

# Sekvenciranje RNK na ravni posameznih celic: revolucionarna tehnologija, ki nadgrajuje razumevanje kompleksnih bolezni in spodbuja osebni pristop k zdravljenju – primer melanoma kože

Single-cell RNA sequencing: a revolutionary technology that has enhanced our understanding of complex human diseases and paved the way towards precision medicine - melanoma example

Tadeja Kuret,<sup>1</sup> Polonca Ferk<sup>2</sup>

## Izvelek

Tehnologija sekvenciranja RNK na ravni posameznih celic (scRNAseq) nam omogoča, da z visoko ločljivostjo in natančnostjo naenkrat določimo nabor vseh molekul RNK v vsaki posamezni celici, ki se nahaja v določenem vzorcu oz. tkivu. Danes je scRNAseq pomembno orodje predvsem za proučevanje kompleksnih bioloških sistemov in tkiv, kot je tumorsko tkivo, kjer je velika celična raznolikost ključnega pomena. V članku navajamo primer melanoma kože, ki je eden najpogostejših in najbolj agresivnih rakov v razvitem svetu. Čeprav se je v zadnjem času z uvedbo imunske terapije napoved izida melanoma bistveno izboljšala, pa je še vedno približno 30–40 % bolnikov, pri katerih tovrstno zdravljenje ni uspešno. Novi podatki, pridobljeni z uporabo scRNAseq, so razkrili, da je mehanizem odpornosti na zdravljenje z zaviralci imunskih nadzornih točk zelo kompleksen, da na to poleg prisotnosti in fenotipa izčrpanih limfocitov T CD8+ vpliva tudi mutacija v genu *BRAF*, fenotip melanocitov, prisotnost in fenotip celic mieloidnega izvora, prisotnost fibroblastov različnega fenotipa ter interakcije med vsemi celicami, ki tvorijo tumorsko mikrookolje. V prihodnosti bo torej vse bolj pomemben osebni pristop zdravljenja, ki bo temeljil na molekularni in celični opredelitvi tumorja in njegovega mikrookolja ter na napovednih bioloških označevalcih. Z uporabo tehnologije scRNAseq se bomo lahko cilju osebne medicine zelo približali, saj nam omogoča identifikacijo posameznih celic in celičnih označevalcev, ki bi lahko napovedali odziv bolnika na zdravljenje in omogoča bolj ciljano odločitev za vrsto zdravljenja za posameznega bolnika. Na ta način bi se izognili principu zdravljenja, ki temelji na “poskusu in napaki” ter tako bistveno izboljšali učinkovitost zdravljenja. Zaenkrat pa se tehnologija scRNAseq uporablja zgolj v raziskovalne namene, zato zaradi določenih omejitev ni uvedena v dejansko klinično prakso.

<sup>1</sup> Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Inštitut za biostatistiko in medicinsko informatiko / Središče ELIXIR-SI, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

**Korespondenca / Correspondence:** Polonca Ferk, e: [polonca.ferk@mf.uni-lj.si](mailto:polonca.ferk@mf.uni-lj.si)

**Ključne besede:** posameznocelične analize; sekvenciranje RNK; melanom; odpornost na zdravljenje; osebna medicina

**Key words:** single cell analyses; RNA sequencing; melanoma; therapy resistance; personal medicine

**Prispelo / Received:** 22. 12. 2022 | **Sprejeto / Accepted:** 5. 9. 2023

**Citirajte kot/Cite as:** Kuret T, Ferk P. Sekvenciranje RNK na ravni posameznih celic: revolucionarna tehnologija, ki nadgrajuje razumevanje kompleksnih bolezni in spodbuja osebni pristop k zdravljenju – primer melanoma kože. Zdrav Vestn. 2023;92(11–12):481–95. DOI: <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.3411>



Avtorske pravice (c) 2023 Zdravniški Vestnik. To delo je licencirano pod Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno 4.0 mednarodno licenco.

## Abstract

Single-cell RNA sequencing (scRNAseq) allows us to simultaneously determine the transcriptome (the set of all RNA molecules) in each individual cell in the sample or tissue of interest with high resolution and accuracy. It represents an important tool, especially for studying complex biological systems and tissues, such as tumour tissues, where cellular complexity and diversity are extremely important. In this article, we focused on cutaneous melanoma, one of the most common and aggressive cancers in industrialized countries. Although, with the introduction of immunotherapy, the prognosis of melanoma has improved significantly, there are still approximately 30-40% of patients in whom this type of therapy is unsuccessful. Recent data obtained using scRNAseq have shown that the mechanism of resistance to treatment with immune checkpoint inhibitors is very complex. Various factors that vary from patient to patient can affect therapy resistance, including the presence and phenotype of exhausted CD8+ T lymphocytes, *BRAF* gene mutation, melanocyte phenotype, the presence and phenotype of cells of myeloid origin, and the interaction between all cells that make up the tumour microenvironment. In the future, an individualized treatment approach based on the molecular and cellular definition of the tumour and its microenvironment, as well as predictive biomarkers, will become increasingly important by greatly improving the efficacy of treatment. We can also expect a new wave of development of more effective therapies for the treatment of melanoma, mostly due to significant advances in technologies, such as scRNAseq, which allows us to precisely determine the genomic and transcriptomic characteristics of thousands of individual cells in the tumour microenvironment simultaneously, thus identifying new potential therapeutic targets. However, due to certain limitations, scRNAseq technology is currently used only for research purposes and has yet to be introduced into real clinical practice.

## 1 Uvod

### 1.1 Sekvenciranje naslednje generacije (NGS)

Z odkritjem sekvence celotnega človeškega genoma leta 2003 (1) se je začelo novo obdobje raziskovanja v medicini, ki ne temelji več na principu, omejenem na posamezno molekulo DNK, RNK ali posamezen protein, temveč vključuje sistemsko-orientirani pristop, ki zajema celoten genom, transkriptom ali proteom. To je omogočil projekt Človeški genom, s katerim se je pričela uporaba visoko zmogljivih tehnologij, predvsem tehnologije sekvenciranja naslednje generacije (*angl.* next generation sequencing, NGS), poleg tega pa tudi razvoj različnih bioinformatičnih orodij, nujno potrebnih za analizo visokogostotnih podatkov, ki jih z navedenimi tehnologijami pridobimo (2). Z nadaljnimi tehnološkimi inovacijami in napredkom v hitrosti in času ter kakovosti sekvenciranja molekul DNK je metoda NGS postala komercialno dostopna, kar je pomenilo tudi znižanje cene analize sekvence DNK (3).

### 1.2 Sekvenciranje RNK (RNAseq)

Metodo NGS danes množično uporabljamo tudi za sekvenciranje celotnega transkriptoma (sekvenciranje RNK), torej nabora vseh molekul RNK, ki se izražajo v določenem organu/tkivu/celicah v določeni časovni točki pod določenimi pogoji (4). Na ta način lahko odkrijemo, kvantificiramo in analiziramo na milijone molekul RNK naenkrat v različnih vzorcih. Pri tem nas predvsem

zanima razlika v izražanju molekul informacijskih RNK, ki se lahko prevedejo v proteine. Tako lahko sklepamo, kateri proteini so pomembno vpleteni v bolezensko stanje, ki ga proučujemo (5). Do nedavnega se je raziskovalo predvsem transkriptom celotne populacije celic v določenem vzorcu (*angl.* conventional/bulk RNA sequencing, RNAseq), kar je pomenilo, da lahko določimo le povprečno količino oz. izražanje molekul RNK v celotnem vzorcu tkiva, ki pa je sestavljeno iz velike in raznolike populacije celic (6). Dobljeni rezultati so tako odražali izražanje molekul RNK, značilnih predvsem za tip celic, ki v vzorcu prevladuje, medtem ko so se informacije o celičnih populacijah, ki so v vzorcu zastopane v manjši meri, izgubile. Tak pristop v nekaterih primerih zadostuje, npr. pri primerjanju homogene populacije celic (npr. celičnih kultur), večinoma pa ne, npr. pri analizi celic v zgodnjem razvoju ali pri analizi kompleksnih bioloških sistemov oz. tkiv, kot sta npr. imunski sistem ali tumorsko tkivo (7).

### 1.3. Sekvenciranje RNK na ravni posameznih celic (scRNAseq)

Omenjene pomanjkljivosti konvencionalnega sekvenciranja RNK je odpravila nova tehnologija sekvenciranja RNK na ravni posamezne celice (*angl.* single cell RNA sequencing, scRNAseq). Metoda scRNAseq so prvič predstavili leta 2009, njena množična uporaba in priljubljenost pa sta začeli naraščati po letu 2014, ko sta

tehnološki napredek in komercialna dostopnost različnih platform in protokolov bistveno znižala ceno analize (8). V nasprotju s konvencionalnim sekvenciranjem RNK, pri katerem lahko določimo le povprečno količino izražanja molekul RNK v celotni populaciji celic, ki se v tkivu nahajajo, lahko sedaj določimo nabor vseh molekul RNK, ki se izražajo v posameznih celicah. Danes je scRNAseq pomembno orodje predvsem za proučevanje kompleksnih bioloških sistemov in tkiv. Z uporabo te tehnologije lahko odkrijemo nove in redke populacije celic v določenem tkivu ter določimo različna obdobja razvoja in diferenciacije posameznih celic (9). Vzorec spremenjenega (preveč ali premalo) izražanja molekul RNK v posamezni celici nam omogoči vpogled v aktivirane ali zavrite biološke signalne poti in mehanizme, ki lahko vodijo v nastanek bolezni. V primerjavi s prej uporabljenimi metodami, pri katerih je bilo naše razumevanje omejeno predvsem na prevladujoči tip celic v tkivu, ponuja metoda scRNAseq nov vpogled v funkcionalno različnost posameznih celic, tudi tistih, ki so v vzorcu zastopane v manjši meri, a lahko pomembno vplivajo na razvoj bolezni in odpornosti na zdravljenje (10).

