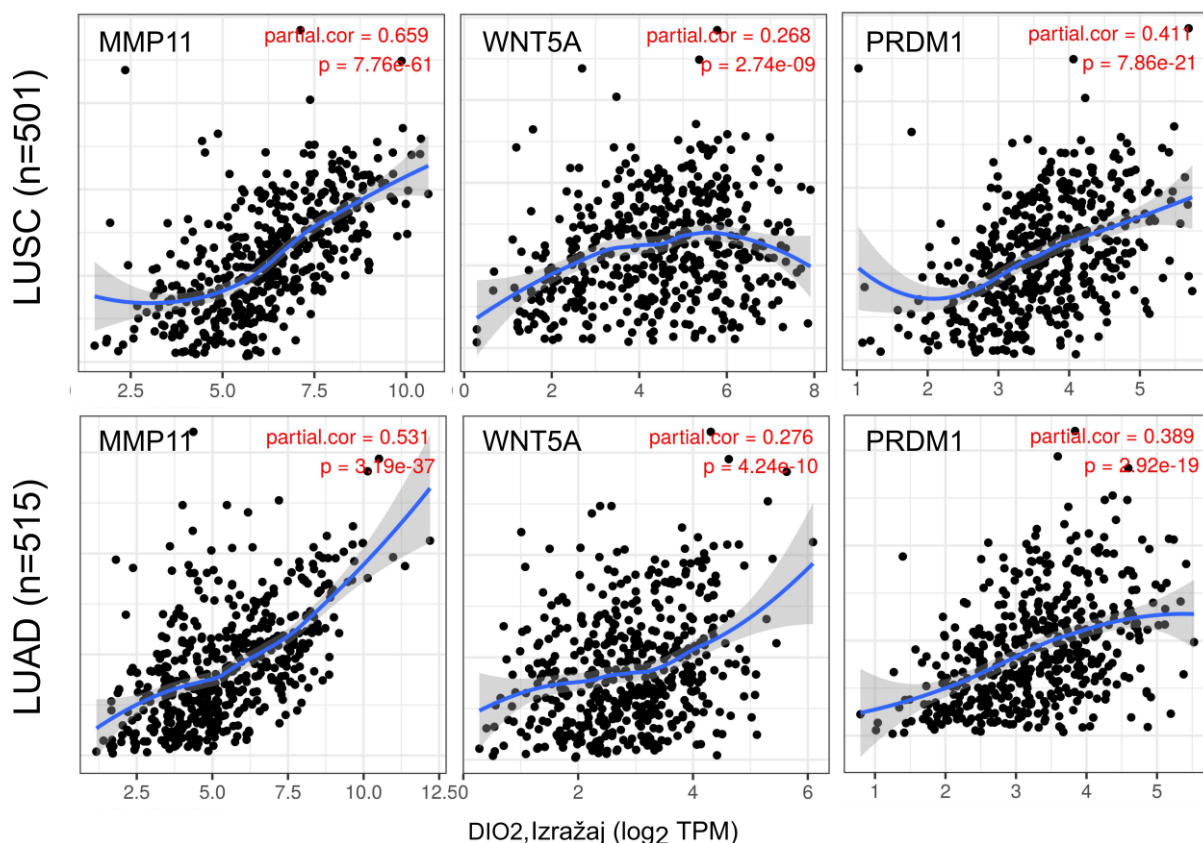


Slika 6. Dejodinaza tip 2 (DIO2), korelirani prijepisi (normalizirani izražaj glasničke RNK, 1 034 stanica, MMP11<sup>+</sup>WNT5A<sup>+</sup> populacija karcinomskih fibroblasta).

Redoslijed gena (padajući popis) odgovara korelacijskom rangu (Pearson  $r \in \{0,226, 0,428\}$ , nominalni  $P \in \{2,2 \times 10^{-47}, 1,7 \times 10^{-13}\}$ , Bonferroni  $P \in \{3,7 \times 10^{-43}, 2,9 \times 10^{-9}\}$ ). Funkcionalni moduli označeni su različitim bojama. Rječnik genskih simbola dostupan je na [www.genecards.org](http://www.genecards.org) (*GeneCards: The Human Gene Database*, v5.14, 03. 01. 2023, Weizmann Institute of Sciences, Rehovot, Izrael).

U ilustrativne svrhe, izabrani primjeri parnih korelacija replicirani su u Slici 7 koristeći podatke cjelogenomskog sekvenciranja tkivne RNK iz TCGA projekta, i to za dvije dominantne histološke kategorije NSCLC: planocelularni karcinom i adenokarcinom pluća. Time je potvrđena robusnost, reproducibilnost i biološko podrijetlo vodećih korelacija iz Slike 6.

## 5. REZULTATI



Slika 7. Parne usporedbe izražaja gena u planocelularnom karcinomu pluća (LUSC) i adenokarcinomu pluća (LUAD, N = broj neovisnih uzoraka, *The Cancer Genome Atlas Program*).

