

Szegedi Tudományegyetem  
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

**A cutan melanoma malignum szöveti biomarkereinek  
vizsgálata a rutin diagnosztikában és a proteomikai  
kutatásban**

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Szadai Leticia

Témavezető: Dr. med. habil. Németh István Balázs Ph.D

Szeged,

2024

## Közlemények jegyzéke

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

**I. Leticia Sz.,** Erika V., Beáta Sz., Natália P. de A., Gilberto D., Lazaro H. B., Jeovanis G., Matilda M.-V., Henriett O., Ágnes Judit J., Maria Del Carmen B.-A., Lajos K., Bo B., Johan M., Peter H., A Marcell Sz., István Balázs N., György M.-V. Deep Proteomic Analysis on Biobanked Paraffine-Archived Melanoma with Prognostic/Predictive Biomarker Read-Out. *Cancers (Basel)* (2021) Dec 3;13(23):6105. doi: 10.3390/cancers13236105. **IF:6.575** (Folyóirat szakterület: Scopus - Oncology, SJR indikátor: Q1)

**II. Leticia Sz.,** Jéssica de S. G., Nicole W., Natalia P. de A., Ágnes J., Ahmed R., Ferenc K, András K., Ede M., Guihong W., Nga N., Henriett O., Roger A., Fábio N., Gilberto D., Kun-Hsing Y., Yevgeniy R. S., Johan M., Melinda R., Elisabet W., David F., Lajos K., Peter H., István B. N., György M.-V., Jeovanis G., Mitochondrial and Immune Response Dysregulation in Melanoma Recurrence. *Clinical and Translational Medicine. Clin Transl Med.* 2023 Nov;13(11): e1495. doi: 10.1002/ctm2.1495. **IF:7.9** (Folyóirat szakterület: Scopus – Medicine (miscellaneous), SJR indikátor: D1)

### Egyéb közlemények:

**III. István N.B., Leticia Sz.,** Ágnes J.J., Zsuzsanna Ú., Tibor P., György M.-V., Lajos K., Erika V., A molekuláris biológiai módszerek dermatopatológiai vonatkozásai. *BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI SZEMLE*, 2022, 98. ÉVF.3.152–158.DOI 10.7188/bvsz.2022.98.3.7.

**IV. Erika V., Leticia Sz.,** Qimin Z., Yonghyo K., Indira P., Aniel S., Roger A., Henriett O., Matilda M.-V., Boram L., Ho J. K., Johan M., Attila M. Sz., Jeovanis G., Lazaro H. B., István B. N., György M.-V. A biobanking turning-point in the use of formalin-fixed, paraffin tumor blocks to unveil kinase signaling in melanoma. *Clin Transl Med.* 2021 Aug;11(8):e466. doi: 10.1002/ctm2.466.

**V. Lazaro H. B., Jeovanis G., Aniel S., Viktória D., Magdalena K., Jimmy R. M., Erika V., Uğur Ç., Yonghyo K., Yutaka S., Indira P. P., Beáta Sz., Roger A., Elisabet W., Charlotte W., Natália P. de A., Nicole W., Matilda M.-V., Jonatan E., Krzysztof P. , Bo B., Christian I., Håkan O., Lotta L., Henrik L., Henriett O., Boram L., Ethan B., Marie S., Carina E., Dasol K., Ho J. K., Beatrice K.,**

Melinda R., Johan M., Runyu H., Peter H., A Marcell Sz., József T., Sarolta K., Peter H., Tasso M., Toshihide N., Harubumi K., Erik S., Madalina O., Ken M., Francesco F., Quimin Z., Gilberto B D., Luciana P., Fábio C S N., **Leticia Sz.**, István B. N., Henrik E., David F., György M.-V. The Human Melanoma Proteome Atlas-Complementing the melanoma transcriptome. Clin Transl Med. 2021 Jul;11(7):e451. doi: 10.1002/ctm2.451. **IF:8.554** (Folyóirat szakterülete: Scopus – Medicine (miscellaneous),SJR indikátor: Q4)

**VI.** Lazaro H. B., Jeovanis G., Yonghyo K., Viktória D., Uğur Ç., Aniel S., Jimmy R. M., Magdalena K., Indira P. P., Yutaka S., Roger A., Elisabet W., Charlotte W., Erika V., Natália P. de A., Nicole W., Matilda M.-V., Krzysztof P., Jonatan E., Beáta Sz., Bo B., Christian I., Håkan O., Lotta L., Henrik L., Henriett O., Boram L., Ethan B., Marie S., Carina E., Dasol K., Ho J. K., Beatrice K., Melinda R., Runyu H., Peter H., Tasso M., Toshihide N., Harubumi K., Erik S., Madalina O., Ken M., Francesco F., Qimin Z., Gilberto B. D., Luciana P., Fábio C.S. N., Peter H., **Leticia Sz.**, József T., Sarolta K., Marcell A. Sz., Johan M., Dávid F., Henrik E., István N. B., György M-V., The human melanoma proteome atlas-Defining the molecular pathology. Clin Transl Med. 2021 Jul;11(7):e473. doi: 10.1002/ctm2.473. **IF:8.554** (Folyóirat szakterülete: Scopus – Medicine (miscellaneous), SJR indikátor: Q4)

