

NKFIH – 121510 IMMUN pályázat záró beszámoló

## **Új hatóanyagok, célpontjaik és biológiai hatásuk karakterizálása tüdőtumorkban, terápiás eljárások kidolgozására**

Vezető kutató: Szász Attila Marcell

Munkánkban a koreai-svéd-magyar együttműködésben tervezett projekt végrehajtása folyik. Rendszeres személyes megbeszélést tartottunk minden évben, amíg erre a COVID-19 pandémia előtt lehetőségünk volt, a koreai és svéd partnerek is eljöttek Budapestre nyaranta.

A tüdőgyógyászati téma miatt a 2020. évben számos megvalósításban akadályba ütköztünk, leginkább az intézet megközelítése, fizikai hozzáférhetetlensége miatt, amit igyekeztünk munkánkkal ellensúlyozni.

### ***1. Tirozin-kináz inhibitor kezelt tüdőtumork***

A bioaktív kis molekulák célfehérjéinek azonosítása kulcsfontosságú lépés a gyógyszer hatásmódjának megértésében és az adott fenotípusért felelős mögöttes mechanizmusok kezelésében. Áttekintettük a lépéseket, amelyek alapján a proteomikát sikeresen alkalmazták a módosíthatatlan és a ligandummal módosított bioaktív kis molekulák célfehérje profiljának tisztázására. Ez utóbbi megközelítésben a vegyületek kattintási kémiai módszerrel módosíthatók, és aktivitás-alapú fehérje-profilalkotással kombinálhatók. Ezután a módosított ligandummal történő lehúzás végrehajtásával a célfehérjéket dúsítják. Munkánkban az imaging tömegspektrométer módszert teszteltük, és melanoma mintákból, amíg a tüdőtumork nem álltak rendelkezésre, előzetes eredményeket közöltünk (Malm et al. 2018; Sugihara et al. 2018). Felmértük az erlotinib hatását tüdőrák sejtvonalakra, az osztódásukat számszerűsítve proliferációs assay-vel (A549, H1199). Majd DARTS western készült a tüdőrák sejtek EGF receptorához kötődő erlotinib bizonyítására. MALDI-MSI készült az erlotinib elhelyezkedésének feltérképezésére, a tüdőrák xenograft, a vese- és a májszövetek tekintetében. Az eredmények a jelenleg beküldött cikkben találhatóak (Kim et al. 2019). A betegekből vett fagyasztott szöveteken végzünk a következőkben validációs vizsgálatot (12 beteg primer tumora – 7 gefitinib, 5 erlotinib kezelt), azonban igen kisszámú olyan anyag áll rendelkezésre, ahol műtét történik TKI kezelés után (általánosan idegsebészeti beavatkozások, ahol az agyi áttét rezekciója történik).

1/b Nintedanib kezelt tüdőtumor xenograft modell elemzése Munkánkban egerekbe oltottunk valós tüdőrák betegekből adenocarcinoma részleteket, amelyeket két generáción keresztül dúsítottunk (6-6 állat). Az egereket nintedanib, kis molekulájú tirozin-kináz inhibitorral kezeltük, majd feláldozást követően a tumorokat az egész testből kinyertük, és részletes elemzésnek vetettük alá.

### ***2. ALK inhibitor kezelt tumorok***

Ebben a projektben a tumor heterogenitás vizsgálatát végezzük ALK génátrendeződést hordozó tüdőtumorkban. 7 tüdő adenocarcinoma, amely FISH vizsgálattal az eltérést hordozza, és megfelelő kezelési, valamint követési adatokkal rendelkezik, került kijelölésre. Megjegyzendő, hogy több beteg az Országos Intézetben sem került azonosításra, és a gyógyszeres kezelés ezekben sem volt teljesen homogén. Mindenesetre ALK-inhibitor kezelt

betegek mind, akiknek szövete rendelkezésre áll a patológiai osztályon, mert a tumorok műtét során eltávolításra került. 7 minta esetében ún. digitális térbeli profilozás történt Seattle-ben, az időközben elérhető transzkriptom alapján, amely a kitűzött 80 gén helyett egy átfogóbb elemzést tett lehetővé. Proteomikai elemzés mind a 7 tumor mintáján, ugyancsak térben annotált területeken. Ezen mérések is Budapesten valósultak meg, technikai beállítást követően. Régióként kb. 500 proteint tervezünk azonosítani az előzetes eredmények alapján.