## 2 Tehnologija scRNAseq

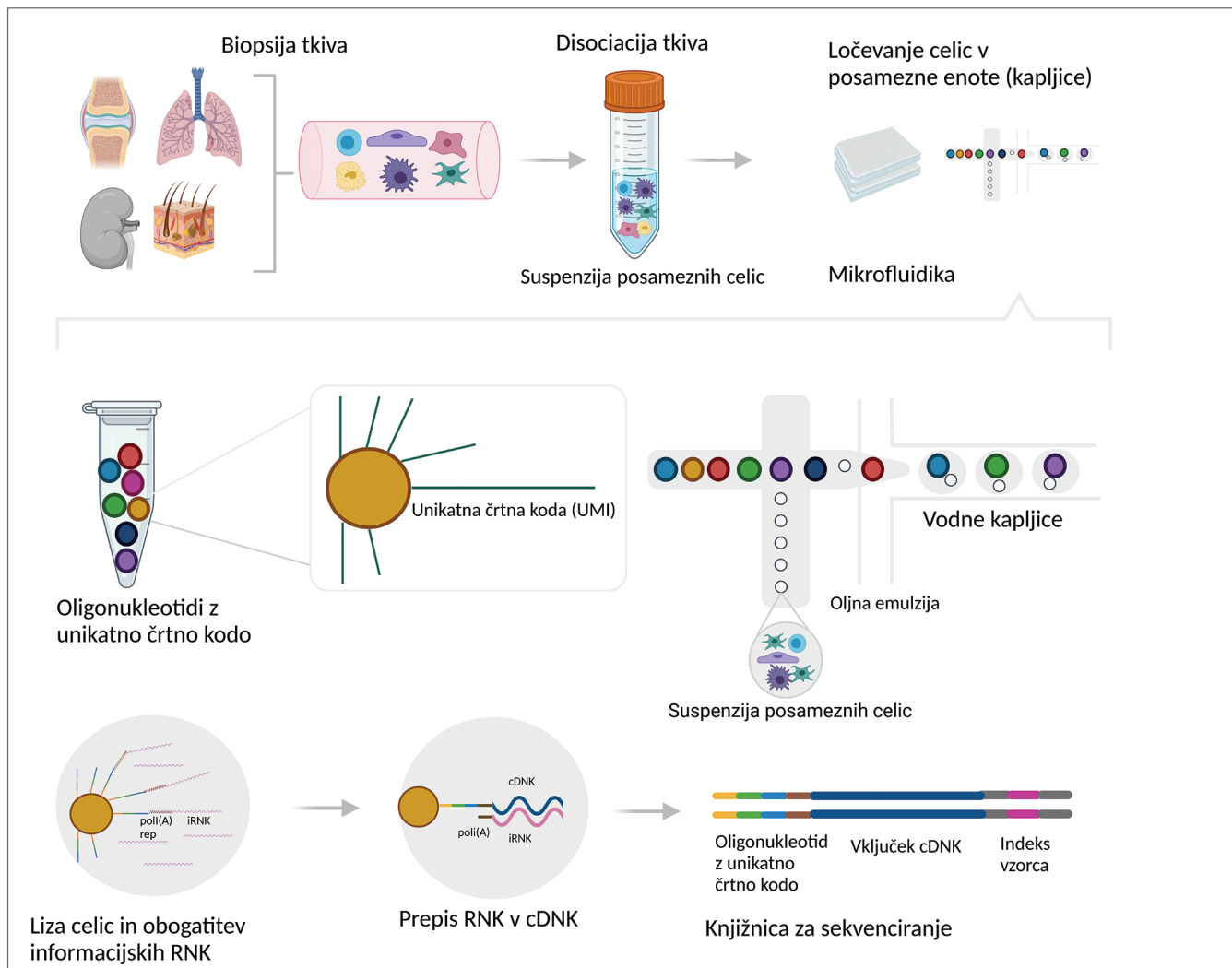
### 2.1 Princip tehnologije scRNAseq

Prvo določitev celotnega transkriptoma na ravni posameznih celic z uporabo tehnologije NGS so opisali leta 2009, ko so Tang in sod. (13) preučevali zgodnje stopnje razvoja zarodka miši. S tehnologijo scRNAseq so odkrili izražanje kar 75 % več molekul informacijskih RNK v celici blastomere, kot so jih v preteklosti lahko določili z drugimi metodami (13). Danes nam metoda omogoča sekvenciranje z zelo veliko ločljivostjo, večjo zmogljivostjo in točnostjo ter velikim naborom komercialno dostopnih platform in protokolov (14). Tudi druge metode, ki na ravni posameznih celic preučujejo celoten genom, metilacijo DNK ali odprtost kromatina in izražanje površinskih proteinov, se v zadnjem času razvijajo in se že uporabljajo v raziskovalne namene (15).

Običajen protokol scRNAseq vključuje naslednje glavne korake: osamitev posameznih celic, pripravo knjižnice in NGS ter bioinformatično obdelavo dobljenih podatkov (16). Osamitev živih in nepoškodovanih posameznih celic iz preučevanega tkiva je ključni korak, ki ga običajno izvedemo s pomočjo encimske ali mehanske disociacije (16). Če želimo preučevati samo določen tip celic, se jih lahko osami na podlagi površinskih proteinov, ki jih celice izražajo (17). Ko pridobimo suspenzijo posameznih celic, jih moramo vsako posebej ločiti

v posamezno reakcijsko enoto oz. predelek. Obstaja več različnih platform in tehnologij, ki uporabljajo različne postopke fizične ločitve posameznih celic iz vzorca ter priprave knjižnice in pomnoževanja. Trenutno je najbolj zastopana uporaba mikrofluidike, ki omogoča ločitev posameznih celic v kapljice (18). Ta tehnologija nam omogoča tudi, da vse nadaljnje reakcije (liza celic, obogatitev informacijskih RNK, reverzna transkripcija RNK v cDNK) poteka znotraj posameznih enot (kapljic), kar je velika prednost, saj tako ne potrebujemo dodatne opreme, poleg tega pa zmanjšamo izgubo materiala in možnost napak (19,20). Tehnologija temelji na uporabi oljne emulzije, ki omogoči enkapsulacijo posameznih celic v vodne kapljice. Vsaka kapljica poleg posamezne celice iz vzorca vsebuje še oligonukleotide, označene z unikatno identifikacijsko črtno kodo, ki se vežejo na molekule informacijske RNK, sproščene iz celice v kapljici. Po reverzni transkripciji RNK v cDNK se unikatna črtna koda integrira v zaporedje DNK, kar nam omogoči identificiranje posameznih celic oz. določitev izvora transkriptoma po sekvenciranju, saj je transkriptom vsake celice označen s svojo črtno kodo (Slika 1). Tehnologija mikrofluidike je pri uporabnikih trenutno najbolj priljubljena, saj zahteva majhen volumen vzorca, cena pa je sorazmerno nizka v primerjavi z ostalimi dostopnimi platformami (21,22).

Označene molekule cDNK iz posameznih celic tarčnega vzorca nato sprostimo iz kapljic, jih združimo v eno reakcijsko enoto, pomnožimo s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR), ter sekvenciramo z uporabo NGS, na podoben način kot pri konvencionalnem sekvenciranju RNK (24). Temu sledi še bioinformatična analiza pridobljenih podatkov, ki zahteva znanje izkušenih bioinformatikov, saj bioinformatični protokoli še niso tako dodelani in standardizirani kot metoda sama (25). Pri sami analizi je zelo pomembno kontroliranje kakovosti sekvenciranja, normalizacija izražanja genov, poravnava sekvenc s tarčnim genomom in kvantifikacija izražanja genov. V nadaljnjih korakih lahko določimo, katere celice prevladujejo ali primanjkujejo in katerim genom posameznih celic se izražanje spremeni (poveča ali zmanjša) v patološko spremenjenemu tkivu v primerjavi z zdravim, celice razvrstimo v različne subpopulacije na podlagi podobnosti izražanja genov, določimo fazo celičnega cikla ter določimo, v kateri fazi razvoja in diferenciacije se celice nahajajo (26). Za namen upravljanja s podatki, bioinformatične analize in shranjevanja podatkov, pridobljenih s pomočjo visokozmogljivostnih tehnologij, kot je NGS, je v Sloveniji na voljo raziskovalna infrastruktura ELIXIR-SI (<https://elixir-slovenia.org/>).



**Slika 1:** Postopek izolacije, ločitve celic v posamezne reakcijske enote in priprave knjižnice za sekvenciranje RNK na nivoju posameznih celic (scRNAseq) z uporabo sistema mikrofluidike.

Posamezne celice iz preučevanega tkiva običajno izoliramo s pomočjo encimske ali mehanske disociacije. Nato z uporabo mikrofluidike, ki temelji na oljni emulziji, fizično ločimo posamezne celice v vodne kapljice. Vse nadaljnje reakcije (liza celic, obogatitev informacijskih RNK in prepis RNK v cDNK) nato potekajo v posamezni kapljici za vsako celico posebej. Vsaka kapljica tako vsebuje posamezno celico ter oligonukleotid, označen z unikatno črtno kodo, ki se veže na informacijske molekule RNK, sproščene iz celice v kapljici, in po prepisu ostane vezan na cDNK posamezne celice. Tako lahko na koncu, ko celice združimo za sekvenciranje, točno določimo izvor transkriptoma. Povzeto po Kuret in sod. (23).

## 2.2 Glavne prednosti in pomanjkljivosti scRNAseq

Glavna prednost tehnologije scRNAseq je ta, da lahko zazna že zelo majhne razlike v izražanju genov med različnimi celicami, kar je predvsem pomembno pri analizi tumorjev, kjer je celična raznolikost velika in lahko le manjše število določenih celic vpliva na razvoj odpornosti na določen tip zdravljenja (27). Poleg tega lahko z njeno pomočjo odkrivamo povsem nove celične tipe in njihove značilne označevalce (28). Tako so npr. že odkrili nov, redek tip dendritičnih celic, ki

so podobne plazmacitoidnim dendritičnim celicam in imajo sposobnost aktivacije limfocitov T. Razvoj cepiva, ki bi povečalo število teh celic, bi lahko pomembno vplivalo na okrepitev imunskega odziva in potencialno delovalo protitumorsko (29). Z uporabo scRNAseq tudi lažje razumemo, kako poteka proces diferenciacije in dozorevanja celic, kar je uporabno predvsem na področju embrionalnega razvoja, kjer imamo običajno omejeno število celic (30).

Čeprav ima tehnologija številne prednosti, obstajajo tudi določene pomanjkljivosti, ki se jih je potrebno zavedati, če želimo rezultate pravilno interpretirati.

Najzahtevnejši izziv je osamitev zadostnega števila živih in nepoškodovanih posameznih celic iz vzorca, ne da bi pri tem kakor koli vplivali na njihov transkriptom. Da bi to dosegli, je običajno potrebnih več optimizacijskih korakov, kar je odvisno tudi od vrste vzorca oz. tkiva, ki ga proučujemo. Doslej se je pokazalo, da je najbolje celice osamiti takoj, ko tkivo odvzamemo, obstaja pa tudi več protokolov zamrzovanja tkiv, kar nam omogoča, da pripravimo knjižnice za več vzorcev naenkrat (23). Težava pri tehnologiji je tudi velika raznolikost med celicami iz vzorca, kar je lahko posledica tehničnega (majhna količina RNK v celicah, slaba učinkovitost pridobitve RNK iz celice) ali biološkega ozadja (veliko različnih stopenj razvoja in diferenciacije celic, različna velikost celic in različne faze cikla, v katerem se celica nahaja). Nekatere od težav lahko rešimo tako, da povečamo število celic, ki jih bomo analizirali, ali da celice na podlagi podobnosti izražanja genov združimo v skupine (16,31). Na pridobljene rezultate lahko negativno vpliva tudi učinek različnih šarž (*angl.* batch effect). To je lahko posledica ravnanja z vzorcem (npr. če različne vzorce sekvenciramo v različnih obdobjih z uporabo različnih platform za sekvenciranje) ali uporabe različnih šarž reagentov. Učinek šarž lahko izničimo z določenimi računalniškimi programi in algoritmi, najbolje pa je, da se jim v celoti izognemo z ustrežnejšim načrtovanjem poskusov, z vključitvijo več različnih bioloških vzorcev ali z zamrzovanjem vzorcev ter njihovo pripravo in sekvenciranjem ob istem času z istimi šaržami reagentov. Ostale pomanjkljivosti metode vključujejo predvsem sorazmerno visoko ceno, izzive pri bioinformatiki obdelavi podatkov in interpretiranju rezultatov ter translaciji rezultatov v klinično prakso (32).

