



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Андра В. Јевтовић

**Ефекти системске апликације IL-33 на  
прогресију мишјег меланома**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2023



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Andra V. Jevtovic

**Effects of systemic IL-33 treatment on the  
progression of murine melanoma**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2023

## Идентификациона страница докторске дисертације

<b>Аутор</b>	
Име и презиме: Андра Јевтовић	
Датум и место рођења: 07.12.1986. Крагујевац	
Садашње запослење: Клиника за Оториноларингологију, Универзитетски клинички центар Крагујевац; Катедра за Оториноларингологију, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу	
<b>Докторска дисертација</b>	
Наслов: Ефекти системске апликације PL-33 на прогресију мишјег меланома	
Број страница: 119	
Број слика: 15 слика, 33 графикана, 1 табела	
Број библиографских података: 544	
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу	
Научна област (УДК): Медицина	
Ментор: <b>Проф. др Гордана Радосављевић</b> , редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија	
<b>Оцена и одбрана</b>	
Датум пријаве теме: 22.07.2019.	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-989/17, 12.12.2019.	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњеност услова кандидата: 1. <b>Проф. др Небојша Арсенијевић</b> , редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник; 2. <b>Проф. др Данило Војводић</b> , редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан; 3. <b>Проф. др Иван Јовановић</b> , редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан.	
Комисија за оцену и одбране докторске дисертације: 1. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 2. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 3. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 4. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 5. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета	
Датум одбране дисертације:	

## Doctoral Dissertation identification page

<b>Author</b>
Name and surname: Andra Jevtovic
Date and place of birth: 07.12.1986. Kragujevac
Current employment: University Clinical Center Kragujevac, Clinics of Otorhinolaryngology; University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, Department of Otorhinolaryngology
<b>Doctoral Dissertation</b>
Title: Effects of systemic IL-33 treatment on the progression of murine melanoma
No. of pages: 199
No. of images: 15 pictures, 33 charts, 1 table
No. of bibliographic data: 544
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
<b>Mentor: Prof. Dr. Gordana Radosavljevic</b> , Full professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Microbiology and immunology
<b>Grade and Dissertation Defense</b>
Topic Application Date: 22.07.2019.
Decision number and date of acceptance of the doctoral: IV-03-989/17, 12.12.2019.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: 1. <b>Prof. Dr. Nebojsa Arsenijevic</b> , Full professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific fields of Microbiology and immunology and Oncology, President; 2. <b>Prof. Dr. Danilo Vojvodic</b> , Full professor at the Institute for Medical Research, Military Medical Academy, University of Defence Belgrade for the narrow scientific field of Immunology, Member; 3. <b>Prof. Dr. Ivan Jovanovic</b> , Full professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific fields of Microbiology and immunology and Oncology, Member.
Commission for evaluation and defense of doctoral: 1. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university 2. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university 3. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university 4. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university 5. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university
Date of Dissertation Defense:

## **Захвалница**

*Пре свега, захваљујем се свом ментору Проф. др Гордани Радосављевић на неизмерној помоћи и подршци, пренетом знању, стрпљењу и времену које је поделила са мном у свим фазама израде ове докторске дисертације.*

*Велику захвалност дугујем Проф. др Небојши Арсенијевићу на указаном поверењу, свакој пруженој прилици, несебичној помоћи и саветима који су ми помогли у изради докторске дисертације.*

*Посебна захвалност припада целокупном колективу Катедре за имунологију, инфекцију и инфламацију и свима из Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија.*

*На крају, неизмерну захвалност дугујем својој породици и пријатељима на несебичној подршци, разумевању и великом стрпљењу.*

*Докторску дисертацију посвећујем  
особама које су ме уз многа  
одрицања извеле на прави пут.*

*Својим родитељима,  
мајци Гојци и оцу Владану.*

## САЖЕТАК

Меланом је један од најагресивнијих тумора који карактеришу повећан инвазивни и метастатски потенцијал, као и стицање резистенције на терапеутике. IL-33 је члан фамилије IL-1 који регулише урођени и стечени имунски одговор. Улога IL-33 у тумору је комплексна и није у потпуности разјашњена.

Циљ студије је да се испитају ефекти системске апликације IL-33 на прогресију мишјег меланома, као и на модулацију антитуморског имунског одговора.

Мишевима чистог соја C57BL/6 је субкутаном апликацијом ћелија B16-F1 и B16-F10 варијетета мишјег меланома трансплантиран примарни меланом, док су им експерименталне метастазе индуковане после интравенске апликације ћелија. Након различитих модалитета апликације мишјег рекомбинантног IL-33, испитиван је ефекат IL-33 на раст и метастазирање меланома. Анализиран је утицај IL-33 на модулацију имунског одговора у метастаском ткиву плућа.

IL-33 супримира раст примарног меланома и са већим (B16-F10) и са мањим метастатским потенцијалом (B16-F1), док с друге стране стимулише хематогено метастазирање B16-F1 варијетета меланома у плућа. Прометастатска активност IL-33 се огледа у томе што редукује цитотоксички капацитет и фаворизује имуносупресивни фенотип CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у метастатском ткиву плућа. Забележена је повећана акумулација мијелоидних супресорских ћелија, као и регулаторних Т лимфоцита. Прометастатски ефекат IL-33 додатно је потврђен и налазом повећане концентрације IL-33 у серуму оболелих од меланома са детектованим регионалним метастазама.

Добијени налаз указује да упркос супресивном деловању на раст примарног меланома, IL-33 подстиче раст хематогених метастаза и то тако што смањује ефикасност стеченог антитуморског имунског одговора. Прометастатски ефекат IL-33 у мишјем меланому доводи у питање његову евентуалну терапијску примену.

**Кључне речи:** Меланом, IL-33, метастазирање, CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити

## **ABSTRACT**

Melanoma is one of the most aggressive tumors, characterized by high invasiveness, metastatic potential and resistance to therapeutics. IL-33 is member of IL-1 cytokine family that regulates both innate and acquired immune response. The role of IL-33 in tumor progression is complex and not fully understood.

The aim of the study is to evaluate effects of systemic IL-33 application on murine melanoma progression, as well as the effects of IL-33 on modulation of antitumor immune response.

For the assessment of tumor growth, wild-type C57BL/6 mice were injected subcutaneously with B16-F1 or B16-F10 cells, whilst for experimental metastasis assays, malignant cells were injected intravenously. Using different modalities of IL-33 application, effects of the mouse recombinant IL-33 on growth and melanoma metastasis were evaluated. Effects of IL-33 on antitumor immune response in metastatic lungs were analyzed.

IL-33 restricted primary tumor growth of both high metastatic (B16-F10) and low metastatic (B16-F1) variant, while on the opposite promoted growth of the B16-F1 melanoma metastasis in the lungs. Prometastatic IL-33 activity is reflected in significant reduction of CD8<sup>+</sup> T cells cytotoxicity and promotion of CD8<sup>+</sup> T cell immunosuppressive phenotype. There was a significant accumulation of myeloid suppressor cells and regulatory T cells in the metastatic lung. The significance of IL-33 for melanoma metastases was also documented in a significantly increased level of serum IL-33 melanoma patients with regional metastases.

These findings implicate that, despite restrictive effects on primary melanoma, IL-33 promotes growth of hematogenous melanoma metastasis in mice by modulation of acquired immune response, thus questioning its usage in therapy of human advanced melanoma.

Keywords: Melanoma, IL-33, metastasis, CD8<sup>+</sup> T cells

## САДРЖАЈ

<b>1. Увод.....</b>	<b>1</b>
1.1. Прогресија меланома .....	1
1.1.1. Сингени трансплантациони модели за испитивање прогресије меланома.....	7
1.2. Имунотерапија тумора.....	9
1.2.1. Имунски одговор против меланома.....	9
1.2.2. Антигени малигних меланоцита и механизми избегавања имунског одговора у меланому.....	12
1.2.3. Имунотерапија меланома .....	18
1.3. Јанус лице IL-33 у туморима – од генезе до терапије.....	20
1.3.1. Опште карактеристике IL-33 .....	20
1.3.2. Улога IL-33 у биологији и терапији тумора.....	24
<b>2. Циљ рада .....</b>	<b>28</b>
<b>3. Материјал и методе.....</b>	<b>29</b>
3.1. Лабораторијске животиње.....	29
3.2. Линије ћелија мишјег меланома .....	29
3.3. Модел трансплантације примарног меланома .....	29
3.4. Модел експерименталних метастаза .....	30
3.5. Апликација мишјег рекомбинантног IL-33 .....	30
3.6. Патохистолошка верификација присуства метастаза.....	30
3.7. Имунохистохемијска анализа експресије IL-33 и ST2 у лезијама примарног меланома и метастаза.....	31
3.8. Изолација леукоцита из плућа .....	32
3.9. Анализа фенотипских и функционалних карактеристика леукоцита проточном цитометријом.....	32
3.10. Магнетна сепарација CD8 <sup>+</sup> Т лимфоцита из плућа.....	33
3.11. Испитивање цитотоксичког капацитета CD8 <sup>+</sup> Т лимфоцита.....	34
3.12. Метод Real-time PCR за квантификацију експресије гена .....	34
3.13. Мерење концентрације IL-33 у серуму пацијената са меланомом.....	36
3.14. Статистичка обрада података.....	36
<b>4. Резултати.....</b>	<b>37</b>
4.1. IL-33 ефикасно инхибира раст мишјег варијетета меланома, и са мањим и са већим метастатским потенцијалом .....	37
4.2. IL-33 индукује експанзиван раст плућних метастаза B16-F1 варијетета меланома са слабијим метастатским потенцијалом.....	39
4.3. Мишеви којима је интраперитонеално апликован IL-33 имају повећану експресију рецептора ST2 у метастатском ткиву, док у примарном тумору повећано исказују IL-33 .....	44



4.4. Концентрација IL-33 је повећана у серуму оболелих у узнапредованом стадијуму меланома .....	47
4.5. IL-33 повећава заступљеност еозинофила и антитуморских NK ћелија у плућима.....	48
4.6. IL-33 смањује удео, а не утиче на активацини статус дендритских ћелија после интравенског убризгавања малигних меланоцита .....	54
4.7. IL-33 слаби туморицидну активност цитотоксичких CD8 <sup>+</sup> Т лимфоцита током формирања хематогених метастаза меланома.....	56
4.7а. IL-33 не мења процентуални удео али снижава туморицидни капацитет CD8 <sup>+</sup> Т лимфоцита .....	56
4.7б. IL-33 повећава заступљеност инхибиционих рецептора на цитотоксичким CD8 <sup>+</sup> Т лимфоцитима .....	59
4.7в. IL-33 редукује имуногеност малигних меланоцита B16-F1 .....	62
4.8. IL-33 креира имуносупресивну микросредину у метастатском ткиву плућа .....	62
<b>5. Дискусија .....</b>	<b>66</b>
5.1. Амбивалентна улога IL-33 у мишћем меланому у зависности од стадијума и метастатског капацитета тумора.....	66
5.2. Евалуација експресије IL-33 и рецептора ST2 у меланому.....	68
5.2.1. Интраперитонеална примена IL-33 повећава експресију рецептора ST2 у метастатским лезијама мишева, док у примарном тумору индукује повећану експресију IL-33 .....	68
5.2.2. Повећана концентрација IL-33 је детектована у серуму пацијената у узнапредованом стадијуму меланома .....	70
5.3. Имуномодулаторни ефекти IL-33 у одбрани од метастатског меланома.....	71
5.3.1. IL-33 активира ефекторске механизме антитуморске урођене имуности .....	71
5.3.2. IL-33 смањује туморицидну активност цитотоксичких CD8 <sup>+</sup> Т лимфоцита и на тај начин "пригушује" антитуморску стечену имуност .....	73
5.4. IL-33 креира имуносупресивно микроокружење у плућима .....	77
<b>6. Закључак.....</b>	<b>81</b>
<b>7. Скраћенице.....</b>	<b>83</b>
<b>8. Литература.....</b>	<b>86</b>

# 1. УВОД

## 1.1. Прогресија меланома

Меланом је најагресивнија форма тумора коже коју карактеришу брз раст и рана дисеминација метастатских ћелија (1,2). Ова врста тумора води порекло од малигно трансформисаних меланоцита локализованих у епидерму, слузницама или у ткиву увеа ока (3). Као што важи за све туморе, генеза меланома је сложен процес у коме меланоцити подлежу опсежним променама чији коначан исход су непланска пролиферација и имортализација меланоцита, избегавање имунског надзора и на крају дисеминација у удаљена ткива и успостављање метастаза. Све наведене промене су резултат акумулације мутираних гена који контролишу пролиферацију и преживљавање ћелија, интеракције са суседним ћелијама, као и способност туморских ћелија да избегну одбрамбене механизме имунског система. Финални исход генских мутација је настанак меланома при чему су малигни меланоцити условно речено "одметници" јер се не придржавају правила која контролишу нормалан раст и понашање ћелија (4,5). Подаци из литературе сугеришу на то да је меланом комплексан тумор кога одликују изражена хетерогеност како на ћелијском тако и на молекулском нивоу (6,7).

Генске мутације су "камен темељац" меланома, што је такође одлика свих врста тумора. Поред генских промена, важни фактори ризика за развој меланома су ултраљубичасто (енгл. *Ultraviolet, UV*) зрачење, генетска предиспозиција, број и локализација урођених и стечених меланоцитних младежа, као и неке од фенотипских карактеристика, а то су дијаметар лезије преко 5mm, ирегуларне или слабо дефинисане границе, неправилна дистрибуција пигментације и околно црвенило (8,9). Почетни корак у генези меланома је иницијација тумора и резултат је генских мутација које се дешавају унутар меланоцита. Дуготрајно излагање UV зрацима може да изазове иреверзибилну дисрегулацију "мастер гена" генетског програма за меланом, а то су онкогени *BRAF* (енгл. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma B-type*) и *NRAS* (енгл. *Neuroblastoma RAS*) с једне стране, а с друге антионкогена као што су *NF1* (енгл. *Neurofibromin 1*), *TERT* (енгл. *Telomerase Reverse Transcriptase*), *CDKN2A* (енгл. *cyclin dependent kinase inhibitor 2A*), *p53* и *PTEN* (енгл. *Phosphatase and Tensin homolog*), укључених у регулацију пролиферације и ћелијског преживљавања (2,3,10,11). Мутације ових циљаних гена за последицу има аберантну активацију два главна сигнална пута у меланому, MAPK (енгл. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) и PI3K/Akt (енгл. *Phosphatidylinositol 3-Kinase/protein kinase B*) (2,12). Наиме, сигнални пут MAPK регулише пролиферацију, диференцијацију и преживљавање меланоцита, док сигнални пут PI3K/AKT је укључен у одржавање ћелијске хомеостазе (13,14).

Главни узрок аберантне активације MAPK сигналног пута у меланому је мутација онкогена *BRAF* (11). Оваква мутација *BRAF* најчешће за последицу има замену валина са глутаминском киселином на позицији 600 (*BRAF<sup>V600E</sup>*) (3,15). Конститутивна експресија онкопротеина B-Raf узрокује непрекидну активацију сигналног пута MAPK што све заједно спречава апоптозу и подстиче пролиферацију и преживљавање ћелија (3,15). Везивање лиганда за мембрански рецептор са тирозин киназном активношћу резултује активацијом G протеина породице RAS молекула, међу којима је NRAS најважнија изоформа што даље узрокује фосфорилацију Raf протеина као што је онкопротеин B-Raf (16). Пролонгирана активација протеина NRAS, осим сигналног пута MAPK, резултује и аберантном активацијом сигналне каскаде која укључује PI3K/Akt (2). *NF1* је антионкоген или тумор-супресорски ген који конвертује

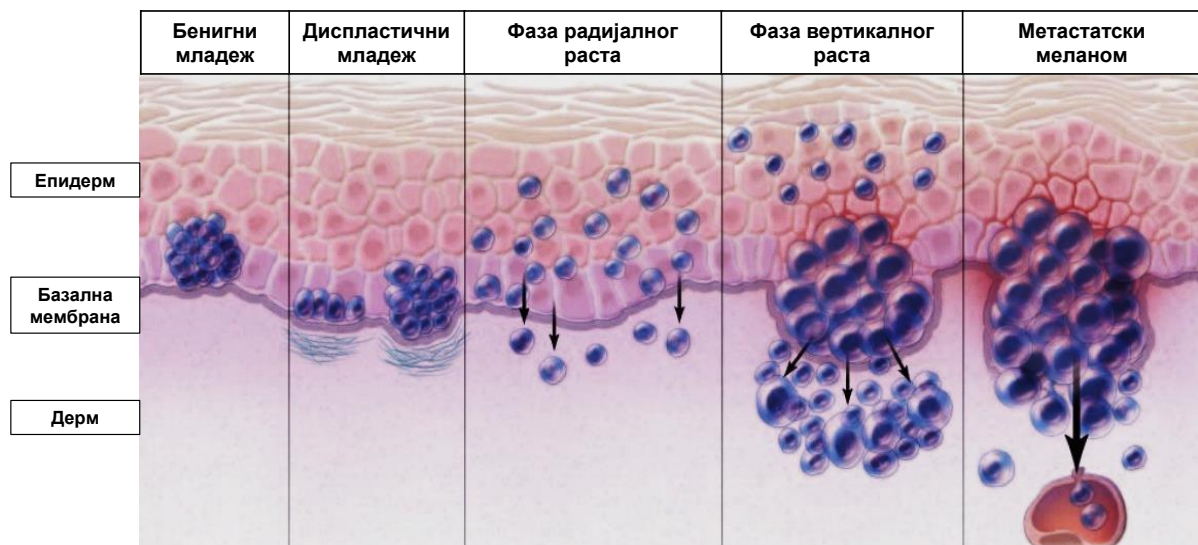
активну форму протеина RAS-GTP (енгл. *RAS-Guanosine Triphosphate*) у инактивну форму RAS-GDP (енгл. *RAS-Guanosine Diphosphate*) и на тај начин инхибира пут који укључује RAS сигналне молекуле (17). Губитак функције гена *NF1* за последицу има непрекидну активацију NRAS протеина и последично сигналних путева MAPK и PI3K/AKT (2,17).