Az egyes mintákon 12 régiót elemeztünk, és 1800 gén kifejeződését határoztuk meg. Ezen adatok párosítása geno- (a) és fenotipikus (b), valamint proteomikus (c) térbeli adatokkal bioinformatikai megoldásokat igényel, amelyre több szakembert vontunk be (Mohácsi Réka - TIL, Szeitz Beáta - proteogenomika). Ezen részei a munkának megvalósultak, további elemzések vannak folyamatban:

a) FISH vizsgálattal DNS-szinten az ALK átrendeződés dokumentálása, eltéréseinek térbeli párosítása az RNS-szintű adatokhoz.

b) Digitális patológiai elemzéssel morfológia és tumor infiltráló limfociták (TIL) elemzése ugyancsak a térben identikus területeken.

A publikáció előkészületben van (Glasz, folyamatban).

### **3. *Atypusos carcinoidok***

63 tüdő atypusos carcinoid klinikopatológiai vizsgálata, és digitális patológiai elemzése (osztódások, Ki67 kifejeződés) történik virtuális metszeteken, valamint mély genetikai vizsgálat előkészítése (teljes exome vagy RNA seq) folyik. A koreai YSU tervezetten IHC validációt végez, és LC/MS vizsgálatokkal keresünk olyan fehérjéket, amelyek prognosztikus jelentőséggel bírnak, esetlegesen választ adnak e tumorok heterogén viselkedésére.

Ez a betegszám nemzetközi viszonylatban is kiemelkedő, az onkológiai ajánlások alapját mindössze 2-3 tucat betegen végzett vizsgálatok képezik. A digitális patológiai elemzéseket Ki67 immunhisztokémiai festést követően végezzük. Ezek a reakciók vélhetően januárban fognak elkészülni, a metszések és az IHC metodika beállítása (Ventana Discovery automata) történt meg. Metszetszekennelést követően a virtuális metszeteken fogunk alkalmazni mashine és deep learning algoritmusokat, amelyeket osztrák együttműködésben valósítunk meg, az ottani esetek hozzáadásával, így vélhetően 100 fölé fog emelkedni az elemezhető daganatok száma (Luka Brcic, Graz).

### **4. *Autopsziás vizsgálatok, molekuláris tumorbiológiai feltérképezésre***

Három helyett 22 beteg primer tumorának és összes áttétének párhuzamos vizsgálata folyik svéd partnereinkkel az ún. tercero vizsgálatban. Minden beteg melanoma progressziója következtében hunyt el, és lehetőségünk van minden tumoros terület mélyebb elemzésére. Az ilyen típusú kutatások általánosan néhány beteg bevonásával történnek (Brown et al. 2017), egyelőre emlőrákban írtak le magasabb esetszámokon alapuló összefüggéseket. Azonban az összes elemzés a nemzetközi irodalomban is kb. 40-50 eseten történt eddig. Időközben egy ilyen mélyreható vizsgálat történt tüdőtumorkban (Suda et al. 2018). Célunk a tumorprogresszió mélyebb megértése betegenként 6-7 távoli áttét elemzésével, egyelőre 3 beteg, de lehetőleg még egyszer ennyi bevonásával 2020-ban. Terveink között teljes exome szekvenálás, proteogenomikai elemzések LU és YSU: maldi, western, IHC szerepelnek. Elfogadásra került egy további cikk időközben (Hwang et al. 2019). További 2019-ben beküldött cikk, amely a témában jelent meg (Kim et al. 2019). Két további cikk jelent meg az együttműködésben melanoma témában, amelyek a pályázati azonosítót nem tartalmazzák (Gil et al. 2019; Sanchez et al. 2019).

### **5. *Tüdőtumrok csoportosítása proteomikai módszerekkel a prognózis tükrében***

A korai stádiumú (I-II) és az előrehaladott stádiumú (III-IV) tüdő ADC-ket 22 betegből választottuk ki és párosítottuk normál tüdőszövetekkel. A szövettanilag és klinikailag rétegzett humán primer tüdő ADC-ket folyadékromatográfiás-tandem tömegspektrometriával elemeztük. Az ADC és a normál minták elemzése alapján 4863 fehérjecsoportot azonosítottunk. A korai és az előrehaladott stádiumú ADC-ben 365 és 366 fehérje expresszáldott különböző módon, a normál és a tumoros szövetek között (korrigált P-érték <0,01, szerez változás  $\geq 4$ ).