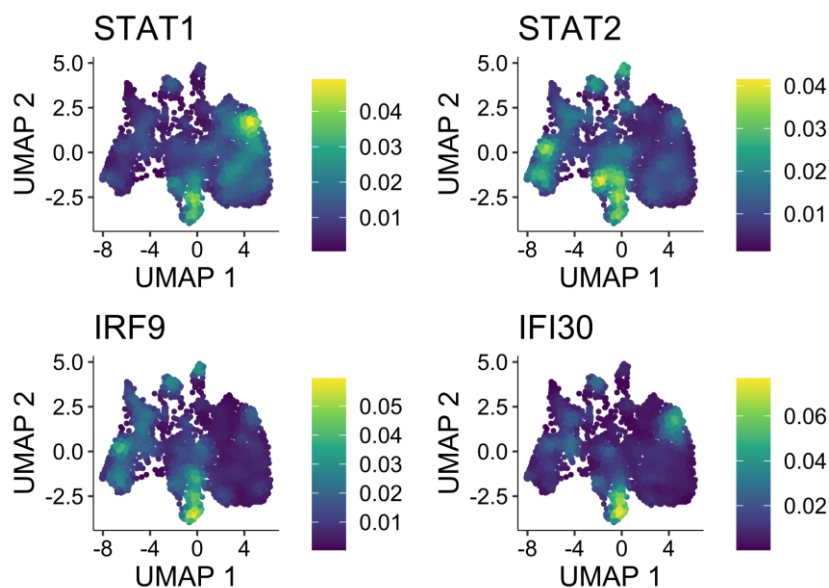
Izbor LUSC i LUAD motiviran je dominantnim prisustvom DIO2<sup>++</sup> CAF i MMP11<sup>+</sup>WNT5A<sup>+</sup> CAF u nemikrocelularnom karcinomu pluća. Parcijalni korelacijski koeficijenti (partial.cor) nakon prilagodbe za tumorsku čistoću (*Tumor Immune Estimation Resource*, <https://cistrome.shinyapps.io/timer>). Dijagrami raspršenja s linijama trenda (plavo) koje su izgladene pomoću LOESS metode (*Local Regression Smoothing*) i 95 % intervalima pouzdanosti (osjenčane vrpce). Rječnik genskih simbola dostupan je na [www.genecards.org](http://www.genecards.org) (*GeneCards: The Human Gene Database*, v5.14, 03. 01. 2023, Weizmann Institute of Sciences, Rehovot, Izrael). Genski izražaj normaliziran je na TPM (*transcript-per-million*).

## 5. REZULTATI

### 5.3. Analiza bioloških puteva u DIO2 modulu

U biološkoj analizi dominira funkcionalna plastičnost DIO2<sup>++</sup> MMP11<sup>+</sup>WNT5A<sup>+</sup> CAF. DIO2<sup>++</sup> frakcija MMP11<sup>+</sup>WNT5A<sup>+</sup> CAF nosi obilježja muralnih (ANPEP, CHN1, FARP1, AXL) miofibroblasta (NKD2, FOXP1, PRDM1, STAT2, WNT5A, STEAP2). U funkcionalnom smislu, genski izražaj DIO2 u ovim stanicama najdosljednije koincidira s kataboličkim fenotipom (FC = 30,4, q = 7,2 x 10<sup>-6</sup>, GO), čije je obilježje prisustvo širokog spektra autokatalitičkih endopeptidaza iz klase kolagenaza (MMP1, MMP3) i stromelizina (MMP3, MMP11), koje zajednički posreduju razgradnju izvanstaničnog matriksa, citokina (TGFβ:HTRA3, pro-IL1β:MMP3) i čimbenika iz puta koagulacije (MMP3, MMP11, PLAU, FC = 10, q = 0,00028, Hallmark). U kontekstu pregradnje matrisoma, osobito se izdvaja izražaj ANTXR1, transmembranskog antraks-toksin receptora koji posreduje endocitozu kolagena tipa I u stromalnim stanicama, i izražaj PEPD, prolidaze koja katalizira završni korak u degradaciji kolagena u prolin. U ovoj skupini nalaze se i druge molekule uključene u građu i funkciju litičkih vakuola, odnosno lizosoma (ukupno 13 gena, FC = 3,46, q = 0,0026, GO; GRN, VCAN, CTSA, DNAJC3, MMD, ITM2C, LUM, CTSK, ATP6V0D1, DTX3L, ANPEP, IFI30). Drugo istaknuto obilježje ovih stanica jesu prijepisi gena upalnog odgovora (q = 4,61 x 10<sup>-17</sup>, Hallmark), tipični za izlaganje interferonu-γ (11 gena, q = 6,8 x 10<sup>-11</sup>, Hallmark), a slijede ih parakrini modulatori (WNT5A, prototipski profibrogeni čimbenik TGFB1). Među prvima, izdvaja se izražaj dva transkripcijska čimbenika, IRF9 i STAT2, koji zajedno sa STAT1 formiraju trimerni ISGF3 kompleks koji kontrolira izražaj interferonskih meta (izražaj STAT1 prisutan je u WNT5A<sup>+</sup>MMP11<sup>+</sup> CAF, ali ne korelira s DIO2, Slika 8). U istu skupinu pripadaju i SERPING1, C1R, IFI30, PARP14, BPGM, TNFAIP6, TAPBP, HLA-B i SECTM1.