Мутације теломеразе TERT заједно са алтерацијама *CDKN2A* доприносе пролиферацији малигнух меланоцита (18). Ген *CDKN2A* на хромозому 9p21 се састоји од четири егзона који кодирају два различита антионкогена,  $p16^{\text{INK4A}}$  (енгл. *p16 inhibitor of cyclin-dependent kinase 4A*) и  $p14^{\text{ARF}}$  (енгл. *p14 alternate reading frame*) (19). Главна тумор-супресорска активност  $p16^{\text{INK4A}}$  подразумева инхибицију циклин-зависних киназа (енгл. *Cyclin-Dependent Kinases, CDKs*)- 4 и 6 што протеин Rb (енгл. *Retinoblastoma*) одржава у хипофосфорилисаном стању и последично спречава улазак меланоцита у S фазу ћелијског циклуса (20). Као позитивни регулатор протеина p53,  $p14^{\text{ARF}}$  игра важну улогу у репарацији молекула DNK, регулацији ћелијског циклуса и апоптози (20). Мутација генског локуса *CDKN2A* може да инактивира један или оба антионкогена што за последицу има ћелијску имортализацију која представља важну карику у малигнуј трансформацији меланоцита (20). Мутације генског локуса *CDK4* на хромозому 12q14 примарно индукују поремећај на нивоу G1 фазе ћелијског циклуса (21). Мутацијом *CDK4* овај ензим губи способност везивања за  $p16^{\text{INK4A}}$  и тиме постаје доминантан онкопротеин (21). Тумор-супресорски ген *PTEN* игра важну улогу у контроли ћелијског циклуса (2). Тако, мутација гена *PTEN* која је често удружена са мутацијама *B-Raf* онкогена резултује активацијом оба сигнална пута MAPK и PI3K/AKT укључених у бројне ћелијске процесе (22,23).

Након иницијације, следеће етапе у онкогенези су промоција и прогресија меланома. Промоција тумора обухвата селективну клонску експанзију иницијално малигну измењених ћелија. С обзиром да је стопа акумулације мутација пропорционална стопи ћелијске деобе, клонском експанзијом иницијално генетски измењених ћелија ствара се све већа популација ћелија која је у опасности од додатних генских оштећења (24,25). Прогресија тумора резултат је додатно стечених генетских и епигенетских модификација којима тумор постаје агресивнији у смислу да, осим што рапидно расте, повећава инвазивни и метастатски потенцијал, као и да ефикасније избегава па чак и користи имунски систем у своје сврхе (26).

Према *Clark*-овом моделу настанак и прогресија меланома који су утемељени на генским мутацијама одвијају се постепено, а главни кораци су: малигна трансформација меланоцита у бенигне меланицитне младеже, развој диспластичног младежа, затим следе фазе радијалног и вертикалног раста примарног меланома и на крају дисеминација метастатских меланоцита и успостављање метастатских колонија у удаљена места (Слика 1) (27). Према овом моделу, прва хистопатолошка промена је појава бенигног младежа (27). Иако је у овој фази контрола раста меланоцита поремећена, младеж ретко прогредира у меланом због делимично ограничене активације сигналних путева у ћелији (28,29). Наиме, пролиферација меланоцита стимулирана је мутацијама онкогена *BRAF* и *NRAS* што последично резултује повећаном активацијом сигналних путева MAPK и PI3K/AKT (28). Следећи корак у развоју меланома је диспластични младеж који представља премалигну лезију и развија се на терену претходно формираног бенигног младежа или *de novo* (27,28). Молекулске промене које се дешавају у овој фази утичу на ћелијску пролиферацију, апоптозу и репарацију молекула DNK, а последица су мутација у генском локусу у коме се налазе *CDKN2A* и *PTEN* (28). У студији која је заснована на моделу мишијег меланома показано је да појединачне мутације *CDKN2A* и *PTEN* саме по себи нису довољне за малигну

алтерацију меланоцита, већ једино када су истовремено присутне или удржене са другим генским мутацијама (30). Рани стадијум примарног меланома означен је као фаза радијалног раста у којој малигни меланоцити пролиферишу интрадермално, док базалну мембрану само појединачно пробијају туморске ћелије (27,31). Ову фазу радијалног раста карактеришу појачана експресија CDK4 и циклина D1, као и инактивација p53 молекула (28). Такође, мутација гена *PTEN* у овој фази индукује појачану активацију протеин киназе Akt са последичном инактивацијом протеина Bad (енгл. *Bcl-2 associated agonist of cell death*) и стимулацијом експресије циклина D1, што све скупа нарушава контролу пролиферације и преживљавања ћелије (28,32). У фази вертикалног раста, малигни меланоцити попримају карактеристике инвазивних туморских ћелија које не само да пробијају базалну мембрану већ учествују и у формирању интрадермалних нодуларних структура (Слика 1) (27).



Слика 1. *Clark*-ов модел настанка и прогресије меланома (преузето и кориговано према: *Miller AJ et al. N Engl J Med 2006;355(1):51-65*).

Инвазија и дисеминација меланома условљени су поремећајима на нивоу ћелијске адхезије (33). Добро је познато да су кадхерини мултифункционални трансмембрански протеини који се својим екстрацелуларним доменом међусобно везују на суседним ћелијама што омогућује формирање међућелијских веза, док цитоплазматским регионом интерагују са актинским цитоскелетом и на тај начин учествују у унутарћелијској сигнализацији (33). Конверзија радијалног у вертикални раст примарног меланома је резултат промене у експресији кадхерина, односно смањене експресије Е-кадхерина на површини меланоцита и кератиноцита, и истовремено појачане експресије N-кадхерина на ендотелним ћелијама и фибробластима у дермису (34,35,36). Осим промене у ћелијској адхезији, овакав образац експресије кадхерина подстиче и преживљавање меланоцита помоћу сигналног пута  $\beta$ -catenin-a (37). Појачана експресија  $\beta$ -catenin-a стимулише експресију молекула циклина D1 и MITF-a (енгл. *Microphthalmia Associated Transcription Factor*), што подстиче преживљавање и пролиферацију меланоцита (38,39). Наиме, MITF игра важну улогу у развоју и диференцијацији меланоцита, а такође стимулише ћелијско преживљавање и то тако што подстиче експресију антиапоптог молекула Bcl-2 (енгл. *B-cell lymphoma-2*) (40,41). Поред наведеног, транзицију из радијалног у вертикални раст меланома карактерише и појачана експресија интегринa  $\alpha$ v $\beta$ 3 (42). Оваква експресија интегринa  $\alpha$ v $\beta$ 3 индукује повећану продукцију матриксне металопроотеиназе (енгл. *Matrix Metalloproteinase, MMP*) 2 и антиапоптог молекула Bcl-2, као и повећан мотилитет меланоцита и то реорганизацијом ћелијског

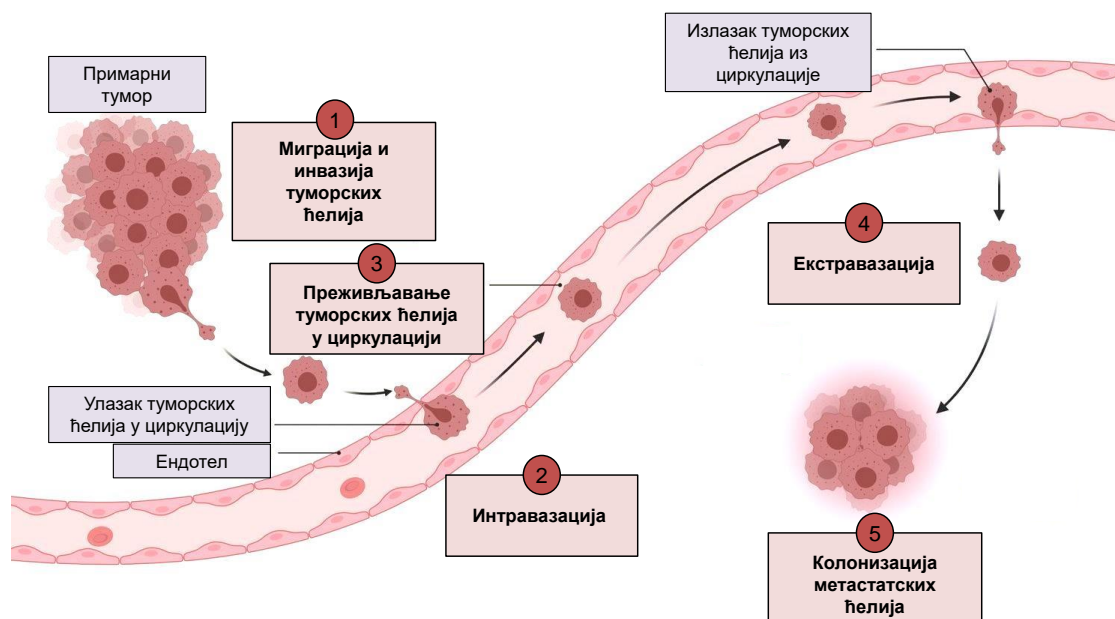
цитоскелета, што све заједно доприноси повећаном инвазивном и метастатском потенцијалу меланоцита (43,44,45).

За повећан инвазивни потенцијал малигнух меланоцита одговорна је и појачана експресија адхезивног молекула МСАМ (енгл. *Melanoma Cell Adhesion Molecule*) и то тако што олакшава интеракцију туморских са ендотелним ћелијама (46). Интегрини, као хетеродимерни молекули састављени од  $\alpha$  и  $\beta$  субјединице, играју важну улогу у везивању ћелија за екстрацелуларни матрикс, у ћелијској пролиферацији, миграцији и преживљавању (47,48). Тако, измене у хетеродимерном саставу интегрин доприносе како инвазивности и метастазирању малигнух ћелија тако и инхибицији апоптозе (49,50). Док су  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  и  $\alpha 5$  субјединице заједно са субјединицом  $\beta 1$  повећано експримиране у малигну трансформисаним меланоцитима, регистровано је да је субјединица интегрин  $\beta 3$  исказана при преласку меланома из фазе радијалног у фазу вертикалног раста (49). Осим интегрин, у миграцији, инвазији и преживљавању туморских ћелија важно место заузима и трансмембрански молекул МСРР (енгл. *Melanoma Chondroitin Sulfate Proteoglycan*) који је повећано експримиран након малигне трансформације меланоцита (51,52). Повећана инвазивност меланома повезана је и са повећаном продукцијом различитих фактора раста укључујући HGF (енгл. *Hepatocyte Growth Factor*), TGF- $\beta$  (енгл. *Transforming Growth Factor- $\beta$* ) и FGF (енгл. *Fibroblast Growth Factor*) (53).

Метастазирање је финални корак прогресије тумора укључујући меланом. Меланом је агресивна форма малигног тумора коју карактеришу брза системска дисеминација и формирање удаљених метастаза (54). И поред напретка у разумевању механизма меланогенезе и прогресије, нису постигнути задовољавајући резултати у преживљавању пацијената са метастазама (54). Иако је метастазирање у великој мери неефикасан процес јер само мали број туморских ћелија успева да комплетира метастатску каскаду, ипак код >90% оболелих од тумора главни разлог смртог исхода су метастазе. Формирање метастаза је резултат низа догађаја који омогућују туморским ћелијама да "побегну" из примарне лезије, да преживе у лимфним или крвним судовима, напусте системску циркулацију и да на крају наставе раст на удаљеним местима (55).

Током метастатске каскаде (Слика 2) малигни меланоцити користе све физиолошке ћелијске процесе који играју важну улогу у ембриогенези и хомеостазу (56). У примарном меланому, да би избегле неповољне услове (нпр. хипоксију, ацидозу...) туморске ћелије покрећу програм неоангиогенезе и лимфангиогенезе. Наиме, туморске ћелије и ћелије строге активно луче факторе раста васкуларног ендотела (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), пре свега VEGF-A и VEGF-C, којима подстичу реорганизацију и пролиферацију ендотелних ћелија и тако стимулишу формирање нових из већ постојећих крвних и лимфних судова што следствено олакшава и улазак метастатских меланоцита у циркулацију и њихову дисеминацију (57,58). Истовремено, туморске ћелије са инвазивним фенотипом стичу покретљивост позивајући програм транзиције епителних ћелија у мезенхим (од енгл. *Epithelial-Mesenchymal Transition*, ЕМТ). Овај програм је есенцијални ембрионални процес који обезбеђује ћелијски мотилитет, а базира се на реверзибилном репрограмирању поларизованих епителних ћелија у мезенхимске ћелије и условљен је изменама у експресији адхезивних молекула (59,60,61). Метастатске ћелије интравазацијом улазе у крвне и лимфне судове којима се затим дисеминују и стижу до удаљених анатомских локализација, а онда их напуштају процесом екстравазације. Када населе удаљене органе метастатске ћелије губе мотилитет и уколико на "новом месту" постоје повољни услови поново стичу способност да пролиферишу

формирајући тако макрометастазе (Слика 2) (62). Неки аутори сугеришу на алтернативне механизме метастазирања меланома. Наиме, метастатски меланоцити имају способност да пријањају уз спољашњи слој дуж крвних судова, али без интраваскуларног продора што представља екстраваскуларно миграторно метастазирање (енгл. *Extravascular Migratory Metastasis*, EVMM) (63). Током EVMM, региструју се ангиотропне туморске ћелије које се хистолошки дефинишу као ћелије меланома које чврсто адхерирају за васкуларни ендотел на локацији перицита. Ангиотропизам подстиче "перицитну мимикрију" односно замену перицита овим ангиотропним туморским ћелијама. Сматра се да ангиотропизам представља прогностички фактор који указује на ризик за развој метастаза код меланома људи, а служи и као маркер EVMM (63). *Landsberg* и сарадници спекулишу да ангиотропизам и перицитна мимикрија ћелија меланома представљају облик пластичности туморских ћелија и овакав програм екстраваскуларне миграције и инвазије аналоган је програмима који се јављају током миграције ћелија нервног гребена у процесу ембриогенезе (64). Меланом карактерише и феномен васкуларна мимикрија који подразумева дедиференцијацију туморских ћелија у ћелије које личе на ендотелне ћелије и њихово организовање у микроваскуларне канале. На тај начин туморске ћелије активно учествују у формирању мреже судова која, осим што обезбеђује снабдевање крвљу, додатно повећава могућност метастазирања тумора (65). Бројне студије су показале да су инвазивни и метастатски потенцијал малигних меланоцита повезани са реактивацијом односно позивањем програма миграције меланобластних прекурсора (66,67).



**Слика 2. Метастатска каскада** (преузето и кориговано према: *Drapela S et al. Curr Opin Syst Biol 2021;28:100381*).

Када доспеју у циркулацију, метастатске ћелије се сусрећу са следећим изазовима, а то су турбулентни ток крви и одбрамбени механизми имунског система (68). Моноцити, макрофаги и NK ћелије су важна компонента одбране који детектују и уклањају метастатске ћелије из циркулације (69). Ове ћелије имунског система детектују малигне меланоците тако што на њима препознају PEDF (енгл. *Pigment Epithelium-Derived Factor*), а онда их следствено уклањају из циркулације (69). Међутим, неки метастатски меланоцити да би избегли ове имунске механизме успевају да смање експресију PEDF (70). Уз то, туморске ћелије могу да формирају комплексе са тромбоцитима и тако постају заштићене од ћелија имунског система,

првенствено од NK ћелија (71). Молекули као што су тромбин, P-селектин, лизофосфатидна киселина и PAR-1 (енгл. *Protease-Activated Thrombin Receptor-1*) подстичу агрегацију туморских ћелија са тромбоцитима и следствено формирање емболуса што олакшава преживљавање метастатских ћелија у циркулацији (72,73).