Összesen 155 fehérje szabályozása eltér a korai és az előrehaladott stádiumú ADC-k között, és 18 korai stádium specifikusnak bizonyult ebből (Kelemen O et al. 2020).

### ***6. A DNS polimeráz alfa B alegység kötő fehérje az erlotinib rezisztencia egyik lehetséges oka nem kissejtes tüdőrákban***

A DNS-polimeráz alfa B alegységet (POLA2) új Erlotinib-kötő fehérjeként azonosítottuk, amelyet a DARTS platform validált, sejtes termikus eltolódási vizsgálatokkal kiegészítve. A POLA2 genetikai kiütése elősegítette a gyógyszer anti-proliferatív hatását az erlotinib-rezisztens H1299 sejtvonalban, magas POLA2 expresszióval, míg a POLA2 túlzott expressziója visszaállította az anti-proliferatív hatásokat az erlotinib-érzékeny HCC827 sejtvonalban, alacsony POLA2 expresszióval. Fontos, hogy a négy NSCLC sejtvonal POLA2 expressziós szintje pozitívan korrelált az anti-proliferatív erlotinib hatékonyságával (Pearson korrelációs együttható,  $R = 0,9886$ ). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a POLA2 egy új komplementer erlotinib célfehérje, és klinikailag validitást nyújthat a gyógyszerrezisztencia helyettesítő markerjeként NSCLC-ben szenvedő betegeknél (Kim T et al. 2021).

### ***7. Modulált elektrohipertermia mint új kezelési módszer tüdőáttétekben***

A modulált elektro-hipertermia (mEHT) egy új kiegészítő terápia az onkológiában, amely a rákos szövetek magasabb elektromos vezetőképességén és permittivitásán alapul, mert a tumoroknak fokozott glikolitikus aktivitása és iontartalma van az egészséges normál szövetekhez képest. Értékeljük a lokális hipertermia kialakulását a pulmonalis metasztatikus melanoma kezelésében. Elsődleges célunk volt az mEHT optimalizálása célzott tüdőkezelésre, valamint a mEHT lehetséges daganatellenes hatásának mechanizmusának azonosítása a B16F10 eger melanoma tüdőmetasztázis modellben, és a mEHT normál tüdőszövetre gyakorolt lehetséges mellékhatásainak vizsgálata. A daganatot hordozó tüdő ismételt kezelése mEHT-val jelentős daganatellenes hatást váltott ki, amit a pulmonalis metasztatikus csomók, a tumor térfogata és a Ki67 csökkent kifejeződése alapján a kezelt állatokban. Az mEHT kezelés szignifikáns DNS kettős töréseket váltott ki, amelyeket a foszforilezett H2AX fehérje megnövekedett expressziója jelzett a kezelt daganatokban, bár a hasított / aktivált kaszpáz-3 expresszió kezelés által indukált emelkedése jelentéktelen volt, ami arra utal, hogy az apoptózis ebben a folyamatban minimális szerepet játszik. A p21waf1 pozitív tumorsejtek mEHT-rel kapcsolatos szignifikáns növekedése azt sugallta, hogy a p21waf1 által közvetített sejtciklus-leállítás fontos szerepet játszik az mEHT melanoma áttétekre gyakorolt tumorellenes hatásában. A kezelt állatok szignifikánsan megnövekedett CD3 +, CD8 + T-limfocitái és F4 / 80 + CD11b + makrofág denzitása a teljes tüdőben és a daganatban hangsúlyozza az mEHT mobilizáló képességét az immunsejteken a tumor célzott megsemmisítésére. Összefoglalva, az mEHT csökkentheti a melanoma növekedési potenciálját, ezáltal kiegészítő terápiás lehetőségként kínálva magát a kemo- és / vagy sugárterápiának (Thomas et al. 2020).

A modulált elektro-hipertermia (mEHT) egy új kiegészítő terápia az onkológiában, amely a rákos szövetek magasabb elektromos vezetőképességén és permittivitásán alapul (Szentgyörgyi-effektus), mert a tumoroknak fokozott glikolitikus aktivitása és iontartalma van az egészséges normál szövetekhez képest (Warburg-effektus).

