

Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika
Klinikai Doktori Iskola

**Interacting Mutational and Antigen Presentation Constraints
Shape Tumor Immunogenicity**

Dr. Papp Benjamin Tamás

Ph.D. disszertáció

Témavezető: Dr. Máté Manczinger

Szeged,

2026

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	3
Célkitűzések	5
Anyagok és módszerek.....	6
Eredmények.....	8
A tumorok mutációs mintázatai fehérjeszinten csoportosíthatók.....	8
A szubsztitúciós mintázatok meghatározzák a tumor immunmikrokörnyezetét.	9
Az aminosav-szubsztitúciós szignatúrák és a HLA-genotípus együttesen alakítják a daganatellenes immunválaszt.	10
Összefoglalás és megbeszélés	11
Köszönetnyilvánítás	12

Bevezetés

A daganatok különböző belső és környezeti folyamatok által létrehozott szomatikus mutációk fokozatos felhalmozódása révén alakulnak ki. Ezek a folyamatok jellegzetes mintázatokat hagynak a daganatok genomjában, amelyeket összefoglalóan mutációs szignatúráknak nevezünk. Az ilyen szignatúrák különböző DNS-károsító hatások és DNS-javító mechanizmusok aktivitását tükrözik, például az ultraibolya sugárzás, az oxidatív stressz és a DNS-javító útvonalak hibái. Az elmúlt évtizedben a mutációs szignatúrák szisztematikus leírása hozzájárult ahhoz, hogy bizonyos mutagéneket vagy biológiai mechanizmusokat a tumorok biológiai viselkedésével hozzunk összefüggésbe. A legtöbb szakirodalom azonban csak a nukleotidok szintjén vizsgálja a jelenségeket anélkül, hogy közvetlenül foglalkozna a mutációk fehérjeszintű funkcionális következményeivel.

A tumorgenomika fejlődésével párhuzamosan a tumorimmunológia egyre inkább rámutatott a tumoreredetű neopeptidek jelentőségére a daganatellenes immunválaszok alakításában. A neopeptidek olyan szomatikus mutációk következtében jönnek létre, amelyek megváltoztatják a fehérjék aminosavsorrendjét, és olyan peptideket hoznak létre, amelyek a humán leukocita antigén (HLA) molekulák által a sejtfelszínen bemutatathatók. Amennyiben ezeket a peptideket a T-sejtek felismerik, immunválaszt indíthatnak a tumorsejtek ellen. Ez a koncepció különösen fontossá vált az immunellenőrzőpont-gátló terápiák (ICB) korszakában, ahol a neopeptidek jelenlétét és tulajdonságait a terápiás válasz fontos meghatározóinak tekintik. E fejlődés ellenére továbbra sem teljesen tisztázott a kapcsolat a genomi eltéréseket létrehozó mutációs folyamatok és az ezekből származó neoantigének immunológiai tulajdonságai között.

A jelenlegi megközelítések egyik alapvető korlátja a DNS-szintű mutációs szignatúrák és az immunfelismerést meghatározó peptidtulajdonságok közötti kapcsolat leírásának hiánya. Míg a nukleotidalapú szignatúrák a mutációk létrejöttének mechanizmusait jellemzik, az immunfelismerés az aminosavszekvenciák szintjén, a HLA-molekulák által prezentált peptideken keresztül valósul meg. Ennek következtében a nukleotidszinten hasonlóknak tűnő mutációk eltérő aminosavcseréket eredményezhetnek, amelyek különböző biokémiai jellemzőkkel és immunológiai következményekkel járnak.

Az eltérő mutációs folyamatok különböző szubsztitúciós mintázatokat hozhatnak létre, ez pedig befolyásolhatja a tumorsejtek által bemutatott neopeptidek minőségét. Bizonyos

szubsztitúciók jelentős fizikai-kémiai változásokat idézhetnek elő, vagy módosíthatják azokat a peptidmotívumokat, amelyek a HLA-kötődést befolyásolják. Ennek eredményeként a mutációs folyamatok nemcsak a mutációk számának növelésén keresztül hathatnak a tumor immunogenitására, hanem azáltal is, hogy torzítják a kialakuló aminosavváltozások típusait.