**VII.** **Leticia Sz.**, Aron B., Indira P. P., Alexandra L., Dorottya P., Anna S. L., Natália P de A., Ágnes J. J., Fábio N., Beata Sz., Viktória D., Nicole W., Jéssica G., Zsuzsanna U., Zoltán G. P., Tibor P., Yonghyo K., Balázs Gy., Bo B., Charlotte W., Marcell A. Sz., Lazaro B., Jeovanis G., Roger A., Ho J. K., Sarolta K., Magdalena K., Jimmy R. M., István B. N., Johan M., David F., Krzysztof P., Peter H., Elisabet W., Lajos V. K., Gilberto D., György M-V., Aniel S. Predicting immune checkpoint therapy response in three independent metastatic melanoma cohorts. Front. Oncol. 2024, 14:1428182. doi: 10.3389/fonc.2024.1428182. **IF:3.5** (Journal specialization: Scopus - Oncology SJR indicator: Q2)

## 1. Bevezetés

### 1.1. A melanoma malignum kezelése a betegellátásban

A melanoma malignum (MM) a bőrrákos okozta halálesetek 80%-ért felelős és magas kezelési költségekkel járó kihívások elé állítja az egészségügyi rendszert. A klinikai felismerés és a szövettani vizsgálat alapján történő korai diagnózis, döntő fontosságú. Az áttétek felismerése és a klinikai stádiumbeosztás az American Joint Committee on Cancer nyolcadik kiadásának (AJCC8) irányelvei szerint elengedhetetlen a terápia megkezdése előtt. Ami a melanoma terápiás lehetőségeit illeti, a kináz és immun *checkpoint* gátlók alkalmazása a sejtproliferáció gátlásával és a lymphocyták aktiválásával forradalmasította a melanoma kezelését az elmúlt 10 évben. Azonban a terápia rezisztencia és a toxicitás, beleértve az immun-kapcsolt mellékhatásokat, továbbra is kihívást jelent.

### 1.2. A prognosztikai és prediktív biomarkerek szerepe

A fehérjék, mint biomarkerek egyre nagyobb jelentőséggel bírnak a betegségek kimenetelének előrejelzésében. Központi szerepet játszanak a különböző kórképekben, mint például az autoimmun betegségek, a gyulladások és a rákos megbetegedések diagnosztikájában és azok nyomon követésében. A prosztata-specifikus antigén például segít a lokalizált prosztatarák kimutatásában, a magas tiroglobulin szint pedig előre jelzi a pajzsmirigydaganat kiújulását. Az elmúlt évtizedben olyan biomarkerek, mint a Breslow szint, a vér laktát-dehidrogenáz szint, a génmutációk (pl. MITF, CDKN2A) és az immunsejtek denzitása ígéretesnek bizonyultak a melanoma progressziójának előrejelzésében, de nem standardizálhatók és kevésbé pontosak. A melanoma szövettanában a biomarkerek prognosztikai és prediktív funkciókat is betölthetnek. A BRAF mutáció fontos biomarkerként szolgál melanomában. A mutáció főként a BRAF gén V600-as pozíciójában fordul elő (pl. V600E, V600K, V600R, V600D) és központi szerepet játszik a kezelés kiválasztásában is. A DNS-alapú PCR analízis, annak ellenére, hogy időigényes és költséges, továbbra is a mutáció kimutatás elsőként választandó módszere. Van alternatív módszer, mint például a fehérjealapú immunhisztokémiai (IHC) festés a VE1 klón antitesttel, amely költséghatékony és hozzáférhető lehetőséget kínál a mutáns BRAF fehérjék kimutatására. Minimális tumortartalmat igényel, és megőrzi a fehérjeintegritást. Az IHC festés értékes információt nyújt a tumor szövetéről kiegészítve a PCR-elemzést a diagnosztikai értékelésben. Ez a tézis részben e két módszer diagnosztikus eredményeinek az összehasonlítását vizsgálja.

A terápiás választ illetően ismert, hogy a melanoma mutációs terhe és immunogén jellege miatt nagyobb a valószínűsége annak, hogy olyan mutáns fehérjék keletkeznek, amelyek neoantigénekként szolgálhatnak, és ezáltal fokozzák az immunogenitást. Ezek a mutáns fehérjék szintén hozzájárulhatnak a terápiás válasz előrejelzésében. Napjainkban a prognózis leírásában fontos szerepet játszik a mesterséges intelligencián alapuló digitális patológia, amely a gépi tanulás és a mélytanulás algoritmusait alkalmazó vizsgálatok alapján a betegség kiújulásának a kockázatát és a túlélést előrejelezheti. Továbbá a proteomikai vizsgálatok formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) melanoma minták segítségével betekintést nyújthatnak a tumor mikrokozmoszába és az ott zajló progressziót segítő mechanizmusokba. Összeségében megállapíthatjuk, hogy a melanoma molekuláris jellemzőinek olyan újszerű módszerekkel történő megismerése, mint a kvantitatív proteomikai, illetve az AI-vezérelt képalkotással végzett digitális patológiai vizsgálatok, lehetőséget adhatnak személyre szabott kezelési lehetőségekre és jobb terápiás eredményekre.