### 2.3 Uporabnost tehnologije scRNAseq

Velika uporabnost tehnologije scRNAseq se je pokazala predvsem v preučevanju biologije tumorjev, kjer je velika celična raznolikost ključnega pomena. V članku navajamo primer melanoma kože, ki je eden najbolj agresivnih rakov v razvitem svetu (11). Čeprav se je v zadnjem času z uvedbo imunske terapije napoved izida melanom bistveno izboljšala, pa je še vedno približno 30–40 % bolnikov, pri katerih tovrstna terapija ni uspešna (12). Glavni razlog je velika raznolikost tako malignih celic, ki tumor sestavljajo, kot tudi normalnih, predvsem imunskih celic, ki tumor obdajajo. Poleg tega nekatere raziskave kažejo, da bi bile lahko za nastanek in razvoj tumorja ter za odpornost na zdravljenje ali ponovitev tumorja po zdravljenju odgovorne rakave

matične celice. Te so namreč sposobne samoobnove, diferenciacije v bolj specializirane celice, ki imajo boljše migracijske lastnosti in sposobnost izogniti se prepoznavi imunskega sistema (33). Pomembna lastnost rakavih matičnih celic je njihova plastičnost oz. sposobnost prilagoditve na novo okolje s pridobitvijo novih lastnosti, ki bolj ustrezajo novemu okolju in s tem pridobitev hkratne odpornosti na več vrst zdravljenja (34).

V nadaljevanju se bomo usmerili v opis uporabe tehnologije na področju melanoma s poudarkom na novih dognanjih na področju razumevanja mehanizmov odpornosti na zdravljenje ter prispevek te tehnologije k povečani učinkovitosti zdravljenja melanoma in razvoju posamezniku prilagojene, t.i. osebne medicine.

## 3 Melanom

### 3.1 Opredelitev melanoma

Melanom je maligni tumor, ki nastane iz maligno transformiranih melanocitov (35). Nastane lahko kot posledica genetskih dejavnikov in dejavnikov okolja, predvsem izpostavljenosti sončnim žarkom. Najpogostejša mutacija, ki se pojavi pri 40 % bolnikov z melanomom, je mutacija v genu BRAF. Gen BRAF nosi zapis za serin-treonin kinazo, ki deluje v signalni poti prenašanja signalov od celičnih receptorjev do celičnega jedra (RAS/RAF/MAPK signalna pot). Sodi v skupino protoonkogenov, ki zaradi določenih mutacij delujejo kot onkogeni. Protein, ki nastane kot produkt onkogene BRAF z mutacijo na kodonu 600 (BrafV600), sproža nenehno signaliziranje preko encimov fibrosarkomske kinaze (*angl.* rapidly accelerated fibrosarcoma, RAF) in z mitogenom aktivirane proteinske kinaze (*angl.* mitogen activated protein kinase, MAPK), kar povzroči številnejše delitve celice in njeno maligno preobrazbo (36). Zato igra onkogen BrafV600 pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju tumorja ter verjetno predstavlja zgodnji dogodek v procesu nastanka rakaste celice. Mutacij BrafV600 je več: mutacija V600E predstavlja več kot 90 % vseh opisanih mutacij v genu BRAF pri različnih tumorjih, mutacija V600K predstavlja 5 %, mutacija V600D pa <5 % vseh mutacij v kodonu V600 gena BRAF (37).

Melanom se najpogosteje pojavi na koži, lahko pa tudi drugod, kjer so prisotni melanociti, npr. v očesu ali možganskih ovojnicah. Predstavlja približno 5 % vseh primerov kožnega raka in je glavni vzrok za 90 % smrti zaradi kožnega raka (38). Je eden pogostejših vrst raka v razvitem svetu, ki lahko hitro napreduje in

ima najhitreje rastočo incidenco med rakavimi boleznimi. Najpogosteje se pojavlja pri svetlopoltih ljudeh, ki se čezmerno izpostavljajo UV žarkom. V Evropi je trenutno ocenjena incidenca 10–25 novih primerov na 100.000 prebivalcev, vendar pa vztrajno narašča v vseh starostnih skupinah, predvsem pa pri starejših od 60 let. Predvidevajo, da bo incidenca strmo naraščala še več desetletij (39). Približno 80–90 % vseh melanomov diagnosticirajo kot primarne tumorje, pri katerih še ni prišlo do zasevanja. Pri teh bolnikih je napoved izida zelo dobra, 10-letno preživetje pa ocenjeno na več kot 90%. Pri približno 10–20 % bolnikih pa bolezen napreduje in pride do pojava zasevkov, ki so lahko regionalni (področne bezgavke) ali sistemski (drugi organi). Pri bolnikih z napredovalo boleznijo s sistemskim zasevanjem je bila napoved izida zgodovinsko gledano zelo slaba, saj je bil delež bolnikov, ki so preživeli 5-letno obdobje po postavitvi diagnoze le 10–20 % (40). Z uvedbo novega sistemskega pristopa zdravljenja z imunoterapijo se je izid bistveno izboljšal, saj se je delež bolnikov, ki preživijo po 5 letih od postavitve diagnoze povečal na 40–50 % (41,42).

## 3.2 Zdravljenje melanoma

### 3.2.1 Kirurško zdravljenje

Zdravljenje primarnega melanoma poteka s kirurško odstranitvijo celotne spremembe z varnostnim robom, ki je odvisen od debeline primarnega melanoma. Minimalni varnostni rob je pri vseh invazivnih melanomih vsaj 1 cm. V primeru prisotnosti metastaz v področnih bezgavčnih ložah sledi tudi kirurška odstranitev le-teh. Ustrezno opravljena disekcija bezgavčne lože ne izključuje povsem možnosti ponovitve bolezni v regionalni loži, na kar bistveno vplivata adjuvantno obsevanje in adjuvantno sistemsko zdravljenje (38). Danes se večina melanomov odkrije že v zgodnji fazi (melanom *in situ* ter začetno invazivni melanom v stadiju pT1a), katerih zdravljenje je izključno kirurško.

### 3.2.2 Obsevanje

Obsevanje se običajno priporoča kot adjuvantna terapija po kirurški odstranitvi primarnega tumorja v primeru tesnega roba in kadar dodatna odstranitev ni več mogoča. Poleg tega se obseva tudi bolnike, pri katerih operacija ni mogoča, ko bi npr. operacija povzročila večjo kozmetično ali funkcionalno okvaro, in pri bolnikih, ki odklonijo operacijo ali zanjo iz medicinskih razlogov niso sposobni. Obsevanje je priporočljivo tudi

v primeru regionalne ali sistemsko razširjene bolezni, npr. po kirurški disekciji klinično pozitivnih področnih bezgavk ali pri nastanku zasevkov v možganih (38).

### 3.2.3 Sistemsko zdravljenje

Sistemsko zdravljenje melanoma z zdravili poteka kot adjuvantno zdravljenje in zdravljenje metastatske bolezni. Adjuvantno zdravljenje je pooperativno zdravljenje z namenom zmanjšanja verjetnosti ponovitve bolezni in podaljšanja celokupnega preživetja. Sistemsko zdravljenje vključuje kemoterapijo, tarčno zdravljenje z zaviralci RAF za bolnike, ki imajo mutacijo v genu *BRAF*, v kombinaciji z zaviralci MEK in imunoterapijo. Za zdravljenje metastatske bolezni se odločamo individualno pri vsakem bolniku, odvisno od prisotnosti mutacije v genu *BRAF*, obsežnosti metastatske bolezni, vrednosti laktatne dehidrogenaze, kliničnih znakov in simptomov bolezni, zmogljivosti bolnika in prisotnosti drugih sočasnih bolezni (38).

Sistemska kemoterapija je popolnoma učinkovita pri le manj kot 5 % bolnikov z melanomom, zato se je poslužujemo šele v 2. ali 3. redu zdravljenja, odvisno od predhodne terapije in splošnega stanja bolnika. Kot kemoterapevtiki se večinoma uporabljajo dakarbazin, temozolamid, karboplatin/paklitaksel ter kombinirana terapija s cisplatinom ali njegovimi analogi v kombinaciji z alkaloidi vinka in derivati nitrosecnine (38).

Tarčno zdravljenje pride v poštev pri bolnikih, ki imajo potrjeno mutacijo v genu *BRAF*. Ne glede na vrsto mutacije (V600E, V600K ali V600D) se najpogosteje uporabljajo zaviralci RAF v kombinaciji z zaviralci MEK (npr. dabrafenib v kombinaciji s trametinibom, vemurafenib v kombinaciji s kobimetinibom in enkorafenib v kombinaciji z binimetinibom), saj je pri vseh teh mutacijah čezmerno aktivirana signalna pot RAS/RAF/MAPK. V primeru kontraindikacij za uporabo zaviralcev MEK bolnike zdravimo z monoterapijo z zaviralci RAF, kot sta npr. dabrafenib in vemurafenib (38).

Imunoterapevtiki so v zadnjih letih že nadomestili slabo učinkovito sistemsko zdravljenje s citostatiki pri bolnikih z napredovalim ali razsejanim melanomom, pri bolnikih z melanomom z velikim tveganjem za ponovitev po kirurški odstranitvi pa se uporabljajo kot dopolnilna oblika zdravljenja. Uporaba imunoterapije je tako bistveno izboljšala napoved izida in preživetje bolnikov z napredovalim stadijem melanoma (43). Imunoterapija vključuje različne biološke molekule za spodbujanje in izboljšanje delovanja bolnikovega imunskega sistema pri prepoznavanju in odstranjevanju

tumorskih celic (44). Zaviralci imunskih nadzornih točk veljajo za najobetavnejše imunoterapevtike doslej. Gre predvsem za monoklonska protitelesa ali fuzijske proteine, ki se specifično vežejo na imunске nadzorne točke, ki se nahajajo predvsem na citotoksičnih limfocitih T CD8+, ki infiltrirajo področje tumorja. Z onemogočanjem delovanja imunskih nadzornih točk pride do ponovne aktivacije limfocitov T, kar jim omogoči, da opravijo svojo primarno funkcijo – prepoznajo, uničijo in odstranijo tumorske celice (44). Trenutno so najbolj široko uporabljena monoklonska protitelesa proti citotoksičnemu T-limfocitnemu antigenu (CTLA-4), programiranemu proteinu celične smrti 1 (PD-1) ali njegovemu ligandu – programiranemu smrtnemu ligandu 1 (PD-L1), ki imajo dokazano učinkovite protitumorske učinke (45). Imunoterapija melanoma vključuje monoterapijo z nivolumabom ali pembrolizumabom (protitelesa proti PD-1) oz. kombinacijo anti-PD-1 s protitelesi anti-CTLA, tj. kombinacijo nivolumaba in ipilimumaba (38).