Korábbi preklinikai tapasztalataink alapján, az mEHT csökkentheti a melanoma növekedési potenciálját, ezáltal kiegészítő terápiás lehetőségként kínálva magát a kemo- és / vagy sugárterápiának.

Ezzel párhuzamosan klinikai eredményeink is arra engedtek következtetni, hogy ezen eljárás mélyebb megismerése terápiás potenciált hordoz, a jelen arzenál hatékony kiegészítője lehet: kiterjedt tumoros megbetegedésben az immunellenőrzőpont-gátlókkal kezelt páciensek

esetében jobb volt a túlélés azon esetekben, ahol tüdőmetasztázis is jelen volt (Kleef et al. 2021, csak részben publikált bizalmas adat).

Jelenleg a Szentgyörgyi-effektus mélyebb megismerésére sejtkultúrák és 3D szöveti elemzéseket végzünk mEHT-kezeléssel kombinálva, és impedancia méréssel kiegészítve rögzítjük az adatokat bioelektronikai mérésekben tapasztalt PhD hallgatóval (Lóránt Gergő).

### **8. COVID-19 munkáink**

A spike glikoprotein nélkülözhetetlen a SARS-CoV-2 vírus szaporodásához, és ennek gátlása már jóváhagyott vírusellenes gyógyszerekkel új utakat nyithat meg a COVID-19 betegségben szenvedő betegek kezelésében. Emiatt elemeztük a SARS-CoV-2 spike glikoprotein gátlását FDA által jóváhagyott antivirális gyógyszerekkel és ezek kettős és hármas kombinációival. A VINI in silico rákmodell segítségével végeztük el ezt a virtuális gyógyszeresztést, amely megmutatta, hogy a HIV-gyógyszerek a leghatékonyabbak. Emellett a kobicisztát-abakavir-rilpivirin HIV-gyógyszerek kombinációja mutatta a legmagasabb in silico hatékonyságot a SARS-CoV-2 tüske glikoprotein gátlásában. Ezért indokolt a kobicisztát-abakavir-rilpivirin klinikai vizsgálata korlátozott számú, közepesen súlyos és súlyos állapotban lévő COVID-19 betegen (Tomic, et al 2021).

A SARS-CoV-2 genomjában stabil célpontokat kerestünk genomikai adatok elemzésével a kezeléshez és az oltáshoz (nem publikált adatok):

- Elemeztük 18 913 SARS-CoV-2 genomot, és meghatároztuk az egyes gének mutációs terhelését, valamint összekapcsoltuk a teljes mutáció prevalenciáját a megállapított mutációs mintázatokkal.
- Vírusgenomként átlagosan 17 mutációt detektáltunk.
- A SARS-CoV-2 különböző génjei igen heterogén mutációs terhelést jelentenek. A burok fehérje, valamint az ORF1a és b, az ORF6, az ORF7a és az ORF10 a legstabilabb gének.
- A vírusmutációs mintázat és a meghatározott mutációs mintázatok összehasonlítása arra utal, hogy a DNS-javító enzimek szerepet játszanak a vírus evolúciójában.

### **9. Metodikai beállítás és áttekintés malignus melanomában /MM/**

A MM a tüdőrákhoz immunogenitása miatt hasonlóan viselkedik, tumorbiológiai háttere és a daganat által használt készletek hasonlóak. A melanoma molekuláris háttere alapján a tumor heterogenitásának és a fehérje expressziós profiljának különbségeiből meghatározott különálló tumorfenotípusok támasztják alá. Ezeket a szempontokat szem előtt tartva a további kihívások a következők: (1) az MM bonyolultságának és heterogenitásának feltérképezése; (2) meghatározza az érintett jelzési útvonalakat; és (3) meghatározzuk a fehérje expresszióját célzott terápiák kifejlesztése érdekében. Itt áttekintést nyújtunk a fehérje expressziójának eredményeiről az MM-ben, valamint a betegség megjelenésének kapcsolatáról a különböző tumorfenotípusokban, és arról, hogy ezek miként fogják leküzdeni a klinikai problémák kihívásait, és új ígéretes megközelítéseket javasolnak a metasztatikus melanoma és a rákterápia terén. E mechanizmusok áttekintését végeztük el (Kim Y et al 2020).