## 2. Célok

Kutatócsoportunk prediktív és prognosztikai célú biomarkerek formalinnal fixált, paraffinba ágyazott melanoma mintából történő azonosításával foglalkozik, új módszerek segítségével. A projekt keretében a következő céljaink voltak: (i) Két diagnosztikai eszköz, a PCR technika és az IHC festés, összehasonlítása a BRAF mutáció kimutatása céljából a rutin diagnosztikában. (ii) Prediktív fehérjék azonosítása átfogó kvantitatív proteomikai vizsgálattal FFPE melanoma mintákon a terápiára adott válasz előrejelzése céljából. (iii) Prognosztikus fehérjék kimutatása AI-alapú digitális patológia és kvantitatív proteomikai módszer segítségével 12 korai stádiumú primer melanomában a progresszió előrejelzése céljából.

## 3. Anyagok és módszerek

A BRAF kimutatási vizsgálat és a prediktív **(I. közlemény)**, prognosztikus biomarker **(II. közlemény)** vizsgálatok alapján az alábbiakban összefoglalom e tanulmányok anyagát és módszereit.

### 3.1. A tézisben szereplő tanulmányok munkafolyamatai

A BRAF kimutatási vizsgálatunkban 94 FFPE melanoma mintát retrospektíve gyűjtöttünk klinikai adatokkal, beleértve a BRAF mutációkra vonatkozó PCR adatokat is. Ezeket a mintákat VE1 ellenanyaggal megfestettük a BRAF mutált fehérje kimutatása céljából. Azok a minták,

amelyek PCR negatívak voltak a BRAF mutációkra, de diffúz pozitív festődést mutattak intratumorális heterogenitással, kvantitatív PCR vizsgálatot végeztünk. A BRAF mutációra PCR negatív, de fokálisan pozitív festődést mutató mintákon újgenerációs szekvenálás (NGS) analízist végeztünk. Ezt követően az eredményeket összesítettük. A prediktív biomarker vizsgálatban (**I. közlemény**) 90 FFPE melanoma mintát retrospektíve gyűjtöttünk az onkológiai gondozás során nyert klinikai adatokkal együtt. A mintákat szövettani és nagyfelbontású tömegspektrometriás proteomikai vizsgálatoknak vetettük alá. Végül az eredményeket kielemeztük. A prognosztikai biomarker vizsgálatba (**II. közlemény**) hat korai stádiumú recidivált és hat korai stádiumú nem recidivált FFPE melanoma mintát vontunk be. A mintákból hematoxilin és eozin (H&E) festéssel metszetek készültek, amelyeket AI-alapú topográfiai képelemzéssel vizsgáltunk, hogy digitális patológiai profilt hozzunk létre az egyes metszeteknek, ezzel automatikusan azonosítva és kijelölve a tumor és stróma területeket. Az annotált metszeteken lézeres mikrodisszekciót alkalmaztunk a tumor és stróma sejtek kinyerésére és a későbbi kvantitatív proteomikai vizsgálatokhoz. Végül a bioinformatikai és a proteomikai adatok biológiai értelmezését összesítettük.

### **3.2. Betegcsoportok**

A BRAF kimutatási vizsgálatban 94 melanoma mintát gyűjtöttünk 94 betegről. A vizsgálatba olyan archivált FFPE szövetblokkokat választottunk, amelyek BRAF immunhisztokémiai festéssel és DNS-alapú BRAF mutációs státusszal rendelkeztek. A prediktív biomarker vizsgálatba (**I. közlemény**) 53 primer és 37 metasztatikus FFPE melanoma mintát vontunk be. A **II. közlemény** 12 primer melanomában szenvedő betegre terjedt ki. Valamennyi minta korai stádiumú, a diagnózis felállításakor AJCC8 IA-IIA stádiumba sorolt betegektől származott. A három vizsgálat mintáit klinikai adatokkal (mint a nem, a primer melanoma diagnózisakor betöltött életkor, a szövettani paraméterek, a terápiára adott válasz és a túlélési adatok) együtt a Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika adatbázisából retrospektíve gyűjtöttük.

### **3.3. Molekuláris elemzés a BRAF kimutatási vizsgálatban (PCR Sanger szekvenálással, NGS, qPCR)**

A BRAF V600 mutációk PCR analízisét FFPE mintákon végeztük Sanger szekvenálási technikával. DNS-izolálással és PCR-amplifikációval azonosítottuk a BRAF gén mutációit (V600E, V600K, V600R, K601E). Az IHC-vel azonosított fokálisan pozitív esetek részletes mutációelemzéséhez új generációs szekvenálást (NGS) alkalmaztunk, amely a következő lépéseket

foglalta magába: extrakció, könyvtárépítés és variánshívás FFPE szövetmintákból. Az IHC-vel azonosított intratumorális és diffúz pozitív esetekben további mutációelemzéshez qPCR-t alkalmaztunk, amely a DNS izolálásának, a BRAF mutáns allél kimutatásának és a mutációs státusz kiszámításának lépéseit foglalta magába.

### **3.4. Immunhisztokémiai validálás**

A **I. és II. közleményben** az archivált FFPE szövetmintákat protokoll szerint metszettük és festettük meg hematoxilinnal és eozinnal (H&E), a BRAF kimutatási vizsgálatban pedig további immunhisztokémiai (IHC) festést alkalmaztunk BRAF VE1 monoklonális antitesttel. A BRAF IHC tekintetében különböző festési mintákat figyeltünk meg, beleértve a diffúz negatív, diffúz pozitív, diffúz pozitív intratumorális heterogenitású, valamint fokálisan pozitív eseteket. A vizualizáláshoz nagy affinitású polimer alapú, alkalin foszfatázhoz kötött másodlagos antitestet használtunk vörös kromogén vagy specifikus HRP-alapú Dab kromogén festéssel. Végül a tárgylemezeket a BRAF kimutatási vizsgálatban és a prediktív (**I. közlemény**), prognosztikus biomarker (**II. közlemény**) vizsgálatokban egy automatizált metszet szkennelőbe (3D Histech Kft., Budapest, Magyarország) helyeztük a szkenneléshez.