## 5. REZULTATI



Slika 8. Dvodimenzionalna (UMAP, *Uniform Manifold Approximation and Projection*) reprezentacija, transkripcijski regulatori (STAT1, STAT2, IRF9) i efektori interferenskog odgovora (IFI30).

Među parakrinim modulatorima, izdvaja se genski izražaj SLC16A3, laktat-proton simportera koji zakiseljava izvanstanični mikrookoliš u glikolitičkim tkivima, i izražaj ENTPD1, ektonukleotidaze koja katalizira ograničavajući korak u konverziji izvanstaničnog adenozin-trifosfata u njegov imunosupresivni katabolit, adenozin. Tu su i WNT5A, regulator epitelnomezehimske tranzicije i matičnosti stanica raka, TGFB1, i DIO2, koja posreduje lokalnu konverziju T4 u T3. Regulatori osmotskog (SLC5A3, Na<sup>+</sup>/inozitol transporter) i hipoksijskog stresa (SLC16A3, EPAS1/HIF-2 $\alpha$ ) također su visoko rangirani u listi koreliranih prijepisa (Slika 6). Na sustavnoj razini, razvidna je snažna zastupljenost brojnih komponenti DIO2 modula u transkripcijskoj arhitekturi invazivnih, uznapredovalih tumora (Tablica 4). U skladu s tim, perturbacije niza spomenutih prijepisa povezane su s dezmozoplazijom (WNT5A), fibroupalnim odgovorom (ANTXR1) i diseminacijskim potencijalom epitelnih neoplazmi (MMP11, PMEPA1, NTM, SLC16A3) (10, 22, 23).

## 5. REZULTATI

Tablica 4. Kemijske i genetske perturbacije (*Chemical and Genetic Perturbations*, CGP, *Human MSigDB Collections*) za skup DIO2<sup>+</sup> koreliranih gena iz Slike 6.

Genski skup (izvorni naziv, [CGP broj])	Opis	N	q
SCHUETZ_BREAST_CANCER_DUCTAL_INVASIVE_VE_UP [352]	Pojačano izraženi geni u invazivnom duktalnom karcinomu dojke u usporedbi s neinvazivnim ( <i>in situ</i> ) duktalnim karcinomom	24	$8,68 \times 10^{-25}$
VECCHI_GASTRIC_CANCER_ADVANCED_VS_EARLY_UP [177]	Razlikovno (pojačano) izraženi geni između dva podtipa raka želuca (uznapredovali vs. rani)	13	$2,16 \times 10^{-13}$
ANASTASSIOU_MULTICANCER_INVASIVENESS_SIGNATURE [64]	Biljezi invazivnosti, kao rezultat interakcije stanica raka s mikrookolišem	10	$2,16 \times 10^{-13}$

DIO2 dejodinaza tip 2, N broj gena, q stopa lažno pozitivnih



### 6. RASPRAVA

Maligne stanice rutinski kooptiraju reaktivne stromalne elemente iz svog neposrednog susjedstva, s kojima potom uspostavljaju metaboličku, imunološku i strukturnu suradnju. Među njima, važno mjesto zauzimaju CAF, heterogena skupina stanica čija funkcionalna akvizicija omogućuje malignim stanicama aktivno upravljanje mikro- i makro- okolišem.

Jedna od funkcija fibroblasta je i upravljanje lokalnim metabolizmom hormona štitnjače u specijaliziranim nišama, poglavito kroz stromalni izražaj DIO2 koja kontrolira konverziju T4 u T3. Sudbina ovog procesa tijekom konverzije fibroblasta u CAF slabo je poznata i uglavnom neistražena.

Koristeći jednostaničnu RNK > 3 900 fibroblasta iz dvije česte neoplazme (NSCLC i PDAC), identificirali smo robusnu, asimetričnu ekspresiju DIO2 u jednoj od ukupno sedam subpopulacija CAF, s jasnom prevagom izražaja u NSCLC. Izražaj DIO2 uglavnom je pronađen u jednoj (MMP11<sup>+</sup>WNT5A<sup>+</sup>) od dvije matrisomske populacije CAF, uz sporadičan ili zanemariv izražaj u aktiviranim CTHRC1<sup>+</sup> CAF, PI16<sup>+</sup>DCN<sup>+</sup> pan-fibroblastima, mezotelnim stanicama, lipofibroblastima i proupalnim CAF. Kolektivno, rezultat podupire koegzistenciju različitih, funkcionalno specijaliziranih CAF u NSCLC i PDAC, potvrđujući izrazitu stromalnu heterogenost unutar i između različitih tumora. Jedan od aspekata ove heterogenosti je i izražaj DIO2, s potencijalno širokim implikacijama na tumorsku biologiju.