### **10. Adenocarcinoma elemzések tüdőrákos eseteinken túl**

A rákkal kapcsolatos immunitás kulcsszerepet játszik a vastagbélrák (CRC) kimenetelében is; a pontos mechanizmusok azonban csak részben ismertek. Ebben a vizsgálatban összesen 242 CRC-beteg sebészeti mintáját értékeltük ki szöveti microarray és immunhisztokémia segítségével, hogy értékeljük a tumorba beszűrődő immunsejteket (CD3, CD4, CD8, CD20, CD23, CD45 és CD56) és az immunellenőrző pont markereket (CTLA-4, PD-L1, PD-1) szisztematikusan kiválasztott tumor régiókban és az ugyanazon betegből származó nyirokcsomókban, valamint májmetasztázisokban. Ezenkívül 12 primer tumoron és 12 egymást követő májmetasztázison végeztünk immunpanel génexpressziós vizsgálatot. A fő daganatos

területen nagyobb számú természetes ölösejt és érett B-sejt, valamint PD-1+ expresszáló sejt volt megfigyelhető, mint a metasztázisokban. A metasztatikus nyirokcsomók nagyobb száma szignifikánsan alacsonyabb B-sejtszámmal járt együtt. Előrehaladottabb nyirokcsomó-metasztatikus státusz esetén magasabb leukocita-, különösen T-sejtszámot figyeltünk meg. Tizenegy eltérően expresszálódó immunrendszerrel kapcsolatos gént találtunk az elsődleges daganatok és a májmetasztázisok között. Ezenkívül a veleszületett immunválasz és a tumornekrózis faktor szupercsalád útvonalainak változásait azonosítottuk (Ágoston et al. 2022).

Feltételeztük, hogy a különböző emlőrák (BC) altípusokat térben elkülönülő tumorimmun mikro környezet (TIME) jellemzi, és hogy a metasztatikus (Met) és nem metasztatikus (Ctrl) BC-k immungén-összeállítása altípusonként eltérő. A peritumorális, stromális és intratumorális TIL-t 309 esetben értékeltük. Meghatároztuk a meleg (immundenz), hideg és immun-kizárt csoportokat, és értékeltük ennek a besorolásnak a prognosztikai szerepét. A CD4+/CD8+ pozitivitást 75 esetben elemeztük négy szisztematikusan előre meghatározott tumorrégióban. A Met és Ctrl HER2-negatív BC-k immungénexpresszióját NanoString nCounter technológiával hasonlítottuk össze. A TIL infiltráció mértéke nagymértékben változott az összes BC altípuson belül. Az esetek kétharmada hidegtumor volt, a túlélésben nem volt szignifikáns különbség a meleg daganatokhoz képest. Az alacsonyabb CD4+/CD8+ arány a stroma belső tumorrégiójában szignifikánsan összefüggött a hosszabb távoli metasztázismentes túléléssel. A Met és a Ctrl között eltérően expresszált immungének a vizsgált BC altípusok között változtak, a TNBC-vel a lúminális altípusoktól eltérő tulajdonságokat mutattak. Jelentős heterogenitás jellemzi a TIME-t; azonban a TIL-ek alacsony szintje nem egyenlő a betegség progressziójával. A Met és Ctrl emlőrák között megfigyelt különbségek az immungén-expresszióban a megváltozott immunfunkciók fontos szerepére hívják fel a figyelmet a BC progressziójában (Szeitz et al. 2022).