### **3.5. Digitális patológia és lézeres mikrodisszekció a II. közleményben**

A H&E-festett FFPE szöveti metszetek képelemzésére mélytanulási és gépi tanulási algoritmusokat használtunk. Az integratív képelemzést a Biological Image Analysis szoftver (BIAS, v. 1.1.1.1, Single-Cell Technologies) segítségével végeztük, amely magába foglalta a kép előfeldolgozását, a mélytanuláson alapuló képszegmentálást, a funkció kinyerést és a szövetrészek kategorizálására szolgáló gépi tanulási eszközöket. A tumor és a stróma tartalmát annotációs és szegmentációs módszerek segítségével különböztettük meg. Az előzetesen annotált tumor- és strómális sejteket automatizált lézeres mikrodisszekcióval izoláltuk, és az izolált sejteket kvantitatív proteomikai vizsgálatnak vetettük alá.

### **3.6. Proteomikai analízis a minta előkészítésével, tömegspektrometrián alapuló elemzéssel, adatelemzéssel az I. és II. közleményben**

Az **I. közleményben** a minta előkészítési protokoll magába foglalta a deparaffinizálást, a fehérjeextrakciót, a fehérje emésztést, az LC/MS-MS elemzést és az adatbázis keresést adatfüggő adatgyűjtési (DDA) móddal. A proteomikai adat keresésre UniProt humán adatbázist és

spektrumkönyvtárakat használtunk a szükséges korrekcióval. A **II. közleményben** mikrodisszekált szövetminták proteomikai elemzését az adatfüggetlen adatgyűjtési módszerrel (DIA) végeztük el. Majd, a DIA neurális hálózati szoftver a fehérje adatbázisok keresését végezte. Az adatokat a Perseus platform segítségével dolgoztuk fel, és a fehérje értékeket log<sub>2</sub>-transzformáltuk, majd a mintában azonosított összes fehérje mediánjával korrigálva normalizáltuk az értékeket, akárcsak az **I. közleményben**.

### 3.7. Proteomikai adatok hozzáférhetősége és statisztikai elemzés

Az **I. közlemény** proteomikai adatainak normalizálása és a korrekciós adatok elemzésének a leírása online elérhető a következő linken: [https://github.com/bszeitz/MM\\_pilot](https://github.com/bszeitz/MM_pilot). A túlélési és proteomikai adatok elemzéséhez különböző statisztikai módszereket alkalmaztunk, többek között Kaplan-Meier túlélési analízist, Pearson Chi<sup>2</sup> tesztet keresztábrával, Cox-regressziós túlélési analízist és géncsoport dúsulási analízist (GSEA). Az alfa értékeket 0,05-re állítottuk be, és a 0,05-nél kisebb p-értékeket szignifikánsnak tekintettük. A statisztikai elemzésekhez és az adatok vizualizálásához a GraphPad Prism, az SPSS, a STRING, a Cytoscape és az RStudio programokat használtuk.

### 3.8. Etikai engedélyek

A három vizsgálatot a svéd biobankokról szóló törvények, a Helsinki Nyilatkozat iránymutatásai és előírásai szerint végeztük, és a magyar Emberi Erőforrások Minisztériuma, továbbá az Országos Tisztifőorvosi Feladatokért Felelős Helyettes Államtitkárság Egészségügyi Igazgatási Főosztályának főosztályvezetője hagyta jóvá. A protokoll kódja MEL-PROTEO-001, a jóváhagyás száma 4463-6/2018/EÜIG, a jóváhagyás keltezése 2018. március 12. A legutóbbi módosítások jóváhagyási számai: 2852-5/2023/EÜIG (2023. február 10.) és 2852-10/2023/EÜIG (2023. július 12.).

## 4. Eredmények

A BRAF kimutatási vizsgálat és a prediktív (**I. közlemény**), prognosztikus biomarker (**II. közlemény**) vizsgálatok alapján az alábbiakban összefoglalom a tanulmányok eredményeit.

### 4.1. A BRAF kimutatási vizsgálat eredményei

Az előrehaladott melanomák kezelésében fontos a melanoma részletes jellemzőinek a meghatározása, mint például a BRAF mutációs státusz, amely elengedhetetlen a *target* terápia elindítása szempontjából. Vizsgálatunk célja két diagnosztikai módszer, a DNS-alapú polimeráz láncreakció (PCR) és a fehérjealapú immunhisztokémia (IHC) összehasonlítása volt a BRAF