Циркулишуће туморске ћелије које су успеле да преживе све претходно наведене препреке, екстравазацијом напуштају системску циркулацију и улазе у паренхим удаљених органа (74). Приликом напуштања циркулације туморске ћелије "имитирају" леукоците (74,75) тако што користе исте обрасце експресије адхезивних молекула односно исте селектине и интегрине као и леукоцити (75,76). Екстравазација започиње адхезијом туморских ћелија за ендотел у циљаним органима. Неутрофили такође олакшавају адхезију и екстравазацију туморских ћелија и то тако што се адхезивни молекули ICAM-1 (енгл. *Intercellular Adhesion Molecule-1*) исказан на малигним меланоцитима везује за LFA-1 (енгл. *Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*) и интегрин  $\beta_2$  на површини неутрофила и оваква интеракција је под утицајем цитокина IL-8 (77,78). Додатно, малигни меланоцити са израженим метастатским потенцијалом експримирају интегрине,  $\alpha_v\beta_3$  и  $\alpha_4\beta_1$  (79). Интегрин  $\alpha_4\beta_1$  омогућава везивање туморских ћелија за ендотел помоћу лиганда VCAM-1 (енгл. *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) (79). Уз наведено, продукција матриксних металопротеиназа је важна у деградацији колагена екстрацелуларног матрикса и омогућује насељавање метастатских ћелија у паренхим циљаних органа (80). Наиме, малигни меланоцити са већим метастатским потенцијалом разграђују екстрацелуларни матрикс тако што продукују ламинин-5 и матриксне металопротеиназе -1, -2, -9 и -14 (81). Туморске ћелије меланома карактерише и повећана експресија катепсина који поред колагена разграђује и еластин (82,83). Пептиди пореклом од еластина, VGVAPG и VAPG, се везују за галектин-3 и  $\alpha_v\beta_3$  интегрин на туморским ћелијама што појачава експресију CXCR-4, MMP-2, MMP-3, VEGF-C, CD44, ICAM-1 и NCAM (енгл. *Neural Cell Adhesion Molecule*) и на тај начин подстичу инвазивни потенцијал метастатских ћелија (84). Претходно је на моделу мишићег меланома показано да експресија галектина-3 у плућима олакшава успостављање хематогених метастаза тако што повећава адхезију туморских ћелија за плућни паренхим (85). Екстравазацију додатно подстиче аутокринна продукција VEGF-A који се везује за рецепторе VEGFR-1 и -2 исказане на малигним меланоцитима (86).

Након насељавања паренхима удаљеног органа, следећи изазов са којим се туморске ћелије сусрећу је да успеју да преживе и да наставе да пролиферишу у метастатској односно новој туморској микросредини (68). Најчешће локализације клинички манифестних метастаза код меланома су кожа и поткожна ткива, плућа, мозак, јетра и кости (87). За хоминг туморских ћелија у циљним ткивима одговорни су хемокински рецептори (70). Тако, CXCR4, CCR7 и CCR9 су главне детерминанте које одређују локализацију удаљених метастаза код меланома (88). Малигни меланоцити који експримирају хемокински рецептор CXCR4 имају тенденцију да метастазирају у плућа, кости и јетру (88).

Развој метастаза у плућима праћена је ниском стопом преживљавања оболелих од меланома (89). За рецептор тромбоцита  $\text{gpIb-IX}$ , важног у адхезији тромбоцита, показано је да у меланому игра важну улогу у формирању метастаза у плућима (90,91). Интегрини поред тога што играју важну улогу у орган-специфичном метастазирању, активацијом интрацелуларних сигнала учествују и у преживљавању и пролиферацији метастатских ћелија (68). Осим што током метастазирања меланома омогућује хоминг туморских ћелија у плућа, CXCR4 учествује и у активацији сигналних путева MAPK PI3K/Akt укључених у спречавање апоптозе метастатских ћелија (68,88).

Развоју метастаза претходи припремање тла у циљном ткиву тако што се формирају преметастатске нише (92). Преметастатске нише у плућима развијају се око терминалних бронхиола и бронхиоларних вена (93). Наиме, регистрована је појачана инфилтрација мијелоидних ћелија у плућима мишева са меланомом, и то тако што повећано експримирају адхезивни молекулу Mac-1 (енгл. *Macrophage-1 antigen*) (94). Ћелије примарног тумора секретују VEGF-A, TGF- $\beta$  и TNF- $\alpha$  (енгл. *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) којима активирају ендотелне ћелије плућа у којима затим се повећава експресија и секреција S100A8 и S100A9, хемоатрактаната туморских ћелија и Mac-1<sup>+</sup> мијелоидних ћелија (94). Регрутовање прогениторских ћелија хематопоезе и ендотелних прогениторских ћелија из костне сржи, као и активација фибробласта који фибронектином разграђују екстрацелуларни матрикс, све скупа обезбеђује завршне кораке у формирању метастатске нише (94).

Метастатске ћелије подстичу продукцију фактора неоангиогенезе као што су VEGF, FGF и IL-8. Неоангиогенеза је битна карика у метастатској каскади која, осим дисеминације туморских ћелија, стимулише и раст метастатских колонија (95,96). Поред наведених молекула, PAF (енгл. *Platelet-Activating Factor*) и LPA (енгл. *Lysophosphatidic Acid*) додатно доприносе ангиогеном фенотипу меланома (97). Малигни меланоцити са израженим метастатским потенцијалом продукују IL-8 којим, помоћу рецептора CXCR1 и CXCR2, делују на ћелије микроваскуларне мреже и подстичу миграцију ендотелних ћелија (98,99). Поред тога, CXCR1 и CXCR2 су експримирани и на туморским ћелијама меланома у којима подстичу продукцију MMP-2 (100). Везивањем за CXCR2 на ендотелним ћелијама, IL-8 стимулише експресију VEGF и на тај начин додатно амплификује неоангиогенезу (97). Поред IL-8, LPA такође стимулише синтезу VEGF у ендотелним ћелијама (97). Цитокин IL-8, својим аутокриним и паракриним дејством на инфламацијске и стромалне ћелије, подстиче и раст метастаза у удаљеним органима (101). Аутотаксин је ензим, први пут идентификован у ћелијама меланома, за који је показано да доприноси расту тумора, метастазирању и неоангиогенези (102,103). Уз то, проинфламацијски липид PAF генерише повољну микросредину за ангиогенезу, преживљавање, као и раст туморских ћелија и то тако што покреће транскрипцију MMP-2 и MT1-MMP (енгл. *Membrane-Type 1-Matrix Metalloproteinase*) у туморским ћелијама меланома (104).

Рано дисеминоване туморске ћелије могу да буду "успаване" (енгл. *tumor dormancy*) у плућном паренхиму и у овом стању могу да остану све док се у потпуности не адаптирају на нову микросредину (105). Због баланса између ћелијске деобе и апоптозе и у одсуству фактора раста, ове микрометастазе су у успаваном стању и не расту (94). Тако на пример, у удаљеном ткиву метастатске ћелије B16 варијанте меланома могу различито дуго остати у оваквом стању све док се за њих не обезбеде услови повољни за даљу репликацију (106).

### 1.1.1. Сингени трансплантациони модели за испитивање прогресије меланома

Сингени трансплантациони модели датирају још из 1950-их година и препознати су као корисна платформа за проучавање образаца понашања и метастазирања меланома (107). Овакви модели имају предност у односу на моделе који се заснивају на коришћењу имунодефицијентних мишева јер омогућују интеракцију туморских ћелија меланома са бројним ћелијским компонентама урођене и стечене имуности система, а које се нормално налазе у туморском микроокружењу код меланома људи (108).



За сингени транссплантациони модел, једна од најчешће коришћених линија туморских ћелија и њених варијанти су ћелије В16 (109) добијене 1954. године и то спонтаном малигном трансформацијом меланоцита коже С57BL/6 мишева (110). Оваква ћелијска линија има широку примену у испитивању раста и метастазирања меланома (111,112). Показано је да туморске ћелије В16 експримирају неке од антигена диференцијације меланоцита као што су gp100, Melan-A/MART-1 (енгл. *Melanoma Antigen Recognized by T cells-1*), тирозиназа, TRP-1 и TRP-2 у чему се и огледа сличност оваквих ћелија са туморским ћелијама хуманог меланома (112). Међутим, за разлику од малигну меланоцита код људи који експримирају променљив ниво МНС (енгл. *Major Histocompatibility Complex*) молекула I класе, ћелије мишјег меланома В16 карактерише ниска експресија ових молекула што умањује њихову имуногеност (112). Такође, ћелије В16 су резистентне на високу концентрацију IL-2, а и за разлику од ћелија хуманог меланома ове ћелије су отпорне и на туморицидну активност цитотоксичких Т лимфоцита специфичних за туморски антиген gp100 након њиховог адоптивног трансфера (112).

У моделу мишјег меланома показано је да туморске ћелије В16 најчешће метастазирају у плућа (113). На моделу метастатског меланома В16 показано је да протеин CLCA2 експримиран у плућима интерагује са  $\alpha\beta4$  интегрином на туморским ћелијама чиме се тропизам малигну меланоцита усмерава ка плућном паренхиму (114,115). Fidler је 1973. године сингеним С57BL/6 мишевима интравенски убризгао туморске ћелије В16 да би тиме индуковао експерименталне плућне метастазе (111). Затим је селектовано изоловао метастатске ћелије из плућа. Ову прву генерацију туморских ћелија означио је као В16-F1 и овај варијетет мишјег меланома одликује низак метастатски капацитет (111,116). Култивацијом В16-F1 ћелија, а затим понављаном "in vivo пасажом" у 10 цилуса, из плућа је селектован варијетет мишјег меланома В16-F10 са већим метастатским потенцијалом у односу на варијетет ћелија В16-F1 (111,116). Овим је показано да са сваком in vivo селекцијом метастатских ћелија изолованих из хематогених метастаза у плућима добијају се метастатски меланоцити које карактеришу све већи метастатски потенцијал и све већа резистенција на апоптозу (111). Овако добијене туморске ћелије одликује и већа инвазивност када се субкутано трансплантирају у сингене мишеве (116).

Примећено је да варијетет меланома В16-F10 показује нижи степен диференцијације у односу на ћелије В16-F1 што иде у прилог његовом агресивнијем метастатском фенотипу (117). Уз то, малигни меланоцити варијетета В16-F10 показују и већи инвазивни потенцијал што се објашњава њихом способношћу да више продукују активатор плазминогена у односу на ћелије В16-F1 (118). Након стимулације лактатима из туморске микросредине, В16-F10 ћелије за разлику од В16-F1 синтетишу хијалуронску киселину у високој концентрацији, а што такође доприноси њиховом агресивном фенотипу (119). На варијације у метастатском потенцијалу варијетета меланома В16-F1 и В16-F10 указују и разлике у експресији антигена, инвазивној активности, продукцији колагеназе, као и агрегацији са тромбоцитима чиме се туморске ћелије штите од цитотоксичког дејства НК ћелија (120,121,122,123). У складу са свим наведеним, након интравенске апликације показано је да варијетет мишјег меланома В16-F10 даје значајно већи број плућних метастаза у поређењу са варијететом В16-F1 (117,123).

Из свега наведеног може се закључити да обе линије туморских ћелија мишјег меланома садрже разнолики спектар субклонова које одликује различити потенцијал за пролиферацију, инвазију и метастазирање. Иако се доста зна о биолошким процесима који омогућују појединачне кораке у метастатској каскади, разумевање

фундаменталних ћелијских разлика између примарних и секундарних лезија, као и покретача колонизације метастатских ћелија је од суштинског значаја не само за идентификацију терапијске стратегије којом ће се циљати метастазе, већ би имало и велики утицај на преживљавање пацијената са тумором. Сходно томе, генерисање нових експерименталних модела који би још боље имитирали меланом код људи имао би велики значај у многим биомедицинским, а посебно у претклиничким истраживањима (55).

## 1.2. Имунотерапија тумора

### 1.2.1. Имушки одговор против меланома

Имушки систем игра важну улогу у елиминацији малигно трансформисаних меланоцита и тиме превенира појаву и развој меланома (124). У већини случајева активација антитуморског имушког одговора није потребна јер интрацелуларни сигнални путеви у измењеним ћелијама покрећу апоптозу што представља унутрашњи механизам превенције малигне алтерације ћелија (124). Међутим, у случају изостанка овог унутарћелијског тумор-супресорског механизма, имушки систем као спољашњи тумор-супресорски механизам мора брзо да одреагује и да елиминише малигно трансформисане ћелије како би се спречила даља прогресија меланома током које се између осталог развијају и механизми избегавања и супресије антитуморског имушког одговора (124,125). Координисана акција ефекторских механизма урођене и стечене имуности је од суштинског значаја за имушки одговор против меланома (124,126). Ћелије урођене имуности учествују како у иницијалном уклањању туморских ћелија након појаве малигног тумора, тако и у активацији и обликовању стеченог имушког одговора. Наиме, дендритске ћелије као важна компонента урођене имуности обрађују и приказују туморске антигене и пружају снажне костимулационе сигнале лимфоцитима са циљем да се генерише ефикасна тумор-специфична популација меморијских лимфоцита (124). Меланом се убраја у високо имуногене туморе јер малигни меланоцити на својој површини експримирају неоантигене којима покрећу тумор-специфични целуларни имушки одговор (127).

Макрофаги, неутрофили, еозинофили, дендритске и НК ћелије, као главне карике урођене имуности, међу првима се укључују у борбу против меланома (128,129). Тако на пример, НК ћелије препознају и елиминишу ћелије меланома са смањеном експресијом МНС молекула I класе и то ангажовањем активационих мембранских рецептора (NKG2D, NKp30, NKp46 и DNAM-1) на НК ћелијама са одговарајућим лигандима на површини малигну меланоцита (126,130). Претходно је показано да на малигним меланоцитима експресија лиганата за рецепторе НК ћелија зависи од локализације и стадијума болести (124). Осим што директно убијају малигне меланоците, активирани НК ћелије у туморској потци продукују хемокине CXCL1 и CCL5 којима регрутују ћелије које приказују антигене у туморску микросредину (124). Макрофаги, неутрофили и дендритске ћелије, регрутовани у туморско ткиво, фагоцитију некротичне или апоптотске ћелије меланома, а затим унакрсном презентацијом туморских антигена CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима способни су да покрену стечени антитуморски имушки одговор (124,131). Заузврат активирани Т лимфоцити секретују солубилне факторе којима се додатно амплификује антитуморска активност ћелија урођеног имушког одговора што јасно указује на координисану интеракцију ефекторских механизма урођене и стечене имуности (132).

Дендритске ћелије су високо специјализоване антиген-презентујуће ћелије које приказивањем туморских антигена и пружањем одговарајућих додатних сигнала функционишу као главни оператори комплетног имунског одговора способни да подједнако контролишу имунску толеранцију и имунитет (133,134). Сматрају се и централним активаторима меланом-специфичних Т лимфоцита (135,136) тако што обезбеђују интеракцију бројних молекула укључујући МНС молекуле I класе, костимулацију и цитокине IL-12 и IFN- $\gamma$  (енгл. *Interferon- $\gamma$* )(137,138). Поред активације, дендритске ћелије продукују хемокине CXCL9, CXCL10 и CXCL11 којима регрутују цитотоксичке Т лимфоците у туморску микросредину (139,140). Присуство незрелих CD1a<sup>+</sup> и зрелих CD208<sup>+</sup> дендритских ћелија у примарном тумору је у корелацији са бројем активираних Т лимфоцита (141). Степен инфилтрације примарног тумора CD1a<sup>+</sup> и CD208<sup>+</sup> дендритским ћелијама је у обрнутој корелацији са дијаметром примарног тумора, док се заступљеност перитуморских дендритских ћелија доводи у везу са дужим преживљавањем пацијената (142). Супротно, плазмацитоидне дендритске ћелије у туморском ткиву делују имunosупресивно тако што активирају регулаторне Т лимфоците (143).

Макрофаги и неутрофили остварују бројне антитуморске функције, а то су фагоцитоза, продукција /или експресија ефекторских молекула као што су реактивна кисеонична једињења, азот-моноксид, IFN- $\gamma$  и FasL, секреција хемотаксичних молекула којима регрутују ћелије стечене имуности (124). С друге стране, ћелије стеченог имунског одговора као што су помагачки Т лимфоцити продукују IFN- $\gamma$ , лимфотоксин- $\alpha$  и експримирају CD40 лиганд и на тај начин додатно подстичу туморицидну способност макрофага (124). Једно од битних обележја ћелија урођене имуности је њихова изузетна функционална пластичност која се огледа у стицању про- и/или анти-туморске функције, а што зависи од бројних међућелијских интеракција и солубилних фактора присутних у туморском микроокружењу (144). Тако у зависности од стимулуса који доминирају у туморској потки активирани макрофаги стичу или M1 или M2 функционални фенотип (145). Класично активирани M1 макрофаге одликује антитуморска активност која се огледа у појачаној туморицидној способности, продукцији проинфламацијских цитокина (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-12), као и појачаној експресији МНС молекула II класе и костимулационих молекула CD80 и CD86, неопходних за оптималну активацију помагачких Т лимфоцита (146). Супротно, алтернативно активирани M2 макрофаги испољавају протуморско дејство тако што смањују експресију МНС молекула II класе и костимулационих молекула, а продукцијом IL-10, IL-6, IL-23 и TGF- $\beta$  подстичу хроничну инфламацију у туморском микроокружењу која на различите начине доприноси напредовању тумора (147). Тако, комплексне интеракције макрофага са туморским ћелијама могу да резултују прогресијом тумора што је условљено повећаном синтезом бројних фактора раста укључујући VEGF-C (148). Рецептор за uPA (енгл. *urokinase-type Plasminogen Activator*) и MMP-9 које продукују и макрофаги и туморске ћелије поспешују инвазију тумора (149). Слично макрофагима, неутрофили N1 фенотипа испољавају антитуморско дејство, док продукција имunosупресивних цитокина као што је TGF- $\beta$  усмерава поларизацију неутрофила у протуморски N2 фенотип (150,151).