U užem smislu, MMP11<sup>+</sup>WNT5A<sup>+</sup> CAF pripadaju skupini miofibroblasta s biljezima adventicijskog sijela. Dio ovih stanica, poglavito u NSCLC, odlikuje se snažnim izražajem DIO2 (ali ne i drugih dejodinaza), što potvrđuje i rezultat ortogonalne validacije RNA-seq analizom 1 016 uzoraka NSCLC iz TCGA atlasa. Katabolički fenotip, osobito razgradnja kolagena s endocitozom i lizosomskom proteolizom kolagenskih fragmenata, vodeće je funkcijsko obilježje ovih stanica, a slijedi ga izražaj morfogena (WNT5A) i prijepisa povezanih s tumorskom invazijom, epitelno-mezenhivskom tranzicijom (TFGβ) i prilagodbom na hipoksijski i osmotski stres. Nadalje, DIO2<sup>+</sup> CAF izrazito su bogati prijepisima gena interferenskog odgovora, u koje potencijalno treba svrstati i DIO2. Naime, robusna indukcija DIO2 opisana je u sinovijalnim fibroblastima nakon izlaganja interferonu-γ i interleukinu-1β (59), a isto vrijedi za još 31 transkript snažno povezan s DIO2 ekspresijom u MMP11<sup>+</sup>WNT5A<sup>+</sup> CAF (npr. HIF-2α, SLC16A3, MMP3, PRDM1, SLC5A3). Takav rezultat upućuje na moguću ulogu upalnog remodeliranja u izražaju DIO2, a podupire ga i slična pojava DIO2 u reaktivnim MMP11<sup>+</sup>TGFB1<sup>+</sup> fibroblastima u još jednom kroničnom upalnom

## 6. RASPRAVA

stanju, idiopatskoj plućnoj fibrozi (60). Potpuni slijed zbivanja nije jasan, ali zajednički, rezultat konzistentno ukazuje na izrazito konzerviran i reguliran proces koji izražaj DIO2 smješta u aberantni plućni mezenhim izložen dugotrajnoj ozljedi i kroničnoj upali (61).

Osim fokusa na dvije neoplazme i skromnog broja stanica, ovo istraživanje ima nekih ograničenja koje svakako treba spomenuti. Prvenstveno, podrijetlo DIO2<sup>+</sup> CAF ostaje nepoznato, stoga nije posve jasno je li izražaj DIO2 u CAF naslijeđe iz ishodišnih fibroblasta ili doista svojstvo stečeno tijekom tranzicije u aberantni mezenhim. Primjerice, u zdravim plućima odraslog čovjeka, koja sadrže najmanje 58 različitih vrsta stanica, DIO2 nalazimo uglavnom u peribronhalnim (DCN<sup>+</sup>COL1A2<sup>+</sup>COL15A1<sup>+</sup>) fibroblastima (62), no veza između ove dvije populacije nejasna je, ako uopće postoji.

Nadalje, je li prisustvo glasničke DIO2 RNK uistinu znak aktivne translacije u DIO2 protein i je li izražaj DIO2 proteina povezan s aktivnom konverzijom T4 u T3? Kamo odlazi novonastali T3: u susjedne stanice ili jezgru CAF? Koje stanice čine neposredno susjedstvo MMP11<sup>+</sup>WNT5A<sup>+</sup> CAF? U prvom slučaju, prisustvo i funkcijska relevantnost DIO2 proteina u stromi tumora već je ranije demonstrirana (36). Također, potvrđen je i sluznički, odnosno stromalni izražaj T3 receptora (TR $\alpha$ ) u tumorskom mikrokolišu (63), zatvarajući signalni krug. U drugom slučaju, DIO2 doista je poznat kao kratkoživući protein, no ubikvitinacija DIO2 (koja upravlja degradacijom i poluživotom DIO2 proteina) paradoksn ovisi o prethodnoj enzimskoj konverziji T4 u T3 i ne pogađa katalitički neiskusni DIO2 dimer (24, 64). Na ovom stupnju, također nije isključena ni nepoznata, nekanonička funkcija DIO2 izvan T3 homeostaze. Prostorna transkriptomika, imunohistokemija i funkcijske studije bit će nužne za jasan odgovor na postavljena pitanja. U ostalim detaljima, treba skrenuti pažnju da relativno oskudan broj DIO2<sup>+</sup> CAF u PDAC ne isključuje njihovo prisustvo. Za definitivni sud potreban je veći broj stanica iz više ljudskih neoplazmi, što će omogućiti i finiji uvid u različita stanična stanja i njihovu kromatinsku arhitekturu. U konačnici, ostaje nejasno u kojoj je mjeri izražaj DIO2 proširen među CAF u drugim neoplazmama, što će svakako biti predmet budućih istraživanja.

U međuvremenu, prikazani rezultati nude preliminarni uvid u identitet DIO2<sup>+</sup> CAF, oslikavajući gene, putove i programe koji karakteriziraju DIO2<sup>+</sup> stromu u plućnoj niši. Pripadni jednostanični atlas genskog izražaja doprinos je raspravi o jednom specifičnom aspektu biologije CAF, koji ilustrira perspektive i otvorena pitanja na sjecištu endokrinologije i tumorske biologije.