Kljub napredku v režimu zdravljenja pa se 30–40 % bolnikov z melanomom na terapijo z zaviralci nadzornih točk ne odziva, 20–30 % bolnikov pa ponovno razvije melanom po koncu zdravljenja (12). To bi lahko pripisali predvsem velikemu številu genetsko različnih celic, ki sestavljajo tumorsko mikrookolje in se od bolnika do bolnika razlikujejo. Glavni cilj raziskav na področju melanoma je tako predvsem izboljšati učinkovitost terapije, kar bo mogoče, ko bo odločitev za vrsto zdravljenja temeljila tudi na podatkih o celični in molekularni sestavi melanoma posameznega bolnika.

Uporabnost tehnologije scRNAseq za vpeljavo bolniku prilagojene terapije se je že pokazala prav v raziskavah na področju onkologije, tudi na primerih melanoma, kjer so raziskovalci odkrili nove celične in molekulske označevalce, katerih izražanje je odvisno od odziva bolnika na zdravljenje. Nekatere primere bomo podrobneje opisali v nadaljevanju.

### 3.3 Tumorsko mikrookolje

Melanom običajno nastane kot posledica mutacij v DNK melanocitov, kar vodi v porušenje celične homeostaze in spremembo normalnega v maligni fenotip. Za melanom je značilno, da se celicam fenotip zelo spreminja skozi čas in faze rasti tumorja (*angl.* phenotype switching), kar vodi v nastanek velikega števila različnih populacij celic istega tipa, ki sestavljajo tumor (46). Da se tumorske celice lahko neomejeno razmnožujejo in se izogonejo prepoznavi imunskim celicam, morajo vzpostaviti svoje lastno mikrookolje, ki ga sestavljajo

tudi normalne oz. nespremenjene celice. Sem sodijo predvsem imunске celice, celice, ki sestavljajo žilni sistem in fibroblasti. Tumorsko mikrookolje igra pomembno vlogo pri rasti in razraščanju tumorja ter pri odzivu malignih celic na zdravljenje z določeno terapijo (47). Manjši del tumorskega mikrookolja so tudi matične rakaste celice, ki v zadnjem času postajajo vse bolj zanimive za raziskave z vidika razumevanja mehanizmov razraščanja tumorja in odpornosti na zdravljenje ter za razvoj novih terapevtskih tarč (33).

Da bi razumeli mehanizem nastanka in napredovanja tumorjev ter odziv na zdravljenje, je nujno proučevanje fenotipa in funkcije tako malignih tumorskih celic kot tudi celic tumorskega mikrookolja (rakavih matičnih celic in normalnih celic, predvsem imunskih) ter dinamike medsebojnega delovanja.

#### 3.3.1 Raznolikost maligno spremenjenih celic znotraj tumorjev

Prav velika raznolikost v fenotipu malignih celic znotraj tumorja in spreminjanje le-tega je eden glavnih razlogov, zakaj se nekateri bolniki ne odzivajo na zdravljenje z določeno terapijo oz. po odzivu doživijo ponovni zagon bolezni (48). Ugotovili so že, da obstajata dva glavna fenotipa malignih celic, ki sestavljajo melanom. Na podlagi zastopanega fenotipa lahko melanome ločujemo med seboj in se odločamo za različno zdravljenje. Za melanocitni fenotip je značilna prisotnost malignih celic z velikim izražanjem gena *MITF*, ki kodira transkripcijski faktor za melanocite in sposobnost pigmentacije. Za mezenhimski fenotip je značilna večja sposobnost migriranja in izražanje gena za receptor tirozinske kinaze AXL. Bolniki, ki imajo prisoten mezenhimski fenotip z velikim izražanjem AXL, so odporni na zdravljenje z zaviralci tirozinskih kinaz, kot sta dabrafenib in trametinib (49,50). V preteklosti je veljalo prepričanje, da so lahko v tumorju prisotne ali zgolj maligne celice z velikim izražanjem *MITF* ali zgolj maligne celice z velikim izražanjem AXL, ne pa oboje. Nato pa so Tirosh in sod. (51) leta 2019 z uporabo scRNAseq ugotovili, da je tudi pri bolnikih (v študijo je bilo vključenih 19 bolnikov z melanomom), pri katerih prevladujejo celice z velikim izražanjem *MITF*, v manjši meri prisotnih nekaj celic z velikim izražanjem AXL, ki jih s konvencionalnim sekvenciranjem RNK ni bilo moč zaznati. Poleg tega so v tej študiji ugotovili tudi, da se bolnikom po zdravljenju z zaviralci tirozinskih kinaz in po razvoju odpornosti število AXL pozitivnih celic še poveča (51).

Na fenotip malignih celic in s tem na fenotip tumorja pomembno vpliva komunikacija med tumorskimi celicami in njihovim okoljem (51). Fenotip maligno spremenjenih melanocitov pa vpliva tudi na celični tip infiltriranih imunskih celic, kar je neposredno povezano z odzivom na imunoterapijo. Tako je npr. infiltracija tumorja z limfociti T povezana z boljšim odzivom na imunoterapijo in daljšim preživetjem. Povezavo med fenotipom malignih celic in infiltracijo z limfociti T je bilo doslej težko dokazati in razumeti. Z uporabo scRNAseq pa so Jerby-Arnon in sod. (52) natančno določili fenotip malignih celic, ki je povezan z infiltracijo limfocitov T CD8+. Pri bolnikih, ki se na zdravljenje z anti-PD1 in anti-CTLA4 ne odzivajo, je prisoten še pred začetkom zdravljenja. Količina celic s tovrstnim fenotipom se po uvedbi imunoterapije še poveča, ne vpliva pa na odziv na zdravljenje z zaviralci RAF/MEK. Za ta fenotip je bilo značilno povečano izražanje genov, vpletenih v prepoznavo in predstavitev antigenov (npr. *B2M*, *CTSB*, *HLA-A/B/C*), signalna pot interferona gama, odziv na komponente komplementnega sistema (*CD59* in *C4A*), prav tako je bilo značilno povečano izražanje gena za encim od ciklina odvisne kinaze 4 (*CDK4*). V študiji so dokazali, da lahko zaviralec *CDK4/6* palbociklib spremeni fenotip malignih celic ter omogoči limfocitom T prepoznavo in odstranitev malignih celic, kar bi za bolnike s tem fenotipom pomenilo boljši odziv na imunoterapijo s palbociklibom (52).

### 3.3.2 Imunske celice

Imunske celice, ki migrirajo na območje tumorja, igrajo pomembno vlogo pri prepoznavi in odstranitvi malignih celic. Za melanom je značilna predvsem infiltracija z limfociti T CD8+, ki se v tumorskem okolju lahko diferencirajo v efektorske, spominske ali citotoksične celice, kar zagotovi ustrezno protitumorsko aktivnost in uničenje tumorskih celic (53). Med bolniki z melanomom pa obstajajo razlike v tem, kateri tip imunskih celic prevladuje v tumorskem okolju, kar je odvisno tudi od prisotnosti mutacije v genu *BRAF*. Bolniki z mutacijo v genu *BRAF* imajo prisotnih več limfocitov T pomagalk in limfocitov B, medtem ko imajo tisti brez mutacije več citotoksičnih limfocitov T in makrofagov. Pri bolnikih z mutacijo *BRAF* so ugotovili tudi povezavo med večjim številom infiltriranih limfocitov B in daljšim časom preživetja. Različno imunsko okolje pa vpliva tudi na odziv na zdravljenje z zaviralci imunskih nadzornih točk, saj je to bolj uspešno pri bolniki z mutacijo *BRAF* (5-letno preživetje pri bolnikih z mutacijo je 60 %, pri bolnikih brez mutacije pa 48 %) (54).

Pogosto pri bolnikih z melanomom opazimo tudi infiltracijo drugačne populacije limfocitov T CD8+, t.i. izčrpanih limfocitov (*angl.* exhausted lymphocytes), ki so fenotipsko spremenjeni, imajo povečano izražanje receptorjev za zaviralce imunskih nadzornih točk, npr. PD1, in niso več zmožni opravljati svoje efektorske funkcije. Izčrpani limfociti delujejo imunosupresivno in ne več protitumorsko; na tumorske celice postanejo tolerantni, jih ne prepoznajo in ne uničijo, posledica pa je razrast tumorja (55). Infiltracija večjega števila izčrpanih limfocitov T je povezana s slabšo napovedjo izida, medtem ko je infiltracija večjega števila spominskih in citotoksičnih limfocitov T povezana z boljšim izidom. Številčno se populacija citotoksičnih limfocitov T zmanjša v poznejših stadijih boleznih, število izčrpanih limfocitov T pa se poveča. Izčrpani limfociti T so fenotipsko različni od ostalih subpopulacij limfocitov T CD8+, saj imajo povečano izražanje genov, ki so vpleteni v signalne poti imunskih nadzornih točk PD-1 in CTLA-4. Prav tako izčrpani limfociti T CD8+ povečano izražajo 3 gene (*PMEL*, *TYRP1* in *EDNRB*), ki so povezani s slabšim izidom in bi lahko v prihodnosti predstavljali pomembne tarče za zdravljenje melanoma (56). Prisotnost različnih populacij infiltriranih imunskih celic je povezana z odzivom na zdravljenje z zaviralci imunskih nadzornih točk. V študiji, ki je vključevala največje število bolnikov z melanomom doslej, so Sade-Feldman in sod. (57) s pomočjo scRNAseq določili transkriptome več kot 16.000 imunskih celic iz 48 bolnikov z melanomom, zdravljenih z zaviralci imunskih nadzornih točk. Ugotovili so prisotnost dveh populacij citotoksičnih limfocitov T, ki se razlikujeta v izražanju transkripcijskega dejavnika TCF7. Prisotnost TCF7 na limfocitih T CD8+ je napovedala dober odziv na zdravljenje z zaviralci imunskih nadzornih točk in ugoden klinični izid. V študiji so odkrili tudi povečano izražanje gena za CD39 na populaciji izčrpanih limfocitov T. Odstranitev limfocitov T CD8+ CD39+ ex vivo iz tumorskih infiltratov pred uvedbo zdravljenja z anti-PD1 je prispevala k večji učinkovitosti prepoznavne in odstranjevanja tumorskih celic. Uporabo zaviralcev CD39 v kombinaciji s protitelesi proti PD1 ali CTLA4 predlagajo kot novo kombinirano terapijo, ki bi lahko bila bolj uspešna pri zdravljenju melanoma (57). Prisotnost dveh populacij citotoksičnih limfocitov T v tumorskem okolju so kasneje potrdili tudi Li in sod. (58). Ugotovili so tudi, da se le ena od obeh populacij fenotipsko spremeni in postane nefunkcionalna oz. izčrpana. Na začetku fenotipske spremembe se limfociti T intenzivno razmnožujejo, vendar se kasneje, ko že pridobijo fenotip izčrpanih celic in postanejo