Инфилтрација еозинофила забележена је у бројним малигномима укључујући меланом (152,153). У туморској микросредини еозинофили могу да буду важни регулатори прогресије тумора захваљујући својим анти- и/или про-туморским функцијама (154). Туморске ћелије продукују IL-5 и GM-CSF (енгл. *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*) и на тај начин подстичу миграцију еозинофила у туморску микросредину (155,156). Акумулацији еозинофила у туморској микросредини

додатно доприноси IL-4 кога продукују T<sub>H</sub>2 лимфоцити, као и CCL11 (еотаксин-1) и бројни алармини ослобођени из некротичних туморских ћелија укључујући HMGB1 (енгл. *High Mobility Group Box 1*) (154). Активирани тумор-инфилтришући еозинофили продукују хемоатрактанте којима стимулишу миграцију цитотоксичких Т лимфоцита у туморску микросредину (157). Дегранулацијом еозинофила ослобађају се бројни протеини као што су МВР (енгл. *Major Basic Protein*), еозинофилна пероксидаза и еозинофилни катјонски протеин задужени за цитолитичко дејство еозинофила (158). На моделу мишијег меланома показано је да дегранулација еозинофила игра важну улогу у елиминацији метастатских ћелија (159). Уз то, примећено је да урођене лимфоидне ћелије, под утицајем IL-33 и IL-25, продукују IL-5 којим стимулишу инфилтрацију еозинофила и следствено снажан антитуморски имунски одговор на меланом (160). Показано је да IL-33, примећен интраназално, инхибира метастазирање варијетета мишијег меланома В16-F10 са израженим метастатским потенцијалом и то тако што стимулише туморицидну активност еозинофила у плућима (161). Супротно, алтернативно активирани еозинофили остварују бројне протуморске функције што се огледа у способности ових ћелија да регрутују регулаторне Т лимфоците у туморску микросредину, да усмеравају поларизацију макрофага у М2 фенотип, да инхибирају цитотоксичност НК ћелија и Т лимфоцита, док продукцијом неких фактора раста стимулишу и процес неоангиогенезе (154).

Осим урођене имуности, ефикасан имунски одговор против меланома се базира и на оптималној активацији ефекторских механизма стечене имуности (162). Цитотоксички CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити су кључне ћелије овог типа имуности укључене у директну борбу против меланома, док помагачки CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити пружају помоћ у активацији и побољшавају ефикасност цитотоксичких Т лимфоцита (124). Захваљујући експресији адхезивних молекула и присуству хемокина у васкуларном ендотелу, активирани Т лимфоцити мигрирају у туморску микросредину (163). У миграцији и задржавању Т лимфоцита у туморској микросредини важну улогу играју интегрини α1β1, α2β1 и αЕβ7, као и лиганди за хемокинске рецепторе CCR5, CCR9 и CXCR3 експримирани на Т лимфоцитима (162,164). У туморском микроокружењу цитотоксички Т лимфоцити поново препознају туморске антигене у склопу МНС молекула I класе на малигним меланоцитима, што иницира испоруку богате палете смртоносних молекула у циљане туморске ћелије (165,166). Први механизам којим цитотоксички Т лимфоцити убијају ћелије меланома је покретање апоптозе односно позивање програма самоуништења у туморској ћелији (167). Најчешћи лиганди којима CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити индукују апоптозу малигних меланоцита су TNF-α, FasL и TRAIL/Apo2L (енгл. *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand/Apo2 Ligand*) (168). Молекул FasL на цитотоксичким Т лимфоцитима везује се за Fas рецептор на површини малигних меланоцита што резултује акумулацијом адаптерских протеина у близини интрацелуларног домена Fas рецептора и последично регрутовање прокаспазе-8 (162,169). Формирани комплекс означен као DISC (енгл. *Death-Inducing Signaling Complex*) индукује активацију каспазе-8 која самостално или заједно са другим сигналним молекулима из митохондрија покреће апоптозу у туморским ћелијама (162). Молекул Bid, члан фамилије протеина Bcl-2 кога активира каспаза-8, транслоцира се у митохондрије где индукује ослобађање цитохрома-с и других апоптотских фактора у цитоплазму (170,171). Молекули цитохром-с, Apaf-1 (енгл. *Apoptotic protease activating factor-1*), аденозин 5-трифосфат и прокаспазе-9 формирају апоптотски комплекс којим се активира каспаза-9 (170,171). Тако активирани инцијаторске каспазе-8 и -9 затим активирају каспазу-3, -6 и -7 који функционишу као егзекутори који разлажу одговарајуће ћелијске супstrate односно "супstrate смрти" и на тај начин узрокују апоптотску смрт малигних меланоцита (170,171). Други механизам којим цитотоксички

T лимфоцити убијају малигне меланоците подразумева ослобађање перфорина и гранзима из цитоплазматских гранула лимфоцита у циљане ћелије (162). Наиме, у присуству калцијума, дешава се полимеризација перфорина што узрокује формирање пора у ћелијској мембрани који омогућују трансфер гранзима из лимфоцита у цитоплазму туморске ћелије (172,173). Гранзими су серин протеазе које активирају егзекуторске каспазе у циљаној ћелији. Додатно, гранзим В директно активира протеин Bid што за последицу има покретање митохондријалног (унутрашњег) пута апоптозе (174,175,176).

На основу података из литературе може се закључити да ефикасан имунски одговор против меланома захтева брзу активацију неспецифичних механизма урођене имуности који, не само што активно учествују у елиминацији генетски измењених ћелија, већ уједно и координирају активацију и појачавају ефикасност специфичних механизма стечене имуности у (177). Додатни фактори као што су презентација неоантигена, квалитет унакрсног прајминга и регрутовање ћелија имунског система у туморску микросредину су такође критични за судбину меланома (178). Међутим, упркос значајној ефикасности имунског система у контроли настанка и развоја тумора, подаци из литературе осветљавају различите стратегије којима меланом "паралише" антитуморски имунски одговор (179). Поред прогресивног исцрпљивања имунског система изазвано хроничном стимулацијом брзорастућег тумора (178), генерално, бекство малигних меланоцита од контроле имунског надзора зависи од: 1) дефекта у познавању неоантигена у фази прајминга лимфоцита; 2) повећане отпорности туморских ћелија на апоптозу; 3) повећане експресије имунских контролних тачака, PD-1 (енгл. *Programmed Cell Death Protein-1*) и CTLA-4 (енгл. *Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Protein-4*), односно молекула који служе као "прекидачи" имунског одговора; 5) развоја имуносупресивног микроокружења (128,180,181), што све заједно подстиче прогресију меланома.

### **1.2.2. Антигени малигних меланоцита и механизми избегавања имунског одговора у меланому**

Идентификација меланом-асоцираних антигена (енгл. *Melanoma-Associated Antigens*, МАА) и дефинисање њихове функције неопходни су за разумевање генезе и прогресије меланома (182). Поред тога, у клиничкој пракси МАА играју вишеструку улогу почев од пружања помоћи у дијагностици, диференцијацији метастатских од примарних туморских лезија, као и у прогнози болести и имунотерапији меланома (182). Када је реч о имунотерапији, већина МАА су аутоантигени што их због имунске толеранције чини слабим имуногенима, а њихова хетерогеност и нестабилни антигенски профил су додатни разлози неефикасног антитуморског имунског одговора на меланом (183,184).

Антигени диференцијације меланоцита (енгл. *Melanocyte Differentiation Antigens*, MDA) су укључени у меланогенезу и експримирају их не само здрави меланоцити већ и туморске ћелије меланома у различитим стадијумима диференцијације (183,185). Наиме, MDA су експримирани како у примарном тако и у метастатском меланому, а њихова улога у развоју меланома још увек није јасна (182,185). Неки од оваквих антигена су тирозиназа, TRP-1 и TRP-2 (енгл. *Tyrosinase-Related Proteins*, TRP), Melan-A/MART-1 и гликопротеин 100 (енгл. *glycoprotein 100*, gp100) (183).

Тирозиназа је ензим који игра главну улогу у синтези меланина (182). Тирозиназа је везана за мембрану меланозома, тако да је каталитички N-терминални домен усмерен ка лумену меланозома, док је C-терминални домен, који је уједно и мета

имунског одговора, изложен ка цитоплазми (186,187). Показано је да су тирокиназа-специфични CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити изоловани из пацијената са меланомом (182) способни да изазову деструкцију аутологих туморских ћелија *in vitro* (188,189). TRP-1 игра важну улогу у пролиферацији и преживљавању меланоцита, и експримиран је у фази радијалног али не и вертикалног раста меланома (190,191). Мада је примећено да појачана експресија протеина TRP-1 и TRP-2 покреће антитуморски имунски одговор (192,193), ипак, с друге стране у неки студијама је регистровао да је експресија TRP-2 удружена са резистенцијом малигну меланоцита на зрачну и хемиотерапију (194). Молекул Melan-A/MART-1 је трансмембрански протеин меланоцита коже и ретине који игра важну улогу у меланогенези и матурацији меланозома (195,196). Melan-A/MART-1 је експримиран у већини примарних и метастатских лезија меланома, а његове пептидне секвенце препознају цитотоксички Т лимфоцити (182). Трансмембрански протеин gp100 присутан је у нормалним и већини малигну измењених меланоцита и игра важну улогу у меланогенези, синтези меланозома и полимеризацији меланина (197,198). Анти- gp100 антитела представљају важан туморски маркер који се користи у дијагностици меланома (199).

Канцер-тестис антигени (енгл. *Cancer-Testis Antigens*, CTA) учествују у пролиферацији, диференцијацији и преживљавању ћелија различитих тумора укључујући меланом (200,201). Најзначајнији CTA у меланому укључују MAGE (енгл. *Melanoma-Associated Antigen*), BAGE (енгл. *B Melanoma Antigen*), GAGE (енгл. *G Antigen*), NY-ESO-1 (енгл. *New York-Esophageal Squamous Cell Carcinoma-1*) и SSX (енгл. *Synovial Sarcoma X*) (202). Улога протеина MAGE (MAGE-I и MAGE-II) није у потпуности разјашњена и верује се да учествују у регулацији ћелијског циклуса и спречавању апоптозе (203). Експресија MAGE-I је повезана са лошијом прогнозом оболелих (204). Фамилију полипептида BAGE сачињава неколико хомологих молекула, међу којима је молекул BAGE-I експримиран у метастатском меланому (205,206). GAGE протеини представљају маркере који се користе у дијагностици меланома и њихова смањена експресија корелира са лошијом прогнозом болести (182). У меланому GAGE покрећу хуморални и целуларни антитуморски имунски одговор, тако да одсуство експресије ових протеина је један од механизма којима ћелије меланома избегавају имунски одговор (207,208). NY-ESO-1 је један од најимуногенијих CTA који покреће снажан имунски одговор којим се успорава прогресија меланома (209,210). Иако неки протеини SSX могу да спонтано индукују антитуморски имунски одговор, експресија SSX у туморима је обично повезана са касним стадијумом болести и лошом прогнозом (182,211).

У значајне антигене малигну меланоцита убрајају се и MTf (енгл. *Melanotransferrin*) и S100 протеини (212,213,214). MTf је мембрански гликопротеин одговоран за интрацелуларни метаболизам гвожђа и неопходан је за ћелијску диференцијацију (212). Аберантна експресија MTf значајно повећава имуногеност туморских ћелија (212). S100 протеини учествују у бројним процесима као што су регулација ћелијског мотилитета, раста, диференцијације, ћелијског циклуса и заштита ћелија од оксидативног стреса (213,214). S100 протеини су међу првима прихваћени као дијагностички маркери меланома (215). Најзначајнији карбохидратни антигени у меланому воде порекло од ганглиозида и представљају комплексе гликофинголипида са сијалнском киселином (216). Иако су GM3 и GD3 најчешће експримирани ганглиозиди у меланому, њихова експресија није ограничена искључиво на туморске ћелије, већ се могу детектовати и у мишићном ткиву, јетри, слезини, бубрезима и мозгу (217). С друге стране, ганглиозиди GM2, GD2 и GT3 чија је експресија нормално ограничена на мозак, могу се детектовати и у већини меланома (217).

Познато је да туморске ћелије садрже бројне стечене клонске и насумичне генске мутације (218,219). Због потенцијалне имуногености и специфичности за тумор намеће се питање да ли неке генске мутације могу да буду атрактивне мете за имунотерапију (220). Клонске мутације присутне су у већини туморских ћелија и обично су селектоване захваљујући предности коју дају расту тумора. Неке мутације резултују и стварањем бројних мутираних туморских антигена. Меланом-асоциране клонске мутације сматрају се важном имунском метом у метастатском меланому (182,221) тако да идентификација цитототоксичких ТИЛ (енгл. *Tumor Infiltrating Lymphocytes*) који препознају клонске мутације је значајна у смислу да може да повећа ефикасност адоптивне терапије и персонализоване вакцине (222). Поред клонских мутација заједничких за више врста тумора (220), детектују се и насумичне мутације (појављују се спорадично) које су одговорне за стварање тумор-специфичних антигена у појединачним туморима и јединствени су за јединку (182,220,223). Мада овакве мутације могу да покрену антитуморски имунски одговор, међутим, узимајући у обзир чињеницу да се јављају насумично и да их дели само мала субпопулација ћелија у тумору обично се не користе као мете у имунотерапији (182,218,220).

Упркос својој имуногености, метастатски меланом расте и дисеминује се и то захваљујући развоју бројних механизма којима избегава имунски надзор (224). Иако, ћелије имунског система активно уклањају туморске ћелије, првенствено у раном стадијуму меланома (124,177,225), акумулацијом одговарајућих мутација, малигни а нарочито метастатски меланоцити стичу особине да ефикасно избегавају антимеланомски имунски одговор (124,177,225). Додатно, селективни притисак кога намеће имунски систем парадоксално нарушава његову ефикасност у борби против меланома. Ово се огледа у томе што имунски систем успева да елиминише само клонове сензитивних малигнућих ћелија и тиме селекује варијанте имунорезистентних (мање имуногених, толерогених и неимуногених) ћелија чији опстанак, експанзија и отпорност на апоптозу у крајњем исходу резултују даљом прогресијом тумора (124,177,225). Овај механизам избегавања имунског одговора познат је као имуноселекција. Сматра се да је меланом људи један од најимуногенијих тумора (177) што је вероватно резултат високог мутацијског оптерећења тумора (енгл. *High Tumor Mutation Burden*) који је кључан у стварању имуногених неоантигена (226,227). Међутим, меланом као један од најагресивнијих тумора одликује пластичност малигнућих меланоцита и имунских ћелија у туморском микроокружењу што има важне импликације не само за метастазирање, већ и за резистенцију на различите терапијске модалитете укључујући имунотерапију и циљану терапију (228). Пластичност туморских ћелија меланома је последица аберантне дедиференцијације и реактивације раличитих сигналних програма које користе њихови најранији прекурсори у нервном гребену (229,230). Такође, проинфламацијски медијатори ослобођени током повреде туморског ткива у одговору на терапију додатно доприносе брзим променама у фенотипу туморских и имунских ћелија у микроокружењу (228). Оваква фенотипска пластичност изазвана инфламацијом мења антигенски профил туморских ћелија, репрограмира мрежу онкогене сигнализације, штити од ћелијске смрти и репрограмира функције ћелија строге укључујући ћелије имунског система у туморском микроокружењу, што све заједно слаби антитуморски имунски одговор и ефикасност терапије (228).

Поред редукције имуногености, важна стратегија меланома у субверзији имунског одговора је продукција имуномодулационих молекула који утиче на састав и функционални фенотип ћелија имунског система у туморском микроокружењу. Другим речима, туморске ћелије "обликују" локални имунски профил у свом микроокружењу тако што регрутују ћелије имунског система са протуморским фенотипом и

истовремено супримирају или искључују популацију антитуморских ћелија (124). Уз то, ослобађају различите молекуле којима индукују развој имunosупресивне туморске микросредине што све скупа фаворизује прогресију меланома (97,124,177). Метастатски меланоцити помоћу екстраћелијских везикула ослобађају неке факторе у метастатској микросредини којима активирају проинфламацијски сигнални програм у канцер-асоцираним фибробластима (енгл. *Cancer-Associated Fibroblasts*, CAF) (231,232). CAF заузимају важно место у креирању имunosупресивне микросредине, као и у пролиферацији и инвазији примарног и метастатског тумора (231,233). Документовано је да фибробласти у плућима, под утицајем малигнух меланоцита, синтетишу IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL10, CXCL1, CCL2, CCL3 и CCL5 којима индукују повећано регрутовање протуморских мијелоидних ћелија нарочито неутрофила у метастатску микро средину (231). Осим на миграцију бројних ћелија у туморску микро средину, CAF супримирају функцију кључних ефекторских ћелија, а то су меланома- специфични цитотоксички Т лимфоцити и NK ћелије (234,235). Ова инхибиција се делимично може приписати појачаној регулацији PD-L1 (енгл. *Programmed Death-Ligand 1*) и COX-2 (енгл. *Cyclooxygenase-2*), као повећаној продукцији матриксних протеиназа и простагландина E2 у CAF (234,235).

У туморској микро средини ћелије меланома стимулишу хоминг и усмеравају поларизацију макрофага и неутрофила у M2 и N2 фенотип (124). Тако, смањена секреција хемокина CCL2 у туморској микро средини резултује регрутовањем и активацијом протуморских M2 макрофага (236). На поларизацију макрофага у M2 фенотип важну улогу играју и други молекули укључујући VEGF-C и TGF- $\beta$  (237,238). Имunosупресивни цитокин IL-10 смањује експресију MHC молекула II класе и костимулационих B7 молекула, CD80 и CD86, на макрофагима, што за последицу има слабо приказивање антигена због чега се следствено нарушава ефикасност цитотоксичких Т лимфоцита (238). Своје протуморско дејство M2 макрофаги остварују и продукцијом молекула укључених у инвазију и неоангиогенезу, а то су матриксне металопроотеиназе и VEGF (239). Малигни меланоцити такође поспешују хоминг неутрофила у туморску микро средину продукцијом богатог сета хемокина, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 и CXCL8, који се сви везују за рецептор CXCR2 (240). У раном стадијуму меланома доминирају неутрофили са антитуморским N1 фенотипом, док у каснијим стадијумима превласт имају N2 неутрофили који на различите начине учествују у прогресији меланома (241,242). Показано је да циркулишуће туморске ћелије секретују G-CSF (енгл. *Granulocyte- Colony Stimulating Factor*) и CXCL6 којима стимулишу регрутовање N2 неутрофила у удаљена циљана места где затим ослобађају бројне факторе раста неопходне за успешно формирање метастаза (243). Додатно, N2 неутрофили малигним меланоцитима олакшавају избегавање антитуморског имунског одговора тако што повећавају експресију инхибиционог молекула PD-L1, секретују ензиме IDO (енгл. *Indoleamine 2,3-Dioxygenase*) и iNOS (енгл. *inducible Nitric Oxide Synthase*), док продукцијом IL-17 регрутују имunosупресивне регулаторне Т лимфоците (244,245).