## 7. ZAKLJUČAK

### 7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- ❖ Tumorska stroma u nemikrocelularnom karcinomu pluća i duktalnom adenokarcinomu gušterače sadrži različite vrste karcinomskih fibroblasta, čiji broj i sastav variraju između dvije neoplazme.
- ❖ Genski izražaj DIO2 uglavnom je zapažen u NSCLC, i to poglavito u MMP11<sup>+</sup>WNT5A<sup>+</sup> populaciji CAF.
- ❖ MMP11<sup>+</sup>DIO2<sup>+</sup>WNT5A<sup>+</sup> CAF odlikuju se kataboličkim fenotipom, biljezima muralnih stanica i prijeljepima gena interferonskog odgovora.
- ❖ Genski izražaj dejodinaze tipa 2 povezan je s transkripcijskim značajkama invazivnih i uznapredovalih tumora.

### 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Dejodinaza tipa 2 (DIO2) posreduje lokalnu konverziju tiroksina u trijodtironin u stromalnom odjeljku, ali aktivnost DIO2 u tumorskoj stromi nije poznata. U tu svrhu, ispitali smo genski izražaj DIO2 u karcinomskim fibroblastima (CAF) na jednostaničnoj rezoluciji.

**Nacrt studije:** Jednostanični transkriptomski atlas.

**Materijali i metode:** Konstruirali smo stanični atlas CAF visoke rezolucije koristeći javno dostupne podatke sekvenciranja jednostanične RNK za dva tumora, duktalni adenokarcinom gušterače i nemikrocelularni karcinom pluća (NSCLC, Seurat v4 protokol, Harmony algoritam). Nakon identifikacije razlikovno izraženih gena (Wilcoxonov test), provedena je ko-ekspresijska analiza i analiza obogaćenih putova (*Broad Molecular Signatures Database* v7.51).

**Rezultati:** Ukupno je profilirano 3 900 visokokvalitetnih stanica, među kojima je identificirano 7 vrlo različitih vrsta CAF. Ekspresija DIO2 uglavnom je ograničena na WNT5A<sup>+</sup>MMP11<sup>+</sup> CAF u NSCLC, čije su glavno obilježje katabolički fenotip, biljezi muralnih stanica i izražaj gena interferonskog odgovora. Nadalje, rastući izražaj DIO2 u WNT5A<sup>+</sup>MMP11<sup>+</sup> CAF snažno je povezan s transkripcijskim značajkama invazivnih i uznapredovalih tumora.

**Zaključak:** Rezultati nude kratki uvid u biologiju DIO2<sup>+</sup> CAF, pružajući putokaz za razumijevanje staničnih i međuorganskih razlika u aktivnosti DIO2 unutar tumorskog okružja. Neovisna potvrda komplementarnim tehnikama nužna je za validaciju preliminarnih rezultata.

**Ključne riječi:** duktalni karcinom gušterače; jednostanična analiza; karcinomski fibroblasti; neoplazme pluća; 5'-dejodinaza tip 2; profiliranje genskog izražaja; računalna biologija; RNK

### 9. SUMMARY

#### **Type 2 deiodinase gene expression in cancer-associated fibroblasts at single-cell resolution**

**Objectives:** Type 2 deiodinase boosts local conversion of thyroxine to triiodothyronine in stromal compartment, but the activity of DIO2 in tumor-associated stroma remains unknown. To this purpose, we examined the gene expression of DIO2 in cancer-associated fibroblasts at single-cell resolution.

**Study design:** Single-cell transcriptomic atlas.

**Material and methods:** We constructed a high-resolution cellular atlas of CAFs using publicly available single-cell RNA sequencing data for two tumors, pancreatic ductal adenocarcinoma and non-small cell lung cancer (NSCLC Seurat v4 pipeline, Harmony algorithm). The Wilcoxon test was used to identify differentially expressed genes, followed by pathway enrichment profiling (*Broad Molecular Signatures Database v7.51*) and co-expression analysis.

**Results:** In total, 3 900 high-quality cells were profiled, identifying 7 highly diverse CAF types. DIO2 expression was restricted mostly to WNT5A<sup>+</sup>MMP11<sup>+</sup> CAFs from NSCLC, which were characterized by a catabolic phenotype, mural cell markers, and expression of interferon response genes. In addition, increased DIO2 gene expression in WNT5A<sup>+</sup>MMP11<sup>+</sup> CAFs was robustly associated with transcriptional markers of invasive and advanced tumors.

**Conclusion:** The results offer a glimpse into the biology of DIO2<sup>+</sup> CAFs, providing a roadmap for understanding cell-type and organ-specific differences in DIO2 activity across the tumor environment. Independent confirmation by complementary techniques is necessary to validate the preliminary results.