Lényeges továbbá, hogy a tumoreredetű peptidek immunfelismerése nemcsak a daganat mutációs mintázatától, hanem a beteg genetikai tényezőitől is függ, ezek közül kiemelten a beteg HLA-genotípusától. A HLA-molekulák határozzák meg, hogy mely peptidek jelenhetnek meg a sejtfelszínen, ezáltal alakítva a T-sejtek számára hozzáférhető potenciális neoantigének repertoárját. Mivel a különböző HLA-allélek eltérő peptidkötési preferenciákkal rendelkeznek, egy adott helyettesítési mintázat immunológiai hatása a beteg antigénprezentációs apparátusától függően változhat. Következésképpen a mutációs folyamatok és a tumor immunogenitása közötti kapcsolat a tumoreredetű peptidtér és a beteg által hordozott HLA-allélek kölcsönhatásának figyelembevételével érthető meg.

Disszertációmban a tumor immunogenitását ebből az interakcióalapú nézőpontból vizsgáljuk. Hipotézisünk, hogy az immunfelismerés a tumor mutációs folyamatai és a betegre jellemző antigénprezentáció együttes hatásából bontakozik ki. Az aminosav-szubsztitúciós szignatúrák (AAS-ek) bemutatásával a célunk jellemezni a mutációs folyamatokat a neopeptidek szintjén és megvizsgálni a fehérjeszinten mutatózó mintázatok hatását a tumor immunfelismerésére. Integratív számítógépes elemzések és kísérletes validáció révén azt vizsgáljuk, hogy a szubsztitúciós szignatúrák miként befolyásolják az immunopeptidomot és az immunfelismerést daganatokban.

Célkitűzések

Kutatásunkban megvizsgáltuk, hogy a tumorspecifikus mutációs folyamatok és a betegre jellemző antigénprezentáció kölcsönhatása miként alakítja a tumor immunogenitását. Kutatásunk középpontjában a különböző mutációs folyamatok által létrehozott aminosav-szubsztitúciós szignatúrák minőségi tulajdonságai, valamint ezek kompatibilitása állt a beteg HLA-genotípusával. Ezen átfogó cél elérése érdekében a disszertáció konkrét célkitűzései a következők voltak:

1. **A mutagenesis fehérjeszintű leírása.** Az első célkitűzésünk, hogy jellemezzük a humán daganatokban visszatérően megjelenő aminosav-szubsztitúciós szignatúrákat, amelyek a környezeti expozíciók, az endogén mutációs mechanizmusok és a DNS-javítás hiányosságainak összesített következményeit tükrözik.
2. **Az aminosav-szubsztitúciós mintázatok és a neopeptidek minősége közötti kapcsolat vizsgálata.** Célunk megvizsgálni, hogy az eltérő szubsztitúciós szignatúrák torzítják-e az aminosavcserék fizikai-kémiai tulajdonságait, és ezen keresztül befolyásolják-e a neoantigének prediktált kötődését és immunogenitását.
3. **Az aminosav-szubsztitúciós szignatúrák klinikai relevanciájának vizsgálata.** Célunk leírni, hogy a szubsztitúciós mintázatokkal jellemezhető tumorok összefüggésben állnak-e a klinikai kimenetellel és az immunellenőrzőpont-gátló kezelésre adott válasszal, valamint hogy kiegészítő információt nyújtanak-e a már ismert genomikai és immunológiai biomarkerekhez képest.
4. **A HLA-genotípus szerepének vizsgálata.** Fontos célkitűzés volt annak értékelése, hogy a tumoreredetű aminosav-szubsztitúciós mintázatok immunológiai hatása függ-e a betegspecifikus HLA-alléloktól, illetve hogy bizonyos HLA-variánsok előnyösebben képesek-e bemutatni bizonyos szubsztitúciós mintázatokból származó peptideket.
5. **Az interakciós modell kísérletes alátámasztása.** Végül igazolni szeretnénk, hogy a mutagének által indukált aminosav-szubsztitúciós mintázatok HLA-specifikus T-sejtes válaszokat válthatnak ki kompatibilis antigénprezentációs környezetben, ezzel alátámasztva a mutációs folyamatok, a HLA-genotípus és az immunfelismerés közötti biológiai kapcsolatot.