Молекули VEGF и TGF- $\beta$  пореклом из туморских ћелија меланома не само што редукују миграцију дендритских ћелија у туморску микро средину, већ супримирају сазревање и фаворизују толерогени фенотип дендритских ћелија што у крајњем исходу атенуира активацију ефекторских цитотоксичких Т лимфоцита (246,247). Смањивањем продукције хемокина CCL4 у туморским ћелијама додатно се редукује хоминг дендритских ћелија, као и Т лимфоцита у туморску потку (246,248). Субоптимална активација и драстично умањена ефикасност ефекторских Т лимфоцита су последица



смањене експресије костимулационих молекула на дендритским ћелијама, а што је опет резултат деловања других одговарајућих медијатора из туморске микросредине (249).

Како би избегао директан напад цитотоксичких Т лимфоцита, меланом користи једну од кључних тактика а то је повећана експресија лиганда за инхибиционе рецепторе, означене и као имунске контролне тачке. Добро је познато да имунске контролне тачке функционишу као "кочнице" имунског одговора против тумора укључујући меланом и то тако што узрокују исцрпљивање и/или толеранцију ефекторских CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита на туморске антигене. Тако, малигни меланоцити појачано исказују лиганд PD-L1 који интерагује са инхибиционим рецептором PD-1 на цитотоксичким CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима хронично изложених туморским антигенима (250). Интеракција PD-1/PD-L1 покреће имуносупресивни програм у цитотоксичким Т лимфоцитима што последично смањује њихову активацију, пролиферацију и продукцију токсичних молекула (251). Показано је да одсуство проинфламацијског цитокинског миљеа и истовремена дуготрајна изложеност антигена цитотоксичким Т лимфоцитима у туморској микросредини резултује њиховом анергијом и апоптозом (252,253). Смањена антитуморска активност тумор-специфичних Т лимфоцита у меланому може да буде узрокована и блокадом корцептора CD8 на цитотоксичким Т лимфоцитима, као и повећаном експресијом инхибиционог рецептора CTLA-4 (97). Молекул CTLA-4 је друга имунска контролна тачка која се везује за костимулационе B7 молекуле и тиме прекида активациони сигнал и изазива анергију CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита (254). Ћелије меланома редукују своју имуногеност на више начина: смањивањем експресије туморских антигена, као и протеина TAP (енгл. *Transporter Associated with Antigen Processing*) укључених у транспорт антигена, или MHC молекула што додатно редукује активацију и функционисање CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита (177,255). Високо антигенско оптерећење цитотоксичких Т лимфоцита индукује њихово исцрпљивање што представља још један начин којим меланом нарушава туморицидну активност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у туморској микросредини (124).

Следећи важан механизам избегавања напада имунског система је локална и системска имуносупресија индукована тумором. Кључне у креирању локалне имуносупресије су имуносупресивне ћелије а које солидни тумор регрутује у своје микроокружење. У том контексту, забележено је да је прогресија меланома у корелацији са присуством регулаторних Т лимфоцита у туморској микросредини, како код пацијената тако и код мишева након трансплантације B16-F10 варијанте меланома са изузетно израженим метастатским потенцијалом (256). Осим богате палете хемокина и одговарајућих рецептора (CCL27-CCR10, CXCL12-CXCR4, CCL20-CCR6, CCL19/CCL21-CCR7, CCL9/10/11-CXCR3, CCL17/22-CCR4 и S1P-S1PR1) који су мастери хоминга регулаторних Т лимфоцита (257), туморска микросредина такође активно учествује у експанзији ових ћелија тако што ослобађа бројне солубилне молекуле (258). Уз то, интеракција мембранских молекула PD-1/PD-L1 у туморској потци стимулише диференцијацију CD4<sup>+</sup> лимфоцита у регулаторне Т лимфоците што додатно доприноси њиховој експанзији (259). Регулаторни Т лимфоцити своју супресивну активност оставарују продукцијом инхибиционих цитокина IL-10, IL-35 и TGF-β, као и интеракцијом мембранских CTLA-4 са костимулационим B7 молекулима на дендритским ћелијама, при чему крајњи резултат је парализа имунских ефекторских механизма одбране од тумора (258,260). Поред добро познате улоге регулаторних Т лимфоцита да "пригушују" антитуморски Т ћелијски одговор, ове супресивне ћелије помоћу TGF-β везаног за мембрану такође директно инхибирају ефекторске функције NK ћелија тако што на њима смањују експресију активационог рецептора NKG2D (енгл. *Natural Killer Group 2D receptor*) (261). У регрутовању друге важне популације

имуносупресивних ћелија MDSC (енгл. *Myeloid-Derived Suppressor Cell*) у туморску микросредину меланома централну улогу играју GM-CSF, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  и VEGF, као и CCL3, CCL4 и CCL5 лиганди за хемокински рецептор CCR5 (262,263). Инхибициона улога MDSC у имунском одговору против тумора огледа се у синтези азот-моноксида, аргиназе 1, IDO, IL-10 и TGF- $\beta$ , као и појачаној експресији PD-L1, што све заједно резултује инхибицијом ефекторске функције Т лимфоцита (262).

Малигни меланоцити могу да на још један начин креирају имуносупресивну микросредину, а то је синтеза распадних метаболичких молекула и коришћење метаболичких супстрата за потребе сопственог раста (124). Потрошњом глукозе и кисеоника у туморској микросредини, малигни меланоцити ускраћују ове супstrate цитотоксичким Т лимфоцитима и на тај начин инхибирају њихову активацију и пролиферацију (264,265). Лактати, као продукти гликолизе у туморским ћелијама, смањују ефикасност дендритских ћелија да приказују антигене и инхибирају активацију цитотоксичких Т лимфоцита и NK ћелија (266,267). Потрошњом glutamina и аргинина, меланом ограничава доступност ових аминокиселина Т лимфоцитима и тиме додатно спречава њихову активацију (268,269). Поред тога, L-аргинин је прекурсор у синтези азот-моноксида, а његовом продукцијом малигни меланоцити инхибирају пролиферацију и функцију Т лимфоцита (270,271). Појачана експресија IDO у туморским ћелијама и у MDSC повећава експресију PD-L1 молекула у туморској микросредини што све скупа ремети оптималну активацију Т лимфоцита (272). Ензим IDO катализује триптофан и тиме узрокује депривацију ове аминокиселине неопходне за нормално функционисање Т лимфоцита. Додатно се синтетише и имуносупресивни молекул кинуренин (273,274,275) који с једне стране инхибира цитолитичку активност NK ћелија тако што смањује експресију активационих рецептора NKp44, NKp30 и NKG2D, а с друге стране подстиче диференцијацију регулаторних Т лимфоцита и повећава експресију PD-1 на ефекторским Т лимфоцитима (274,275). Појачано ослобађање аденозина у туморској микросредини, за које имунске ћелије експримирају рецептор, за последицу има инхибицију функције NK ћелија и Т лимфоцита, као и поремећај у активацији макрофага и сазревању регулаторних Т лимфоцита (276,277,278).

Интересантно, молекули микро RNK као некодирајуће RNK секвенце, атенуирају синтезу протеина и на тај начин такође учествују у имуномодулацији туморске микросредине у меланому (124). Имуносупресивни ефекат микро RNK се базира на више начина, на: 1) смањењу инфилтрације ефекторских Т лимфоцита, 2) повећању заступљености регулаторних Т лимфоцита у туморској микросредини, 3) конверзији моноцита у MDSC 4) смањењу имуногености туморских ћелија и 5) подстицању процеса неоангиогенезе (124). Егзозоми пореклом из туморских ћелија се отпуштају у екстрацелуларни простор где ослобађају бројне молекуле којима туморске ћелије комуницирају са другим ћелијама туморске микросредине (124). Тако на пример, егзозоми пореклом из малигних меланоцита отпуштају молекуле који делују имуносупресивно тако што подстичу експанзију и ефикасност регулаторних Т лимфоцита, а повећавањем експресије PD-L1 индукују апоптозу цитотоксичких и помагачких Т лимфоцита (279,280,281).

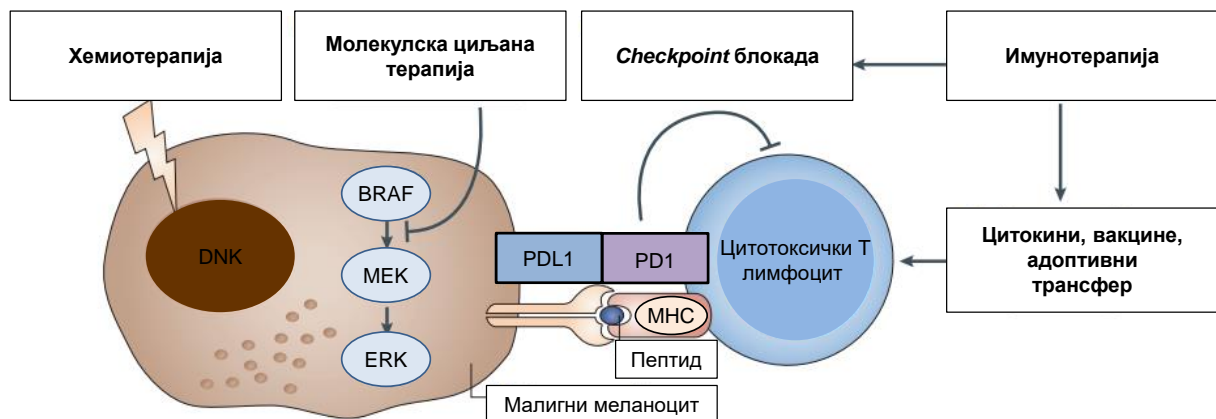
На крају, имајући у виду претходно наведене податке у литератури, може се констатовати да откривање јединствених антигена и прецизније дефинисање меланом-асоцираних антигена представља основу за развој биолошке терапије метастатске болести (182). Такође, детаљније познавање механизма којима меланом избегава имунски одговор доприноси не само развоју, већ и побољшању ефикасности циљане имунотерапије.

### 1.2.3. Имунотерапија меланома

Идеја да се имунски систем домаћина може искористити за лечење тумора датира деценијама уназад, а темељи се на запажањима да ћелије имунског система активно елиминишу ћелије током почетне малигне трансформације и тиме сузбијају пре свега настанак, а касније, у мањој мери и прогресију спонтано насталих малигнома (282,283). Имунотерапија детектабилних тумора укључујући меланом обухвата различите тактике манипулације имунског система и то у широком распону, почев од потенцирања стимулационих и ефекторских па све до стратегије супротстављања инхибиционим и имуносупресивним механизмима (284).

Концепт имунотерапије тумора постоји више стотина година са најраним покушајем примене Колијевог токсина, а затим скоро век касније, за лечење меланома описани су употреба интерферона и високих доза IL-2, као и BCG (енгл. *Bacillus Calmette-Guerin*) вакцине директно у туморску лезију, са циљем да као моћан имунски модулатор регрутује ћелије урођене и стечене имуности и да тиме локално покрене снажан имунски одговор против меланома (180,285).

До данас постоје бројни модалитети имунотерапије метастатског меланома који се генерално базирају на цитокинској терапији IL-2 и IFN- $\alpha$ , молекулској циљаној терапији инхибиторима B-raf и MEK, “*checkpoint*” блокади анти-CTLA-4 и анти-PD-1 антителима, као и на локалној терапији онколитичким вирусима (Слика 3) (286).



**Слика 3. Модалитети имунотерапије метастатског меланома** (преузето и кориговано према: Hölzel M et al. *Nat Rev Cancer* 2013;13(5):365-76).

IL-2 је први имуномодулацијски агенс одобрен у терапији нересектабилног меланома (287). IL-2 је цитокин који директно подстиче пролиферацију и антитуморску активност цитотоксичких CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита (288). Високе дозе IL-2 се данас ретко користе у терапији метастатског меланома због ограниченог терапијског ефекта у поређењу са новијим имунотерапеутицима, а нарочито високе токсичности и последично мултисистемске органске дисфункције (286). IFN- $\alpha$  је био други биолошки лек одобрен као адјувантна имунотерапија меланома са ограниченим терапијским могућностима (289). Други цитокини као што су IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 и GM-CSF такође су показали интересантне резултате у претклиничким и клиничким истраживањима (290). Употреба IL-2 и IFN- $\alpha$  пружила је увид у биолошке ефекте имунотерапије метастатског меланома и тиме отворила пут ка интензивном развоју нових имунотерапијских модалитета.

С обзиром да су ови рани облици имунотерапије неспецифични, стога, у последњој деценији лечење меланома усмерено је на различите облике циљане

имунотерапије укључујући коришћење моноклонских антитела која блокирају CTLA-4 или PD1/PD-L1 интеракцију, као и адаптивну Т-ћелијску терапију и терапију онколитичким вирусима (180,285,291,292).

Терапија "*checkpoint*" блокаторима подразумева примену антитела која "коче" активацију имунских контролних тачака односно инхибиционих рецептора CTLA-4 и PD-1 што резултује прекидом дотадашње парализе антитуморског имунског одговора (293). Ipilimumab, неутралишуће антитело специфично за негативни регулатор активације Т лимфоцита CTLA-4, је прво одобрено антитело у терапији метастатског меланома (288). Ово антитело блокира интеракцију CTLA-4 са B7 костимулационим молекулима и тиме прекида енергију и стимулише оптималну активацију Т лимфоцита и следствено елиминацију туморских ћелија (288). PD-1 је други инхибициони рецептор исказан на активираним Т лимфоцитима, макрофагима и NK ћелијама (294). Лиганди за PD-1 молекул, PD-L1 и PD-L2, експримирани су на дендритским ћелијама и макрофагима, али и на туморским ћелијама (295). Анти-PD-1 антитела, pembrolizumab и nivolumab, везујући се за PD-1 на Т лимфоцитима, спречавају интеракцију овог рецептора са његовим лигандима исказаним на туморским ћелијама и на тај начин подстичу активацију Т лимфоцита (286). У поређењу са анти-CTLA-4 антителом, овакви блокатори PD-1 молекула показују већу специфичност за малигне ћелије што је праћено са мање нежељених дејстава (286). Уз то, скорија истраживања указују на важност процене циркулишућих PD-1<sup>+</sup> регулаторних Т лимфоцита да би се предвидела успешност лечења наведеним блокаторима PD-1 молекула (296). Наиме, регистровано је да убрзо након започињања терапије блокирајућим анти-PD-1 антителима, број циркулишућих PD-1<sup>+</sup> регулаторних Т лимфоцита рапидно опада у оболелих од меланома што је праћено смањеним ризиком од метастатске прогресије болести (296).

Локална инокулација онколитичких вируса директно у туморску лезију је новији имунотерапијски приступ и базира се на коришћењу нативних или атенуисаних вируса са циљем да се селективно убију малигни меланоцити (293). На пример, у терапији меланома користи се генетски модификован *herpes simplex virus* тип 1 у смислу да су у њему циљано уклоњена два вирусна гена која су онда замењена кодирајућим секвенцама за фактор раста GM-CSF. Овако модификован вирус *Talimogene laherparepvec* (T-VEC) се репликује у туморским ћелијама и стимулише продукцију GM-CSF (297,298,299). Другим речима, након интратуморске инокулације, овакав вирус индукује лизу туморских ћелија и последично ослобађање туморских антигена, као и локалну продукцију GM-CSF, што би све заједно могло да амплификује системски антитуморски одговор (293,297). Штавише, појачана локална експресија и секреција GM-CSF фаворизује регрутовање антиген-презентујућих ћелија у туморску микросредину и тиме индукује снажан антитуморски имунитет (283,298,300,301).

Разумевање начина на који су различите генске мутације повезане са генезом и прогресијом меланома пружа могућност иновације и следствено имплементације нових терапијских стратегија усмерених на специфичне онкогене (302). У 40-50% пацијената са меланомом детектована је BRAF<sup>V600E</sup> мутација која резултује непрекидном активацијом сигналног пута MAPK (293,303). Стога, код пацијената са BRAF<sup>V600E</sup> мутацијом примењује се таргет терапија инхибиторима молекула BRAF самостално или у комбинацији са инхибиторима киназа MEK што у крајњем исходу блокира сигнални пут MAPK (293). Мада терапију инхибиторима BRAF/MEK код пацијената са метастатским меланомом углавном прати брз терапијски одговор, ипак је могућ развој туморске резистенције и то након 9 месеци од почетка терапије (288).