**Key words:** Cancer-Associated Fibroblasts; Carcinoma, Pancreatic Ductal; Computational Biology; Gene Expression Profiling; Lung Neoplasms; RNA; Single-Cell Analysis; type II 5'-deiodinase

### 10. LITERATURA

1. Jukić S, Jukić D, Nola M, Damjanov I. Novotvorine. U: Damjanov I, Jukić S, Nola M, urednici. Patologija. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2008. str. 127-168.
2. Gagliano T, Brancolini C. Epigenetic Mechanisms beyond Tumour–Stroma Crosstalk. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 22; 13(4):914.
3. Šekerija M, Korda K, Čukelj P, Erceg M. Uloga Registra za rak u praćenju epidemiologije raka u Hrvatskoj. *Bilten Hrvatskog društva za medicinsku informatiku (Online)*. 2020;26(2).
4. Buechler MB, Pradhan RN, Krishnamurty AT, Cox C, Calviello AK, Wang AW, i sur. Cross-tissue organization of the fibroblast lineage. *Nature*. 2021 May;593(7860):575-579.
5. Huet E, Jaroz C, Nguyen HQ, Belkacemi Y, de la Taille A, Stavriniades V, i sur. Stroma in normal and cancer wound healing. *FEBS J*. 2019 Aug;286(15):2909-2920.
6. Campbell NE, Kellenberger L, Greenaway J, Moorehead RA, Linnerth-Petrik NM, Petrik J. Extracellular Matrix Proteins and Tumor Angiogenesis. *J Oncol*. 2010;2010:586905.
7. Lohela M, Werb Z. Intravital imaging of stromal cell dynamics in tumors. *Curr Opin Genet Dev*. 2010 Feb;20(1):72.
8. Xu M, Zhang T, Xia R, Wei Y, Wei X. Targeting the tumor stroma for cancer therapy. *Mol Cancer*. 2022 Nov 2;21(1):208.
9. Arima Y, Matsueda S, Saya H. Significance of Cancer-Associated Fibroblasts in the Interactions of Cancer Cells with the Tumor Microenvironment of Heterogeneous Tumor Tissue. *Cancers (Basel)*. 2023 May;15(9):2536.

## 10. LITERATURA

10. Ganguly D, Chandra R, Karalis J, Teke M, Aguilera T, Maddipati R, i sur. Cancer-Associated Fibroblasts: Versatile Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2020 Sep 17;12(9):2652.
11. Plikus MV, Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, i sur. Fibroblasts: origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*. 2021 Jul 22;184(15):3852-3872.
12. Kanzaki R, Pietras K. Heterogeneity of cancer-associated fibroblasts: Opportunities for precision medicine. *Cancer Sci*. 2020 Aug;111(8):2708-2717.
13. Kirk T, Ahmed A, Rognoni E. Fibroblast Memory in Development, Homeostasis and Disease. *Cells*. 2021 Oct 22;10(11):2840.
14. Korsunsky I, Wei K, Pohin M, Kim EY, Barone F, Major T, i sur. Cross-tissue, single-cell stromal atlas identifies shared pathological fibroblast phenotypes in four chronic inflammatory diseases. *Med*. 2022 Jul 8;3(7):481-518.e14.
15. D'Arcangelo E, Wu NC, Cadavid JL, McGuigan AP. The life cycle of cancer-associated fibroblasts within the tumour stroma and its importance in disease outcome. *Br J Cancer*. 2020 Mar 31;122(7):931-942.
16. Sahai E, Astsaturon I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, i sur. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*. 2020 Mar;20(3):174-186.
17. Lendahl U, Muhl L, Betsholtz C. Identification, discrimination and heterogeneity of fibroblasts. *Nat Commun*. 2022 Jun 14;13(1):3409.
18. Han C, Liu T, Yin R. Biomarkers for cancer-associated fibroblasts. *Biomark Res*. 2020 Nov 11;8(1):64.

## 10. LITERATURA

19. Zhang T, Ren Y, Yang P, Wang J, Zhou H. Cancer-associated fibroblasts in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Death Dis.* 2022 Oct 25;13(10):897.
20. Sharma V, Letson J, Furuta S. Fibrous stroma: Driver and passenger in cancer development. *Sci Signal.* 2022 Mar 8;15(724):eabg3449.
21. Davidson S, Coles M, Thomas T, Kollias G, Ludewig B, Turley S, i sur. Fibroblasts as immune regulators in infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol.* 2021 Nov;21(11):704-717.
22. Hu B, Wu C, Mao H, Gu H, Dong H, Yan J, i sur. Subpopulations of cancer-associated fibroblasts link the prognosis and metabolic features of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Transl Med.* 2022 Mar;10(5):262.
23. Louault K, Li RR, DeClerck YA. Cancer-Associated Fibroblasts: Understanding Their Heterogeneity. *Cancers (Basel).* 2020 Oct 24;12(11):3108.
24. Luongo C, Dentice M, Salvatore D. Deiodinases and their intricate role in thyroid hormone homeostasis. *Nat Rev Endocrinol.* 2019 Aug;15(8):479-488.
25. Goemann IM, Marczyk VR, Romitti M, Magagnin Wajner S, Maia AL. Current concepts and challenges to unravel the role of iodothyronine deiodinases in human neoplasias. *Endocr Relat Cancer.* 2018 Dec 1;25(12):R625-R645.
26. Goemann IM, Romitti M, Souza Meyer EL, Magagnin Wajner S, Maia AL. Role of thyroid hormones in the neoplastic process: an overview. *Endocr Relat Cancer.* 2017 Nov;24(11):R367-R385.
27. De Stefano MA, Porcelli T, Schlumberger M, Salvatore D. Deiodinases in thyroid tumorigenesis. *Endocr Relat Cancer.* 2023 May 1;30(5):e230015.