nefunkcionalni, njihovo razmnoževanje ustavi. Količina izčrpanih limfocitov T CD8+ je neposredno povezana z odzivom imunskega sistema na tumorske celice. Čim več je izčrpanih celic, tem slabši je imunski odziv in slabši je izid (58). Kim in sod. (59) so analizirali obstoječe zbirke podatkov, pridobljenih s tehnologijo scRNAseq, pri čemer so se osredinili na limfocite T CD8+, ki tvorijo tumorsko mikrookolje. Ugotovili so, da se izražanje transkripcijskega dejavnika TOX poveča, ko limfociti CD8+ postanejo izčrpani in da lahko na podlagi izražanja TOX predvidimo preživetje in učinkovitost terapije s protitelesi proti PD1. Avtorji študije predlagajo, da bi na podlagi izražanja TOX bolnike lahko razdelili v podskupine in se bolj ciljano odločali za terapijo. TOX pa bi lahko predstavljal tudi pomembno novo tarčo za zdravljenje melanoma (59).

Čeprav je uvedba imunoterapije z zaviralci imunskih nadzornih točk bolnikom z melanomom omogočila veliko boljši izid in preživetje, še vedno ostaja velik delež bolnikov, ki se na tovrstno terapijo ne odziva ali pa doživi ponovni zagon bolezni po tem, ko je terapija že pokazala učinkovitost. Kljub intenzivnim raziskavam na tem področju trenutno še ni na voljo biološkega označevalca, ki bi zanesljivo napovedal odziv na zdravljenje ali ponovni zagon bolezni. Idealno bi bilo biološki označevalec, ki bi nam napovedal izid zdravljenja, meriti v krvi ali serumu bolnikov, saj bi tako vzorec pridobili na minimalno invaziven način brez potrebe po biopsiji. S tem namenom so z aplikacijo scRNAseq Li in sod. (60) preučevali populacije limfocitov T CD8+ v krvi in v tumorskem tkivu bolnikov z melanomom. Ugotovili so, da je tako v tumorju kot v krvi prisotna specifična populacija limfocitov T CD8+, ki imajo povečano izražanje genov, povezanih z oksidativnim stresom (OXPHOS). Ti limfociti T pa izražajo tako gene, ki označujejo sposobnost citotoksičnosti kot tudi gene, ki nakazujejo na nefunkcionalnost oz. izčrpanost. Prisotnost OXPHOS pozitivnih limfocitov T CD8+ v krvi je povezana z odpornostjo na zdravljenje z zaviralci imunskih nadzornih točk. Določanje deleža OXPHOS pozitivnih celic v krvi bi tako lahko prispevala k napovedovanju odziva na zdravljenje z imunoterapijo, obenem pa bi lahko z inhibicijo teh celic izboljšali učinkovitost zdravljenja (60).

V zadnjem času se pri raziskovanju tumorje infiltrirajočih imunskih celic pozornost poleg limfocitom T posveča tudi celicam, ki pripadajo mieloidni liniji in so značilne za prirojeni imunski odziv. Uporaba scRNAseq na izoliranih mononuklearnih celicah iz krvi je pokazala, da sta prisotnost večjega števila monocitov in manjše razmerje med številom limfocitov T pomagalk

in monocitov povezana s slabšim izidom in slabšim odzivom na zdravljenje s protitelesi anti-PD1. Tudi večje izražanje gena za S100A9 na monocitih je bilo povezano s slabšim izidom, kar bi nam lahko predstavljajo potencialen biološki označevalec za odziv na zdravljenje, pridobljen z minimalno invazivnim odvzemom venske krvi (61). Tudi Choi in sod. (62) so ugotovili, da je prisotnost specifičnih s tumorjem povezanih makrofagov povezana z odpornostjo na zdravljenje z imunoterapijo. Posameznocelična analiza tumorskih tkiv pred in po uvedbi zdravljenja z imunoterapevtiki je pokazala, da se izražanje genov, vpletenih v metabolizem glukoze (npr. *GLUT1* in *GLUT3*), na makrofagih razlikuje glede na odziv bolnika na zdravljenje. Bolnikom, ki se na zdravljenje niso odzvali, se je povečalo število specifične populacije makrofagov s povečanim izražanjem genov za *GLUT1*, *PDL1*, *OXPHOS* in genov, značilnih za fenotip M2 (62).

S ponovno analizo že obstoječih podatkov scRNAseq bolnikov z melanomom, zdravljenih z zaviralci imunskih nadzornih točk, so Xiong in sod. (63) pri bolnikih, ki se na terapijo niso odzvali, prepoznali skupino makrofagov s povečanim izražanjem gena za *TREM2*, ki imajo tudi povečano izražanje genov, vpletenih v aktiviranje komplementnega sistema, kar je dokazano povezano z razraščanjem tumorja in slabšim izidom. Poleg tega so pri bolnikih, ki se na zdravljenje niso odzvali, določili večje število limfocitov T gama-delta, ki imajo zmanjšano aktivnost protitumorskega interferona gama in s tem zmanjšano učinkovitost odstranjevanja tumorskih celic (63). Kasneje so povezavo med aktivirano signalno potjo interferona gama in boljšim odzivom na zdravljenje z imunoterapijo potrdili v več različnih študijah (64,65). Vendar pa so Vanmeerbeek in sod. (66) ugotovili, da interferon gama ni zanesljiv biološki označevalec odziva na imunoterapijo s protitelesi anti-PD1 pri bolnikih, ki so bili najprej zdravljeni s protitelesi anti-CTLA4, v primerjavi z bolniki, ki prej še niso prejeli imunoterapije, zato so v svojo študijo vključili bolnike, ki so zaporedoma prejeli terapijo anti-CTLA4 in anti-PD1. Ugotovili so, da so v tem primeru označevalci, povezani z aktiviranjem spominskih limfocitov T, ki so odporni na apoptozo, boljše izbira za napoved ugodnega odziva na zdravljenje z anti-PD1. Tako so dokazali, da uvedba imunoterapije lahko bistveno vpliva na tumorsko mikrookolje, predvsem na fenotip limfocitov T, kar lahko značilno vpliva na napovedno vrednost tumorskih označevalcev (66).

Pregled uporabe tehnologije sekvenciranja RNK na ravni posameznih celic (scRNAseq) pri bolnikih z melanomom prikazuje **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Pregled uporabe tehnologije sekvenciranja RNK na ravni posameznih celic (scRNAseq) pri bolnikih z melanomom.

Vrsta vzorca (število)	Tip celic (število)	Glavne ugotovitve	Doprinos tehnologije scRNAseq	Ref.
Tkivo kožnega melanoma bolnikov (n=19)	maligne, imunske in stromalne (n=4.645)	Pri bolnikih, pri katerih prevladujejo maligne celice z velikim izražanjem gena za MITF, so v manjšem številu prisotne tudi celice z velikim izražanjem AXL in so odporne na zdravljenje z zaviralci RAF/MEK, njihovo število se po zdravljenju še poveča.	Hkratna določitev vseh glavnih celičnih komponent tumorja, njihovih genomskih in molekularnih značilnosti ter določitev dejavnikov, ki vplivajo na klinični odziv bolnika na zdravljenje. Natančna določitev subpopulacij celic in vzorcev njihovega genskega izražanja bo omogočila bolj informirano analizo rezultatov konvencionalnih metod sekvenciranja in bolj ciljan pristop zdravljenja.	(51)
Tkivo kožnega melanoma bolnikov (n=21)	maligne, imunske in stromalne (n=7.186)	Fenotip malignih celic (povečano izražanje CDK4) vpliva na infiltracijo limfocitov T CD8+, zaviralec CDK4/6 palbociklib vpliva na fenotip malignih celic in izboljša odziv na zdravljenje z imunoterapevtiki.	Določitev fenotipa malignih celic, ki vplivajo na razvoj odpornosti na zdravljenje z anti-PD1 imunoterapijo, določitev novih terapevtskih tarč (CDK4), ki bi ob hkratni uvedbi imunoterapije bistveno izboljšale odziv na zdravljenje.	(52)
Analiza obstoječih zbirk podatkov	levkociti CD45+ (ND)	Bolniki z mutacijo v genu BRAF imajo prisotnih več limfocitov T CD4+ in limfocitov B, medtem ko imajo tisti brez mutacije več limfocitov T CD8+ in makrofagov. Večje število infiltriranih limfocitov B je povezano z daljšim časom preživetja.	Sestava imunskih celičnih populacij v tumorskem mikrookolju je različna pri bolnikih z mutacijo gena BRAF v primerjavi z bolniki, ki te mutacije nimajo. Ne le fenotip imunskih in malignih celic, tudi mutacija v genu BRAF vpliva na odziv na zdravljenje z imunoterapevtiki.	(54)
Analiza obstoječih zbirk podatkov	limfociti T CD8+ (n=10.861)	Večja infiltracija izčrpanih limfocitov T je povezana s slabšo napovedjo izida, večja infiltracija spominskih in citotoksičnih limfocitov T CD8+ pa z boljšo. Število izčrpanih limfocitov T CD8+ se poveča v poznejših stadijih boleznih. Izčrpani limfociti T povečano izražajo 3 gene (PMEL, TYRP1, EDNRB), ki so povezani s slabšim izidom.	Različne subpopulacije limfocitov T CD8+ različno vplivajo na prognozo bolezni, napredovanje rasti tumorja in na odziv bolnika na imunoterapijo. Odkritje novih potencialnih tarč (PMEL, TYRP1 in EDNRB) za zdravljenje melanoma.	(56)
Tkivo kožnega melanoma bolnikov (n=48)	levkociti CD45+ (n=16.291)	Prisotnost TCF7 na limfocitih T CD8+ je napovedala dober odziv na zdravljenje z zaviralci nadzornih točk in ugoden klinični izid. V študiji so odkrili tudi povečano izražanje gena za CD39 na populaciji izčrpanih limfocitov T. Odstranitev limfocitov T CD8+ CD39+ ex vivo iz tumorskih infiltratov pred uvedbo zdravljenja z anti-PD1 je prispevala k večji učinkovitosti prepoznavne in odstranjevanja tumorskih celic.	Odkritje nove tarče za zdravljenje melanoma CD39, ki ga izražajo izčrpani limfociti T. Kombinacija terapije, usmerjene proti CD39, z imunoterapevtiki bi lahko bistveno izboljšala odziv na zdravljenje bolnikov z melanomom. Rezultati študije bi lahko vplivali na načrtovanje kliničnih preskušanj za anti-PD1 imunoterapijo, v katere bi selektivno vključili bolnike na podlagi prisotnosti različnih subpopulacij limfocitov T, kar bi pripomoglo k večjemu uspehu kliničnega preskušanja.	(57)
Tkivo kožnega melanoma bolnikov (n=25)	limfociti T CD3+ (n=29.825)	Večje število izčrpanih limfocitov T CD8+ je povezano s slabšim imunskim odzivom in slabšim izidom. Izčrpani limfociti T CD8+ so največja prisotna populacija v tumorskem mikrookolju, ki se intenzivno deli in diferencira.	Določitev dinamike spreminjanja infiltratov limfocitov T skozi časovna obdobja. Populacijo izčrpanih limfocitov T CD8+ bi v prihodnje bilo smiselno dojemati kot aktivno in intenzivno delečo se populacijo celic, ki pomembno vpliva na odzivnost tumorja.	(58)
Analiza obstoječih zbirk podatkov	limfociti T CD8+ (n=4.645)	Izražanje transkripcijskega dejavnika TOX se poveča, ko limfociti T CD8+ postanejo izčrpani. Izražanje TOX je povezano z večjim izražanjem imunskih nadzornih točk. Na podlagi izražanja TOX lahko predvidimo preživetje in učinkovitost terapije s protitelesi proti PD1.	Določitev dejavnikov, ki so vpleteni v razvoj izčrpanih limfocitov T. Zaviralci TOX bi lahko zmanjšali število izčrpanih limfocitov T CD8+ in izboljšali učinkovitost imunoterapije. No podlagi izražanja TOX bi lahko bolnike selektivno izbrali za terapijo z anti-PD1 protitelesi.	(59)