Иако циљана терапија заснована на примени инхибитора “*checkpoint*”, а и BRAF/MEK молекула има значајан допринос у лечењу оболелих од метастатског меланома, и даље се интензивно наставља развој нових имунотерапијских стратегија, као и увођење комбиноване терапије са различитим имунотерапеутицима које се испитују у различитим фазама клиничких студија (284,286,288). Додатно, адоптивни ћелијски трансфер подразумева изолацију тумор-инфилтришућих лимфоцита и других ћелија из пацијената оболелих од меланома који се онда након експанзије и активације цитокинима *in vitro* поново враћају пацијентима са циљем да се појача антимеланомски одговор (284,289). Главни кандидати за адоптивни трансфер тумор-инфилтришућим лимфоцитима су пацијенти са нересектабилним метастатским меланомом (288). У току су рандомизоване клиничке студије у којима се испитује комбинована примена инхибитора IDO и PD-1 (304). Инхибитори хистонске деацетилазе који утичу на генску експресију епигенетским модулацијама, показали су ефикасност у предклиничким студијама, а у клиничким испитивањима захтевају даљу евалуацију (305). Ране клиничке студије су такође показале потенцијалну ефикасност и безбедност комбинације инхибитора PD-1 и блокаде имуномодулационог молекула LAG-3 (енгл. *Lymphocyte-Activation Gene-3*)(306).

Са напретком туморске имунологије стичу се нова сазнања о интеракцијама између туморских ћелија, ћелија имунског система и других ћелија туморске средине, што олакшава развој нових имунотерапеутика примењивих нарочито у терапији метастатског меланома. Тако, број одобрених ефикасних имунотерапеутика у лечењу меланома се значајно повећава што је истовремено праћено и повољнијом прогнозом за пацијенте са метастазама. Крајњи циљ био би постизање дуготрајног ефикасног антитуморског имунског одговора без развоја туморске резистенције и истовремено са што већом минимализацијом нежељених дејстава.

### 1.3. Јанус лице IL-33 у туморима – од генезе до терапије

#### 1.3.1. Опште карактеристике IL-33

Интерлеукин-33 (енгл. *Interleukin-33*, IL-33), као нуклерани цитокин фамилије интерлеукина-1, обилно је експримиран у једру епителних, ендотелних ћелија и ћелија строме, као и активираних мијелоидних ћелија (307,308,309). Откривен је 2003. године и то као нуклеарни фактор венула са високим ендотелом (енгл. *Nuclear Factor From High Endothelial Venules*, NF-HEV) јер је његово присуство прво забележено у овим специјализованим венулама за које се зна да служе као “главна врата” за улазак лимфоцита у лимфне нодусе (310,311). Тако, поред лимфних нодуса, експресија молекула IL-33/NF-HEV на нивоу информационе RNK иницијално је регистрована и у тонзилама и Пејеровим плочама (310). Уз то, ген за IL-33 идентификован је на кратком краку 9. хромозома (9p24.1) као и ортологни ген за мишји IL-33/NF-HEV (310). Иако на почетку није детектована значајна хомологија између примарне секвенце NF-HEV и познатих протеина, накнадно је уочено да су хумани и мишји IL-33/NF-HEV слични протеину DVS27 пса, откривеног 1999. године у вазоспастичним церебралним артеријама и то приликом субарахноидалне хеморагије (310,312). *Schmitz* и сарадници су 2005. године објавили да тродимензионална структура карбоксилног краја NF-HEV протеина код људи је хомологна структури цитокина фамилије интерлеукина-1. Првобитно је примећено да овај молекул везујући се за рецептор ST2 (енгл. *Suppression of Tumorigenicity 2*) који припада суперфамилији рецептора IL-1, индукује развој T<sub>h</sub>2 имунског одговора (307). Због свих наведених опсервација, *Schmitz* и сарадници су за овог новог члана фамилије интерлеукина-1 предложили назив IL-33 (307).



Подаци из литературе сугеришу да је IL-33 протеин који функционише и као транскрипциони фактор и као цитокин (323). Након синтезе, прекурсорска дужа форма IL-33<sub>FL</sub> (енгл. *Full Length IL-33*, IL-33<sub>FL</sub>) се транслоцира у једро где интерагује са хистонима и хроматином (321,324). N-терминални домен IL-33 омогућује нуклеарну локализацију и интеракцију овог цитокина са хроматином и тиме регулише експресију гена (321). Везујући се за H2A и H2B хистоне, IL-33 активира хистонску деацетилазу-3 и на тај начин утиче на експресију гена и то епигенетским механизмима и ремоделацијом структуре хроматина (321,324,325). Такође је показано да IL-33 интерагује са N-терминалним доменом р65 субјединице транскрипционог фактора NF-κB (енгл. *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) и тако супримира експресију гена одговорних за продукцију проинфламацијских медијатора (326). Егзогени екстрацелуларни IL-33 регулише експресију богатог сета проинфламацијских протеина у ендотелним ћелијама, а делеција N-терминалног домена IL-33 резултовала је повећаном концентрацијом IL-33 у серуму и развојем ST2-зависне инфламације (327,328).

IL-33 не поседује сигналну секвенцу која му омогућује активну секрецију у екстрацелуларни простор као у случају већине конвенционалних цитокина (313). Уместо тога, IL-33 у једру се пасивно ослобађа из некротичних и оштећених ћелија у екстрацелуларни простор. Овако ослобођен IL-33 функционише као "сигнал узбуне" (алармин) који упозорава ћелије имунског система на опасност и то тако што се везује за мембрански ST2L рецептор на њиховој површини и у њима покреће проинфламацијску каскаду (313,323). У прилог функције IL-33 као ткивног алармина говори његова конститутивна експресија у ткивима, биолошка активност прекурсорске форме IL-33<sub>FL</sub>, као и ослобађање у екстрацелуларни простор након механичког оштећења или некрозе ћелије (308,329,330,331). Молекул IL-33<sub>FL</sub>, за разлику од других цитокина фамилије IL-1 као што су IL-1β и IL-18, представља биоактивну форму која не захтева претходно активацију каспазом-1 (329,330,331). Показано је да и каспаза-3 и -7 разграђују IL-33<sub>FL</sub> што резултује инактивацијом ове дуже форме цитокина (330,332). На осову тога може се констатовати да за активацију прекурсорског IL-33<sub>FL</sub> није неопходно дејство каспаза, већ супротно, каспазе инактивишу биоактивни IL-33<sub>FL</sub> и на тај начин спречавају његову проинфламацијску активност, док у случају апоптотске смрти ћелије обезбеђује имунску толеранцију (330). Међутим, у инфламацијским условима серинске протеазе (катепсин G, еластаза и протеиназа 3) ослобађене из неутрофила разграђују хумани и мишији IL-33<sub>FL</sub> и тиме настају зреле форме IL-33 чија потентност је 10 пута већа у односу на прекурсорску дужу форму IL-33<sub>FL</sub> (333). Протеазе мастоцита (химаза, триптаза и катепсин G) разградњом IL-33<sub>FL</sub> генеришу три различите изоформе зрелог IL-33 које показују чак 30 пута израженију потентност у односу на IL-33<sub>FL</sub> (334). Овим зрелим краћим формама IL-33 (18-21kDa) недостаје N-терминални домен, а захваљући свом C-терминалном домену функционишу као цитокини суперфамилије IL-1 (317,323). Овакви подаци имплицирају да се активност IL-33 значајно повећава у инфламацијској микросредини и то под дејством протеаза ћелија урођене имуности активираних ткивним оштећењем или инфламацијом (333,334,335). Инфламацијске протеазе, поред тога што разградњом IL-33<sub>FL</sub> генеришу зреле цитокинске форме са значајно повећаном биолошком активношћу, такође играју важну улогу и у инактивацији IL-33 (329,333,334). Химаза мастоцита разграђује IL-33 код мишева али не и код људи, док неутрофилна протеиназа 3 игра дуалну улогу која се огледа у способности да или активира или инактивира IL-33 (334,336,337). Рапидна инактивација IL-33 у екстрацелуларном простору се постиже и оксидацијом цистеинских остатака што за последицу има конформационе промене и

формирање дисулфидних мостова карактеристичних за биолошки инактивни облик IL-33 (338).

IL-33 је мултифункционални цитокин који своје биолошке функције остварује тако што се везује за рецепторски комплекс кога чине молекули ST2 и акцесорски протеин рецептора за IL-1 (енгл. *IL-1 Receptor Accessory Protein, IL-1RAcP*) (339). Молекул ST2 је идентификован пре открића IL-33 и то у мишићним фибробластима, а уочена је и његова сличност са рецептором за IL-1 (340). Алтернативним сплајсингом гена за IL1RL1 (енгл. *IL-1 receptor-like 1*) настају четири изоформе молекула: трансмембранска ST2L (енгл. *ST2 ligand*), солубилна sST2 (енгл. *soluble ST2*), варијантна ST2V (енгл. *ST2 variant*) и ST2LV (енгл. *ST2 ligand variant*) (323). ST2L је мембрански рецептор који садржи три *Ig-like* екстрацелуларна домена, трансмембрански регион и *ILI-R1-like* интрацелуларни домен (341,342). sST2 је солубилна форма која се секретује у форми гликозилизованог протеина који не садржи трансмембрански домен, већ поседује екстрацелуларни домен сличан ST2L и додатних 9 аминокиселина на С-терминусу (341,343). Мада је сличан sST2, ST2V садржи хидрофобни реп на месту трећег *Ig-like* домена, док је ST2LV солубилна N-гликозилисана изоформа којој недостаје трансмембрански домен присутан у ST2L (344,345,346). ST2L заједно са IL-1RAcP образује хетеродимерни трансмембрански рецепторски комплекс којим се покреће трансдукција сигнала и то након везивања IL-33, док sST2 функционише као рецептор "мамац" за који се везује екстрацелуларни IL-33 (343,347). Улога ST2V и ST2LV није у потпуности разјашњена (323). Експресију гена за IL1RL1 регулишу транскрипциони фактори GATA1 и GATA2, док EREs (енгл. *Estrogen-Response Elements*) регулишу експресију ST2L и sST2 (343,348,349). Транскрипција ове две изоформе може настати са оба промотера, а да ли ће транскрипција започети са проксималног или дисталног промотера зависи од типа ћелија (348).

Приликом ћелијског оштећења, ослабођени IL-33 својим С-терминалним доменом се везује за рецептор ST2L што индукује конформационе промене које му омогућују интеракцију са IL-1RAcP и последично формирање хетеродимерног рецепторског комплекса на ћелијској мембрани (329). Оваквом хетеродимеризацијом се спајају интрацелуларни домени два трансмембранска протеина што иницира регрутовање адаптерских молекула укључених у трансдукцију сигнала (323). Адаптерски молекули који учествују у пренос сигнала су MyD88 (енгл. *Myeloid Differentiation Primary Response 88*), IRAK (енгл. *IL-1 Receptor-Associated Kinase*)-1, IRAK-4 и TRAF6 (енгл. *TNF Receptor Associated Factor 6*) (307,350). Покретањем сигналне каскаде индукује се деградација инхибиционог протеина I $\kappa$ B што ослобађа и активира транскрипциони фактор NF- $\kappa$ B (313). Додатно, покретање сигналног пута који укључује MAP киназу p38, JNK (енгл. *c-Jun N-terminal Kinase*) и ERK (енгл. *Extracellular signal-Regulated Kinase*) резултује активацијом транскрипционог фактора AP-1 (енгл. *Activator Protein-1*) (313). У коначном исходу IL-33 остварује многобројне ефекте тако што активира многе транскрипционе факторе и на тај начин регулише експресију цитокина и хемокина којима делује на бројне ћелије. Супротно, молекул SIGIRR (енгл. *Single Ig IL-1-Related Receptor*) инхибира сигнални пут IL-33/ST2 тако што ремети димеризацију рецептора ST2 и IL-1RAcP (351). У инхибицији овог сигналног пута учествују и убиквитин-протеазомски систем који разграђује молекул ST2 (352).

IL-33 је повећано експримиран у једру епителних и ендотелних ћелија, у ћелијама сличним фибробластима и миофибробластима, како током хомеостазе тако и у запаљењским условима (308,353). Захваљујући експресији у ендотелним ћелијама



крвних судова, као и у ћелијама бројних епителних баријера изложене спољашњим утицајима, IL-33 је присутан у готово свим ткивима (308,354). У случају ткивног оштећења и у инфламацијској средини, експресија IL-33 у ткиву се значајно повећава (313). Ћелије имунског система које конститутивно експримирају молекулу ST2 су главна мета деловања IL-33 (313,339). IL-33 је битан имунорегулатор који остварује плејотропну активност како у урођеном тако и у стеченом имунском одговору. Генерално, IL-33 првенствено поларизује тип 2 ћелија имунског одговора као што су мастоцити, еозинофили, базофили, урођене лимфоидне ћелије типа II (енгл. *Type 2 Innate Lymphoid Cells*, ILC2s) и T<sub>h</sub>2 лимфоцити, као и имуносупресивне ћелије укључујући регулаторне Т лимфоците и MDSCs (317,339,355). IL-33 стимулише пролиферацију и преживљавање мијелоидних и лимфоидних ћелија, усмерава њихову миграцију и узрокује продукцију T<sub>h</sub>2 цитокина, пре свега IL-5 и IL-13 (339,356). Међутим, у одговарајућем цитокинском миљеу и инфламацијским условима, експресија ST2 молекула на ћелијама имунског система се мења тако што се индукује експресија овог рецептора и на другим ћелијама као што су NK ћелије, T<sub>h</sub>1 и CD8<sup>+</sup>T лимфоцити (317,339). Ово резултује тиме да IL-33 индукује конверзију типа 2 у тип 1 имунског одговора у коме главну улогу играју ефекторске ћелије NK ћелије, T<sub>h</sub>1 и CD8<sup>+</sup>T лимфоцити, као и ефекторски цитокини TNF и IFN- $\gamma$  (357,358,359,360).

Стога, чини се да сложене интеракције ћелија имунског система, као и експресија IL-33 и његовог рецептора у различитим ћелијама и ткивима утичу на комплексну функцију IL-33 у бројним инфламацијским, аутоимунским и инфективним обољењима.

### 1.3.2. Улога IL-33 у биологији и терапији тумора

Подаци из литературе, имплицирају да IL-33 игра сложену улогу у генези, прогресији и контроли тумора. Претпоставља се да у неким условима IL-33 учествује у креирању одговарајућег микроокружења и тиме доприноси не само развоју већ фаворизује раст и прогресију тумора, док у другим специфичним околностима генерише оптималан имунски одговор против тумора који би чак могао да се искористи за побољшање ефикасности имунотерапије (361,362).

Постоје бројни докази у литератури који потврђују да IL-33 игра важну улогу у настанку тумора. Тако IL-33, као алармин, ослобађен током запаљења панкреаса, покреће активацију протоонкогена *KRAS* (енгл. *Kirsten Ras*) што представља рани епигенетски механизам малигне трансформације ћелије (363). У хуманом карциному желуца показано је да IL-33 игра важну улогу како у регулацији ћелијског циклуса тако и у пролиферацији и на тај начин додатно доприноси генези тумора (364). Уз то, IL-33 подстиче развој карцинома желуца тако што инхибира апоптозу туморских ћелија (364). Аберантна експресија IL-33 у хепатоцитима је повезана са онкогенезом и прогресијом хепатоцелуларног карцинома (365). Документовано је да IL-33 стимулише експресију IL-6 и тако утиче на развој мишјег холангиокарцинома (366). Појачана експресија IL-33 резултује транзицијом гастроэзофагеалне рефлуксне болести у езофагусни аденокарцином (367). *Maywald* и сарадници описали су да IL-33 подстиче формирање интестиналног полипа (аденома) и следствено колоректалног карцинома код *Arc*<sup>Min/+</sup> мишева са тачкастом мутацијом тумор-супресорског гена *Arc* (енгл. *Adenomatous polyposis coli*) (368). Наиме, аутори сугеришу на то да IL-33 индукује координисану активацију ћелија строме и на тај начин доприноси креирању протуморског микроокружења (368). IL-33 такође може да генерише туморогену нишу која има способност да се аутоамплификује што коначно резултује насцентним тумором.

На моделу карцинома сквамозних ћелија, показано је да када се ћелије малигно трансформишу, оне стичу туморогени капацитет и овакве ћелије су означене као ћелије које иницирају тумор (369). Ћелије које иницирају тумор луче IL-33 који заузврат изазива инфилтрацију тумор- асоцираних макрофага и стимулишу сигнални пут TGF- $\beta$  што последично омогућује стварање туморогене нише (369). Новија истраживања указују на то да IL-33 повећава експресију протеина Vcl-2 и истовремено инхибира експресију молекула Вах, па тако у коначном исходу супримира апоптозу у ћелијама остеосаркома (370). Антиапоптотски ефекат IL-33 се огледа и у појачаној активацији протеина p38 MAPK сигналног пута и транскрипционог фактора NF- $\kappa$ B у ћелијама акутне мијелобластне леукемије (371). Конститутивна експресија IL-33 индукује активацију транскрипционог фактора NF- $\kappa$ B и сигналног пута MAPK што резултује продукцијом цитокина и фактора раста, укључених у развој хроничне мијелоидне леукемије (372). *Larsen* и сарадници сугеришу да сигнални пут IL-33/ST2 индукује повећану активност протоонкогена, ремети контролу ћелијског циклуса и апоптозе, а и покреће секрецију цитокина који утичу на критичне елементе канцерогенезе укључујући ћелијско преживљавање, раст, неоангиогенезу, инвазивност, метастазирање и имунски надзор (323).