Anyagok és módszerek

A mutációs folyamatok, az aminosav-szubsztitúciós mintázatok és a tumor immunogenitása közötti kapcsolat vizsgálatához kutatásunkban nagyléptékű, tumorgenomikai adatokon végzett számítógépes elemzéseket kombináltunk különböző adatbázisokon, majd eredményeinket *in vitro* kísérletekkel validáltuk. Az átfogó analitikai keretrendszer a tumorok mutációs adatait, a prediktált antigénprezentációt, az immunfenotípusok jellemzését és a funkcionális validációt egyaránt integrálta.

A humán tumorok szomatikus mutációs adatait a The Cancer Genome Atlas (TCGA) adatbázisból nyertük. A további elemzésekhez kizárólag a missense mutációkat tartottuk meg, mivel ezek közvetlenül módosítják a fehérjék aminosavsorrendjét, és olyan aminosav-szubsztitúciókat hoznak létre, amelyek befolyásolhatják az antigénprezentációt. Minden tumorminta esetében a nukleotidszintű mutációkat a megfelelő aminosav-szubsztitúciókra fordítottuk át, hogy a különböző daganattípusok mutációs mintázatait fehérjeszinten is jellemezni tudjuk. A TCGA-mintákhoz tartozó klinikai adatokat és további immunológiai annotációkat szintén bevontuk az elemzésekbe a tumorok immunológiai jellemzőinek és klinikai kimenetelének vizsgálatához.

A visszatérően megjelenő aminosav-szubsztitúciós mintázatok azonosítására nemnegatív mátrixfaktorizációt (NMF) alkalmaztunk. Ez a módszer a tumormintákban megfigyelt szubsztitúciós gyakoriságokat korlátozott számú szignatúrára bontja fel, amelyek egymástól elkülönülő mintázatokot reprezentálnak. A kapott AAS-profilokat ezt követően az egyes tumorok szubsztitúciós mintázatainak jellemzésére, valamint azok ismert mutációs folyamatokkal, daganattípusokkal és biológiai sajátosságokkal való összefüggéseinek vizsgálatára használtuk.

A szubsztitúciós mintázatok lehetséges immunológiai következményeit *in silico* analízisekkel vizsgáltuk. Az aminosav-szubsztitúciós mintázatok és a peptidek prediktált HLA-kötődési tulajdonságai közötti kapcsolatot annak megállapítására elemeztük, hogy bizonyos szubsztitúciós mintázatok előnyben részesítik-e a HLA-prezentációra alkalmas peptidek keletkezését. Emellett az AAS-profilok és a tumorok immunmikrokörnyezeti jellemzői közötti összefüggéseket is vizsgáltuk rendelkezésre álló immunsejt-infiltrációs adatok és génexpresszió-alapú immunszignatúrák felhasználásával. A klinikai relevanciát továbbá olyan betegkohorszokban elemeztük, amelyek immunellenőrzőpont-gátló kezelésben részesültek.

A számítógépes eredmények független validációját nyilvánosan elérhető immuno-peptidomikai adatkészleteken végeztük el, amelyek daganatmintákból kísérletileg azonosított, HLA-hoz kötődő peptideket, valamint ezekhez illesztett genomi információkat tartalmaztak. Ezek az adatszettek lehetővé tették a megfigyelt neoantigén-repertoár és a prediktált szubsztitúciós mintázatok összehasonlítását, ezáltal empirikus alátámasztást adva annak, hogy az aminosav-szubsztitúciós mintázatok befolyásolják a HLA-molekulák által bemutatott peptideket.

Végül in vitro modellekben kísérletes validációt is végeztünk annak tesztelésére, hogy a mutagének által indukált szubsztitúciós mintázatok képesek-e HLA-specifikusan immunválaszokat kiváltani. Meghatározott HLA-alléleket expresszáló humán A549 tüdődaganat-sejtvonalakat kémiai mutagenézisnek tettünk ki szomatikus mutációk és új aminosav-szubsztitúciók létrehozása céljából. A kialakult mutációkat teljesgenom-szekvenálással azonosítottuk, majd meghatározott HLA-genotípusú donorok perifériás vér mononukleáris sejtjeit (PBMC) együtt tenyésztettük a mutagenizált tumorsejtekkel. Az immunaktiváció mérésére T-sejt-proliferációs vizsgálatokat alkalmaztunk, így értékelni tudtuk, hogy a mutagén eredetű neoantigének kompatibilis antigénprezentációs környezetben képesek-e HLA-korlátozott T-sejtes válaszokat kiváltani.