Vrsta vzorca (število)	Tip celic (število)	Glavne ugotovitve	Doprinos tehnologije scRNAseq	Ref.
Tkivo kožnega melanoma in kri bolnikov (n=8)	limfociti T CD8+ (n=173.061)	Povečano izražanje genov OXPPOS na limfocitih T CD8+ iz tumorskega tkiva in krvi bolnikov je povezano z odpornostjo na zdravljenje z zaviralci imunskih nadzornih točk.	Razvoj modela na podlagi limfocitov T CD8+ OXPPOS+, ki z veliko točnostjo razlikuje med bolniki, ki se odzivajo na zdravljenje z zaviralci imunskih nadzornih točk, in tistimi, ki se ne. Na novo identificirana populacija celic bi lahko predstavljala tudi novo tarčo za zdravljenje melanoma.	(60)
Kri bolnikov z melanomom (n=8)	mononuk. celice (n=50.000)	Večje število monocitov in manjše razmerje med številom limfocitov T pomagalk in monocitov v krvi sta povezana s slabšo prognozo in slabšim odzivom na zdravljenje s protitelesi anti-PD1. Večje izražanje gena za S100A9 na monocitih je povezano s slabšo prognozo.	Poleg limfocitne lahko tudi mieloična linija celic vpliva na odziv bolnikov na zdravljenje z anti-PD1 terapijo. Določanje izražanja S100A9 bi lahko služilo kot napovedni biološki označevalec za odziv na zdravljenje z anti-PD1.	(61)
Analiza obstoječih zbirk podatkov	levkociti CD45+ (ND)	Bolniki, ki se na zdravljenje z imunoterapijo niso odzvali, imajo v tumorskem mikrookolju prisotno populacijo makrofagov s povečanim izražanjem genov za GLUT1, PDL1, OXPPOS in genov, značilnih za fenotip M2.	Poglobljena analiza genov vpletenih v metabolizem glukoze, izraženih predvsem na makrofagih v tumorskem mikrookolju, bi lahko vplivala na razvoj novih terapevtskih tarč in izboljšala odziv na zdravljenje melanoma z imunoterapijo.	(62)
Analiza obstoječih zbirk podatkov	levkociti CD45+ (n=16.291)	Bolniki, ki se na terapijo z zaviralci nadzornih točk ne odzivajo, imajo prisotne makrofage s povečanim izražanjem gena za TREM2 in genov, vpletenih v aktivacijo komplementnega sistema, ter večje število limfocitov T gama-delta, ki imajo zmanjšano protitumorsko aktivnost.	Razvoj novega algoritma (ImmuneCells.Sig), s katerim lahko na podlagi analize izražanja genov imunskih celic napovemo odziv bolnikov na imunoterapijo.	(63)
Tkivo kožnega melanoma bolnikov (n=48)	maligne, imunske in stromalne (16.291)	Označevalec IFN gama, prisoten na limfocitih T CD8+ in CD4+, ni uporaben za napoved odziva na zdravljenje s protitelesi anti-PD1 pri bolnikih, ki so bili predhodno že zdravljeni s protitelesi anti-CTLA4. Geni, ki so povezani s spominskimi limfociti T, sposobnimi odpornosti na celično apoptozo, so bolj uporabni za napoved odziva na zdravljenje pri teh bolnikih.	Uvedba imunoterapije lahko bistveno vpliva na tumorsko mikrookolje, predvsem na fenotip limfocitov T, kar lahko bistveno vpliva na napovedno vrednost tumorskih označevalcev.	(66)

Legenda: AXL – tirozinsko-kinazni receptor; BRAF – serin/treonin-protein kinaza B-Raf; CDK – od ciklina odvisna kinaza; CTLA4 – citotoksični T-limfocitni antigen 4; EDNRB – endotelni receptor tipa B; GLUT1 – prenešalec glukoze 1; IFN – interferon; MEK – z mitogenom aktivirana proteinska kinaza; mononuk. – mononuklearne; ND – nedefinirano; OXPPOS – oksidativna fosforilacija; PD1 – programirani protein celične smrti 1; PDL1 – programirani smrtni ligand 1; PMEL – pre-melanosomski protein; RAF – fibrosarkomska kinaza; Ref. – referenca; TCF7 – transkripcijski dejavnik 7; TOX – visokomobilni protein, povezan s selekcijo timocitov; TREM2 – sprožilni receptor, izražen na mieloidnih celicah 2; TYRP1 – s tirozinazo povezan protein 1.

## 4 Vloga tehnologije scRNAseq na drugih področjih znanosti/medicine

Tehnologija scRNAseq se danes že uporablja na področjih raziskav tako pri človeku kot pri živalih in rastlinah. Omogoča bolj točno in hitro prepoznavanje redkih in novih celic v tkivu. S pridobljenimi informacijami o izražanju genov na ravni mRNA in beljakovin ter med-celični komunikaciji in prostorski organizaciji različnih tipov celic v tkivu je mogoče ugotavljati tovrstne razlike

med zdravim in bolezenskim stanjem.

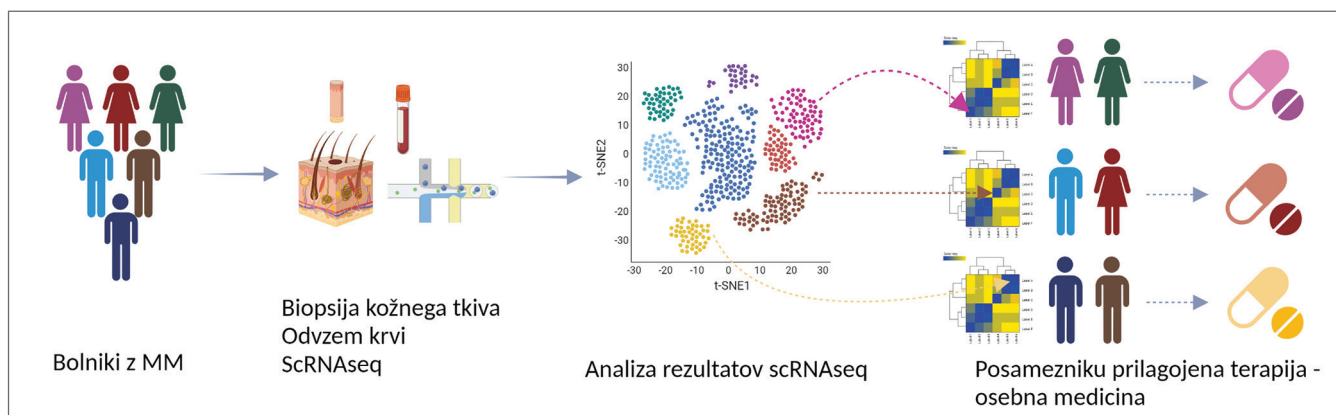
Tako se na področju humane medicine z scRNAseq profilirajo, identificirajo, klasificirajo in odkrivajo novi in redki tipi in podtipi celic v organih in tkivih, npr. v raziskavah biologije raka, razvojne biologije, imunologije, sladkorne bolezni, mikrobiologije (vključno s covidom-19), žilne biologije, nevrobiologije, klinične diagnostike in na številnih drugih področjih. Na nobenem področju pa trenutno tehnologija scRNAseq še ni uvedena v rutinsko klinično prakso (67).

## 5 Vizija tehnologije scRNAseq v prihodnosti

Čeprav je v zadnjih letih uvedba zdravljenja z zaviralci imunskih nadzornih točk bistveno izboljšala napoved izida za bolnike z napredovalim stadijem melanoma, se še vedno veliko bolnikov ne odzove na terapijo ali pa ne dosežejo dolgotrajne remisije. Trenutno pri zdravljenju melanoma ostajata dva glavna izziva: prvi je iskanje novih načinov, terapevtskih tarč in kombinacij zdravljenja, ki bi povečali učinkovitost zaviralcev imunskih nadzornih točk, brez sočasnega povečanja sistemske toksičnosti, drugi izziv pa predstavlja ustrezen način selekcije kandidatnih bolnikov, ki se bodo ustrezno odzvali na imunoterapijo in ne bodo razvili odpornosti. Razlogov za razvoj odpornosti na zdravljenje posamezne ali več različnih vrst terapij je lahko več in se lahko razlikujejo od bolnika do bolnika. Prav zato bo v prihodnosti postala pomembna poglobljena analiza celične sestave melanoma vsakega posameznega bolnika ter vpliv le-te na učinkovitost zdravljenja. Novi podatki, pridobljeni z naprednimi visokozmogljivostnimi tehnologijami z ločljivostjo posamezne celice, so razkrili, da je mehanizem odpornosti na zdravljenje z zaviralci imunskih nadzornih točk zelo kompleksen, da na to poleg prisotnosti in fenotipa izčrpanih limfocitov T CD8+ vpliva tudi mutacija v genu *BRAF*, fenotip malignih melanocitov, prisotnost in fenotip celic mieloidnega izvora, prisotnost fibroblastov različnega fenotipa ter interakcije med vsemi celicami, ki tvorijo tumorsko mikrookolje.