У бројним студијама је регистрована повишена концентрација молекула IL-33 и sST2 у серуму пацијената оболелих од карцинома желуца и дојке, као и хепатоцелуларног карцинома и карцинома главе и врата (373,374,375,376). Ћелијски извор IL-33 су туморске ћелије и ћелије строге (313). IL-33 је мултифункционални протеин који подстиче прогресију тумора на више начина: утиче на метаболизам туморских ћелија, повећава инвазивност тумора, стимулише неоангиогенезу и учествује у ремодовању микросредине што све заједно олакшава метастазирање тумора. IL-33 подстиче пролиферацију ћелија карцинома дојке и то фосфорилацијом COT протеина (енгл. *Cancer Osaka Thyroid*) којом се покреће каскадна активација бројних сигналних путева што резултује повећаном експресијом транскрипционих фактора AP-1 и STAT3 (377). Експресија sST2 доприноси повећаном мотилитету ћелија карцинома дојке на тај начин што повећава експресију рецептора ErbB2 (378). У серуму пацијената са карциномом дојке регистрована је повишена концентрација IL-33 и sST2 која корелира са повећаном концентрацијом молекула VEGF, и MMP-11 и PDGF-C (енгл. *Platelet Derived Growth Factor-C*) важних у процесима ангиогенезе и метастазирања, што све скупа указује на лошу прогнозу болести (379). На моделу мишјег карцинома дојке детектовано је да сигнални пут ST2/IL-33 фацитира раст тумора тако што повећава експресију VEGF и тиме подстиче ангиогенезу и следствено пригушује некрозу тумора (380). Показано је да је IL-33 укључен не само у процес транзиције хуманог аденома у колоректални карцином, већ и у прогресију тумора тако што стимулише ангиогенезу и метастазирање, а учествује и у ремодовању туморске микросредине (381,382,383). IL-33 индукује преузимање глукозе у неситноћелијском карциному плућа а истовремено креира и имуносупресивну туморску микросредину, што све заједно поспешује бржи раст и метастазирање тумора (384,385). Код пацијената оболелих од сквамозног карцинома главе и врата примећено је да фибробласти туморске строге продукују IL-33 који онда у туморским ћелијама покреће програм транзиције епитела у мезенхим и тиме подстиче њихову миграцију и метастазирање (386). IL-33, заједно са дугом некодирајућом RНК, репрограмира нормалне у канцер-асоциране фибробласте и тиме обликује протуморску микросредину, што подстиче прогресију оралног сквамозног карцинома (387). IL-33 повећава агресивност карцинома језика на сличан начин, ремодовањем туморске микросредине и стимулацијом неоангиогенезе (375). Активацијом MAPK сигналног пута, IL-33 подстиче раст и метастазирање ћелија карцинома јажника (388).

Експресија IL-33 у туморском ткиву повезана је са лошијом прогнозом оболелих од глиобластома (389). Стимулација миграције микроглије у туморску микросредину је потенцијални механизам којим IL-33 подстиче прогресију глиома (390). Показано је да IL-33, пореклом из ћелија строме, подстиче продукцију цитокина и фактора раста којима поспешује пролиферативну способност малигно измењених ћелија мијелоидне лозе (391). Слично је примећено да IL-33 подстиче и пролиферацију прогениторских CD34<sup>+</sup> ћелија изолованих из пацијената са хроничном мијелоидном леукемијом (392). Такође, IL-33 повећава миграцију и инвазивност ћелија хуманог меланома A375 *in vitro* тако што стимулише синтезу ензима MMP-2 и MMP-9 (393).

Одавно је утврђено да хронична инфламација може да буде један од важних покретача онкогенезе код многих врста тумора. Екосферу кутаног меланома чине инфламација и туморска микросредина, где се претпоставља да запаљење у туморској микросредини може да убрза епигенетске промене, као и промене у компонентама туморске микросредине, што све заједно подстиче развој тумора (394,395). Неке студије указују на то да IL-33 игра важну улогу у тумор-асоцираној инфламацији (309,396). Сматра се да IL-33 може да подстакне прогресију тумора на тај начин што модулира урођени и стечени имунски одговор. Узимајући у обзир налаз да је генска делеција рецептора ST2 повезана са повећаном цитотоксичком активношћу NK ћелија и појачаним T<sub>H</sub>1 и T<sub>H</sub>17 имунским одговором, чини се да је сигнални пут ST2/IL-33 укључен како у прогресију раста и тако и у метастазирању мишјег карцинома дојке (397). Уз то, IL-33 индукује акумулацију имуносупресивних ћелија у туморској микросредини и повећава густину крвних судова и тако додатно доприноси прогресији ове врсте тумора (398). У хуманом карциному панкреаса, IL-33 делује као важан медијатор инфламације који подстиче канцерогенезу и то тако што стимулише продукцију цитокина IL-6 и IL-8 (399). Примећено је да IL-33 подстиче пролиферацију холангиоцита на тај начин што активира ILC2s да продукују IL-13 који заузврат стимулише хиперплазију холангиоцита (400). IL-33, кога продукују туморске ћелије, сматра се одговорним за акумулацију MDSCs у туморској микросредини што последично убрзава раст и инвазивност, а и повећава ангиогени и метастатски потенцијал колоректалног карцинома (401). Протуморски ефекат IL-33 у колоректалном карциному се огледа и у томе што подстиче експанзију регулаторних Т лимфоцита, продукцију цитокина T<sub>H</sub>2 типа, као и алтернативну активацију макрофага (402). Епителне ћелије слузнице желуца реагују на ткивно оштећење тако што ослобађају IL-33 којим се стимулишу ILC2s да продукују IL-13 (403). IL-13 покреће алтернативну активацију макрофага који заузврат додатно секретују IL-33 што чини зачарани круг хроничне инфламације која на крају може индуковати ћелијску метаплазију желуца (403,404). На моделу мишјег тумора пљувачних жлезда показано је да макрофаги индукују продукцију IL-33 у туморским ћелијама који их онда чини резистентним на цитотоксичност NK ћелија (405). UV зраци индукују експресију IL-33 у кератиноцитима епидерма и у фибробластима дерма што је у корелацији са улогом IL-33 као ткивног алармина ослобођеног током инфламације изазване радијацијом (406). Примена IL-33 супримира T<sub>H</sub>1 имунски одговор у кожи мишева, док је повећана експресија IL-33 регистрована у ћелијама сквамозелуларног карцинома коже (406). Показано је да IL-33 подстиче развој и метастазирање карцинома једњака тако што стимулише акумулацију регулаторних Т лимфоцита у туморској микросредини (407). Свој имуносупресивни ефекат IL-33 остварује и на тај начин што утиче на функционалну стабилност регулаторних Т лимфоцита у примарном тумору B16-F10 варијанте меланома (408). Активацијом ILC2s IL-33 супримира цитолитичку способност NK ћелија и тиме додатно омета ефикасност имунског одговора против меланома (409).

Супротно претходним налазима у литератури постоје тврдње о антитуморској улози IL-33 и потенцијалној могућности његове примене у имунотерапији тумора. Показано је да инфилтрација ефекторских меморијских CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита који продукују IL-33 у туморску микросредину је повезана са дужим преживљавањем оболелих од хепатоцелуларног карцинома (410). Штавише, смањена експресија IL-33 је у тесној вези са лошијом прогнозом код пацијената са аденокарциномом плућа, што јасно указује на важну улогу овог цитокина у туморском имунском надзору (411). Сигнални пут IL-33/ST2 супримира раст карцинома колона тако што повећава инфилтрацију макрофага у тумор (412). На моделу мишјег карцинома колона показано је да IL-33 свој антитуморски ефекат остварује и активацијом CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита (413). Такође, IL-33 игра важну улогу у развоју снажног антитуморског имунског одговора и то тако што повећава експресију антигена на туморским ћелијама (414). Примећено је да се током метастатске транзиције експресија IL-33 смањује што малигним ћелијама омогућава да избегну ефикасан тумор-специфичан имунски одговор (414). Експресија IL-33 се прогресивно смањује и током трафорације неинвазивног дукаталног карцинома дојке *in situ* у инвазивни агресивни фенотип (415). У случају цервикалног карцинома такође је регистрована смањена експресија IL-33 што је у складу са даљом прогресијом болести (416,417). Документовано је да алармин IL-33 служи као адјуванс који када се примени заједно са вакцином која садржи DNK HPV (енгл. *Human Papilloma Virus*) узрокује регресију малигнома, а што је резултат активације тумор-специфичних CD8<sup>+</sup> и T<sub>h</sub>1 лимфоцита (418). Системском активацијом и локалним регрутовањем НК ћелија, IL-33 индукује потентан антитуморски имунски одговор који код карцинома дојке супримира успостављање метастаза у плућима (419). На моделу мишјег лимфома показано је да IL-33 превенира раст тумора и то активацијом  $\gamma\delta$ Т лимфоцита (420,421). Ектопична експресија IL-33 у ћелијама В16-F10 варијанте мишјег меланома за последицу има смањен раст примарног тумора тако што активира ILC2s који играју критичну улогу у масовној апоптози туморских ћелија (422). Код мишева третираних са анти-PD-1 антителом, IL-33, ектопично експримиран у туморским ћелијама, такође подстиче ефикасан антитуморски T<sub>h</sub>1 имунски одговор (423). Показано је да IL-33 смањује процентуалну заступљеност имуносупресивних ћелија, MDSCs и регулаторних Т лимфоцита, и истовремено подстиче инфилтрацију CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у примарни меланом В16-F1 ћелијске варијанте (424). Додатно, у меланому IL-33 директно активира туморицидне еозинофиле и то тако што у њима повећава експресију маркера активације CD69, адхезивних молекула ICAM-1 и CD11b/CD18, као и дегранулационог маркера CD63 (425). Интересанто је да IL-33, када је повећано ослобођен из туморских ћелија функционише као ткивни алармин и активира снажан антитуморски имунски одговор, док његова смањена експресија резултује имунском толеранцијом и следствено прогресијом малигне болести (309,426).

Из свега наведеног очигледно је да је улога IL-33 у тумору изузетно комплексна и није још увек у потпуности разјашњена. Планираним истраживањем требало би да се одговори на питање какви су ефекти системске апликације IL-33 у зависности од метастатског потенцијала и стадијума мишјег меланома у циљу да се додатно евалуира његова потенцијална системска примена у терапији меланома.

## 2. ЦИЉ РАДА

Главни циљ истраживања је да се испитају ефекти системске апликације IL-33 на прогресију мишјег меланома, као и на модулацију имунског одговора против меланома. На основу налаза актуелне студије додатно би се евалуирала потенцијална системска примена IL-33 у терапији меланома.

У складу са главним циљем дефинисани су следећи експериментални задаци:

1. Испитати утицај IL-33 на појаву и раст примарног меланома
2. Одредити утицај IL-33 на учесталост, број и раст метастатских колонија у плућима
3. Испитати експресију IL-33 и ST2 на нивоу гена у малигним меланоцитима B16-F1 након њиховог излагања IL-33
4. Анализирати експресију протеина IL-33 и ST2 у туморским ћелијама и ћелијама имунског система у примарном тумору, као и у метастазама након апликације IL-33
5. Утврдити потенцијалну везу између концентрације IL-33 у серуму пацијената и стадијума меланома
6. Procenити ефекат IL-33 на модулацију имунског одговора у метастатском ткиву плућа анализом:
  - заступљености мононуклеарних и полиморфонуклеарних леукоцита
  - фенотипских и функционалних карактеристика инфилтришућих леукоцита
  - цитотоксичког капацитета CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита
  - процентуалне заступљености и функционалног фенотипа имуносупресивних ћелија
7. Испититати утицај IL-33 на имуногеност B16-F1 ћелија
8. Утврдити утицај IL-33 на цитокински миље у метастатској микросредини плућа.

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1. Лабораторијске животиње

Истраживање је спроведено на мишевима чистог соја C57BL/6 (енгл. *wild type*). Овакви мишеви су одгајани у стандардним условима у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. У појединачним експериментима коришћене су животиње оба пола и старости 8 до 10 недеља, али усклађеног пола и старости (разлика у старости није била већа од 7 дана) између испитиваних група.

У актуелној студији су све експерименталне процедуре на животињама спроведене уз одобрење Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (бр. одлуке 01-2588).

#### 3.2. Линије ћелија мишјег меланома

У студији су коришћени варијетети мишјег меланома B16-F1 (ATCC CRL-6323) и B16-F10 (ATCC CRL-6475) произвођача *American Type Culture Collection*, ATCC, Manassas, USA. Туморске ћелије B16-F1 и B16-F10 су узгајане у асептичним условима, у пластичним T<sub>25</sub> фласковима (BD Falcon) на температури 37°C и у присуству 5% CO<sub>2</sub>. За култивацију ћелија коришћен је медијум DMEM (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) у који је додато 10% FBS (енгл. *Fetal Bovine Serum*), 2mmol/l L-глутамин, 1mmol/l penicillin/streptomycin и 1mmol/l неесенцијалних масних киселина (PAA Laboratories GmbH). Периодичним пресејавањем одржавана је субконфлуентност ћелија односно једнослојна ћелијска прекривеност ~80% површине флашка.

За инокулацију туморских ћелија у мишеве адхерентне ћелије су најпре одвојене са дна флашка тако што су пар минута третиране 0.25% трипсином и хелатором 0.02% EDTA (енгл. *Etilen-Diamin-Tetraacetat*, PAA Laboratories GmbH) који су растворени у фосфатном сланом пуферу (енгл. *Phosphate Buffered Saline*, PBS, PAA Laboratories GmbH). У циљу неутралисања трипсина, ћелије су ресуспендоване у 8ml DMEM-а са додатком 10% FBS-а, након чега су 10 минута центрифугиране на 125G. Након центрифугирања одливен је супернатант и ћелије су ресуспендоване у медијуму. Вијабилност ћелија је одређивана виталним бојењем помоћу *trypan-blue*, а у свим појединачним експериментима коришћена је само она ћелијска суспензија са ≥95% вијабилних туморских ћелија.

#### 3.3. Модел трансплантације примарног меланома

Примарни меланом трансплантиран је у дорзални лумбосакрални регион мишева тако што су им субкутано убризгане туморске ћелије B16-F1 и B16-F10 у дози од  $0.8 \times 10^6$  ћелија у 200μl DMEM-а (161). Појава и раст палпабилног примарног тумора праћена је свакодневно до 29. дана од убризгавања малигних меланоцита тако што је величина тумора морфометријски одређивана помоћу калипера.

Површина примарног меланома је израчуната према формули (427):

$$\text{Површина тумора (mm}^2\text{)} = \mathbf{L}(\text{највећи пречник тумора}) \times \mathbf{W}(\text{најмањи пречник тумора})$$

На крају експеримента мишеви су жртвовани, а затим су тумори хируршки уклоњени и измерена је њихова маса. Онда је ткиво тумора рутински обрађено,

односно фиксирано формалином и укалупљено у парафин за каснију имунохистохемијску анализу.

### **3.4. Модел експерименталних метастаза**

За успостављање експерименталних метастаза суспензија туморских ћелија је припремљена према претходно описаном протоколу (поглавље 3.2.). Експерименталне метастазе су индуковане тако што су малигне ћелије убризгане у латералну репну вену мишева, најпре у већој дози од  $0.3 \times 10^6$  ћелија В16-Ф1 и В16-Ф10 у 200 $\mu$ l DMEM-а, а која је наведена у претходним истраживањима (161). Затим, како би се што приближније имитирали природни услови дисеминације туморских ћелија, у наредним експериментима је за успостављање експерименталних метастаза коришћен много мањи број туморских ћелија ( $0.5 \times 10^5$  ћелија В16-Ф1/200 $\mu$ l DMEM) који је оптимизован у ранијој студији (85).

### **3.5. Апликација мишјег рекомбинантног IL-33**

У циљу испитивања ефеката системске и локалне апликације IL-33 на примарни раст и метастазирање мишјег меланома, мишеви су, након убризгавања туморских ћелија, методом случајног узорка распоређени у следеће експерименталне и контролне групе:

- I група: мишеви са примарним меланомом/метастазама којима је апликован IL-33
- II група: мишеви са примарним меланомом/метастазама којима је убризгаван PBS
- III група: мишеви који нису третираны туморским ћелијама, а којима је апликован IL-33
- IV група: мишеви који нису третираны туморским ћелијама, а којима је убризгаван PBS

У актуелној студији коришћен је мишји рекомбинантни IL-33 (eBioscience, San Diego, CA, USA) који је у различитим дозама апликован на два начина, интраперитонеално и интраназално.

За евалуацију ефеката системске апликације IL-33 на раст и метастазирање мишјег меланома, мишевима са примарним меланомом/метастазама је убризгаван рекомбинантни IL-33 интраперитонеално у дози 0.4 $\mu$ l/100 $\mu$ l PBS и то од нултог дана експеримента, сваки други дан, укупно у 5 доза (161). У зависности од модела болести мишеви су жртвовани 29-ог или 18-ог дана од инокулације туморских ћелија.

У циљу испитивања ефеката локалне апликације IL-33 на метастазирање мишјег меланома, мишеви са метастазама су били подрвгнути третману IL-33 у дози од 2 $\mu$ g у 20 $\mu$ l PBS-а. Овај локални третман састојао се од 4 интраназалне инстилације IL-33: 3 узастопна дана пре, и 6. дан након инокулације туморских ћелија (161). Мишеви су жртвовани 19-ог дана након инокулације туморских ћелија (161).

### **3.6. Патохистолошка верификација присуства метастаза**

Жртвовање мишева је обављено у атмосфери засићеној диетилетром (Beta Нем, Београд). Мишевима су изоловани плућа и јетра који су затим фиксирани у 4% формалину и укалупљени у парафин. Након парафинизације, узорци ткива су сечени

микротомом на серијске пресеке дебљине 5-10 $\mu$ m. Патохистолошка анализа урађена је на ткивним пресецима са пет нивоа тако што је од сваког миша анализирано по 5 ткивних исечка и то сваки 3. ткивни пресек.