mutáció kimutatása céljából. Beteganyagunkban a Sanger-szekvenálás 94 mintából 43 esetben mutatott ki BRAFV600 mutációt, túlnyomórészt BRAFV600E mutációt. Ezzel párhuzamosan mind a 94 FFPE mintából származó tárgylemezt VE1 antitesttel festettük. A PCR analízis azonban további mutációkat azonosított, mint a V600K, V600R és K601E mutációk, amelyeket a BRAFV600E mutáns fehérjére specifikus VE1-klón nem mutatott ki. Ezért ezeket az eseteket mind az immunhisztokémiai eredményekből, mind a specificitási és szenzitivitási értékekből kivettük. A VE1 antitest festődési mintázata alapján négy csoportba soroltuk a mintákat, amelyeknek nagyjából egyharmada diffúz negatív vagy nagyon gyenge festődést mutatott, míg 32 esetben diffúz pozitív festődést, 8 esetben diffúz pozitív festődést intratumorális heterogenitással, és 11 esetben pedig fokális pozitív festődést láttunk. A PCR és az IHC módszerek között szignifikáns eltérés mutatkozott (Pearson Chi-négyzet teszt,  $p < 0,05$ ). Az összehasonlító elemzés a BRAFV600E IHC-n keresztüli kimutatásának 100%-os érzékenységét mutatta 63%-os specificitás mellett, 63%-os pozitív és 100%-os negatív prediktív értékekkel. Eredményeink validálása érdekében további molekuláris elemzéseket végeztünk. A V600E mutáns fehérje fokális expresszióját mutató PCR-negatív esetek újgenerációs szekvenálása (NGS) kilencből egy mintában BRAF D594N aberrációt mutatott ki. A valós idejű polimeráz láncreakció (qPCR), a PCR negatív és intratumorális heterogenitással diffúz pozitivitást mutató nyolc eset közül csak egy esetben igazolta a BRAFV600E mutáció jelenlétét, három eset pedig határvonalon lévő eredményt adott.

#### **4.2. A prediktív biomarker vizsgálat eredményei (I. közlemény)**

A prediktív biomarker vizsgálatunkban (I. közlemény) az immunterápiára adott választ előrejelző potenciális fehérjék feltárására törekedtünk. Klinikai és globális proteomikai expressziós adatok felhasználásával 77 beteg 90 mintáját elemeztük. A betegeknél a progressziómentes túlélés (PFS) alapján azonosítottuk az immunterápiára adott válasz potenciális prediktív biomarkereit. Többszörös Cox-regressziós modelleket készítettünk, amelyek jelentős összefüggéseket mutattak a fehérjeexpresszió és a túlélés között (többszörös Cox-regresszió  $p$ -értéke  $< 0,05$ ) az immunterápiát kapott betegeknél. A fehérjék funkcionális elemzése különböző útvonalakat emelt ki, amelyek a különböző PFS időtartamhoz kapcsolódtak. Azoknál a betegeknél, akiknél immunterápia adását követően rövidebb progressziómentes túlélés volt detektálható, olyan fehérjék mutattak fokozott expressziót, mint a sejtes és metabolikus folyamatokban kifejeződő VEGFA-VEGFR2 útvonal (KEGG útvonal adatbázis, FDR  $< 0,05$ ). A VEGFA-VEGFR2 útvonalhoz kapcsolódóan a NOS3 csökkent expressziója az immunterápia kezelést követően hosszabb

PFS-t mutató betegeknél volt megfigyelhető (Cox-regressziós teszt  $p < 0,05$ ). Emellett azoknál a betegeknél, akiknél a tumor nem válaszolt az immunterápiára (azaz néhány hónap után progresszióba kerültek), az RNS-splicing mechanizmusokban szerepet játszó fehérjék, például az SNRPB2, SNRNP70 és SNRPA1 (GO Biológiai Folyamatok, FDR  $< 0,05$ ) fokozott expressziója volt észlelhető. Azonosítottunk olyan fehérjéket is, mint az extracelullaris mátrixhoz és az immunrendszerhez kapcsolódó fehérjék, amelyek fokozott kifejeződést mutattak (KEGG útvonal, adatbázis, GO Biológiai Folyamatok, FDR  $< 0,05$ ) olyan betegeknél, akiknél az immunterápia adását követően hosszabb progressziómentes túlélés volt detektálható. Ugyanebben a betegcsoportban, a neutrophil degranulációban (pl. PNP (purin-nukleozid-foszforiláz), FTH1 (ferritin nehéz lánc 1)), immunregulációban (pl. ADAM17 (ADAM metallopeptidáz domén 17)), ECM-receptor kölcsönhatásban (pl. AGRN (Agrin) fehérje), az integrin sejtfelszíni kölcsönhatásokban és a sejtadhézióban (pl. ICAM2, COL4A2 és COL6A2 fehérjék) részt vevő fehérjék szignifikánsan fokozott kifejeződést mutattak.