V prihodnosti bo torej vse bolj pomemben osebni pristop zdravljenja, ki bo temeljil na molekularni in celični opredelitvi tumorja in njegovega mikrookolja ter na napovednih bioloških označevalcih (Slika 2). Z razvojem in uporabo tehnologije scRNAseq se bomo lahko cilju osebne medicine zelo približali, saj nam omogoča identificirati posamezne celice in celične označevalce, ki bi lahko napovedali odziv bolnika na zdravljenje in omogoča bolj ciljano odločitev za vrsto zdravljenja, ki bi jo uporabili pri posameznem bolniku ali manjši skupini bolnikov. Na ta način bi se lahko izognili pogosto uporabljenemu principu zdravljenja, ki temelji na "poskusu in napaki (*angl.* trial-and-error)" ter tako bistveno izboljšali učinkovitost zdravljenja.

Tovrsten princip, ki se bolj osredinja na posameznega bolnika in temelji na celični in molekularni opredelitvi tumorja, bi lahko v prihodnosti pomembno vplival tudi na ustreznejše načrtovanje in izbor ustreznih bolnikov za določeno klinično študijo ter tako povečal uspeh kliničnih preskušanj. V prihodnosti lahko pričakujemo nov val razvoja učinkovitejših terapij za zdravljenje melanoma prav zaradi bistvenega napredka v tehnologijah, kot je scRNAseq, s katerimi lahko zelo natančno določimo genomske in transkriptomске značilnosti na tisoče posameznih celic v tumorskem mikrookolju naenkrat. Tako prepoznamo nove možne napovedne označevalce za odziv na zdravljenje in nove terapevtske tarče, ki bi povečale učinkovitost imunoterapije.



**Slika 2:** Uporaba tehnologije sekvenciranja RNK na nivoju posamezne celice (scRNAseq) za razvoj osebne medicine pri bolnikih z melanomom.

Tehnologijo lahko uporabimo tako na tkivnih vzorcih tumorja kot tudi na vzorcih odvzete krvi, da z visoko ločljivostjo določimo fenotip različnih vrst celic (malignih, imunskih, stromalnih) v različnih obdobjih bolezni pri različnih bolnikih na nivoju posamezne celice. Tako lahko natančno opredelimo celično in molekularno sestavo tumorja pri določenem bolniku in določimo zanesljive in specifične biološke označevalce ter molekularne poti, povezane z boleznijo in odpornostjo na zdravljenje. Na podlagi celičnih in molekularnih značilnosti ter bioloških označevalcev bomo lahko bolnike po podobnosti razdelili v posamezne manjše skupine in jim prilagodili zdravljenje, ki bo bolj učinkovito.

Legenda: MM – melanom; scRNAseq – sekvenciranje RNK na nivoju posamezne celice.

Vir: Tadeja Kuret, lasten arhiv.

## 6 Zaključek

Trenutno je uporaba tehnologije scRNAseq v medicini, vključno z obravnavo bolnikov z melanomom, omejena le na znanstveno-raziskovalno delo in še ni uvedena v klinično prakso. Verjamemo, da bo zaradi velike količine celično specifičnih transkriptomskih podatkov in velikega potenciala za odkrivanje novih znanj na osnovi teh podatkov z nadaljnjim tehnoloških razvojem, z razvojem standardnih laboratorijskih in bioinformatičkih delotokov ter z znižanjem cene kmalu omogočen tudi

prenos rezultatov scRNAseq v klinično prakso.

### Izjava o navzkrižju interesov

Avtorji nimamo navzkrižja interesov.

### Zahvala

Članek je nastal ob podpori raziskovalne infrastrukture ELIXIR-SI (<https://elixir-slovenia.org>), ki jo financirajo Evropski sklad za regionalni razvoj, Ministrstvo za izobraževanje, znanost in šport ter Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije.

## Literatura

- International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431(7011):931-45. DOI: [10.1038/nature03001](https://doi.org/10.1038/nature03001) PMID: 15496913
- Hood L, Rowen L. The Human Genome Project: big science transforms biology and medicine. *Genome Med*. 2013;5(9):79. DOI: [10.1186/gm483](https://doi.org/10.1186/gm483) PMID: 24040834
- Preston J, VanZeeland A, Peiffer DA. Innovation at Illumina: The road to the \$600 human genome. San Diego: Illumina; 2023 [cited 2023 Mar 20]. Available from: <https://www.nature.com/articles/d42473-021-00030-9>.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009;10(1):57-63. DOI: [10.1038/nrg2484](https://doi.org/10.1038/nrg2484) PMID: 19015660
- Anchang CG, Xu C, Raimondo MG, Atreya R, Maier A, Schett G, et al. The Potential of OMICs Technologies for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14):7506. DOI: [10.3390/ijms22147506](https://doi.org/10.3390/ijms22147506) PMID: 34299122
- 6Kuksin M, Morel D, Aglave M, Danlos FX, Marabelle A, Zinovyev A, et al. Applications of single-cell and bulk RNA sequencing in onco-immunology. *Eur J Cancer*. 2021;149:193-210. DOI: [10.1016/j.ejca.2021.03.005](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.03.005) PMID: 33866228
- Zhao M, Jiang J, Zhao M, Chang C, Wu H, Lu Q. The Application of Single-Cell RNA Sequencing in Studies of Autoimmune Diseases: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2021;60(1):68-86. DOI: [10.1007/s12016-020-08813-6](https://doi.org/10.1007/s12016-020-08813-6) PMID: 33236283
- Method of the year 2013. *Nat Methods*. 2014;11(1):1. DOI: [10.1038/nmeth.2801](https://doi.org/10.1038/nmeth.2801) PMID: 24524124
- Shaffer SM, Dunagin MC, Torborg SR, Torre EA, Emert B, Krepler C, et al. Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature*. 2017;546(7658):431-5. DOI: [10.1038/nature22794](https://doi.org/10.1038/nature22794) PMID: 28607484
- Picelli S. Single-cell RNA-sequencing: the future of genome biology is now. *RNA Biol*. 2017;14(5):637-50. DOI: [10.1080/15476286.2016.1201618](https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1201618) PMID: 27442339
- Matthews NH, Li WQ, Qureshi AA, Weinstock MA, Cho E. Epidemiology of Melanoma. In: Ward WH, Farma JM, eds. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*. 5th ed. Brisbane: codon Publications; 2017.
- Vukadin S, Khaznadar F, Kizivat T, Vcev A, Smolic M. Molecular Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Melanoma Treatment: an Update. *Biomedicines*. 2021;9(7):835. DOI: [10.3390/biomedicines9070835](https://doi.org/10.3390/biomedicines9070835) PMID: 34356899
- Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*. 2009;6(5):377-82. DOI: [10.1038/nmeth.1315](https://doi.org/10.1038/nmeth.1315) PMID: 19349980
- Liu S, Trapnell C. Single-cell transcriptome sequencing: recent advances and remaining challenges. *F1000 Res*. 2016;5:5. DOI: [10.12688/f1000research.7223.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.7223.1) PMID: 26949524
- Lee J, Hyeon DY, Hwang D. Single-cell multiomics: technologies and data analysis methods. *Exp Mol Med*. 2020;52(9):1428-42. DOI: [10.1038/s12276-020-0420-2](https://doi.org/10.1038/s12276-020-0420-2) PMID: 32929225
- Hedlund E, Deng Q. Single-cell RNA sequencing: technical advancements and biological applications. *Mol Aspects Med*. 2018;59:36-46. DOI: [10.1016/j.mam.2017.07.003](https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.07.003) PMID: 28754496
- Hu P, Zhang W, Xin H, Deng G. Single Cell Isolation and Analysis. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:116. DOI: [10.3389/fcell.2016.00116](https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00116) PMID: 27826548
- Kolodziejczyk AA, Kim JK, Svensson V, Marioni JC, Teichmann SA. The technology and biology of single-cell RNA sequencing. *Mol Cell*. 2015;58(4):610-20. DOI: [10.1016/j.molcel.2015.04.005](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.005) PMID: 26000846
- Prakadan SM, Shalek AK, Weitz DA. Scaling by shrinking: empowering single-cell 'omics' with microfluidic devices. *Nat Rev Genet*. 2017;18(6):345-61. DOI: [10.1038/nrg.2017.15](https://doi.org/10.1038/nrg.2017.15) PMID: 28392571
- Jammes FC, Maerkl SJ. How single-cell immunology is benefiting from microfluidic technologies. *Microsyst Nanoeng*. 2020;6(1):45. DOI: [10.1038/s41378-020-0140-8](https://doi.org/10.1038/s41378-020-0140-8) PMID: 34567657
- Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, Tallapragada N, Veres A, Li V, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell*. 2015;161(5):1187-201. DOI: [10.1016/j.cell.2015.04.044](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.044) PMID: 26000487
- Macosko EZ, Basu A, Satija R, Nemes J, Shekhar K, Goldman M, et al. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell*. 2015;161(5):1202-14. DOI: [10.1016/j.cell.2015.05.002](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.002) PMID: 26000488
- Kuret T, Sodin-Šemrl S, Leskošek B, Ferk P. Single Cell RNA Sequencing in Autoimmune Inflammatory Rheumatic Diseases: Current Applications, Challenges and a Step Toward Precision Medicine. *Front Med (Lausanne)*. 2022;8(8):822804. DOI: [10.3389/fmed.2021.822804](https://doi.org/10.3389/fmed.2021.822804) PMID: 35118101
- Islam S, Zeisel A, Joost S, La Manno G, Zajac P, Kasper M, et al. Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers. *Nat Methods*. 2014;11(2):163-6. DOI: [10.1038/nmeth.2772](https://doi.org/10.1038/nmeth.2772) PMID: 24363023
- Yang J, Liao B, Zhang T, Xu Y. Editorial: Bioinformatics Analysis of Single Cell Sequencing Data and Applications in Precision Medicine. *Front Genet*. 2020;10:1358. DOI: [10.3389/fgene.2019.01358](https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01358) PMID: 32038714
- Chen G, Ning B, Shi T. Single-Cell RNA-Seq Technologies and Related Computational Data Analysis. *Front Genet*. 2019;10:317. DOI: [10.3389/fgene.2019.00317](https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00317) PMID: 31024627