## 10. LITERATURA

28. Sabatino L, Vassalle C, Del Seppia C, Iervasi G. Deiodinases and the Three Types of Thyroid Hormone Deiodination Reactions. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2021 Oct;36(5):952-964.
29. Nappi A, De Stefano MA, Dentice M, Salvatore D. Deiodinases and Cancer. *Endocrinology*. 2021 Apr 1;162(4):bqab016.
30. Grout JA, Sirven P, Leader AM, Maskey S, Hector E, Puisieux I, i sur. Spatial Positioning and Matrix Programs of Cancer-Associated Fibroblasts Promote T-cell Exclusion in Human Lung Tumors. *Cancer Discov*. 2022 Nov 2;12(11):2606-2625.
31. Hanley CJ, Waise S, Ellis MJ, Lopez MA, Pun WY, Taylor Y, i sur. Single-cell analysis reveals prognostic fibroblast subpopulations linked to molecular and immunological subtypes of lung cancer. *Nat Commun*. 2023 Jan 31;14(1):387.
32. Pelka K, Hofree M, Chen JH, Sarkizova S, Pirl JD, Jorgji V, i sur. Spatially organized multicellular immune hubs in human colorectal cancer. *Cell*. 2021 Sep 2;184(18):4734-4752.e20.
33. Hwang WL, Jagadeesh KA, Guo JA, Hoffman HI, Yadollahpour P, Reeves JW, i sur. Single-nucleus and spatial transcriptome profiling of pancreatic cancer identifies multicellular dynamics associated with neoadjuvant treatment. *Nat Genet*. 2022 Aug;54(8):1178-1191.
34. Chijimatsu R, Kobayashi S, Takeda Y, Kitakaze M, Tatekawa S, Arao Y, i sur. Establishment of a reference single-cell RNA sequencing dataset for human pancreatic adenocarcinoma. *iScience*. 2022 Jun 22;25(8):104659.
35. Elyada E, Bolisetty M, Laise P, Flynn WF, Courtois ET, Burkhart RA, i sur. Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Discov*. 2019 Aug;9(8):1102-1123.

## 10. LITERATURA

36. Kojima Y, Kondo Y, Fujishita T, Mishiro-Sato E, Kajino-Sakamoto R, Taketo MM, i sur. Stromal iodothyronine deiodinase 2 (DIO2) promotes the growth of intestinal tumors in *Apc* $\Delta$ 716 mutant mice. *Cancer Sci.* 2019 Aug;110(8):2520-2528.
37. Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med.* 2018 Aug 7;50(8):1-14.
38. Khozyainova AA, Valyaeva AA, Arbatsky MS, Isaev SV, Iamshchikov PS, Volchkov EV, i sur. Complex Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Data. *Biochemistry (Mosc).* 2023;88(2):231-252.
39. Chen G, Ning B, Shi T. Single-Cell RNA-Seq Technologies and Related Computational Data Analysis. *Front Genet.* 2019 Apr 5;10:317.
40. Lavie D, Ben-Shmuel A, Erez N, Scherz-Shouval R. Cancer-associated fibroblasts in the single-cell era. *Nat Cancer.* 2022 Jul;3(7):793-807.
41. Wang S, Sun ST, Zhang XY, Ding HR, Yuan Y, He JJ, i sur. The Evolution of Single-Cell RNA Sequencing Technology and Application: Progress and Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 2;24(3):2943.
42. Hafemeister C, Satija R. Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression. *Genome Biol.* 2019 Dec 23;20(1):296.
43. Korsunsky I, Millard N, Fan J, Slowikowski K, Zhang F, Wei K, i sur. Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony. *Nat Methods.* 2019 Dec;16(12):1289-1296.
44. Traag VA, Waltman L, van Eck NJ. From Louvain to Leiden: guaranteeing well-connected communities. *Sci Rep.* 2019 Mar 26;9(1):5233.