### **4.3. A prognosztikai biomarker vizsgálat eredményei (II. tanulmány)**

Ebben a tanulmányban 12 korai stádiumú primer melanoma (AJCC8 IA-IIA a diagnóziskor) mintájának proteomikai vizsgálatát végeztük el, hogy feltárjuk a betegség kiújulásához kapcsolódó molekuláris és szövettani markereket. A mintákat két csoportra osztottuk: az 5 éven belül recidiváló ( $n = 6$ ) és az 5 éven belül nem recidiváló ( $n = 6$ ) melanoma mintákra. A szövettani értékelésünk korrelációt mutatott a tumor vastagsága (Breslow- és Clark-index, Mann–Whitney U teszt:  $p = 0,0022$ ) és a kiújulás között. Továbbá a klinikai stádiumok (IA-IIA) (Fisher exakt teszt:  $p = 0,0606$ ) is hatással voltak a kiújulásra. A kvantitatív proteomikai vizsgálat előtt az FFPE melanoma minták tumor és strómális sejtjeinek izolálását lézeres mikrodisszekcióval végeztük el, digitális patológia segítségével. AI-alapú digitális patológiai (AI-DP) analízist használtunk, amely mélytanulási és gépi tanulási algoritmusokat integrált a tumor és stróma sejtek pontos azonosítására a korai stádiumú primer melanomák szövettani képeiből. A betanítást és optimalizálást követően az algoritmus pontosan azonosította a tumor- és stróma régiókat, valamint a normális epidermiszt, dermiszt, mirigyeket és kötőszöveteket. Összességében mintegy 80%-os szegmentálási pontosságot ért el. Ezt követően lézeres mikrodisszekciót alkalmaztunk a tumor és a stróma elkülönítésére a kvantitatív proteomikai vizsgálat számára. HR-DIA-MS segítségével átfogó proteomikai vizsgálatot végeztünk, amely során az összes mintában több mint 7000 fehérjét azonosítottunk. A hierarchikus klaszterezés és a PLS-DA analízis egyértelmű proteomikai

különbségeket mutatott ki a tumor és a stróma között a két csoportban. A strómális fehérjék kifejeződése differenciáltabb volt a tumoros régiókhoz képest a két csoport között. A recidiváló és a nem recidiváló melanoma sejtek közötti proteomikai különbségeket tovább vizsgáltuk a GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) segítségével. A recidiváló melanoma sejtekben a mitokondriális transzlációs útvonalak és fehérjék (például ADP/ATP transzlokáz (ANT1, ANT2, and ANT3), MCAM, HNRNPA1), továbbá olyan metabolikus útvonalak fokozott expressziója volt látható, mint az oxidatív foszforiláció és a TCA-ciklus, míg a nem recidiváló melanoma sejtekben az immunválaszhoz kapcsolódó útvonalaknál mutatkozott fokozott expresszió (FDR, q-value < 0.05). Emellett, a recidiváló melanoma sejtekben az immunválaszban fontos szerepet betöltő fehérjék csökkent expresszióját is észleltük. Továbbá a nem recidiváló melanomák nagyobb mértékben fejeztek ki olyan fehérjéket, amelyek az extracelluláris mátrixban, a mitofágiában, az adaptív immunitásban és a korai immunválaszban is szerepet játszanak (FDR, q-value < 0.05). A recidiváló és a nem recidiváló melanomák strómális sejtjei között a funkcionális útvonal analízis különböző fehérje mintázatokat azonosított. A mitokondriális transzláció jelentős expressziót mutatott mind a recidiváló melanomák tumorsejtjeiben, mind a strómális sejtekben (FDR, q-value < 0,05). A recidiváló melanomákban a strómális sejtek olyan útvonalakban mutattak fokozott kifejeződést, mint az epitheliális-mesenchymális átmenet és a PD-1 jelátvitel, összehasonlítva a nem recidiváló csoport strómális sejtjeivel (FDR, q-value < 0.05). Ezzel szemben a nem recidiváló melanomák strómális sejtjei a recidiváló esetekhez képest nagyobb arányban mutattak ki olyan fehérje jelutakat, mint az interleukinnal kapcsolatos jelátviteli útvonalak, a kollagén lebontása és a komplement mechanizmusok (FDR, q-érték < 0,05).

## 5. Megbeszélés

A tézisben három tanulmányt foglaltunk össze, amelyek célja a melanoma prognosztikus és prediktív biomarkereinek azonosítása volt immunhisztokémiai (IHC), proteomikai és AI-vezérelt képalkotással végzett digitális szövettani módszerek segítségével. BRAF kimutatási vizsgálatunk a PCR és az IHC technikákat hasonlította össze a BRAF mutáció kimutatása céljából a rutin diagnosztikában. A BRAFV600E IHC festése FFPE metszeteken értékes információt ad a tumor tulajdonságáról és a fehérje expressziós mintázatokról. Vizsgálatunkban az IHC validálás során négy festődési mintázatot tártunk fel, kiemelve az intratumorális és fokális heterogenitást. A PCR és az IHC eredmények összehasonlításakor szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk. Az IHC nagy érzékenysége ellenére a BRAF V600E mutációk kimutatásában alacsonyabb specificitási érték volt

észlelhető, amelyben az álpozitív eredmények szerepet játszottak. A szakirodalom alapján a fals pozitív eredményeket különböző BRAF pontmutációk vagy antitest-keresztreakciók okozhatják. A szignifikánsan eltérő eredményeket tovább vizsgáltuk NGS és qPCR segítségével. Egy PCR-negatív esetről, amely diffúz pozitív festődést mutatott intratumorális heterogenitással, a qPCR pozitív eredményt igazolt, amely a mutáns DNS esetleges felhígulási artefaktumára és ezzel a PCR használatának korlátaira hívta fel a figyelmet. Az NGS vizsgálatnál egy eredetileg PCR által mutációra negatívnak detektált mintában, amely fokálisan pozitívnak festődött, BRAF D594N aberrációt azonosítottunk, amely eredmény rávilágított a részletes DNS-alapú PCR analízis szükségességére, különösen a BRAF IHC festődéssel nem egyértelmű vagy fokálisan pozitív eseteknél. Mind az NGS, mind a qPCR eredmények kiemelik, hogy a magas mutációs rátájú daganatok vizsgálatánál nem elegendő kizárólag egyetlen technikára támaszkodni, és szükség van a PCR és az IHC technikák együttes alkalmazására.