27. Zhang Y, Wang D, Peng M, Tang L, Ouyang J, Xiong F, et al. Single-cell RNA sequencing in cancer research. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021;40(1):81. DOI: [10.1186/s13046-021-01874-1](https://doi.org/10.1186/s13046-021-01874-1) PMID: 33648534
28. Perkel JM. Single-cell sequencing made simple. *Nature.* 2017;547(7661):125-6. DOI: [10.1038/547125a](https://doi.org/10.1038/547125a) PMID: 28682345
29. Villani AC, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science.* 2017;356(6335). DOI: [10.1126/science.aah4573](https://doi.org/10.1126/science.aah4573) PMID: 28428369
30. Jiang M, Xu X, Guo G. Understanding embryonic development at single-cell resolution. *Cell Regen (Lond).* 2021;10(1):10. DOI: [10.1186/s13619-020-00074-0](https://doi.org/10.1186/s13619-020-00074-0) PMID: 33501559
31. Hicks SC, Townes FW, Teng M, Irizarry RA. Missing data and technical variability in single-cell RNA-sequencing experiments. *Biostatistics.* 2018;19(4):562-78. DOI: [10.1093/biostatistics/kxx053](https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxx053) PMID: 29121214
32. Shaham U, Stanton KP, Zhao J, Li H, Raddassi K, Montgomery R, et al. Removal of batch effects using distribution-matching residual networks. *Bioinformatics.* 2017;33(16):2539-46. DOI: [10.1093/bioinformatics/btx196](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx196) PMID: 28419223
33. Girouard SD, Murphy GF. Melanoma stem cells: not rare, but well done. *Lab Invest.* 2011;91(5):647-64. DOI: [10.1038/labinvest.2011.50](https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.50) PMID: 21445060
34. Prunk T, Šalamon Š. Rakaste matične celice: ključ do uspešnejšega zdravljenja malignega melanoma? *Med Razgl.* 2014;53(2):233-44.
35. Maja Primic Žakelj TŽ. Vesna Zadnik. *Epidemiologija malignega melanoma.* *Radiol Oncol.* 2007;41:1-12.
36. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949-54. DOI: [10.1038/nature00766](https://doi.org/10.1038/nature00766) PMID: 12068308
37. Cerkovnik P, Ličar A, Novaković S. Določanje mutacije V600E v genu BRAF. *Onkologija.* 2010;14(2):97-100.
38. Hočevar M, Strojani P, Ocvirk J, Perić B, Blatnik O, Luzar B, et al., eds. *Priporočila za obravnavo bolnikov z melanomom.* Ljubljana: Onkološki inštitut; 2020.
39. Garbe C, Amaral T, Peris K, Hauschild A, Arenberger P, Basset-Seguín N, et al.; European Dermatology Forum (EDF), the European Association of Dermato-Oncology (EADO), and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: Diagnostics: Update 2022. *Eur J Cancer.* 2022;170:236-55. DOI: [10.1016/j.ejca.2022.03.008](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2022.03.008) PMID: 35570085
40. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009;27(36):6199-206. DOI: [10.1200/JCO.2009.23.4799](https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.4799) PMID: 19917835
41. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 2019;381(16):1535-46. DOI: [10.1056/NEJMoa1910836](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910836) PMID: 31562797
42. Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, Karaszewska B, Hauschild A, Levchenko E, et al. Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med.* 2019;381(7):626-36. DOI: [10.1056/NEJMoa1904059](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1904059) PMID: 31166680
43. Karner KB. Imunoterapija in obsevanje pri nemelanomskem kožnem raku in malignem melanomu kože. Ljubljana: Onkološki inštitut; 2021. pp. 27-30.
44. Esfahani K, Roudaia L, Buhlaiga N, Del Rincon SV, Papneja N, Miller WH. A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future. *Curr Oncol.* 2020;27(12):S87-97. DOI: [10.3747/co.27.5223](https://doi.org/10.3747/co.27.5223) PMID: 32368178
45. Carlino MS, Larkin J, Long GV. Immune checkpoint inhibitors in melanoma. *Lancet.* 2021;398(10304):1002-14. DOI: [10.1016/S0140-6736\(21\)01206-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01206-X) PMID: 34509219
46. O'Connell MP, Weeraratna AT. Change is in the air: the hypoxic induction of phenotype switching in melanoma. *J Invest Dermatol.* 2013;133(10):2316-7. DOI: [10.1038/jid.2013.208](https://doi.org/10.1038/jid.2013.208) PMID: 24030649
47. Labani-Motlagh A, Ashja-Mahdavi M, Loskog A. The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses. *Front Immunol.* 2020;11:940. DOI: [10.3389/fimmu.2020.00940](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00940) PMID: 32499786
48. Quek C, Bai X, Long GV, Scolyer RA, Wilmott JS. High-Dimensional Single-Cell Transcriptomics in Melanoma and Cancer Immunotherapy. *Genes (Basel).* 2021;12(10):1629. DOI: [10.3390/genes12101629](https://doi.org/10.3390/genes12101629) PMID: 34681023
49. Konieczkowski DJ, Johannessen CM, Abudayeh O, Kim JW, Cooper ZA, Piris A, et al. A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov.* 2014;4(7):816-27. DOI: [10.1158/2159-8290.CD-13-0424](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0424) PMID: 24771846
50. Müller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, et al. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun.* 2014;5(1):5712. DOI: [10.1038/ncomms6712](https://doi.org/10.1038/ncomms6712) PMID: 25502142
51. Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, Wadsworth MH, Treacy D, Trombetta JJ, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science.* 2016;352(6282):189-96. DOI: [10.1126/science.aad0501](https://doi.org/10.1126/science.aad0501) PMID: 27124452
52. Jerby-Arnon L, Shah P, Cuoco MS, Rodman C, Su MJ, Melms JC, et al. A Cancer Cell Program Promotes T Cell Exclusion and Resistance to Checkpoint Blockade. *Cell.* 2018;175(4):984-997.e24. DOI: [10.1016/j.cell.2018.09.006](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.006) PMID: 30388455
53. van der Leun AM, Thommen DS, Schumacher TN. CD8+ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(4):218-32. DOI: [10.1038/s41568-019-0235-4](https://doi.org/10.1038/s41568-019-0235-4) PMID: 32024970
54. Wang M, Zadeh S, Pizzolla A, Thia K, Gyorki DE, McArthur GA, et al. Characterization of the treatment-naive immune microenvironment in melanoma with BRAF mutation. *J Immunother Cancer.* 2022;10(4):e004095. DOI: [10.1136/jitc-2021-004095](https://doi.org/10.1136/jitc-2021-004095) PMID: 35383113
55. Miller BC, Sen DR, Al Abosy R, Bi K, Virkud YV, LaFleur MW, et al. Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol.* 2019;20(3):326-36. DOI: [10.1038/s41590-019-0312-6](https://doi.org/10.1038/s41590-019-0312-6) PMID: 30778252
56. Deng W, Ma Y, Su Z, Liu Y, Liang P, Huang C, et al. Single-cell RNA-sequencing analyses identify heterogeneity of CD8+ T cell subpopulations and novel therapy targets in melanoma. *Mol Ther Oncolytics.* 2020;20:105-18. DOI: [10.1016/j.omto.2020.12.003](https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.12.003) PMID: 33575475
57. Sade-Feldman M, Yizhak K, Bjorgaard SL, Ray JP, de Boer CG, Jenkins RW, et al. Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. *Cell.* 2018;175(4):998-1013.e20. DOI: [10.1016/j.cell.2018.10.038](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.038) PMID: 30388456
58. Li H, van der Leun AM, Yofe I, Lubling Y, Gelbard-Solodkin D, van Akkooi AC, et al. Dysfunctional CD8 T Cells Form a Proliferative, Dynamically Regulated Compartment within Human Melanoma. *Cell.* 2019;176(4):775-789.e18. DOI: [10.1016/j.cell.2018.11.043](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.043) PMID: 30595452
59. Kim K, Park S, Park SY, Kim G, Park SM, Cho JW, et al. Single-cell transcriptome analysis reveals TOX as a promoting factor for T cell exhaustion and a predictor for anti-PD-1 responses in human cancer. *Genome Med.* 2020;12(1):22. DOI: [10.1186/s13073-020-00722-9](https://doi.org/10.1186/s13073-020-00722-9) PMID: 32111241
60. Li C, Phoon YP, Karlinsky K, Tian YF, Thapaliya S, Thongkum A, et al. A high OXPPOS CD8 T cell subset is predictive of immunotherapy resistance in melanoma patients. *J Exp Med.* 2022;219(1):e20202084. DOI: [10.1084/jem.20202084](https://doi.org/10.1084/jem.20202084) PMID: 34807232
61. Rad Pour S, Pico de Coaña Y, Demorentin XM, Melief J, Thimma M, Wolodarski M, et al. Predicting anti-PD-1 responders in malignant melanoma from the frequency of S100A9+ monocytes in the blood. *J Immunother Cancer.* 2021;9(5):e002171. DOI: [10.1136/jitc-2020-002171](https://doi.org/10.1136/jitc-2020-002171) PMID: 33963011

62. Choi H, Na KJ. Different Glucose Metabolic Features According to Cancer and Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Front Oncol.* 2021;11:769393. DOI: [10.3389/fonc.2021.769393](https://doi.org/10.3389/fonc.2021.769393) PMID: 34966676
63. Xiong D, Wang Y, You M. A gene expression signature of TREM2hi macrophages and  $\gamma\delta$  T cells predicts immunotherapy response. *Nat Commun.* 2020;11(1):5084. DOI: [10.1038/s41467-020-18546-x](https://doi.org/10.1038/s41467-020-18546-x) PMID: 33033253
64. McKean WB, Moser JC, Rimm D, Hu-Lieskovan S. Biomarkers in precision cancer immunotherapy: promise and challenges. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2020;40(40):e275-91. DOI: [10.1200/EDBK\\_280571](https://doi.org/10.1200/EDBK_280571) PMID: 32453632
65. Jiang P, Gu S, Pan D, Fu J, Sahu A, Hu X, et al. Signatures of T cell dysfunction and exclusion predict cancer immunotherapy response. *Nat Med.* 2018;24(10):1550-8. DOI: [10.1038/s41591-018-0136-1](https://doi.org/10.1038/s41591-018-0136-1) PMID: 30127393
66. Vanmeerbeek I, Borrás DM, Sprooten J, Bechter O, Tejpar S, Garg AD. Early memory differentiation and cell death resistance in T cells predicts melanoma response to sequential anti-CTLA4 and anti-PD1 immunotherapy. *Genes Immun.* 2021;22:108-19. DOI: [10.1038/s41435-022-00189-1](https://doi.org/10.1038/s41435-022-00189-1) PMID: 36456662
67. Jovic D, Liang X, Zeng H, Lin L, Xu F, Luo Y. Single-cell RNA sequencing technologies and applications: A brief overview. *Clin Transl Med.* 2022;12(3):e694. DOI: [10.1002/ctm2.694](https://doi.org/10.1002/ctm2.694) PMID: 35352511