Eredmények

A disszertáció eredményei egy olyan keretrendszert vázolnak fel, amely a tumorok mutációs folyamatait a HLA-specifikus immunfelismeréssel kapcsolja össze az aminosav-szubsztitúciós mintázatokon keresztül. Elsőként humán tumorokban visszatérően megjelenő aminosav-szubsztitúciós szignatúrákat azonosítottunk, amelyek a mutációs mintázatok fehérjeszintű leírását teszik lehetővé. Másodszor, kimutattuk, hogy ezek a szubsztitúciós mintázatok összefüggést mutatnak a tumorok immunfenotípusával és klinikai jellemzőivel. Végül kísérletes validációval igazoltuk, hogy a mutagének által indukált szubsztitúciós mintázatok kompatibilis antigénprezentációs környezetben HLA-specifikus immunválaszokat válthatnak ki.

A tumorok mutációs mintázatai fehérjeszinten csoportosíthatók.

Annak vizsgálatához, hogy a mutációs folyamatok miként alakítják a tumoreredetű peptideket, a tumorgenomokból származó szomatikus mutációkat aminosav-szubsztitúciókra fordítottuk át, majd fehérjeszinten elemeztük. Nemnegatív mátrixfaktorizáció alkalmazásával öt, humán tumorokban visszatérően megjelenő aminosav-szubsztitúciós szignatúrát (AAS) azonosítottunk. Mindegyik szignatúra az aminosavváltozások egy jellegzetes mintázatát írja le, tükrözve a tumorokban zajló mutációs folyamatok együttes hatását.

Az azonosított AAS-ek eltérő szubsztitúciós profilokat mutattak, és meghatározott tumortípusokkal, illetve mutációs környezetekkel hozhatóak összefüggésbe. Egyes szignatúrák olyan daganatokban dúsultak fel, amelyek környezeti mutagén hatásoknak, például ultraibolya sugárzásnak voltak kitéve, míg mások endogén mutációs mechanizmusokkal, például oxidatív károsodással vagy DNS-javító folyamatok zavaraiival mutattak összefüggést. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a mutációs folyamatok nemcsak nukleotidszinten hagynak felismerhető nyomot, hanem a tumorfehérjékben létrejövő aminosav-szubsztitúciók spektrumában is.

Fontos megfigyelés volt, hogy az egyes AAS-ek által leírt szubsztitúciós mintázatok biokémiai tulajdonságaikban is különböztek. Egyes szignatúrákra olyan aminosavcserék voltak jellemzők, amelyek jelentős fizikai-kémiai változásokat idéznek elő az oldalláncokban, míg mások inkább konzervatívabb cserékből álltak. Ezek a különbségek befolyásolhatják a mutált fehérjékből származó peptidek szerkezetét és immunológiai tulajdonságait. Ennek megfelelően egy tumor

szubsztitúciós mintázata hatással lehet arra, hogy mutációiból milyen tulajdonságú peptidrepertoár jön létre.

A tumorok mutációinak aminosav-szubsztitúciós szintű klaszterezése lehetővé teszi annak vizsgálatát, hogy az eltérő mutációs mechanizmusok miként alakítják a tumoreredetű peptidek immunfelismerés szempontjából releváns minőségi tulajdonságait.

A szubsztitúciós mintázatok meghatározzák a tumor immunmikrokörnyezetét.

Miután azonosítottuk az aminosav-szubsztitúciós szignatúrákat különböző humán tumorokban, a következő lépés annak vizsgálata volt, hogy ezek a szubsztitúciós mintázatok mennyiben határozzák meg a tumorok immunfenotípusát. *In silico* elemzéseink azt mutatták, hogy a különböző AAS-profillal jellemezhető tumorok között szisztematikus eltérések figyelhetők meg a prediktált neopeptid-kötési tulajdonságokban és az immunmikrokörnyezet jellemzőiben.