A prediktív biomarker vizsgálatban (**I. közlemény**) az immunterápiára adott válaszhoz kapcsolódó fehérjéket és jelutakat azonosítottuk FFPE melanoma mintákból. Az immunterápiában részesülő betegeknél, akiknél rosszabb volt a terápiás válasz és rövidebb a progressziómentes túlélés, a VEGFA-VEGFR2 fehérjék fokozott expressziója volt látható, amely útvonal a vaszkulogenezis mechanizmusában vesz részt. Irodalmi adatok alapján ez az útvonal olyan folyamatokat segít elő, mint a lokoregionális nyirokmetasztázis, amely progresszióhoz vezet. A közelmúltban a VEGFA-blokkolókat, mint a bevacizumab (Avastin), rákellenes terápiaként alkalmazták a tüdő- és metasztatikus vastagbélrák esetében, amely, kapcsolódva eredményeinkhez, potenciálisan szerepet játszhat a jövőben a melanoma kezelésében. Az RNS-splicing is hasonló fehérje expressziós mintázatot mutatott ebben az alcsoportban. Ismert, hogy az RNS-splicing elősegítheti a sejtfelszíni antigének elvesztését, ami immunterápiára kialakult rezisztenciához és progresszióhoz vezethet. Számos tanulmányban vizsgáltak olyan kismolekulákat, amelyek megzavarják a splicing-mechanizmusokat, és bár hatékonyságuk és biztonságosságuk értékelése még folyamatban van, a spliceoszóma ellenes gyógyszerek potenciális lehetőséget adhatnak az immunterápiára kialakult rezisztencia leküzdésére. A jobb immunterápiás választ mutató alcsoportban az extracelluláris mátrixhoz és az immunrendszerhez kapcsolódó fehérjék száma jelentősen megnövekedett. Különösen a neutrofil degranulációhoz és immunoregulációhoz kapcsolódó útvonalak mutattak fokozott expressziót, amelyek összhangban korábbi kutatások eredményeivel potenciális terápiás célpontok lehetnek.

A **II. közleményben** korai stádiumú melanomás betegeknél a tumor és a stróma prognosztikai útvonalait azonosítottuk, kiemelve azok kölcsönhatásait. A szövettani értékelési eredményeinkben, korábbi irodalmi adatokkal összhangban, a nagyobb Breslow és Clark szintek magas kiújulási kockázatot prediktáltak a két csoport melanoma mintáinál. AI-alapú képalkotással végzett digitális patológiai vizsgálatot használtunk a szöveti kompartmentek annotációjához, amely jelentős pontossággal (megközelítőleg 80%-os pontossággal) határolta el a tumor és a stróma régiókat. Bár az eredmények ígéretesek, a tanulmány kis elemszáma miatt további vizsgálatra van szükség. A proteomikai eredmények összehasonlításával kapcsolatban megállapítottuk, hogy a mitokondriális és az immunválaszhoz kapcsolt útvonalak szerepet játszottak a melanoma kiújulásában.

A recidiváló melanoma tumorsejtekben a mitokondriális metabolikus útvonalak közül az oxidatív foszforiláció és a TCA-ciklus mutatott fokozott expressziót. Ezek a mechanizmusok a tumorsejtek proliferációjához nélkülözhetetlen nagy energiaigényre utalnak. Továbbá ezekből az útvonalakból speciális fehérjék szintén fokozott fehérje kifejeződést mutattak. Például a mitokondriális ADP/ATP-transzlokázok (ANT1, ANT2 és ANT3), amelyek fokozott ATP áramlást okoznak, az MCAM elősegíti az angiogenezist és az áttétképzést, a HNRNPA1 pedig hozzájárul a melanomasejtek metabolikus átprogramozásához. Ezen fehérje expressziók egy agresszívabb fenotípust tükröznek és hozzájárulnak a betegség kiújulásához. Az irodalomban már több mitokondriumot célzó terápiás lehetőséget leírtak. Az antibiotikumok közül a Doxiciklin, a Tigeciklin és az Azitromicin mutatott mitokondriális gátló hatást a melanomasejtek proliferációjával szemben *in vivo* körülmények között. Továbbá a metforminról kimutatták, hogy mitokondriális funkció gátló hatása van és elősegíti az immun-mediált tumorsejtpusztulást, így ígéretes terápiás lehetőségnek tűnik. A nem recidiváló melanomák az immunválasszal és mitofágiával kapcsolatos útvonalak fokozott expresszióját mutatták, amely folyamatok a kiújulással szembeni védőmechanizmusokban játszanak fontos szerepet. A recidiváló melanomák strómális sejtjei olyan fokozott proliferációs útvonalak kifejeződését mutatták, mint a PD-1 jelátvitel. A PD-L1 fokozott expressziója a stróma sejtekben, valamint az adaptív immunsejtek PD-1 receptorához való kötődése olyan jelátviteli kaszkádot indít el, amely gátolja az immunrendszer általi ellenőrzést. Továbbá, eredményeinkkel összhangban, korábbi kutatások bizonyították, hogy mind az immunrendszerrel kapcsolatos útvonalak gátlása, mind az immunsejtek tumor mikro környezetébe való inváziójának a gátlása hozzásegíthet a tumor progressziójához és a kedvezőtlen prognózishoz. Emellett, a mitokondriális transzlációs fehérjék megnövekedett

expressziója volt látható a recidiváló melanomák strómális sejtjeiben, amely felveti a tumor tulajdonságainak a stróma sejtjekre történő átruházás lehetőségét. Kutatásunk a korai stádiumban lévő primer melanomák esetében mind a tumorsejtek, mind a strómális sejtek különálló molekuláris mintázatát azonosítja, amely útvonalak segíthetnek előrejelezni a melanoma öt éven belüli kiújulásának magas kockázatát.