## 10. LITERATURA

45. Becht E, McInnes L, Healy J, Dutertre CA, Kwok IWH, Ng LG, i sur. Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat Biotechnol.* 2018 Dec 3. doi: 10.1038/nbt.4314.
46. Luo H, Xia X, Huang LB, An H, Cao M, Kim GD, i sur. Pan-cancer single-cell analysis reveals the heterogeneity and plasticity of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Nat Commun.* 2022 Nov 4;13(1):6619.
47. Foster DS, Januszyk M, Delitto D, Yost KE, Griffin M, Guo J, i sur. Multiomic analysis reveals conservation of cancer-associated fibroblast phenotypes across species and tissue of origin. *Cancer Cell.* 2022 Nov 14;40(11):1392-1406.e7.
48. Cords L, Tietscher S, Anzeneder T, Langwieder C, Rees M, de Souza N, i sur. A Cancer-Associated Fibroblast Classification Framework for Single-Cell Data. *BioRxiv* 2022.12.14.520398
49. Alquicira-Hernandez J, Powell JE. Nebulosa recovers single-cell gene expression signals by kernel density estimation. *Bioinformatics.* 2021 Aug 25;37(16):2485-2487.
50. McAndrews KM, Chen Y, Darpolor JK, Zheng X, Yang S, Carstens JL, I sur. Identification of Functional Heterogeneity of Carcinoma-Associated Fibroblasts with Distinct IL6-Mediated Therapy Resistance in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov.* 2022 Jun 2;12(6):1580-1597.
51. Lun AT, Bach K, Marioni JC. Pooling across cells to normalize single-cell RNA sequencing data with many zero counts. *Genome Biol.* 2016 Apr 27;17:75.
52. McCarthy DJ, Campbell KR, Lun AT, Wills QF. Scater: pre-processing, quality control, normalization and visualization of single-cell RNA-seq data in R. *Bioinformatics.* 2017 Apr 15;33(8):1179-1186.

## 10. LITERATURA

53. Li T, Fan J, Wang B, Traugh N, Chen Q, Liu JS, i sur. TIMER: A Web Server for Comprehensive Analysis of Tumor-Infiltrating Immune Cells. *Cancer Res.* 2017 Nov 1;77(21):e108-e110.
54. Li T, Fu J, Zeng Z, Cohen D, Li J, Chen Q, i sur. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells. *Nucleic Acid Res.* 2020 Jul 2;48(W1):W509-W514.
55. Dillies MA, Rau A, Aubert J, Hennequet-Antier C, Jeanmougin M, Servant N, i sur. A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. *Brief Bioinform.* 2013 Nov;14(6):671-683.
56. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst.* 2015 Dec 23;1(6):417-425.
57. Luecken MD, Theis FJ. Current best practices in single-cell RNA-seq analysis: a tutorial. *Mol Syst Biol.* 2019 Jun 19;15(6):e8746.
58. Heumos L, Schaar AC, Lance C, Litinetskaya A, Drost F, Zappia L, i sur. Best practices for single-cell analysis across modalities. *Nat Rev Genet.* 2023 Mar 31;1-23.
59. Smith MH, Gao VR, Periyakoil PK, Kochen A, DiCarlo EF, Goodman SM, i sur. Drivers of heterogeneity in synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Nat Immunol.* 2023 Jul;24(7):1200-1210.
60. Kathiriya JJ, Wang C, Zhou M, Brumwell A, Cassandras M, Le Saux CJ, i sur. Human alveolar type 2 epithelium transdifferentiates into metaplastic KRT5+basal cells. *Nat Cell Biol.* 2022 Jan;24(1):10-23.
61. Yu G, Tzouveleakis A, Wang R, Herazo-Maya JD, Ibarra GH, Srivastava A, i sur. Thyroid hormone inhibits lung fibrosis in mice by improving epithelial mitochondrial function. *Nat Med.* 2018 Jan;24(1):39-49.

## 10. LITERATURA

62. Sikkema L, Ramírez-Suástegui C, Strobl DC, Gillett TE, Zappia L, Madisson E, i sur. An integrated cell atlas of the lung in health and disease. *Nat Med.* 2023 Jun;29(6):1563-1577.
63. Bice BD, Stephens MR, Georges SJ, Venancio AR, Bermant PC, Warncke AV, i sur. Environmental Enrichment Induces Pericyte and IgA-Dependent Wound Repair and Lifespan Extension in a Colon Tumor Model. *Cell Rep.* 2017 Apr 25;19(4):760-773.
64. Gereben B, Goncalves C, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. Selective proteolysis of human type 2 deiodinase: a novel ubiquitin-proteasomal mediated mechanism for regulation of hormone activation. *Mol Endocrinol.* 2000 Nov;14(11):1697-1708.

## 11. ŽIVOTOPIS

### 11. ŽIVOTOPIS

#### OSOBNJE INFORMACIJE

Ime i prezime: Mariela Stipetić

Datum i mjesto rođenja: 08. 03. 1994., Ogulin

Adresa: Struga 5, 47 300 Ogulin

Mobilni telefon: 098 162 6938

E-mail adresa: mariela.stipetic@gmail.com

#### OBRAZOVANJE

2000. - 2008. Prva osnovna škola, Ogulin

2008. - 2012. Gimnazija i strukovna škola Bernardina Frankopana, Ogulin

- opća gimnazija

2012. - 2015. Zdravstveno veleučilište Zagreb

- stručni studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika

2021. - ~ Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

- Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

#### RADNO ISKUSTVO

Stručna praksa u sklopu studija: Klinički bolnički centar Zagreb,

Opća bolnica i bolnica branitelja Domovinskog rata Ogulin

2015. - 2016. Stručno osposobljavanje bez zasnivanja radnog odnosa, pripravnički staž,

Klinička bolnica Merkur, Zagreb

2017. - ~ Klinički zavod za patologiju i citologiju, Odjel za aspiracijsku i neginekološku

eksfolijacijsku citologiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb