

A mutációs szignatúrák hatása a tumorok immunfenotípusára

Fülöp Anna Tácia

Molekuláris bionika, III. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Témavezető: Manczinger Máté

Bevezetés	2
Az immunrendszer működése	2
HLA-molekulák	3
Tumorer	7
Tumorer immunogenitása	8
Immunellenőrzőpont-gátló immunterápia	10
Célkitűzés	11
Módszerek	13
Felhasznált adatok és adatbázisok	13
A mutációs szignatúrák hatásának szimulációja	14
Validálás valódi tumormintákon	15
Eredmények és értékelésük	16
Az eltérő mutagének eltérő aminosavcseréket eredményeznek	16
A különböző HLA-molekulák aminosav-specifitása jelentősen eltér	18
A kiszámolt aminosav-specifitás prediktálja a mutáns peptidek sejtfelszíni megjelenését	20
A HLA-molekulák eltérő mértékben képesek bemutatni egy adott mutagén által generált neoptideket	23
Összefoglalás	25
Köszönetnyilvánítás	26
Ábrajegyzék	26
Irodalom	26
Validáláshoz használt neoantigének forrásai:	28
Függelék	30
A validáláshoz felhasznált minták:	30
Az egyes minták ROC görbéi és AUC értékei külön-külön	32
Tételes szerzői hozzájárulás	33

1. Bevezetés

1.1. Az immunrendszer működése

Ahhoz, hogy az immunrendszer elláthassa feladatát: a szervezet védelmezését, mindenekelőtt képesnek kell lennie a fenyegető veszélyforrások felismerésére, és az ártalmas és ártalmatlan hatások megfelelő elkülönítésére.¹ Fontos megjegyezni, hogy ez nem egyezik meg a saját és idegen elkülönítésével²; hiszen jól ismert, hogy a szervezetben számos veszélytelen, sőt jótékony mikroorganizmus fordul elő, a dolgozat fő témájául szolgáló tumorokat pedig lényegében csupán néhány mutáció különbözteti meg a funkcionális emberi sejtektől.

A kórokozók felismerésének és az ellenük való védekezésnek két útja ismert: a veleszületett és az adaptív immunitás.³

Röviden összefoglalva a fő különbség a kettő között, hogy a veleszületett immunreakció nem specifikus, míg az adaptív igen. Ebből következik, hogy a veleszületett immunválasz azonnali (hiszen minden fenyegetésre ugyanúgy reagál, csak a fenyegetés tényét kell felismernie, a típusát, konkrét mibenlétét nem), míg az adaptív immunitás reakcióideje hosszabb, mivel fel kell szaporítani az aktuális támadó ellen hatásos immunsejteket. Újbóli, hasonló támadás esetén azonban a hosszú életű memóriasejtek itt is lehetővé teszik a gyors reakciót.

A veleszületett immunitás a lokális, gyorsan leküzdhető fertőzések elleni védekezésben játssza a főszerepet. Két fő végrehajtója van: egyrészt a patogén (baktérium, vírusfertőzött sejt, eukarióta parazita) felismerésében is szerepet játszó komplementrendszer (humorális immunválasz), másrészt patogéneket közvetlenül elpusztítani képes sejtes elemek (sejtes immunválasz).¹ Az előbbi esetben a kórokozó jelenléte aktiválja a komplementeket, amelyeknek egy része kovalensen hozzákötődik a sejthez, így jelölve meg veszélyesként. A nem kötődő, vízzoldékony komplementrész fagocitákat vonz a helyszínre, amelyek sejtfelszíni receptoraikkal felismerik a megkötött komplementet, és bekebelezik a megjelölt sejtet.³

A sejtes elemek közé tartoznak a granulociták, a dendritikus sejtek, a monociták/makrofágok, és az NK (természetes ölő-) sejtek. Ezek mindegyike képes valamilyen módon fellépni a kórokozók ellen: fagocitózissal bekebelezik, vagy antitestek segítségével pusztítják el őket.¹ Emellett gyakran citokin-indukált gyulladás jön létre a fertőzés helyén, amely a vérrellátás javulásával és a fehérvérsejtek számának növekedésével segíti a fertőzés leküzdését.³

A fertőzés elhúzódása esetén lép színre az adaptív immunitás. Ebben a folyamatban a veleszületetthez képest eltér a patogének felismerésének módja: általános jellemzők helyett a végrehajtó limfociták (T-sejtek) egyetlen molekulatípusra koncentrálnak, és ehhez egyedi, különböző ligandumokat megkötni képes receptorokkal rendelkeznek.³ A ligandumok megkötése és felismerése során egy ún. immunológiai szinapszis nevű molekulakomplex jön létre. Az immunológia szinapszist egy antigént bemutató sejt vagy célsejt, és egy T-sejt összekapcsolódása hozza létre. Mindkét sejtben speciális, erre a célra létrejött molekulák helyezkednek el, a kötés létrejötte lehetővé teszi a T-sejt aktiválódását.⁴

Az adaptív immunitás fő előnye és jellegzetessége, hogy akár specifikusan egy konkrét patogén ellen irányulhat,² ha csak az azt megkötni képes receptorral rendelkező limfociták vesznek részt a reakcióban. Ezeknek a specifikus limfocitáknak a szelektálása és sokszorozása időt vesz igénybe, így az adaptív immunitás lassabb a veleszületettnél, azonban pont a létrehozott immunsejteknek hála hosszantartó szerzett immunitást eredményez.³

A dolgozatban arra koncentrálok, hogy hogyan ismeri fel az adaptív immunrendszer a tumorokat. Vizsgáljuk meg tehát közelebbről ez utóbbi típusát a szervezet védekezőképességének!

1.1.1. HLA-molekulák

A következőkben bemutatok egy molekulacsoportot, amely az immunológiai szinapszis antigénbemutató tagjaként kulcsszerepet tölt be az adaptív immunfelismerésben.⁵ Ez a Fő Hisztokompatibilitási Komplex (Major Histocompatibility Complex - MHC), vagy más néven – ha emberről van szó – a Humán Leukocita Antigén (Human Leukocyte Antigen - HLA) komplex. A továbbiakban a HLA rövidítést használom.

A HLA-molekulák a membrán-asszociált glikoproteinek közé tartoznak.³ Működésük során rövid peptideket kötnek meg, és bemutatják őket a sejt felszínén. Ezek a peptidek patogén- vagy saját fehérjék feldarabolásából származnak, és antigéneknek nevezzük őket, magát a folyamatot pedig antigénprezentálásnak, antigénbemutatásnak.³

Antigénnek számít minden makromolekula, víruspartikulum, sejt, stb, amelyet immunoglobulin vagy T-sejt felismer és megköt, ehhez a folyamathoz szükséges az adott ágenst azonosító peptid HLA általi bemutatása. Az antigénnek azt a konkrét részét, amelyhez az immunreakció során antitest kötődik, epitópnak nevezzük, ezek általában szénhidrát- vagy fehérjeláncok.³

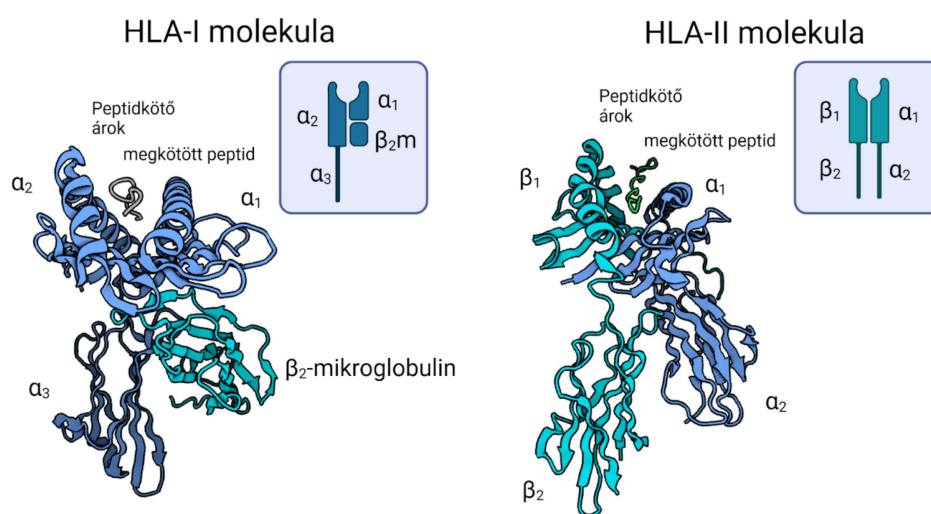
Az antigénspecifikus receptorral rendelkező T-sejtek képesek kapcsolódni a HLA-antigén komplexhez⁶, így lehetővé válik az antigén immunrendszer általi felismerése, amely nélkülözhetetlen az immunválasz kiváltásához. Egy adott antigén HLA-kötésének elmaradása lehetetlenné teszi, hogy az immunrendszer fellépjen ellene, illetve az őt hordozó sejt ellen. Természetesen nem minden HLA-bemutatott peptid ellen indul immunválasz; a “döntést” már az immunsejtek hozzák meg. A HLA-kötés tehát szükséges, de nem elégséges feltétele az immunreakciónak.

1.1.1.1. Csoportosítás

A HLA-molekulákat két osztályba soroljuk: HLA-I és HLA-II.³

HLA-I-es molekulák minden sejt felszínén előfordulnak (a vörösvértestek kivételével), és a sejt belsejéből származó, 8-10, de leggyakrabban 9 aminosav hosszúságú peptideket mutatnak be⁵; ezek származhatnak saját vagy intracelluláris patogének (pl. vírusok) fehérjéiből. Az általuk bemutatott antigéneket a citotoxikus T-sejtek ismerik fel.⁵ Ez a csoport játssza a fő szerepet a tumorelles immunválasz kialakításában.

A HLA-II-es molekulák a hivatásos antigénprezentáló sejtek (dendritikus sejtek, makrofágok és B-limfociták) felületén találhatók. Ezek a sejtek extracelluláris eredetű antigéneket prezentálnak, ehhez először bekebelezik, majd feldarabolják a fehérjét, végül pedig bemutatják a létrejövő peptideket a HLA-II molekulák segítségével. Mivel itt a megkötött peptid túlnyúlhat a peptidkötő árok két végén, a hossz nincs annyira limitálva, mint az I. osztály esetén: 13-25 aminosav, vagy még hosszabb peptidek is bemutatásra kerülhetnek⁵. Az antigénfelismerésben a helper T-sejtek vesznek részt.



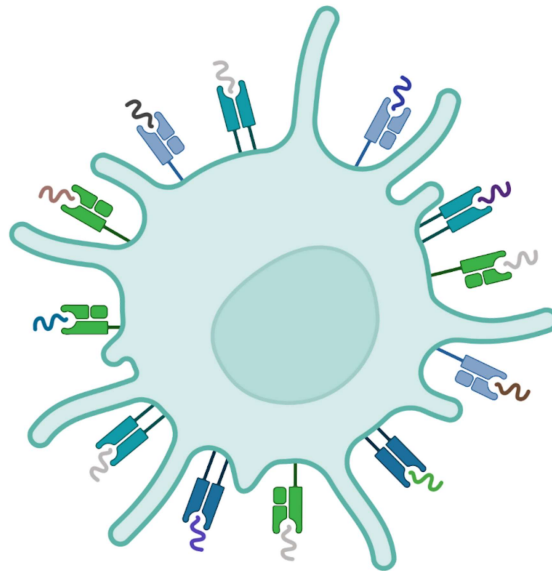
1. ábra: A HLA-molekulák felépítése

A I-es és II-es osztályú HLA-molekulák sematikus és strukturális ábrázolása. (Másodlagos szerkezeti elemek kiemelve: a peptidkötő árkot felépítő spirálok α -hélixeket, a hullámos nyilak

megadott irányultságú β -lemezeket jelölnek.) Különböző színnel jelölve láthatók az egyes polipeptidláncok. A HLA-I molekula felépítő elemei egy három doménből (α_1 , α_2 , α_3) álló peptidlánc és egy hozzákapcsolódó β -immunoglobulin. A peptidkötő árkot a nagyon hasonló szerkezetű 1-es és 2-es domén alkotja. A HLA-II két peptidláncból (α és β) áll, ezek mindegyike két doménnel rendelkezik, itt a két 1-es domén alkotja a peptidkötő árkot.

Forrás: PDB DOI: [10.2210/pdb3MRR/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb3MRR/pdb), PDB DOI: [10.2210/pdb3PGD/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb3PGD/pdb), BioRender

A két osztályba tartozó molekulák háromdimenziós felépítése hasonló, de nem teljesen megegyező; a HLA-I-es molekulák egy, a II-esek két polipeptidláncon keresztül kapcsolódnak a plazmamembránhoz.⁵ (1. ábra) A transzmembrán láncokon kívül mindkét típus rendelkezik egy peptidkötő árokkal, illetve a T-sejtek ko-receptorainak megkötésére szolgáló helyekkel. A bemutatott antigén a peptidkötő árokban rögzül nemkovalens kötésekkel. Ez a kialakítás lehetővé teszi, hogy egy molekula több különböző aminosavszekvenciájú peptidet legyen képes bemutatni.³ (2. ábra)



2. ábra: Antigénbemutatás

Egy HLA-molekula egy adott időpontban legfeljebb egy peptid megkötésére képes, azonban minden sejt számos példányban expresszálja a HLA-molekuláit (a különböző allélokat különböző színnel jelöltem), így lehetővé válik többféle antigén (újfént különböző színnel jelölve) egyidejű bemutatása.

Forrás: saját készítésű ábra a Biorender segítségével.

Bár a két csoport működése és funkciója szorosan összekapcsolódik, a továbbiakban a HLA-I-es molekulákra koncentrálok, hiszen a tumorok immunitása, intracelluláris fenyegetés lévén, ennek az osztálynak a működéséhez kötődik.⁷

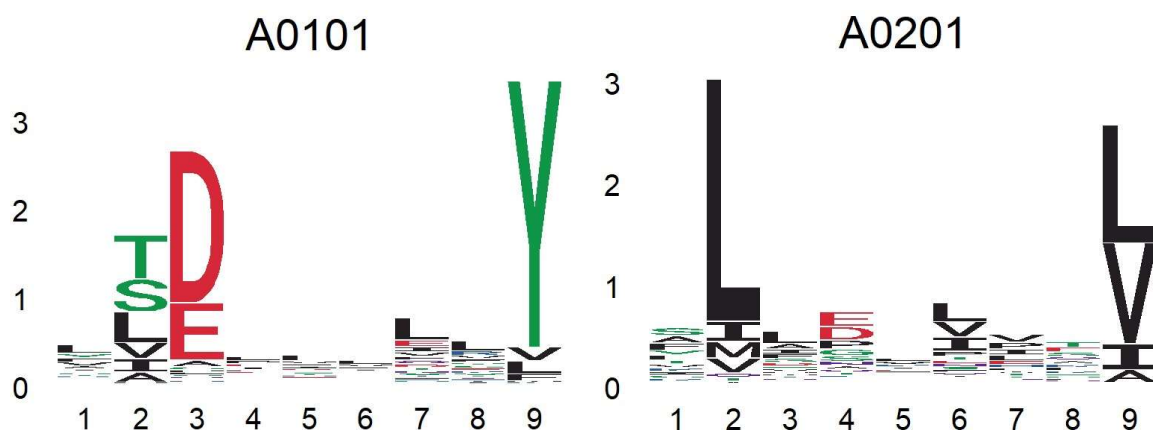
A dolgozat tárgyául szolgáló analízisek során három HLA-I génnel foglalkoztunk: ezek a HLA-A, HLA-B és HLA-C. Mindhárom lókuszt a humán genom legváltozékonnyabb területei

közé tartozik, ezres nagyságrendű allélszámmal a teljes populációban.⁷ A három lókuszt összesen 6 HLA-I-es allélt jelent egyéenként, ezek a nagy genetikai variabilitásnak köszönhetően jó eséllyel mind különbözőek.

1.1.1.2. Aminosavspecifitás

Minden allélnak vannak preferenciái a peptidkötés során; bizonyos aminosavakat igényelnek a megfelelő kötési pozíciókban. Ennek megfelelően egyes peptideket stabilan és erősen, másokat pedig gyengén vagy egyáltalán nem kötnek meg.⁸ A megkötött peptid aminosavjainak relatív pozíciója a HLA-molekulához képest jól meghatározott. HLA-I esetén a peptidkötő árok peptid limitálja a bemutatott antigén hosszát, rendszerint 9 aminosavban.⁵ A peptid a két végén rögzül a HLA-molekulához, általában a 2., 3. és 9. aminosavnál, ezeket horgonyzó pozícióknak hívjuk. A kötés erősségét várhatóan a horgonyzó pozíciók aminosavjai határozzák meg.

Az allélok által megkötött peptidek vizsgálatával leírhatjuk, hogy mely aminosavakra specifikusak, azaz mely aminosavak jelenlétét igénylik az egyes pozíciókban ahhoz, hogy létrejöjjön a peptidkötés.⁸ (3. ábra)



3. ábra: Peptidkötő logók

A vízszintes tengelyen a kötési pozíciók láthatóak, a függőlegesen az, hogy mennyi az adott pozíció információtartalma (bit), ezáltal jelentősége. Az egyes betűk egymáshoz viszonyított aránya az oszlopon belül a megfelelő aminosavak előfordulási gyakoriságát jelöli az adott allél által bizonyítottan megkötött peptidek kérdéses pozíciójában.⁹ Példaként két gyakori allélt választottam, amelyek aminosavspecifitásai jelentősen eltérnek: az A0101-es allél fő horgonyzó pozíciói a 3. és a 9. aminosav, az előbbiben aszparaginsavat, az utóbbiban tirozint köt legszívesebben. Az A0201-es allél horgonyzóit a 2. (leucin) és a 9. (leucin vagy valin). Ezek az adatok nem feltétlenül jelentik azt, hogy az adott pozíciókban ilyen aminosavakkal bíró peptidek mindenképpen bemutatásra kerülnek, vagy hogy csak ilyen peptidek kötődnek meg, de jó becslést jelentenek.

Forrás: saját ábra.

1.2. Tumorok

Tumornak nevezzük a sejtszaporodás és pusztulás egyensúlyának felborulását, mikor genetikai és/vagy epigenetikai okokból génhibák jönnek létre, melynek következtében genetikailag károsodott sejtek szaporodnak fel.¹⁰ A felszaporodás okozhat jó- vagy rosszindulatú daganatot, előbbi szabályozott méretű, nem terjeszkedő, általában nem okoz problémát; utóbbi folyamatosan növekszik, behatol a környezetébe és pusztítja azt, további, távolabbi szöveteket megtámadva pedig áttéteket képez. A rosszindulatú tumoros megbetegedéseket ráknak nevezzük. A továbbiakban elsősorban a rosszindulatú daganatokkal foglalkozunk, és a tumor szót is ennek a szinonimájaként használom.

Ha a tumorsejtek DNS-ében keletkezett mutációk letranszlálódnak, sok esetben változásokat okoznak a fehérjék aminosavszekvenciájában. Ezek a megváltozott szekvenciájú, egészséges emberi sejtben jelen nem lévő fehérjék a neopeptidek.⁶ Ha a neopeptidek bekerülnek az antigénbemutatás folyamatába, és a HLA-molekulák útján megjelennek a sejtfelszínen, immunreakció indulhat ellenük. A neopeptidek HLA által bemutatott, a saját emberi antigénekhez képest aminosavcserét tartalmazó darabjai a neoepitópok, ezeket képes az immunrendszer felismerni. Azokat a mutáns szekvenciákat, amelyek ellen indul immunreakció, neoantigénnek nevezzük.⁶

A neoantigének rendkívül fontos szerepet játszanak a immunrendszer tumorok elleni védekezésében, hiszen a jelenlétük felismerésével beazonosíthatók a rákos sejtek, és lehetővé válik az immunreakció. A neoantigének HLA-bemutatása tehát kulcsfontosságú.¹¹

Egy-egy aminosav megváltozása jelentős változást hozhat a HLA-kötésben, sőt az aminosavcsere hatására korábban meg nem kötött peptidek válhatnak HLA-bemutatottá, illetve fordítva, eredetileg bemutatott peptidek elveszthetik ezt a tulajdonságukat.

A eredeti és a mutáns peptid kötési affinitásának eltérését differenciális agretopicitási indexnek (Differential Agretopicity Index), röviden DAI-nak nevezzük, ez jó jellemzője az neopeptid eltérésének és az immunogenitásnak¹²:

$$DAI = A_{Orig} - A_{Mut}, \text{ ahol } A_{Orig} \text{ az eredeti peptid affinitása, } A_{Mut} \text{ pedig a mutálté.}$$

A DAI kiszámítása általában a NetMHCpan epitóp-prediktáló program¹³ segítségével történik, amely egy becsült affinitást ad vissza arra vonatkozóan, hogy a kérdezett peptidet milyen erősen köti meg egy bizonyos HLA-molekula. Ennek kiszámításához az IC_{50} -értéket használják, amely megadja, hogy az adott peptid mekkora koncentrációban szorít le 50%-ban egy biztos kötő ligandumot a HLA-molekuláról. Mértékegysége általában nM (nmol/L). Kis

IC₅₀ magas affinitást, vagyis jól kötődő peptidet jelent, hiszen kis koncentráció is elegendő a nagyarányú megkötéshez. Ezt az affinitási értéket kiszámítják az eredeti és a mutált peptidre, és a különbsége adja meg a keresett DAI-t.¹⁴

Kis DAI kis különbségre utal az eredeti és a mutált peptid között, tehát nagy az esélye, hogy az eredeti peptid is bemutatásra került – ebben az esetben valószínűbb, hogy az immunrendszer hasonlóan reagál a kettőre, és tolerancia alakul ki a neopeptiddel szemben. Ennek az az oka, hogy a két peptidszekvencia között egyetlen aminosav különbség van, így nagy eséllyel ugyanaz a T-sejt receptor fogja felismerni őket (ezt T-sejt keresztreaktivitásnak nevezik, amely azt jelenti, hogy egy T-sejt receptor egynél több HLA-peptid-komplexet képes felismerni).

Pozitív DAI (a mutált peptid affinitása nagyobb az eredetiénél) azt jelenti, hogy az eredeti peptid várhatóan nem került bemutatásra, a neopeptid viszont igen. Ez lehetővé teszi az immunreakció kialakulását, hiszen az immunrendszer nem alakított ki toleranciát a mutálthoz nagyon hasonló eredeti peptiddel szemben. Az újonnan bemutatott neopeptid tehát elég különböző lesz ahhoz, hogy az immunrendszer újként, idegenként, veszélyesként azonosítsa.

1.2.1. Tumorok immunogenitása

A tumorok immunogenitása tehát nagymértékben függ az őket kialakító mutációktól. Azonban még az azonos tumortípusba tartozó esetek között is nagy különbségek lehetnek immunogenitás szempontjából.

Az első tényező, amely ezt magyarázhatja, a tumorok mutációs számában adódó eltérések. Minél több mutáció történik, annál valószínűbb, hogy lesz ezek között olyan, amelyet a HLA-molekulák képesek hatékonyan megkötni. A tumor mutációs szám egy széles körben használt mérőszám.¹⁵

Önmagában azonban a mutációs szám nem jelzi előre a tumor immunológiai sorsát. Felmerülhet tehát a kérdés, hogy hatással van-e, és ha igen, milyen hatással van az immunogenitásra a keletkezett mutációk minősége.

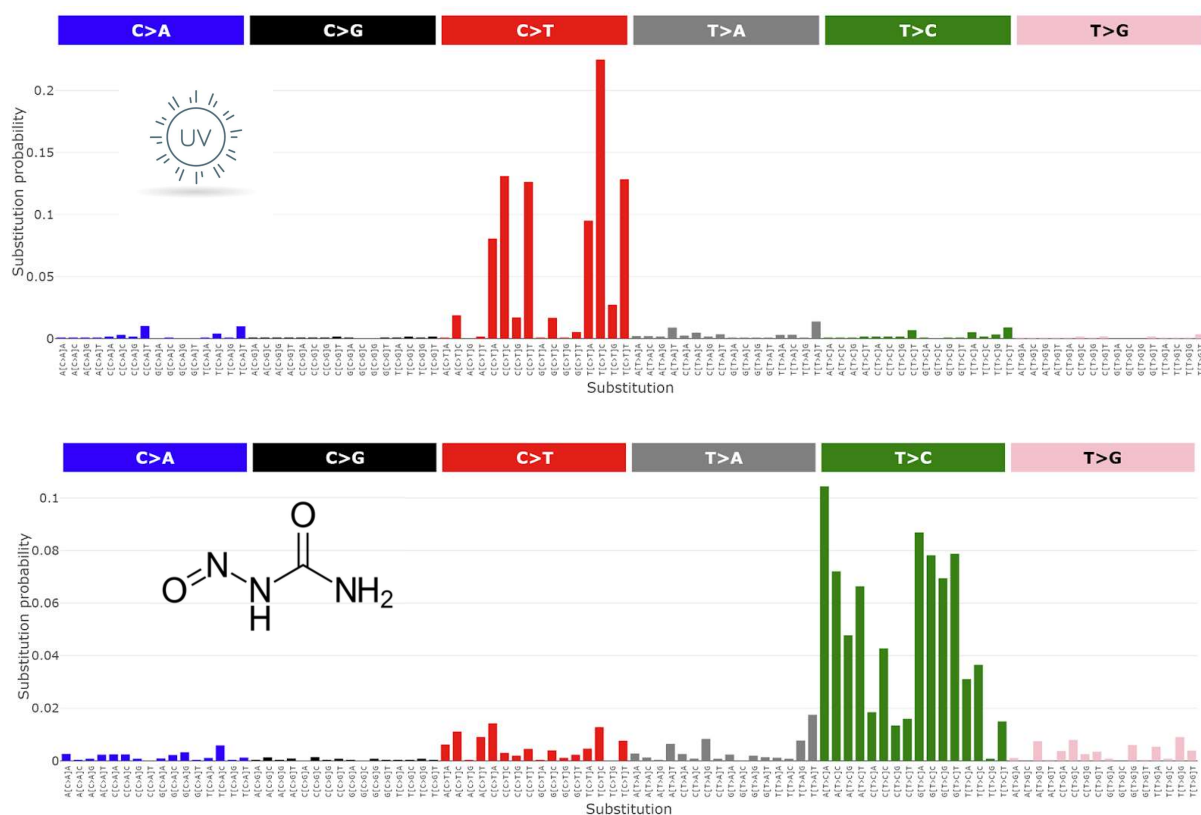
1.2.1.1. Mutációs szignatúrák

Mutációk az emberi test minden sejtjében folyamatosan keletkeznek. Ezek több mutációs folyamat következményei lehetnek: a DNS-replikáció kisebb-nagyobb hibái, külső és belső mutagéneknek való kitettség, a DNS enzimatisz módosulása, hibás DNS hibajavítás. A

különböző mutációs folyamatok a mutációk egyedi kombinációit generálják, amelyeket mutációs szignatúráknak neveznek.

Az eltérések a nukleotidtípusok mutációinak gyakoriságában nyilvánul meg; gyakran a szomszédos nukleotidok minősége is befolyással van a kialakult mutációkra. A szomszédokat is figyelembe véve a tizenkét lehetséges nukleotidszubsztitúció (A>C, A>G, A>T, C>A, C>G, C>T, G>A, G>C, G>T, T>A, T>C és T>G) 96 különböző mutációs lehetőséget jelent. Minden mutációs szignatúra esetében ezeknek a mutációknak egyedi mintázata jön létre.

A jobb érthetőség kedvéért bemutatok két példát: az első az UV-fény, a második egy kemoterápiás szer, a nitrozourea mutációs szignatúrája. (4. ábra)



4. ábra: Mutációs szignatúrák

Az egyes oszlopok egy-egy bázishármasnak felelnek meg, ahol mindig a középső nukleotid megy keresztül mutáción. A változás minőségét a színek jelzik, egy színekategórián belül a szomszédos bázisok szerint különítik el az eseteket. A tizenkét lehetséges cseretípus helyett csak hat szerepel: ennek magyarázata, hogy valójában minden mutáció két egyidejű báziscserét jelent (egy-egy a két szálon), és a diagram készítése során ezek közül mindig az eredetileg pirimidint tartalmazó szálat vették figyelembe. A függőleges tengely az adott mutációtípus gyakoriságát mutatja.

Forrás: signal.mutationsignatures.com

Látható, hogy az UV elsősorban C>T, míg a nitrozourea T>C mutációkat hoz létre.

Más mutagéneket és mutációs hatásokat hasonlóan felépülő mutációs szignatúrákkal jellemezhetünk.

1.2.2. Immunellenőrzőpont-gátló immunterápia

A T-sejtek aktivált állapotba kerüléséhez, vagyis az immunreakció megindulásához a megfelelő antigénen kívül a kérdéses sejten bizonyos aktiváló szignálok jelenlétére és gátló szignálok hiányára is szükség van. Ezeket összefoglaló néven immunellenőrzési pontoknak nevezzük.¹⁶

Az immunellenőrzőpontokon úgynevezett kostimulátor molekulák kapcsolódnak a T-sejtek megfelelő receptoraihoz. Közülük a negatív kostimulátor-molekulák (ko-stimulátor: a név abból származik, hogy az antigénen kívül az ő jelük is szükséges a T-sejt aktivációhoz) jelzik a T-sejtek számára, hogy a szervezet saját sejtjéről van szó, így jelenlétük toleranciát alakít ki. A tumorsejtekben felülexpresszálnak a negatív kostimulátorok, ezzel hatékonyan meggátolva a tumorelles T-sejt aktivációt, és toleranciát alakítva ki. Néhány ellenőrzőpont gátlásának eredményességét a rákkezelés során már kimutatták; ilyenek például a programozott sejthalál protein-1 (PD-1) és a citotoxikus T-limfocitákkal asszociált antigén-4 (CTLA-4). Ezek blokkolásával az immunrendszer rávehető a tumor megtámadására.¹⁷

A közelmúltban fejlődésnek indult immunellenőrzőpont-gátló kezelések ígéretes terápiás lehetőséget jelentenek sokféle daganattípus esetében.¹⁰ Fő jelentőségük abban rejlik, hogy olyan esetekben is hatásosak lehetnek, amelyek kezelése egyébként nehézkes vagy várhatóan sikertelen. Ilyenek például az előrehaladott tumorok, vagy bizonyos daganattípusok, mint a tüdő laphámrákja vagy a húgyhólyagrák.¹⁰

Sajnos azonban az immunterápiák nem minden beteg esetében járnak eredménnyel. Hatékonyságuk előzetes becsléséhez a betegszelekcióban segítséget nyújtó prognosztikus és prediktív faktorokra lenne szükség. A számba vehető markerek közül a legszélesebb körben alkalmazottak a mutációs szám, az Immunoscore (a daganatot infiltráló egyes T-sejt-populációk denzitása) és a PD-1 fehérje expressziója a daganat- vagy infiltráló immunsejteken.¹⁰

A használt markerek hatékonysága azonban még hogy maga mögött kívánnivalót: bár a segítségükkel kiválogatható egy, a hagyományos kemoterápia helyett az immunterápiából jobban profitáló csoport, de a kezelésre adott választ nem tudják előrejelezni - a betegek egy része egyáltalán nem reagál.¹⁸

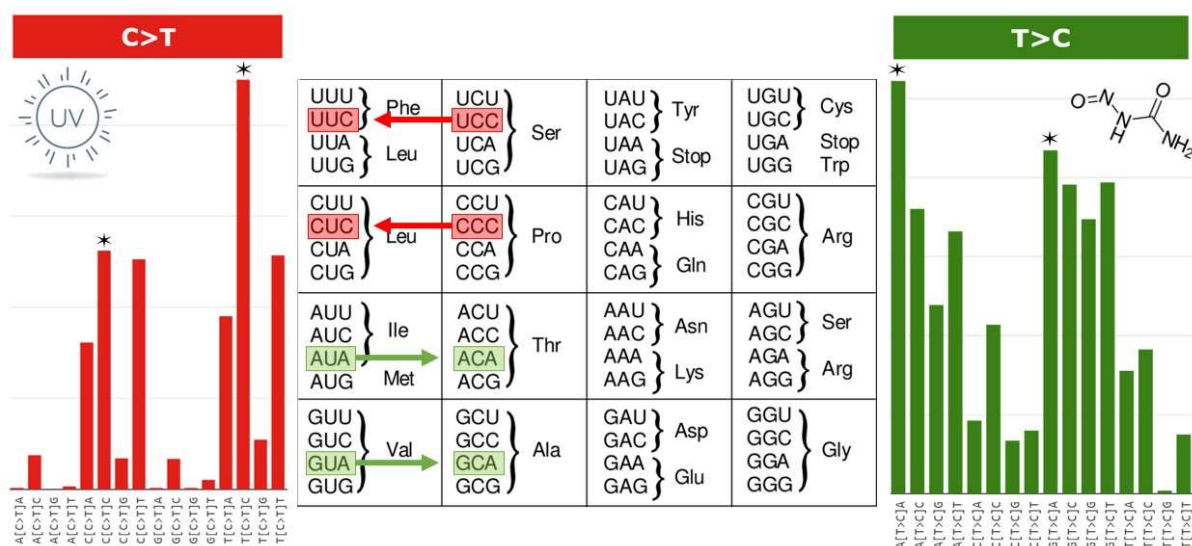
Analíziseinkben meg szeretnénk volna mutatni, hogy a tumorokban létrejövő neopeptidek bemutatását potenciálisan meghatározzák a tumorokra ható mutagén hatások, valamint a hordozott HLA molekulák, így a vizsgálat első lépése lehet a jelenlegiekénél lényegesen pontosabb biomarkerek felfedezésének.

2. Célkitűzés

A hipotézisünk első eleme: a különböző mutagén hatások különböző aminosavcseréket eredményeznek.

Különböző mutagén hatások különböző DNS-mutációkat hoznak létre. Ahhoz, hogy foglalkozhassunk ezeknek a mutációknak az immunológiai jelentőségével, meg kell vizsgálnunk, hogy milyen hatással vannak a sejt peptidjeire, nevezetesen, hogy különböző mutációs szignatúrák különböző típusú aminosavcseréket, ebből következően pedig különböző minőségű neopeptideket eredményeznek-e.

Az elméleti megfontolások támogatják ezt az elképzelést, hiszen a mutációs szignatúrák definícióból adódóan különböző kodonokat hajlamosak mutálni, így várhatóan eltérő hatással lesznek a peptidszekvenciákra. Arra számítunk tehát, hogy a (különböző mutációs szignatúrával jellemezhető) különböző tumortípusok eltérnek az egyes aminosav-változások gyakoriságában. (5. ábra)



5. ábra: Aminosavcserék

A két-két leggyakoribb UV- és nitroourea-indukált mutáció (a nekik megfelelő oszlop csillaggal jelölve a szignatúra-diagramon) hatása az aminosavakra. Látható, hogy a két szignatúra által eredményezett neopeptidek erősen eltérnek a várható aminosavcserékben (színesen kiemelve a kodontáblában). Természetesen ez csak néhány kiragadott példa, hiszen a fellépő mutációk nem feltétlenül a kodon közepére esnek, mégis adnak egy képet az átfogó jelenségről.

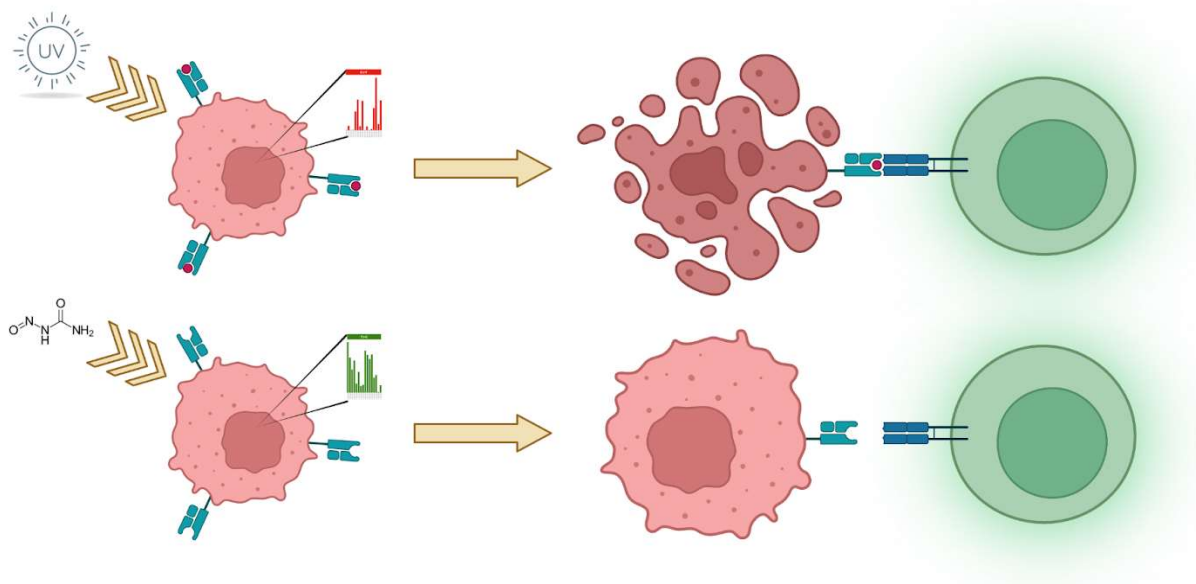
Forrás: szignatúrarészletek: a signal.mutationalsignatures.com, a jelölések saját munka

Mivel a HLA-molekulák peptidbemutatósi hatékonysága az adott peptid aminosavjaitól függ, a neopeptidek megkötésének hatékonysága nagymértékben eltérhet az eredeti, mutálatlan szekvenciához képest. Hipotézisünk, hogy ez a kötési affinitásban jelentkező

eltérés függ a jelenlévő HLA-alléltól, hiszen a különböző HLA-allélok különböző aminosavak megkötésére specifikusok. Feltételezésünk szerint egy adott neoantigént bizonyos allélok az eredetnél hatékonyabban, bizonyos allélok kevésbé hatékonyan mutatnak be.

Ezek után, ha azt is figyelembe vesszük, hogy az első feltevésünk szerint a különböző mutációs szignatúrák különböző aminosavcserékkel rendelkező neopeptideket hoznak létre, végső célunk annak kimutatása, hogy egy adott mutációs szignatúra neopeptidjeit egyes HLA-allélok hatékonyabban, mások gyengébben kötik meg. Más szavakkal, a tumort jellemző mutációs szignatúrák és a HLA-genotípus együttesen közvetlenül meghatározza, hogy a sejtek felszínén milyen potenciális neoantigének jelennek meg.

Célunk, hogy kimutassuk, hogy ha egy mutagén hatás olyan aminosavakat hoz létre, amelyet a beteg HLA alléljai megkötnek, a tumor felszínén több potenciális neoantigén jelenik meg, így az nagyobb eséllyel lesz immunogén.



6. ábra: Hipotézis

Különböző mutagének különböző mutációs szignatúrával jellemezhető mutációkat hoznak létre, amelyek ebből adódóan eltérő eséllyel kerülnek bemutatásra a HLA-allélok által.

Forrás: szignatúrarészletek: a signal.mutationsignatures.com, BioRender

3. Módszerek

3.1. Felhasznált adatok és adatbázisok

A használt mutációs szignatúrák két interneten elérhető adatbázisból származnak: ezek a COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) és a Signal. Mindkét helyről ingyenesen letölthetők a mutációs szignatúrák adatai.

A COSMIC adatbázis esetében az SBS (Single base substitutions – Egyszeres bázisszubsztitúciók) szignatúrákat használtam, összesen 67-et. Ebben sok különböző feltételezett etiológiájú szignatúra előfordul (pl környezeti mutagének vagy a DNS-hibajavító mechanizmusok hibáinak szignatúrái). A szignatúrákat valódi tumoros minták mutációinak elemzésével hozták létre.

A Signálról a környezeti mutagenézis kategóriába tartozó szignatúrákat használtam, amelyek leírásához indukált pluripotens őssejteket tettek ki különböző mutagéneknek. Innen 38-féle szignatúrát használtam.

A két adatbázis szignatúrái esetében hasonló eredményeket kaptam. A dolgozatban ezeket az eredményeket a Signal-féle szignatúrákon mutatom be, mivel itt könnyebben értelmezhetőek az egyes szignatúrák, hiszen mindegyiket egy-egy konkrét és jól meghatározott hatás hozott létre, míg a COSMIC esetében a szignatúrákat generáló hatások gyakran csak feltételezettek, és számos esetben nem ismertek.

A HLA-allélok peptidkötésének vizsgálatához egy monoallélikus sejteken végzett immunpeptidomikai vizsgálatból származó adatszettet használtuk, amelyben több, mint 185000 megkötött peptidet eluáltak összesen 95-féle HLA-I-es allélt hordozó monoallélikus sejtvonalról.¹⁹

Egy allél aminosav-specifitásának kiszámításához először csoportosítottuk az általa megkötött peptideket hossz szerint, és csoportonként minden pozícióban meghatároztuk az aminosavak relatív előfordulási gyakoriságát. A pozíciók abszolút értékét súlyoztuk annak információtartalmával (amely azt mutatja, hogy mennyire változatos aminosavak fordulnak itt elő, vagyis indikálja, mennyire meghatározó az adott pozíció). Minden aminosavra vettük a súlyozott gyakoriságok összegét. Az allél végső specifitásait az adott aminosav különböző peptidhosszakra számolt eredményeinek a megfelelő peptidhossz relatív előfordulásával súlyozott átlagaként kaptuk.

A számolás menetét az alábbi képletek foglalja össze (x jelöli az aktuális aminosavat, y a pozíciót, $P(x,y)$ az x aminosav relatív gyakorisága y pozícióban, $I(y)$ az y pozíció

információtartalma, $A_n(x)$ x aminosav n hosszúságú peptidek alapján kapott affinitása, $P(n)$ az n hosszú peptidek relatív előfordulása az adott allél által megkötött epitópok között, m a különböző peptidhosszok száma:

$$A_n(x) = \sum_{y=1}^n (P(x, y) \cdot I(y))$$

$$A(x) = \frac{\sum_n (A_n(x) \cdot P(n))}{m}$$

Ebből az aminosavcserékre vonatkozó allélspecifikus DAI-t már egy egyszerűen a két érintett aminosav értékének különbségeként megkaptuk.

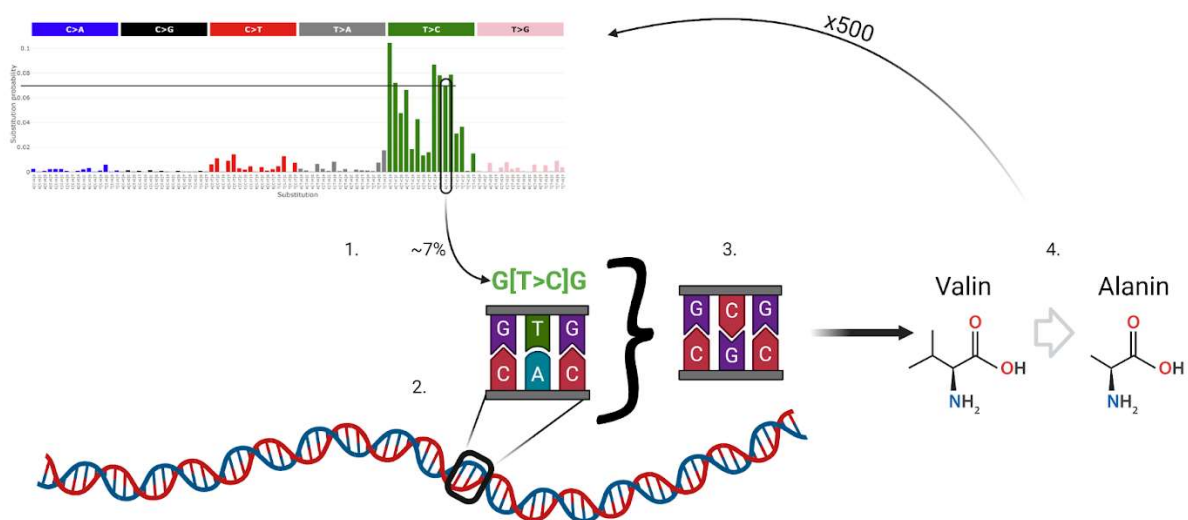
$$DAI(x_1, x_2) = A(x_1) - A(x_2)$$

Annak valódi tumormintákon történő megmutatásához, hogy a HLA-allélok aminosav-specifitásának jellemzésére használt mérőszámaink valóban jól jellemzik-e egy adott aminosav-változás megjelenését a sejtfelszínen, ismert HLA-genotípusú tumorminták adatait gyűjtöttem össze különböző publikációkból. A mintákról ugyancsak ismert volt, hogy milyen mutációkat tartalmaznak, és milyen mutált peptidek jelennek meg a sejtek felszínén.

3.2. A mutációs szignatúrák hatásának szimulációja

A szimulációkat és a további analíziseket R nyelven történő programozással végeztem el.

Először is szimulált tumorokat készítettem a szignatúrák (signal.com, letöltve: 2020. február 18.) és a humán genom (ensemble.org, letöltve: 2019. szeptember 26.) adatainak segítségével. Az analízis során azokat a kódoló szakaszokat használtuk fel, amelyeknek szerepel mutált verziója a TCGA (The Cancer Genome Atlas)-adatbázisban) adataiban. Egy tumor szimulálásának menete a következő volt: minden iterációban a mutációs szignatúrában való előfordulási gyakoriságnak megfelelően súlyozott valószínűséggel vettem egy bázishármaszt, és a középső nukleotidot megfelelően mutáltam. Ezután megvizsgáltam, hogy a mutáció hatására történt-e aminosavcsere, és ha igen, ezt feljegyeztem. Ezt addig ismételtam, míg 500 missense mutációt létre nem hoztam, ekkora mutációs szám már releváns, jól vizsgálható tumort jelent.¹⁰ Minden szignatúrára 10 tumort szimuláltam, és összesítettem az ezekre kapott eredményeket. Végül a kapott tumorokban megállapítottam az egyes aminosavcserék gyakoriságát.



7. ábra: Tumorszimulálás

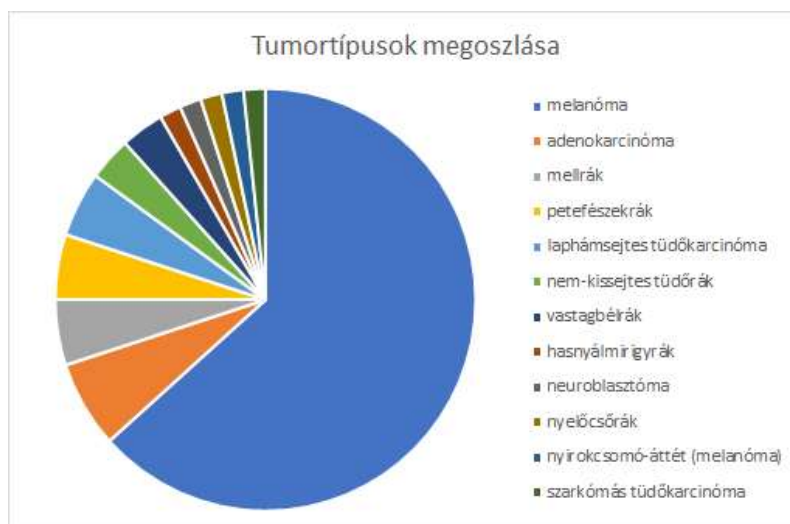
Az ábrán összefoglaltam a szimuláció lépéseit: először (1.) véletlenszerűen (de a szignatúrában való gyakoriságukkal súlyozva) választok egyet a tripletek közül, majd (2.) szintén véletlenszerűen keresek egy megfelelő bázishármost a genomból, (3.) létrehozom a megfelelő mutációt, végül (4) megvizsgálom és feljegyzem az esetleges aminosavcserét. Ezt addig ismétlem, míg el nem érek 500 aminosav-változást.

Forrás: szignatúra: a signal.mutationalsignatures.com, BioRender

A kapott eredményeket hő térképeken ábrázoltam, ehhez az R “pheatmap” csomagját használtam.

3.3. Validálás valódi tumormintákon

Tumorminták HLA-alléljainak aminosav-specifitását jellemző értékek valós predikciós képességét teszteltem a neopeptid-bemutatásra. Számos publikációból (lásd: Irodalom: *Validáláshoz használt neoantigének forrásai*) gyűjtöttem ismert HLA-genotípusú, valódi tumorokból származó mintákat. Ezek között számos tumortípus előfordult, a leggyakoribb (a minták 63%-a) a melanóma volt.



8. ábra: Tumortípusok megoszlása

Végül összesen 60 esetet használtam fel, amelyeknél ismertem egyrészt az egyes aminosavcserék gyakoriságát a tumor teljes neopeptidállományában, másrészt a tömegspektrometriával azonosított, HLA-bemutatott neoepitópok listáját. Az összegyűjtött minták mutációit aszerint csoportosítottam, hogy bemutatásra kerültek-e a sejtfelszíni neopeptidekben, vagy sem. Ezt követően a korábban leírt HLA-affinitási értékekből számolt DAI segítségével megvizsgáltam, hogy a két csoportban az egyes mutációk milyen hatást gyakoroltak az adott minta HLA-alléljainak kötésére.

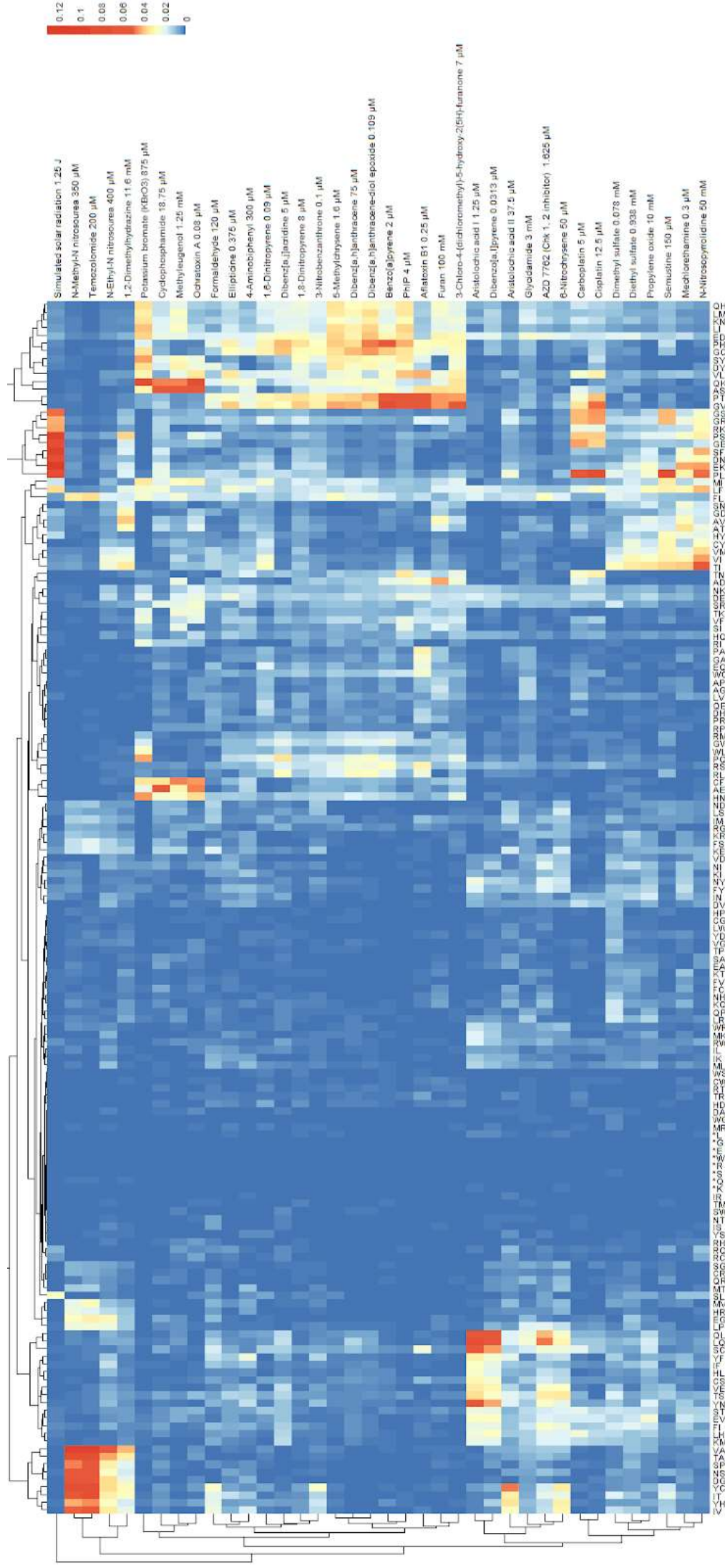
ROC-analízis keretében a “ROCR” könyvtár segítségével tumoros sejtvonalak²⁰ peptidjeit elemeztem, és megkíséréltem az aminosavak HLA-affinitásának segítségével prediktálni a peptidek bemutatását, így ellenőrizve az affinitási értékek predikciós pontosságát.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Az eltérő mutagének eltérő aminosavcseréket eredményeznek

Az első analízissel azt akartam megmutatni, hogy a különböző mutációs szignatúrák valóban különböző aminosavcseréket eredményeznek.

Ehhez meghatároztam a korábban leírt szimulációkban létrejött aminosavcseréket minden vizsgált mutagén esetén. Ez alapján egy előfordulási gyakoriságot rendeltem az egyes aminosavcserék és mutációs szignatúrák minden kombinációjához. A kapott eredményeket hő térképen ábrázoltam. (9-10. ábra)

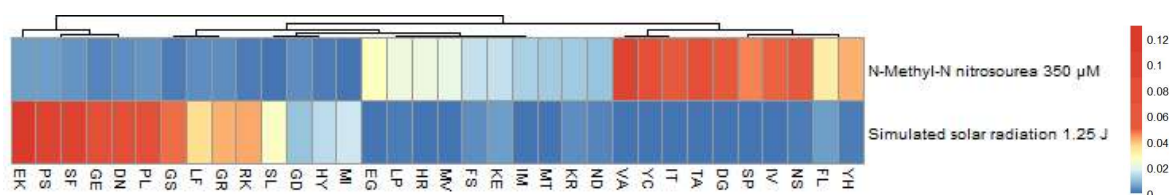


9. ábra: Aminosavcserekék gyakorisága szignatúráként

A hőtéreképen a különböző aminosav-változások (oszlopok) gyakoriságát láthatjuk az egyes mutációs szignatúrák (sorok) esetében. A színskálát a kiugró értékek miatt vörös irányban eltoltam. A vörös színhez közeledve az adott variáció előfordulási gyakorisága növekszik.

A sorok és oszlopok sorrendjét az oldalt látható dendrogramok határozzák meg, amelyeket a hőtéreké készítéséhez használt algoritmus hierarchikus klaszterezéssel hoz létre. Az algoritmus alapértelmezett módszerét, a teljes euklideszi távolsághoz használtam.

Látható, hogy a különböző mutagén hatások jelentősen eltérő gyakorisággal eredményeznek különböző aminosav-változásokat.



10. ábra: A nitrozourea és az UV aminosavcseréi

Ezen az ábrán kiemeltem a két korábban említett példát, az UV (Simulated solar radiation) és a nitrozourea (N-Methyl-N nitrosourea) mutációs szignatúráját, illetve azokat az aminosavcseréket, amelyek legalább az egyik esetben nagy valószínűséggel létrejöttek. Vegyük észre, hogy a két mutációs szignatúra milyen különböző aminosavcseréket hozott létre a szimulációk során.

Azt is láthatjuk, hogy az 5. ábrán az UV meghatározó aminosavcseréjének várt prolin→leucin (PL) és szerin→fenilalanin (SF) valóban gyakran bekövetkezett, ugyanígy az izoleucin→treonin (IT) és a valin→alanin (VA) a nitrozourea esetében.

A különböző mutációs szignatúrák nagy variabilitást mutatnak az aminosavcserék tekintetében: nincsen egyetlen általános elterjedt, minden vagy majdnem minden szignatúrára jellemző mutáció sem. Ez alátámasztja, hogy a különböző mutagén hatások által létrehozott tumorok neopeptidjei valószínűleg különbözni fognak.

4.2. A különböző HLA-molekulák aminosav-specifitása jelentősen eltér

Következő lépésként megnéztem, hogy a keletkezett aminosav-változások milyen hatást gyakorolnak az egyes HLA-allélok kötésére. Ehhez minden aminosavpárhoz egy allélfüggő DAI-értéket rendeltünk, amely azt fejezi ki, hogy az első aminosav cseréje a másodikra hogyan befolyásolja az adott allél esetében egy peptid kötésének erősségét és valószínűségét (részletek a Módszerekben). Minél kisebb DAI tartozik egy aminosavcseréhez, annál kisebb a különbség az eredeti és a mutált aminosav affinitása között az adott allél esetében, tehát annál valószínűbb, hogy a neopeptid képes toleranciát kialakítani. Nagy DAI esetében az eredeti peptid várhatóan nem kerül bemutatásra, így a neopeptid nem immúnreakciót válthat ki. Ezek az értékek az allélok által megkötött peptidek alapján kerültek meghatározásra.

Az egyes aminosavak alapján meghatároztuk az aminosavcserék hatását az egyes allélok peptidkötésére, és ezt az előzőkhez hasonlóan hőtérképen ábrázoltuk. (11. ábra)

Az ábrán észrevehetünk számos komplementer oszlopot – az ellentétes irányú aminosavváltozások (pl S→L és L→S) természetesen éppen ellentétes hatást gyakorolnak az egyes allélokra.

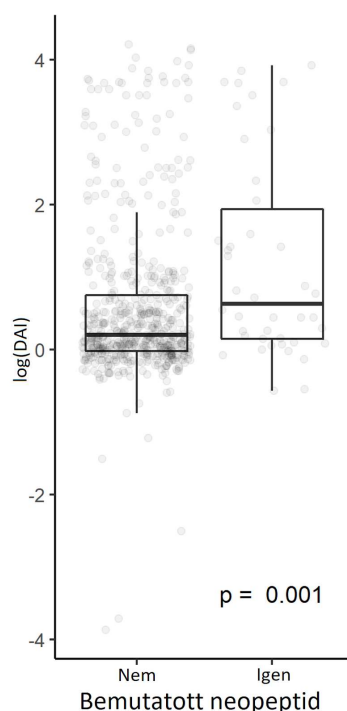
És újra csak nagy variabilitást láthatunk: a HLA-allélok különböző aminosavcserékre lesznek érzékenyek (észrevehetünk hasonló peptidkötő jellegzetességgel bíró allélok csoportjait), és az aminosavcserék különböző HLA-allél kötésére lesznek pozitív hatással.

4.3. A kiszámolt aminosav-specificitás prediktálja a mutáns peptidek sejtfelszíni megjelenését

A következőkben bemutatott két vizsgálattal azt szeretném megmutatni, hogy a 2. szimulációs lépés során felhasznált, a HLA-allélok aminosav-specificitását jellemző értékek valóban meghatározzák a neopeptidek bemutatást.

Az első analízis végrehajtásához számos különböző publikációból gyűjtöttem ismert HLA-genotípusú, valósi tumorokból származó mintákat. Ezek között több tumortípus is előfordult, a leggyakoribb a melanóma volt. Végül összesen 60 esetet használtam fel, amelyeknél ismertem egyrészt az egyes aminosavcserék gyakoriságát a tumor teljes neopeptidállományában, másrészt a tömegspektrometriával azonosított, HLA-bemutatott neoepitópok listáját.

A feltételezésünk szerint egy minta neopeptidjei közül azok kerülnek bemutatásra, amelyekben az aminosav-változás növeli a HLA-kötés erősségét. Ennek bizonyításához a minták aminosavmutációit aszerint csoportosítottam, hogy bemutatásra kerültek-e vagy sem a sejtfelszíni neopeptidekben. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a két csoportban az egyes mutációk milyen hatást gyakoroltak az adott minta HLA alléljainak kötésére. Ehhez a szimuláció során alkalmazott mérőszámokat használtuk. Minden mutációra kiválasztottam azt a HLA-allélt, amelyik a predikció szerint legerősebben köti, és az ezekre vonatkozó értékeket ábrázoltam. A kapott eredmények (12. ábra) azt mutatják, hogy a bemutatott aminosavcserék szignifikánsan jobban erősítették a HLA kötést, tehát az alkalmazott mérőszámok jól megközelítik a valóságot.



*12. ábra: A HLA-bemutatott aminosavcserék jobban növelik a kötés erősségét
A vízszintes tengelyen a eredeti és a mutált aminosav közti DAI-változás logaritmusát láthatjuk.
A diagramon jól látható, hogy a bemutatott mutációk átlagosan jóval nagyobb
DAI-növekedéssel jártak. A két csoport eredményeit Wilcoxon-próbával hasonlítottam össze,
ennek p-értékét láthatjuk az ábrán.*

A mérőszámok további validálásához még egy analízist végeztem, amely során ROC (Receiver operating characteristic – “Vevő működési karakterisztika”) görbéket hoztam létre annak jellemzésére, milyen jól jelzi előre a DAI számolásához használt allél-specifikus aminosav-affinitás (A) a bemutatás tényét.

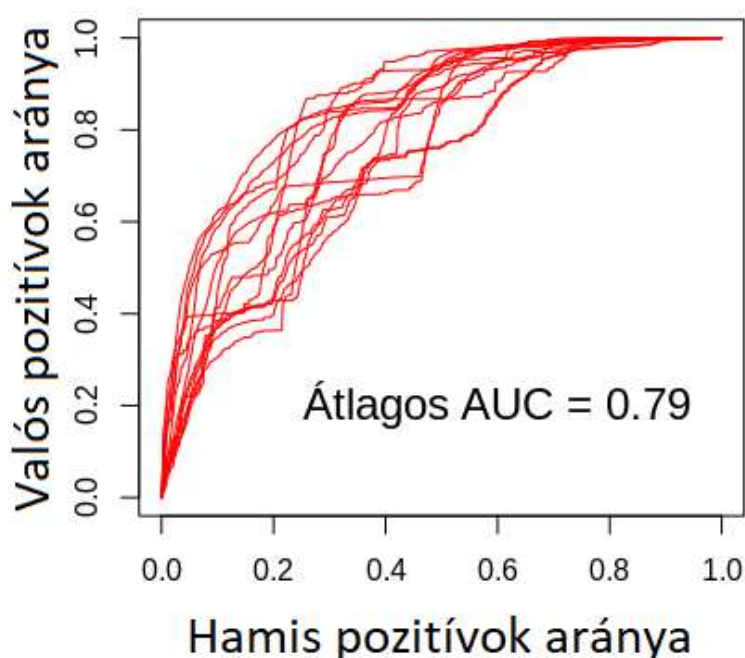
Ehhez egy 18 B-limfoblasztoid sejtvonalmintából álló adatsort használtam¹⁹, amelyek közül 14-et tudtam elemezni (négy esetben nem volt adatunk a sejtvonal egy-egy HLA-alléljáról). Mindegyik minta esetében ismertek a HLA-A és HLA-B-allélok, illetve a sejtfelszínről eluált peptidek, amelyek közül kiszűrtem a kilenc aminosavból állókat, és a továbbiakban csak ezekkel foglalkoztam.

Ebben az analízisben figyelembe vettem azt is, hogy az egyes aminosavak hatása a HLA-kötésre függ az adott aminosav pozíciójától is megkötött epitópon belül. A korábban meghatározott DAI-értékek számolása során felhasznált pozíció-specifikus ($A(x,y)$), vagyis a bemutatott peptid egyes helyeihez külön-külön számolt értékek alapján minden HLA-allélra meghatároztunk egy kötési motívumot, amely tartalmazza az allél specificitását minden aminosavra minden pozícióban.

Ezeknek a motívumoknak a segítségével meghatároztam az összes mintára nézve a jelenlévő HLA-allélok affinitását minden, legalább egy minta által bemutatott peptid

aminosavjaira. Mivel az egyes pozíciók különböző mértékben játszanak szerepet a kötés erősségében (elsősorban a horgonyzó pozíciók határozzák meg), minden allélra vettem a három legpozitívabb hatású aminosavat (ez jó közelítés a horgonyzó pozíciók számára²⁰), és ezek átlagával jellemeztem az adott allél hatékonyságát a kérdéses peptid bemutatásában. Végül minden peptidre nézve kiválasztottam a legjobb eredményt adó allélt (hiszen várhatóan ez fogja bemutatni az adott peptidet).

Így minden mintára kaptam egy adatsort annak jellemzésére, hogy az egyes peptidek mennyire hatékonyan kötődnek meg a HLA-molekulák által ebben a mintában, illetve ismertem minden peptid esetében, hogy az adott minta sejtfelszínén megjelent-e, vagy sem. Ezek alapján képes voltam ROC-görbét készíteni minden mintára, amelyeket együtt ábrázoltam a 15. ábrán.



13. ábra: Peptidbemutatás előrejelzése a HLA-affinitás segítségével

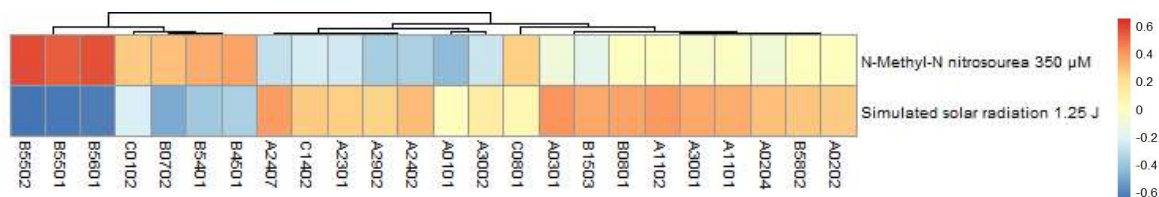
14 tumorminta ROC-görbáját láthatjuk együtt ábrázolva. A görbe minden adatpontja megfelel a hamis pozitívok arányának a valós pozitívokhoz képest, emellett az origóból kiindulva a csoportosításhoz használt küszöbérték folyamatosan növekszik. Minél nagyobb a görbe alatti terület (AUC), annál jobban működik az előrejelzés, hiszen ez azt jelenti, hogy a prediktor már szigorú (alacsony) küszöbnél jó teljesítményt nyújt: jelentős mennyiség elemet prediktál, és ezeket helyesen teszi. A grafikonon feltüntettem az AUC-értékek átlagát a 14 mintára.

Ez az eredmény alátámasztja, hogy a másodikként említett, különböző aminosavcserék HLA-bemutatásáról szóló szimulációból származó predikciók (lásd 4.2. fejezet) megbízhatóak, és segítségükkel valóban előrejelezhetjük a neopeptid-bemutatást, és ezen keresztül a tumor immunogenitását.

4.4. A HLA-molekulák eltérő mértékben képesek bemutatni egy adott mutagén által generált neopeptideket

Ezután kombináltam az előző két eredményt: az egyes aminosav-változások DAI-ját (lásd 11. ábra) súlyoztam a gyakoriságával (10. ábra) a megfelelő mutációs szignatúra esetében, így megkaptam, hogy egy adott szignatúra által okozott aminosavcserék várhatóan milyen hatást gyakorolnak egy adott HLA-allél peptidbemutatására.

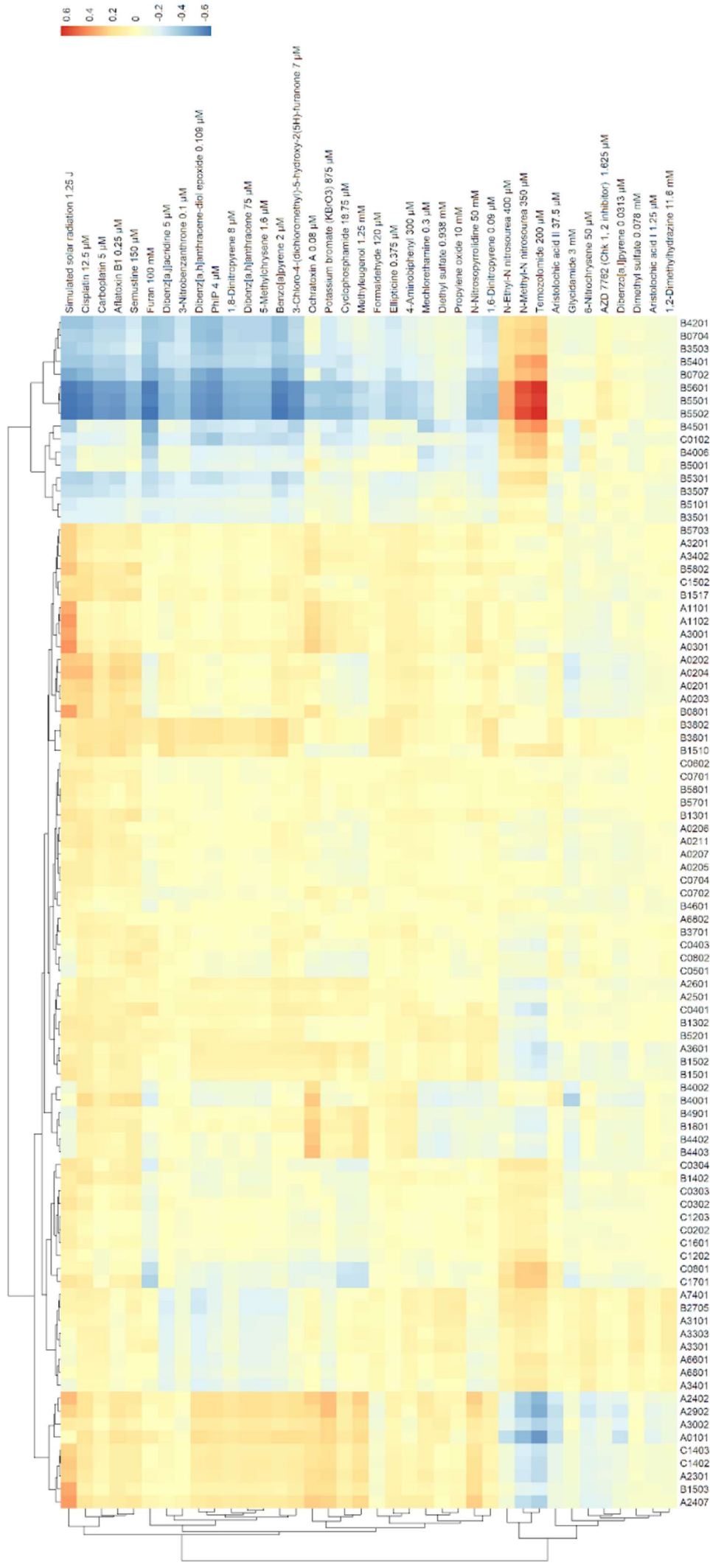
A következő hőtérképek bemutatja a kapott eredményeket. (14-15. ábra)



14. ábra: A nitrozourea és az UV neo-peptideinek HLA-kötése

Újra a két szokásos példánkat láthatjuk, az UV-t (Simulated solar radiation) és a nitrozoureat (N-Methyl-N nitrosourea). Látható, hogy szinte ellentétes az egyes HLA-allélok reakciója rájuk: ha az egyik emeli a peptidkötés hatékonyságát, a másik szinte biztosan csökkenti.

A vizsgált HLA-allélok reakciója tehát eltérő lesz a különböző mutációs szignatúrákkal rendelkező tumorok esetében: az eredményeim segítségével megállapíthatunk protektív és kockázatot jelentő mutagén-HLA párokat, vagyis hogy milyen HLA-allélok hordozása jelenthet előnyt és hátrányt bizonyos tumortípusok esetében. A 13. ábra alapján például arra számíthatunk, hogy az elsősorban UV-generált melanóma esetében a kifejezetten gyakorinak számító A0301-as vagy az A1102-es allél pozitívan, míg a B55-ös allélok negatívan befolyásolják a kimenetelt.



15. ábra: Mutációs szignatúrák neopeptidjeinek HLA-kötése

A hőérképen mutációs szignatúra (oszlop) és HLA-allél (sor) párok peptidkötési hatékonyságára adott becslésünk látható. Láthatjuk, hogy a lehetséges kölcsönhatások nagy variabilitást mutatnak: egy adott mutációs szignatúra különféle módon viselkedik eltérő HLA-allélokkal, és egy adott HLA-allél különböző módon köt meg az egyes mutációs szignatúrák neopeptidjeit.

5. Összefoglalás

A HLA általi peptidbemutatás kulcsfontosságú eleme a tumorellenes immunválasznak: minél több neopeptid kerül ki a sejt felszínére, annál valószínűbb, hogy a tumor nem kerül el az immunrendszer figyelmét.

A bemutatott neopeptidek száma elsősorban a mutációszámtól függ, hiszen a mutációk számával együtt a neopeptidek száma is nő, ezzel együtt pedig annak esélye, hogy közöttük előfordul olyan, amelyet valamelyik jelenlévő HLA-molekula megköt. Azonban még közel azonos mutációszámmal rendelkező tumorok között is jelentős különbséget tapasztalhatunk immunogenitás tekintetében.

A kutatócsoportunk egyik fő hipotézise szerint nem csak a tumor mutációinak száma, hanem azok minősége is rendkívül fontos szerepet játszik a peptidbemutatás hatékonyságában. A mutációk minőségét az adott tumorra jellemző mutációs szignatúrák írják le, ezek pedig a tumort létrehozó mutagéntől függenek.

Kutatásom során a különböző mutációs szignatúrák által generált neopeptidek és azok HLA-kötésének variabilitását vizsgáltam. Számítógépes szimuláció segítségével nagy változékonyságot prediktáltam az eltérő mutációs szignatúrák neopeptidjeinek aminosavszekvenciáiban, különböző gyakori aminosavcseréket jósolva a különböző mutációs szignatúrákra. Szintén erős variabilitást mutattam ki a különböző HLA-allélok peptidkötő specificitásában az általuk bizonyítottan megkötött peptidek alapján. Végül pedig az eredményeim alapján különböző peptidkötő hatékonyságú mutációs szignatúra–HLA-allél párok létezését várom. Ez alapján várhatóan megállapíthatunk kockázatot jelentő és protektív HLA allélokat különböző tumortípusok esetén, illetve eredményeink segíthetnek előrejelezni az immunterápia sikerességét, ismerve a tumortípust és a beteg HLA-genotípusát.

További terveink az analízis folytatására a HLA-allél és mutációs szignatúra kombinációk prediktív erejének meghatározása, amelyhez *in silico* és *in vitro* kísérletet is tervezünk. Ez utóbbihoz monoallélikus (egyetlen HLA-alléllal rendelkező) sejtvonalakat használunk, amelyeket különböző mutagén hatásoknak teszünk ki, és vizsgáljuk, hogy az adott mutagénre nézve jól kötőnek prediktált allél jelenléte valóban magasabb immunogenitást eredményez.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a Rendszerimmunológiai Kutatócsoport minden tagjának, és mindenekelőtt témavezetőmnek, Manczinger Máténak a segítségét a kutatás és a dolgozat írása során.

7. Ábrajegyzék

1. ábra: A HLA-molekulák felépítése
2. ábra: Antigénbemutató
3. ábra: Peptidkötő logók
4. ábra: Mutációs szignatúrák
5. ábra: Aminosavcserék
6. ábra: Hipotézis
7. ábra: Tumorszimulálás
8. ábra: Tumortípusok megoszlása
9. ábra: Aminosavcserék gyakorisága szignatúránként
10. ábra: A nitrozourea és az UV aminosavcseréi
11. ábra: Aminosavcserék hatása a HLA-kötésre
12. ábra: A HLA-bemutató aminosavcserék jobban növelik a kötés erősségét
13. ábra: Peptidbemutató előrejelzése a HLA-affinitás segítségével
14. ábra: A nitrozourea és az UV neopeptidjeinek HLA-kötése
15. ábra: Mutációs szignatúrák neopeptidjeinek HLA-kötése

8. Irodalom

1. Beutler, B. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* **40**, 845–859 (2004).
2. Chaplin, D. Overview of the Immune Response. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, (2010).
3. Parham, P. *The Immune System*.
4. Čemerski, S. & Shaw, A. Immune synapses in T-cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 298–304 (2006).
5. Wieczorek, M. *et al.* Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front. Immunol.* (2017)

doi:10.3389/fimmu.2017.00292.

6. Efremova, M., Finotello, F., Rieder, D. & Trajanoski, Z. Neoantigens Generated by Individual Mutations and Their Role in Cancer Immunity and Immunotherapy. *Front. Immunol.* (2017) doi:10.3389/fimmu.2017.01679.
7. Trowsdale, J. The MHC, disease and selection. *Immunol. Lett.* **137**, 1–8 (2011).
8. Manczinger, M. *et al.* Negative trade-off between neoantigen repertoire breadth and the specificity of HLA-I molecules shapes antitumor immunity. *Nat. Cancer* **2**, 950–961 (2021).
9. Gao, Z., Liu, L. & Ruan, J. Logo2PWM: a tool to convert sequence logo to position weight matrix. *BMC Genomics* **18**, 709 (2017).
10. Chan, T. A. *et al.* Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann. Oncol.* **30**, 44–56 (2019).
11. Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* **348**, 69–74 (2015).
12. Ghorani, E. *et al.* Differential binding affinity of mutated peptides for MHC class I is a predictor of survival in advanced lung cancer and melanoma. *Ann. Oncol.* **29**, 271–279 (2018).
13. Lundegaard, C., Lund, O. & Nielsen, M. Accurate approximation method for prediction of class I MHC affinities for peptides of length 8, 10 and 11 using prediction tools trained on 9mers. *Bioinformatics* **24**, 1397–1398 (2008).
14. Duan, F. *et al.* Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity. *J. Exp. Med.* **211**, 2231–2248 (2014).
15. Fusco, M. J., West, H. (Jack) & Walko, C. M. Tumor Mutation Burden and Cancer Treatment. *JAMA Oncol.* **7**, 316 (2020).
16. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264 (2012).
17. Mehdizadeh, S. *et al.* Immune checkpoints and cancer development: Therapeutic implications and future directions. *Pathol. - Res. Pract.* **223**, (2021).
18. Pharaon, R., Koczywas, M. A., Salgia, S., Mohanty, A. & Massarelli, E. Biomarkers in immunotherapy: literature review and future directions. *J. Thorac. Dis.* **12**, (2020).

19. Sarkizova, S. *et al.* A large peptidome dataset improves HLA class I epitope prediction across most of the human population. *Nat. Biotechnol.* **38**, 199–209 (2020).
20. Pearson, H. *et al.* MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome. *J. Clin. Invest.* **126**, (2016).

Validáláshoz használt neoantigének forrásai:

Bassani-Sternberg M, Pletscher-Frankild S, & Jensen LJ, Mann M. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. *Mol Cell Proteomics*. 2015 Mar;14(3):658-73. doi: 10.1074/mcp.M114.042812.

Carreno BM. *et al.* Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. *Science*. 2015 May 15;348(6236):803-8. doi: 10.1126/science.aaa3828.

Kalaora S. *et al.* Use of HLA peptidomics and whole exome sequencing to identify human immunogenic neo-antigens. *Oncotarget*. 2016 Feb 2;7(5):5110-7. doi: 10.18632/oncotarget.6960.

Bassani-Sternberg M. *et al.* Direct identification of clinically relevant neoepitopes presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry. *Nat Commun*. 2016 Nov 21;7:13404. doi: 10.1038/ncomms13404.

Bassani-Sternberg M. *et al* HLA-I motifs across HLA peptidomes improves neo-antigen predictions and identifies allosteric regulating HLA specificity. *PLoS Comput Biol*. 2017 Aug 23;13(8):e1005725. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005725.

Cohen CJ. *et al.* Isolation of neoantigen-specific T cells from tumor and peripheral lymphocytes. *J Clin Invest*. 2015 Oct 1;125(10):3981-91. doi: 10.1172/JCI82416.

Van Allen EM. *et al.* Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science*. 2015 Oct 9;350(6257):207-211. doi: 10.1126/science.aad0095.