Bizonyos szubsztitúciós mintázatok nagyobb valószínűséggel hoztak létre olyan aminosavváltozásokat, amelyek kedvezőbb HLA-kötődési tulajdonságú peptidek kialakulásához vezettek, míg mások kevésbé bizonyultak hatékonyak az antigénprezentáció szempontjából. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a mutációs folyamatok a tumor immunogenitását nemcsak a mutációs szám növelésén keresztül, hanem az immunrendszer számára bemutatható peptidek típusának alakításával is befolyásolhatják.

Az AAS-profilok összefüggést mutattak az immunaktivitás különböző mutatóival, beleértve az immunsejt-infiltráció becsléseit és a génexpresszió-alapú immunszignatúrákat. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a tumorok mutációs mintázatának minőségi szerkezete befolyásolhatja a tumorelles immunválasz minőségét.

E megfigyelések klinikai jelentőségét tovább erősítették az immunellenőrzőpont-gátló kezelésben részesülő betegkohorszok elemzései. A különböző szubsztitúciós mintázatokkal jellemezhető tumorok eltérő klinikai kimenetelt mutattak, ami arra utal, hogy a mutációkból származó peptidek tulajdonságai hozzájárulhatnak a terápiás válasz változékonyságához. Ezek az eredmények együttesen azt mutatják, hogy az aminosav-szubsztitúciós szignatúrák a tumorok mutációinak olyan biológiai releváns jellemzőit ragadják meg, amelyek összefüggnek az immunfenotípussal és a klinikai viselkedéssel.

Az aminosav-szubsztitúciós szignatúrák és a HLA-genotípus együttesen alakítják a daganatellenes immunválaszt.

Annak kísérletes vizsgálatára, hogy a mutagének által indukált szubsztitúciós mintázatok képesek-e immunogén peptideket létrehozni, *in vitro* kísérleteket végeztünk mutagenizált tumorsejtek és T-sejt-proliferációs vizsgálatok alkalmazásával. Humán A549 tüdődaganat-sejtvonalakat (HLA-knockout, HLA-B*07:02, HLA-A*03:01) tettünk ki az etil-nitrozourea (ENU) mutagén hatásának, amely szomatikus mutációkat és az ezeknek megfelelő aminosav-szubsztitúciókat idéz elő.

A mutagenizált klónok teljesgenom-szekvenálása megerősítette számos ENU-indukált missense mutáció jelenlétét, amelyek új aminosav-szubsztitúciókat hoztak létre a tumorfehérjékben. Ezeket a mutált sejteket ezután ismert HLA-genotípusú donorokból származó perifériás vér mononukleáris sejtjeivel (PBMC) együtt tenyésztettük az immunaktiváció vizsgálata céljából.

A T-sejt-proliferációs vizsgálatok azt mutatták, hogy a HLA-B*07:02 allélt expresszáló, ENU-val mutagenizált tumorsejtek erőteljes T-sejtes választ váltottak ki, amikor ugyanazt a HLA-allélt hordozó donorokból származó PBMC-kkel együtt tenyésztettük őket. Ezzel szemben nem figyeltünk meg hasonló proliferációt, ha akár az antigént prezentáló tumorsejtekből, akár a reagáló limfocitákból hiányzott a megfelelő HLA-allél. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a megfigyelt immunaktiváció egyaránt mutációfüggő és HLA-specifikus volt.

Ez a proof-of-concept kísérlet bizonyítja, hogy a mutagének által indukált aminosav-szubsztitúciós mintázatok képesek olyan neoantigéneket létrehozni, amelyek kompatibilis HLA-környezetben immunválaszt válthatnak ki. Eredményeink így alátámasztják interakcióalapú modellünket, amely szerint a tumor immunogenitása a peptiddiverzitást létrehozó mutációs folyamatok és azokat szelektáló, betegspecifikus antigénprezentációs korlátok együttes hatásából bontakozik ki.