## 6. A PhD munka összefoglalása, új megállapításai

Vizsgálatainkban összehasonlítottuk a DNS-alapú PCR és a fehérjealapú IHC technikákat a BRAF kimutatása szempontjából, valamint új módszerek segítségével, mint a proteomika és az AI-vezérelt digitális szövettan, prediktív és prognosztikus fehérjék azonosítását végeztük formalinnal fixált, paraffinba ágyazott melanoma mintákból.

- Az IHC gyors és költséghatékony jellege ellenére a BRAFV600E mutáció PCR-rel és IHC-technikával történő kimutatásának eredményei közötti jelentős eltérések kiemelik a PCR és az IHC kombinált használatának fontosságát, különösen az inhomogén és fokális BRAF-pozitív esetekben.
- Először sikerült azonosítanunk prediktív fehérjéket és útvonalakat részletes proteomikai szekvenálással, formalinnal fixált, paraffinba ágyazott melanoma mintákból. A VEGFA-VEGFR2 és az RNS-splicing útvonalak fokozott expressziója a rövid progressziómentes túléléssel, míg az immunsejtekből és az extracelluláris mátrixból származó fehérjék és útvonalak fokozott aktivitása a hosszú progressziómentes túléléssel volt összefüggésben az immunterápia adását követően.
- Eredményeinkben elsők között sikerült lézer mikrodisszekcióval nyert formalinnal fixált, paraffinba ágyazott korai stádiumú melanoma mintákból részletes kvantitatív proteomikai szekvenálás és AI-vezérelt képalkotással végzett digitális patológia segítségével prognosztikus fehérjéket és jelutakat azonosítani.
- Vizsgálatunkból kimutattuk, hogy a mitokondriális transzlációs és sejtproliferációs útvonalak fokozott kifejeződése, valamint az immunválaszhoz kapcsolt útvonalak csökkent expressziója kulcsfontosságú szerepet játszik a korai stádiumú melanoma progressziójában mind a tumor-, mind a stróma sejtekben.

Összefoglalva, eredményeinkben a betegek alcsoportjaiban megfigyelt változatos fehérje expressziós mintázatok arra utalnak, hogy az immunhisztokémia, a részletes kvantitatív

proteomika és az AI-alapú képalkotással végzett digitális szövettani vizsgálatok, mint a „*spatial*” proteomika aspektusai, újonnan megjelenő, kulcsfontosságú elemei a terápia kiválasztásnak és a precíziós orvoslásnak.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek, Dr. Németh István Baláznak a munkám során nyújtott folyamatos támogatásáért és felügyeletért. Hálás vagyok Prof. Dr. Kemény Lajosnak, Prof. Dr. Gyulai Rollandnak, Prof. Dr. Oláh Juditnak és Dr. Baltás Eszternek, hogy a Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikán történő munkavégzés lehetőségét biztosították számomra. Szintén örömmel fejezem ki köszönetemet Prof. Marko-Varga Györgynek, aki doktori tanulmányaim során mentorált és segítette svédországi kutatásaimat. Külön köszönet a European Cancer Moonshot projekt tömegspektrometriás csapatának, köztük Erika Velasqueznek, Natália Pinto de Almeidának, Aniel Sancheznek, Jeovanis Gilnek, Nicole Woldmarnak, Magdalena Kurasnak, Lazaro Hiram Betancourtnak, Rezel Melindának. Nagyon hálás vagyok Jéssica de Siqueira Guedesnek, Szeitz Beátának, Dr. Jánosi Ágnes Juditnak, Prof. Gilberto Domontnak, Fenyő Dávidnak, Elisabet Wieslandernek, Horvátovich Péternek, Krzysztof Pawlowskinak, Roger Appelqvistnek, Oskolás Henriettnek, Dr. Johan Malmnak, Marko-Varga Matildának, Horváth Zsoltnak, Henrik Lindbergnek, Horváth Péternek, Migh Edének, Kovács Ferencnek, Kriston Andrásnak, Farkas Sükösdnek, Pankotai Tibornak, Pankotai-Bodó Gabriellának, Priskin Katalinnak, Giricz Zsófiának, Dr. Korom Irmának, Dr. Varga Erikának, Fügő Róbertnének, Romhányi Veronikának, Kórárszné Lauf Krisztinának, Horváthné Papp Diának. Köszönöm családomnak és barátaimnak, különösen Lupis Gabriellának és Németh Ádám Gézának. Ezt a tanulmányt több kutatási ösztöndíj támogatta, többek között a Berta Kamprad Alapítvány (The Impact of Melanoma Tumor Heterogeneity on Drug Treatment Effects, 2021-004), Lund, Svédország, valamint a GINOP-2.3 pályázatból.2-15-2016-00020 TUMORDNS, GINOP-2.2.1-15-2017-00052 és K125509 ösztöndíj, valamint az ÚNKP-21-3-SZTE-102 ösztöndíj (Szegedi Tudományegyetem, Szeged, Magyarország).