## REFERENCIÁK

- Ágoston EI, Acs B, Herold Z, Fekete K, Kulka J, Nagy A, Mühl D, Mohácsi R, Dank M, Garay T, Harsanyi L, Gyórfy B, Szasz AM: Deconstructing Immune Cell Infiltration in Human Colorectal Cancer: A Systematic Spatiotemporal Evaluation, *Genes* 2022, 13(4), 589, 2022
- Brown, D., D. Smeets, B. Szekely, D. Larsimont, A. M. Szasz, P. Y. Adnet, F. Rothe, G. Rouas, Z. I. Nagy, Z. Farago, A. M. Tokes, M. Dank, G. Szentmartoni, N. Udvarhelyi, G. Zoppoli, L. Pusztai, M. Piccart, J. Kulka, D. Lambrechts, C. Sotiriou, and C. Desmedt. Phylogenetic analysis of metastatic progression in breast cancer using somatic mutations and copy number aberrations. *Nat Commun* 2017; 8: 14944.
- Fehniger, and G. Marko-Varga. 2018. 'Endogenous expression mapping of malignant melanoma by mass spectrometry imaging', *Clin Transl Med*, 7: 22.
- Gil, J., L. H. Betancourt, I. Pla, A. Sanchez, R. Appelqvist, T. Miliotis, M. Kuras, H. Oskolas, Y. Kim, Z. Horvath, J. Eriksson, E. Berge, E. Burestedt, G. Jonsson, B. Baldetorp, C. Ingvar, H. Olsson, L. Lundgren, P. Horvatovich, J. R. Murillo, Y. Sugihara, C. Welinder, E. Gil J, Betancourt LH, Pla I, Sanchez A, Appelqvist R, Miliotis T, Kuras M, Oskolas H, Kim Y, Horvath Z, Eriksson J, Berge E, Burestedt E, Jönsson G, Baldetorp B, Ingvar C, Olsson H, Lundgren L, Horvatovich P, Murillo JR, Sugihara Y, Welinder C, Wieslander E, Lee B, Lindberg H, Pawłowski K, Kwon HJ, Doma V, Timar J, Karpati S, Szasz AM, Németh IB, Nishimura T, Corthals G, Rezeli M, Knudsen B, Malm J, Marko-Varga G. Clinical protein science in translational medicine targeting malignant melanoma. *Cell Biol Toxicol*. 2019 Aug;35(4):293-332.
- Glasz T, Szeitz B, Tóth G, Balbisi M, Fillinger J, Horváth Sz, Mohácsi R, Kwon HJ, Moldvay J, Turiák L, Szász AM: Spatial evaluation of transcriptomic and proteomic data in ALK rearranged lung cancer - a

pilot study. *Frontiers in Oncology - Mass Spectrometry-Based Proteogenomics – Advances in Mutant Proteomics and Clinical Oncology*, issue invitation by Toshihide Nishimura

Hwang HY, Kim TY, Szász MA, Dome B, Malm J, Marko-Varga G, Kwon HJ. Profiling the Protein Targets of Unmodified Bio-Active Molecules with Drug Affinity Responsive Target Stability and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Proteomics*. 2020 May;20(9):e1900325.

Hwang HY, Kim TY, Szász MA, Dome B, Malm J, Marko-Varga G, Kwon HJ. Profiling the Protein Targets of Unmodified Bio-Active Molecules with Drug Affinity Responsive Target Stability and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Proteomics*. 2020 May;20(9):e1900325.

Kelemen O, Pla I, Sanchez A, Rezeli M, Szasz AM, Malm J, Laszlo V, Kwon HJ, Dome B, Marko-Varga G. Proteomic analysis enables distinction of early- versus advanced-stage lung adenocarcinomas. *Clin Transl Med*. 2020 Jun;10(2):e106.

Kim TY, Ji ES, Lee JY, Kim JY, Yoo JS, Szasz AM, Dome B, Marko-Varga G, Kwon HJ. DNA Polymerase Alpha Subunit B Is a Binding Protein for Erlotinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Sep 13;12(9):2613.

Kim TY, Lee B, Kim Y, Sugihara Y, Rezeli M, Szasz AM, Dome B, Marko-Varga G, Kwon HJ: Matrix-assisted laser desorption ionization - mass spectrometry imaging of erlotinib reveals a limited tumor tissue distribution in a non-small-cell lung cancer mouse xenograft model., *Clin Transl Med*. 2021 Jul;11(7):e481, 2021

Kim TY, Lee B, Kim Y, Sugihara Y, Rezeli M, Szasz AM, Dome B, Marko-Varga G, Kwon HJ. Matrix-assisted laser desorption ionization - mass spectrometry imaging of erlotinib reveals a limited tumor tissue distribution in a non-small-cell lung cancer mouse xenograft model. *Clin Transl Med*. 2021 Jul;11(7):e481.