Parkhurst M. *et al.* Isolation of T-Cell Receptors Specifically Reactive with Mutated Tumor-Associated Antigens from Tumor-Infiltrating Lymphocytes Based on CD137 Expression. *Clin Cancer Res*. 2017 May 15;23(10):2491-2505. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2680.

Tran E. *et al.* T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer. *N Engl J Med*. 2016 Dec 8;375(23):2255-2262. doi: 10.1056/NEJMoa1609279.

Zorn E & Hercend T. A MAGE-6-encoded peptide is recognized by expanded lymphocytes infiltrating a spontaneously regressing human primary melanoma lesion. *Eur J Immunol.* 1999 Feb;29(2):602-7. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199902)29:02<602::AID-IMMU602>3.0.CO;2-Y.

Oiso M. *et al.* A newly identified MAGE-3-derived epitope recognized by HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Int J Cancer.* 1999 May 5;81(3):387-94. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19990505)81:3<387::aid-ijc12>3.0.co;2-z.

Schrörs B. *et al.* HLA class I loss in metachronous metastases prevents continuous T cell recognition of mutated neoantigens in a human melanoma model. *Oncotarget.* 2017 Apr 25;8(17):28312-28327. doi: 10.18632/oncotarget.16048.

Müller M, Gfeller D, & Coukos G, Bassani-Sternberg M. 'Hotspots' of Antigen Presentation Revealed by Human Leukocyte Antigen Ligandomics for Neoantigen Prioritization. *Front Immunol.* 2017 Oct 20;8:1367. doi: 10.3389/fimmu.2017.01367.

Robbins PF. *et al.* Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med.* 2013 Jun;19(6):747-52. doi: 10.1038/nm.3161.

Balachandran VP. *et al.* Identification of unique neoantigen qualities in long-term survivors of pancreatic cancer. *Nature.* 2017 Nov 23;551(7681):512-516. doi: 10.1038/nature24462.

Toor JS. *et al.* A Recurrent Mutation in Anaplastic Lymphoma Kinase with Distinct Neopeptide Conformations. *Front Immunol.* 2018 Jan 30;9:99. doi: 10.3389/fimmu.2018.00099.

Kato T, *et al.* Effective screening of T cells recognizing neoantigens and construction of T-cell receptor-engineered T cells. *Oncotarget.* 2018 Jan 13;9(13):11009-11019. doi: 10.18632/oncotarget.24232.

Matsuda T. *et al.* Induction of Neoantigen-Specific Cytotoxic T Cells and Construction of T-cell Receptor-Engineered T Cells for Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res.* 2018 Nov 1;24(21):5357-5367. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0142.

Zhang X. *et al.* Breast Cancer Neoantigens Can Induce CD8⁺ T-Cell Responses and Antitumor Immunity. *Cancer Immunol Res.* 2017 Jul;5(7):516-523. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0264.

9. Függelék

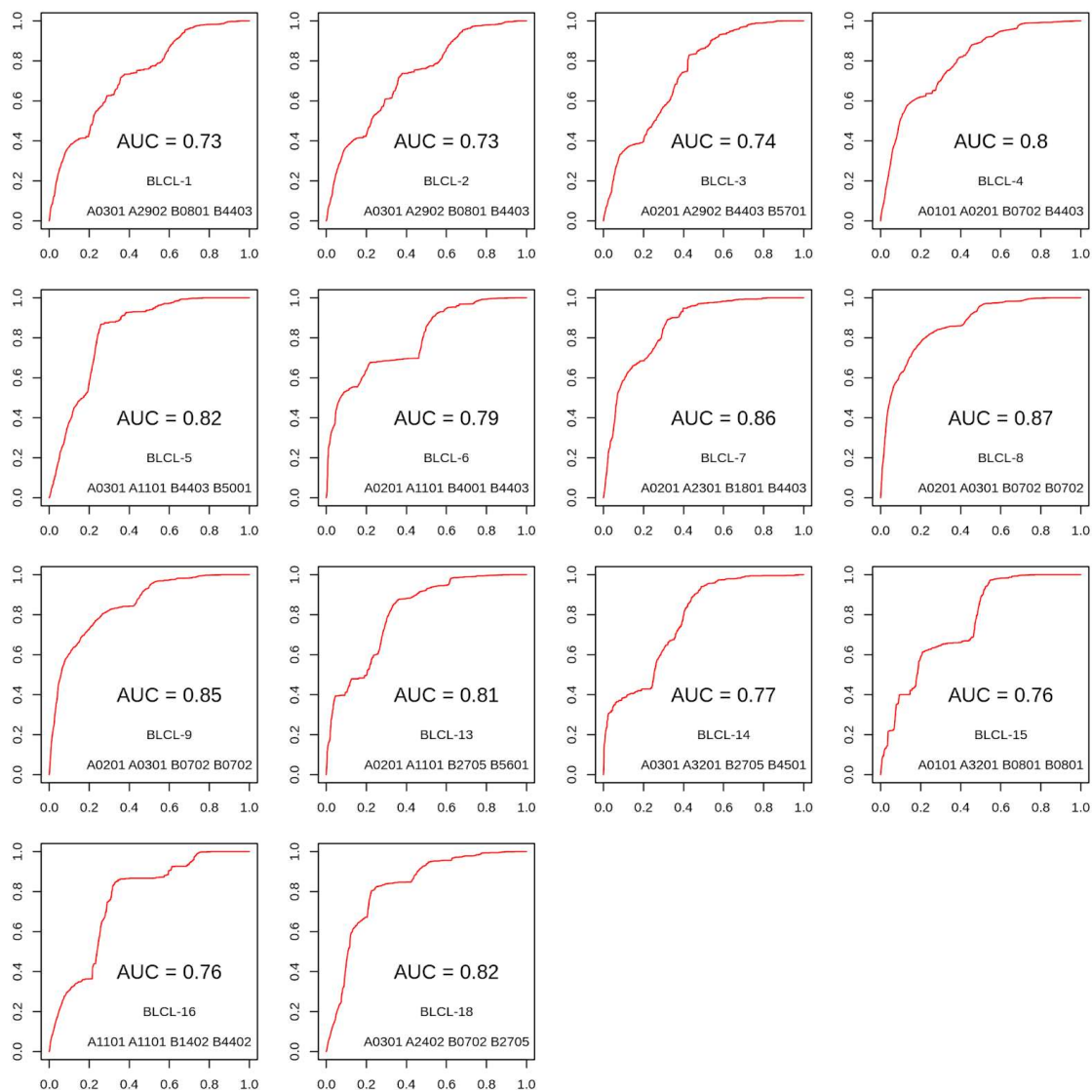
A validáláshoz felhasznált minták:

Mintanév	HLA	Tumortípus	PMID
HCT-116	A0101, B1801, B4501, C0501	vastagbélrák	25576301
MEL38	A0201	melanóma	25837513
MEL21	A0201	melanóma	25837513
MEL218	A0201	melanóma	25837513
S1	A0201, A0301, B0801, B5101, C0102, C0701	melanóma	26819371
Mel15	A030101, A680101, B270502, B350301, C020202, C040101	melanóma	27869121
Mel5	A01, A25, B08, B18	melanóma	27869121
Mel8	A010101, A030101, B070201, B080101, C070101, C070201	melanóma	27869121
LO13	A0201, B1501	nem-kissejtes tüdőrák	28832583
LO11	A1101, B3501, A2402	nem-kissejtes tüdőrák	28832583
1-001-002	C0102, B5101, A0101, B0801	melanóma	30556813
1-024-001	A3201, A0301, B2705, C0202	szarkómás tüdőkarzinóma	30556813
1-024-002	A6801, C0304	adenokarcinóma	30556813
1-038-001	B4901, C0701, C1701	adenokarcinóma	30556813
1-050-001	A2902, C1601, B4403, A2601	adenokarcinóma	30556813
CU04	B1801, B3801, A2601, C1203	adenokarcinóma	30556813
CU05	A6802, A2402	laphámsejtes tüdőkarzinóma	30556813
CU02	B0702, B5701, A0301	laphámsejtes tüdőkarzinóma	30556813
CU03	C1203, A0101, B0801, A2301, B1503	laphámsejtes tüdőkarzinóma	30556813
3713	A0201	melanóma	26389673
3466	A0201	melanóma	26389673
3703	A0201, A1101	melanóma	26389673
3879	A0201, A0101	melanóma	26389673

3919	A0101	melanóma	26389673
Pat117	A1101	melanóma	26359337
Pat88	C1601, A0301, C0802	melanóma	26359337
Pat138	B1507	melanóma	26359337
Pat132	C0701, A2301, A0101, A3201	melanóma	26359337
Pat07	A0101, C0702, C0701, B0801	melanóma	26359337
Pat77	A2402, A2601, C1203, C0102	melanóma	26359337
Pat38	C0202, B1517, A0201, A0301	melanóma	26359337
Pat105	C0501	melanóma	26359337
Pat174	C0202, A2902	melanóma	26359337
Pat123	C0202	melanóma	26359337
Pat21	A0101, C0701	melanóma	26359337
Pat49	A0101	melanóma	26359337
Pat66	A0101, B5801	melanóma	26359337
Pat79	A0201, C0202	melanóma	26359337
3466	A0201	melanóma	27827318
3713	A0201	melanóma	27827318
3784	B0702	melanóma	27827318
3903	B3801	melanóma	27827318
3678	C1402, B4402, A0301, A0201	melanóma	27827318
3716	B1501	melanóma	27827318
sam	A0201, A0301, B1401, B4403, C0802, C1601	vastagbélrák	27959684
MaMel86	B1501, A2402	nyirokcsomó-áttét (melanóma)	28423700
Patient 1	A0201, B1501	melanóma	29104575
Patient 2	A0201, A1101, B0702, B3501	melanóma	29104575
mel 2098	A0201	melanóma	23644516
mel 2369	A0101, A2601	melanóma	23644516
mel 3309	A0101, A1101	melanóma	23644516

1	C0702, C0303, B4001	hasnyálmirigyrák	29132146
PARHAM	B1501, C0303, A2402	neuroblasztóma	29441070
TE-8	A2402	nyelöcsőrák	29541393
AS21	A0201	petefészekrák	29541393
12183	A0201	petefészekrák	29720506
12832	A0201, A3101	petefészekrák	29720506
WHIM30	B0702	mellrák	28619968
WHIM35	A0201	mellrák	28619968
WHIM37	A0201	mellrák	28619968

Az egyes minták ROC görbái és AUC értékei külön-külön



10. Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott Fülöp Anna Tácia nyilatkozom, hogy a 35. OTDK-ra benyújtott **A mutációs szignatúrák hatása a tumorok immunfenotípusára** című dolgozatomban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

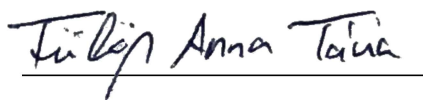
Rész/feladat	Felkészítés után önállóan végeztem (%-ban megadva)
A vizsgálandó adatok összegyűjtése, letöltése és feldolgozása	50
A szükséges programkódok elkészítése	90
Az eredmények vizualizációja	100

Magyarázat:

A felhasznált források közül a humán genom adatai, a HLA-molekulákra kiszámolt affinitás- és DAI-értékek, és ROC-analízis keretében vizsgált minták korábban már korábban, a labor más kísérleteiben is szerepeltek, így ezeket előzetesen a hallgató rendelkezésére bocsátották. A többi adat összegyűjtését (mutációs szignatúrák, tumorminták) ő végezte.

A kódok egy része szintén korábbi analízisekből újrahasznosított, más által írt program volt.

Kelt: Szeged, 2021. 04. 11.



Pályamunkát benyújtó hallgató (Fülöp Anna Tácia) aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető (Manczinger Máté, SZTE ÁOK) aláírás