Összefoglalás és megbeszélés

A disszertációban az aminosav-szubsztitúciós szignatúrákat (AAS-eket) olyan analitikai keretrendszerként mutatjuk be, amely összekapcsolja a tumorok mutációs folyamatait az immunfelismeréssel. Míg a korábbi kutatások elsősorban a mutagenezist nukleotidszinten jellemezték, az immunfelismerés a fehérjékből származó peptidek szintjén történik. A szomatikus mutációk aminosav-szubsztitúciós mintázatokká történő átfordításával az AAS-ek a mutációs folyamatok olyan fehérjeszintű leírását adják, amely közvetlenül kapcsolódik a tumoreredetű peptidek kialakulásához. A daganatokban visszatérően megjelenő szubsztitúciós szignatúrák azonosítása azt mutatja, hogy a mutációs folyamatok 5 elkülönülő aminosav-szubsztitúciós mintázatot hoznak létre.

Ezeknek az eredményeknek fontos következményei vannak a tumor immunogenitásának értelmezésére nézve. A tumorok mutációs száma (TMB) széles körben alkalmazott biomarkerré vált az immunellenőrzőpont-gátló kezelésekre adott válasz előrejelzésében, azon a feltevésen alapulva, hogy a magasabb mutációs szám növeli a neoantigének kialakulásának valószínűségét. Az itt bemutatott eredmények ugyanakkor arra utalnak, hogy a mutációk minőségi tulajdonságai is meghatározó szerepet játszanak. Az eltérő mutációs folyamatok különböző szubsztitúciós mintázatot hoznak létre, amelyek biokémiai tulajdonságaikban és antigénprezentációval való kompatibilitásukban is különböznek. Ennek következtében a hasonló mutációs terhelésű tumorok között jelentős különbségek lehetnek abban, hogy mutációikból milyen peptidek keletkeznek, és ezáltal abban is, hogy milyen mértékben képesek immunválaszt kiváltani.

Eredményeink továbbá egy olyan interakcióalapú modellt támasztanak alá, amelyben az immunfelismerés a tumoreredetű peptiddiverzitás és a betegre jellemző antigénprezentációs korlátok együttes hatásából bontakozik ki. A mutációs folyamatok meghatározzák, hogy milyen aminosav-szubsztitúciók jelennek meg a tumorfehérjékben, míg a beteg HLA-genotípusa korlátozza, hogy ebből a repertoárból mely peptidek prezentálhatók a T-sejtek számára. A disszertációban bemutatott kísérletes eredmények alátámasztják, hogy a mutagének által indukált szubsztitúciós mintázatok olyan immunogén peptideket hozhatnak létre, amelyek kompatibilis antigénprezentációs környezetben HLA-specifikus immunválaszokat képesek kiváltani.

Az eredmények értelmezésekor több limitációt is figyelembe kell venni. Elemzéseink elsősorban a missense mutációkra fókuszáltak, így a neoantigénképződéshez hozzájáruló genomi

eltéréseknek csak az egyik típusát vizsgálják. Emellett a számítógépes elemzések a tumorok genomjának és immunológiai környezetének statikus állapotait tükrözik, miközben a tumor és az immunrendszer közötti kölcsönhatás dinamikus folyamat, amely a daganat progressziója és a kezelés során is folyamatosan változik.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni legmélyebb hálámat témavezetőmnek, Dr. Manczinger Máténak, akinek tudományos látásmódja, szakmai igényessége és rendíthetetlen támogatása nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg. Munkája alapvetően formálta kutatói fejlődésemet.

Ugyancsak hálával tartozom Prof. Dr. Kemény Lajosnak szakmai iránymutatásáért, valamint azért, hogy biztosította azt az akadémiai közeget, amelyben ez a munka kibontakozhatott. Bizalma és támogatása e tézis alapvető pillérei voltak.

Köszönettel tartozom Juhász Szilviának, közös eredeti cikkünk társelő első szerzőjének, akinek szakértelme nélkülözhetetlen volt ahhoz, hogy a számítógépes hipotéziseket kísérletesen is igazolni tudjuk. Hálás vagyok kollégáimnak — Fülöp Anna Táciának, Kókai Dávidnak, Spekhardt Franciska Dórának, Koncz Balázsnak, Balogh Gergő Mihálynak, Szücs Balázsnak és Pál Csabának — együttműködésükért, szakmai támogatásukért és hozzájárulásukért, amelyek számos módon erősítették ezt a munkát.