Kim Y, Gil J, Pla I, Sanchez A, Betancourt LH, Lee B, Appelqvist R, Ingvar C, Lundgren L, Olsson H, Baldetorp B, Kwon HJ, Oskolás H, Rezeli M, Doma V, Kárpáti S, Szasz AM, Németh IB, Malm J, Marko-Varga G. Protein Expression in Metastatic Melanoma and the Link to Disease Presentation in a Range of Tumor Phenotypes. *Cancers (Basel)*. 2020 Mar 24;12(3):767.

Kleef R, Nagy R, Baiertl A, et al. Low-dose ipilimumab plus nivolumab combined with IL-2 and hyperthermia in cancer patients with advanced disease: exploratory findings of a case series of 131 stage IV cancers - a retrospective study of a single institution. *Cancer Immunol Immunother*. 2021;70(5):1393-1403.

Malm, J., Y. Sugihara, M. Szasz, H. J. Kwon, H. Lindberg, R. Appelqvist, and G. Marko-Varga. 2018. 'Biobank integration of large-scale clinical and histopathology melanoma studies within the European Cancer Moonshot Lund Center', *Clin Transl Med*, 7: 28.

Petenyi FG, Garay T, Muhl D, Izso B, Karaszi A, Borbenyi E, Herold M, Herold Z, Szasz AM, Dank M: Modulated Electro-Hyperthermic (mEHT) Treatment in the Therapy of Inoperable Pancreatic Cancer Patients—A Single-Center Case-Control Study, *Diseases* 2021, 9(4), 81, 2021

Sanchez A, Kuras M, Murillo JR, Pla I, Pawlowski K, Szasz AM, Gil J, Nogueira FCS, Perez-Riverol Y, Eriksson J, Appelqvist R, Miliotis T, Kim Y, Baldetorp B, Ingvar C, Olsson H, Lundgren L, Ekedahl H, Horvatovich P, Sugihara Y, Welinder C, Wieslander E, Kwon HJ, Domont GB, Malm J, Rezeli M, Betancourt LH, Marko-Varga G. Novel functional proteins coded by the human genome discovered in metastases of melanoma patients. *Cell Biol Toxicol*. 2020 Jun;36(3):261-272.

Suda, Kenichi, Jihye Kim, Isao Murakami, Leslie Rozeboom, Masaki Shimoji, Shigeki Shimizu, Christopher J. Rivard, Tetsuya Mitsudomi, Aik-Choon Tan, and Fred R. Hirsch. 2018. 'Innate Genetic Evolution of Lung Cancers and Spatial Heterogeneity: Analysis of Treatment-Naïve Lesions', *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 13: 1496-507.

Szadai L, Velasquez E, Szeitz B, Almeida NP, Domont G, Betancourt LH, Gil J, Marko-Varga M, Oskolas H, Jánosi ÁJ, Boyano-Adánez MDC, Kemény L, Baldetorp B, Malm J, Horvatovich P, Szász AM, Németh IB, Marko-Varga G: Deep Proteomic Analysis on Biobanked Paraffine-Archived Melanoma with Prognostic/Predictive Biomarker Read-Out, *Cancers (Basel)*. 2021 Dec 3;13(23):6105, 2021

Szeitz B, Pipek O, Kulka J, Szundi C, Ruzs O, Tőkés T, Szász AM, Kovács KA, Pesti A, Ben Arie TB, Gángó A, Fülöp Z, Drágus E, Vári-Kakas SA, Tőkés AM: Investigating the Prognostic Relevance of Tumor Immune Microenvironment and Immune Gene Assembly in Breast Carcinoma Subtypes, *Cancers (Basel)*. 2022 Apr 12;14(8):1942., 2022

Thomas MJ, Major E, Benedek A, Horvath I, Mathe D, Bergmann R, Szasz AM, Krenacs T, Benyo Z. Suppression of Lung Tumor Growth by Modulated Electro-hyperthermia Using a Minimally Invasive Heat Stress Monitoring Approach in Mice. e: [*Cancers*] Manuscript ID/ cancers-1007302

Tomić D, Davidović D, Szasz AM, Rezeli M, Pirkić B, Petrik J, Vrca VB, Jandel V, Lipić T, Skala K, Mesarić J, Periša MM, Šojat Z, Rogina BM: The screening and evaluation of potential clinically significant HIV drug combinations against the SARS-CoV-2 virus, *Inform Med Unlocked*. 2021;23:100529, 2021