Парафински ткивни исечци бојени су методом хематоксилин-еозин (енгл. *Hematoxylin-eosin*) по *Heidenhain*-у, сагласно са препорукама *Gurr*-а (428,429). Најпре су плочице са ткивним пресецима плућа пуферисане десетак секунди у пуферу формаледехида, након чега су опране у текућој води и потопљене у *Mayer*-ов хематоксилин (Merck) пар минута. Након краткотрајног испирања у текућој води, исечци су минут третирани алкохолним еозином (Merck). Затим је уследила дехидратација исечка тако што су исечци краткотрајно потапани у серију растућих концентрација алкохола и то најпре у 85% алкохолу, затим 2 пута у 96% алкохолу и на крају 2 пута у апсолутном алкохолу. У циљу просветљавања исечци су по 50 секунди потапани најпре у мешавину ксилола и алкохола у односу 1:1, а затим два пута у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет Канада балзам (енгл. *Canada balsam*, Centrophem, Србија) и исечци су прекривени покровним стаклима. Након сушења у трајању од 24 часа, препарати су анализирани под светлосним микроскопом.

Метастатске колоније су и макроскопски верификоване у плућима на основу карактеристичне браон-црне пигментације. Од изолованих органа (плућа и јетре) присуство метастаза је патохистолошки доказано само у плућима. Наиме, под светлосним микроскопом утврђен је број метастаза анализом 5 пресека ткива по мишу на увећању 400X и то на основу присуства метастатских лезија са увећаним вишеједарним ћелијама које су јасно демаркиране од околног плућног ткива. Величина метастаза је одређена помоћу програма *ImageJ* при чему су у оквиру сваке испитиване групе мишева анализирани само они пресеци ткива са највећом површином метастаза (430). Добијени резултати су приказани као средња вредност $\pm$ стандардна грешка.

### **3.7. Имунохистохемијска анализа експресије IL-33 и ST2 у лезијама примарног меланома и метастаза**

Укратко, методом имунохистохемије је према препорученом протоколу испитивана експресија IL-33 и ST2 у парафинским ткивним пресецима примарног тумора и плућа са метастазама тако што су коришћена моноклонска антимишја антитела специфична за молекуле IL-33 (sc-98660, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) и ST2 (PA5-20077, Thermo Fisher Scientific Inc.). Експресија наведених молекула у ткиву затим је визуализована коришћењем одговарајућег кита *Rabbit specific HRP/AEC (ABC) Detection IHC Kit* (ab64260, Abcam, Cambridge, UK).

Наиме, најпре је изведена депарафинизација ткивних исечка тако што су предметна стакла потопљена 2 пута по 5 минута у ксилолу, а онда у серији алкохола опадајућих концентрација и то 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, а затим по 5 минута у 96%, 70% и 50% алкохолу и на крају у дестилованој води. За демаскирање у формалину умрежених епитопа коришћен је цитратни пуфер рН=6.0 у коме су исечци ткива загревани двадесетак минута у микроталасној пећници на 800W. Након хлађења ткивни исечци су екстензивно испирани најпре у дестилованој води а затим у PBS-у. У циљу пермеабилитације ткивних исечка, препарати су потопљени у расхлађеном ацетону. Након испирања у PBS-у, најпре је блокирана активност ендogene прексидазе тако што је на исечке ткива нането пар капи *Hydrogen Peroxide Block*-а. Након инкубације препарати су поново испирани у PBS-у, а затим је на њих нането неколико капи *Protein Block*-а којим се спречава позадинско бојење. После инкубације и испирања, на ткивне исечке је нането одговарајуће примарно антитело а затим је



уследила њихова инкубација у влажној комори пар сати на собној температури. Након испирања, ткивни исечци на којима је нането секундарно антителио (*Rabbit Specific HRP Conjugate*) су инкубирани у влажној комори. После троструког испирања у PBS-у, на ткивне исечке је нанета *Streptavidin Peroxidase*-а и инкубирани су десетак минута на собној температури. Уследило је поновно испирање у PBS-у, а затим су ткивни исечци инкубирани десетак минута са субстратом *AEC Single Solution*. На крају, после троструког испирања, ткивни исечци су обојени хематоксилином и онда интензивно испрани текућом водом. Обојени исечци су прекривени једном капи глицерола и покровном љуспицом.

Под светлосним микроскопом (*Olympus BX51, Japan*) одређен је проценат или број туморских ћелија/ћелија имунског система које исказују IL-33 и ST2 у примарном тумору и метастазама и то бројањем у пет поља по пресеку, на увећању 400X. Добијени резултати су приказани као средња вредност±стандардна девијација.

### 3.8. Изолација леукоцита из плућа

Након хируршке ресекције, урађена је перфузија плућа мишева свих испитиваних група. Онда је ткиво подвргнуто механичкој и ензимској обради тако што је најпре уситњено, а затим инкубирано у медијуму за ензимску дигестију који садржи 1mg/ml колагеназе I, 1mM EDTA и 2% FBS. Након двочасовне инкубације на 37°C уз мешање на 150rpm, додато је 10ml претходно загрејаног 0.25% трипсина и инкубирано пар минута. Затим је уследила инкубација у ензиму DN-аза I, на температури од 37°C уз мешање на 150rpm. На крају, после истека инкубације и додавања медијума, ћелијска суспензија је пропуштена кроз ћелијско сито.

Вијабилност ћелија процењена је помоћу *trypan-blue*-а, а у свим појединачним експериментима коришћена је само она суспензија ћелија са вијабилношћу већом од 95%. Добијена суспензија појединачних ћелија коришћена је у даљим испитивањима и то за фенотипску и функционалну анализу инфилтришућих леукоцита проточном цитометријом и за магнетну сепарацију CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита.

### 3.9. Анализа фенотипских и функционалних карактеристика леукоцита проточном цитометријом

Фенотип и функционални статус различитих популација ћелија екстрахованих из плућа према претходно описаном протоколу (поглавље 3.9) је дефинисан бојењем одговарајућих мембранских и интрацелуларних маркера.

Поступак бојења мембранских маркера спроведен је према стандардном протоколу. Наиме,  $1 \times 10^5$  ћелија ресуспендованих у 50µl пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*, BD Biosciences) инкубирано је са антимишијим моноклонским антителима специфичним за Siglec-F, CD11b, Ly6G, CD3, CD8, CD4, PD-1, CD69, KLRG-1, CTLA-4, CD11c, МНСII, CD80, Gr-1, NKp46 и CD49b (BD Biosciences/Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany/Biolegend, San Diego, CA, USA/Invitrogen). Другим речима, конјугована примарна моноклонска антителиа обележена различитим флуоресцентним бојама додата су на  $1 \times 10^5$  ћелија које су претходно ресуспендоване у 50µl пуфера за бојење. Испитивана суспензија појединачних ћелија је такође инкубирана и са одговарајућим изотипским контролама. Инкубација је обављена у мраку на температури од +4°C у трајању од 20 минута. После истека инкубације, уследио је поступак испирања тако што су ћелије, у 1.5ml хладног пуфера за бојење, центрифугиране на 400G. Онда је супернатант одливен, а затим је пелет ћелија

ресуспендован у 350 $\mu$ l пуфера за бојење. Овако обојене ћелије анализиране су проточном цитометријом на апарату *FACSCalibur* (BD Biosciences). Добијени подаци су обрађени коришћењем софтверског програма *FlowJo* (Tree Star).

За интрацелуларно бојење цитокина и транскрипционих фактора од интереса у овој студији примењена је *BD Cytofix/CytoPerm<sup>TM</sup>* метода. Поликлонски активатор форбол 12-миристат 13-ацетат (енгл. *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*, РМА, Sigma) и јонофор јономицин (енгл. *Ionomycin*, Sigma) су коришћени за стимулацију  $1 \times 10^6$  ћелија. Наиме, додавањем РМА и јономицина, активира се протеин киназа С (енгл. *Protein Kinase C*) и покреће се инфлукс јона калцијума чиме се у ћелијама које су претходно активирани физиолошким стимулусима индукује експресија цитокина (431). Познато је да за индукцију транскрипције цитокина оптимално време инкубације ћелија са РМА и јономицином око 4-6 часова, а дужа инкубација резултује интензивним цитопатогеним ефектом на овако третираним ћелијама. Уз то, коришћењем инхибитора *BD GolgiStop<sup>TM</sup>* (садржи моненсин) и *BD GolgiPlug<sup>TM</sup>* (садржи брефелдин А) блокира се интрацелуларни транспорт протеина што за последицу има акумулацију цитокина у ендоплазматском ретикулуму или Голџи комплексу и тиме се последично повећава могућност њихове детекције.

По истеку стимулације, ћелије су центрифугиране, а онда ресуспендоване у пуферу за бојење. Уследила је инкубација ћелија са антителима специфичним за одговарајуће површинске маркере према претходно описаној процедури. Касније, ћелије су фиксиране и пермебализоване коришћењем раствора *Cytofix/CytoPerm<sup>TM</sup>* (BD Pharmingen) у коме су инкубирани 20 минута на температури +4°C. Затим су ћелије опране у пуферу *Perm/Wash<sup>TM</sup>* (BD Pharmingen) и центрифугиране на 400G. За интрацелуларно бојење, пелет ћелија ресуспендован је у 50 $\mu$ l пуфера *Perm/Wash<sup>TM</sup>*. а онда су додата конјугована антимишја моноклонска антитела специфична за цитокине, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и IL-10, као и транскрипциони фактор FoxP3 (BD Biosciences/Miltenyi Biotec GmbH). Суспензија ћелија екстрахованих из плућа инкубирана је и са одговарајућим изотипским контролама. Након инкубације у трајању 30 минута на +4°C у мраку, ћелије су опране у пуферу *Perm/Wash<sup>TM</sup>*. После центрифугирања, пелет ћелија је ресуспендован у 350 $\mu$ l пуфера за бојење. Након спроведеног бојења, ћелије су анализиране на проточном цитометру, а онда су добијени подаци обрађени помоћу претходно поменутог софтверског програма.

### 3.10. Магнетна сепарација CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита из плућа

За издвајање CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита из плућа мишева са метастазама коришћен је одговарајући магнетни сепарациони кит *CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA). Генерално, овај принцип магнетне сепарације заснован је на негативној селекцији CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита помоћу магнетних куглица, при чему принос необележених циљаних ћелија био је изузетно висок.

Први корак у сепарацији цитотоксичких Т лимфоцита је изолација леукоцита из ткива плућа према претходно описаној процедури (3.6.). Након изолације,  $1 \times 10^7$  ћелија ресуспендовано је у 40 $\mu$ l пуфера (*Buffer* садржи PBS, pH 7.2, 0,5% BSA и 2 mM EDTA). Затим је додато 10 $\mu$ l коктела антитела обележених биотином. Наиме, овакав коктел антитела садржи антимишја анти-CD4, анти-CD11b, анти-CD11c, анти-CD19, анти-CD45R (B220), анти-CD49b (DX5), анти-CD105, анти-МНС Class II, анти-Тег-119 и анти-TCR $\gamma/\delta$  антитела помоћу којих се најпре битоинном обележавају нежељене различите популације ћелија како би се у наредном кораку елиминисале из ћелијске суспензије. Ћелије са коктелом антитела су добро промешане и инкубирани 20 минута

на температури од +4°C. После истека инкубације, додато је 30µl пуфера и 20µl антибиотин *MicroBeads* (анти-биотин антителиа конјугована са магнетним куглицама) и уследила је наредна инкубација 10 минута у фрижидеру на температури од +4°C. По истеку инкубације, ћелије су ресуспендоване у 500µl пуфера. Затим су ћелије, претходно инкубирани са магнетним куглицама, постепено пропуштене кроз *LS* колоне које су претходно пласиране у магнетно поље MACS магнетног сепаратора. Онда је додато 5ml пуфера у колону и у магнетном пољу благим гурањем клипа инјекционог шприца кроз колону потиснути су CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити који су неообележени магнетним куглицама. На овај начин у финалном кораку, у епрувету за колекцију негативном селекцијом су сакупљени CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити. Пре коришћења за тест цитотоксичности, овако добијеним свежим ефекторским CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима најпре је проверена вијабилност.

### 3.11. Испитивање цитотоксичког капацитета CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита

На апарату *Roche xCELLigence RTCA (Real-Time Cell Analyzer) DP (Dual Plate) Instrument* (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) одређиван је цитотоксички потенцијал CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита код мишева са меланомом који су третирани са IL-33 или PBS-ом. Првог дана су засејане таргет ћелије, односно туморске ћелије B16-F1 (10<sup>4</sup> ћелија по бунару) у плочу са златним нитима. После 34 часа додате су ефекторске ћелије (CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити) тако да је однос циљаних (таргет):ефекторских ћелија био 1:10. Наредних 48 часова је праћен ћелијски индекс циљаних туморских ћелија.

Процент цитоллизе је израчунат према формули (432):

$$\text{Процент цитоллизе} = \left( \frac{\text{ћелијски индекс таргет ћелија без ефекторских ћелија} - \text{ћелијски индекс таргет ћелија инкубираних са ефекторским ћелијама}}{\text{ћелијски индекс таргет ћелија без ефекторских ћелија}} \right) \times 100$$

### 3.12. Метод Real-time PCR за квантификацију експресије гена

Експресија информационе RNK (iRNK) за синтезу IL-33 и ST2, као и процена имуногености ћелијског варијетета меланома B16-F1 на основу експресије iRNK за MHC1 и TAP1, анализирана је методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену (енгл. *quantitative Real Time-PCR*, qRT-PCR).

Укупна RNK је најпре екстрахована из ћелија B16-F1 које су претходно 48 часова инкубирани са 200ng/ml IL-33, као и из нетретираних туморских ћелија. Свака испитивана група имала је по 6 независних узорака. У овим туморским ћелијама је коришћењем одговарајућих прајмера анализирана експресија iRNK за синтезу IL-33, ST2, MHC1 и TAP1 коришћењем одговарајућих прајмера (Табела 1). Процедура је спроведена на следећи начин: по истеку инкубације са IL-33, ћелије су ресуспендоване у 0.5ml TRIzol-а односно у раствору фенола и гуанидин изотиоцианата. Након што су ћелије механички хомогенизоване на температури од +4°C, у сваки узорак је додато 50µl BCP-а (енгл. *1-Bromo-3-chloropropane*, BCP, Sigma Aldrich). Уследила је инкубација на собној температури 10 минута, након чега су узорци центрифугирани на 12000rpm 10 минута, на температури од +4°C. Центрифугирањем су се јасно издвојиле три фракције: горња (водена) фракција у којој је RNK, доња фракција са протеинима и липидима и интермедијарна фракција у којој је DNK. Из епендорфица са узорцима пажљиво је издвојена водена фракција са RNK која је онда сипана у нов сет епрувета са 250µl изопропил алкохола. Након центрифугирања, ручно је одливена течност и затим је додат 70% етил алкохол, након чега су узорци залеђени до извођења анализе.

Поступак екстракције укупне iRNK из ткива плућа мишева третираних са IL-33 или PBS је спроведен према претходно описаној процедури. Свака испитивана група имала је по 6 независних узорак. Анализа цитокинског миљеа у плућима са метастазама је спроведена након амплификације секвенце гена за Foxp3, IL-10 и TGF- $\beta$  помоћу одговарајућих прајмера који су приказани на Табели 1.

Узорци са укупном RNK екстрахованом из ћелија B16-F1/ткива плућа на раније описан начин, даље су ресуспендовани у 20 $\mu$ l воде која не садржи нуклеазе (енгл. *Nuclease free water, Applied Biosystems*). За процес реверзне транскрипције RNK у комплементарну DNK коришћен је кит *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)*. Узорци са укупном RNK изолованом из ћелија B16-F1/ткива плућа су инкубирани са одговарајућом мешавином (*Master mix*) који је припремљен према упутству произвођача тако да садржи: хексамер (енгл. *Random Hexamer Primer*), пуфер (енгл. *5X Reaction Buffer*), инхибитор RNase-e (енгл. *RiboLock Rnase Inhibitor*), dNTP Mix-а и реверзну транскриптазу (енгл. *RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase*). Узорци су лагано промешани и инкубирани 60 минута на 42°C. Реакција је заустављена грејањем 5 минута на 70°C, а узорци су затим охлађени на 4°C. Реакција реверзне транскрипције је реализована на уређају *Mastercycler® ep realplex, Eppendorf, Hamburg, Germany*. На овај начин је добијена комплементарна DNK која је затим коришћена за квантификацију експресије гена.

На крају мерена је експресија гена од интереса на апарату *Mastercycler® ep realplex (Eppendorf, Hamburg, Germany)*. Реакциона смеша у волумену од 20 $\mu$ l по бунарчићу садржала је: узорак комплементарне DNK, *Master mix (Power SYBR Green PCR Master Mix (2x), Applied Biosystems)*, мешавину прајмера ("*Sense*" и "*Antisense*") за одговарајући ген и воду која не садржи нуклеазе. Реакција qRT-PCR је изведена по следећој температурној шеми: 4 минута на 95°C, затим 50 циклуса у трајању од по 15 секунди на 95°C и по минут на 62°C. Да би се одредила специфичност PCR продукта подешени су услови за извођење криве топљења (енгл. *Melting Curve*): 15 секунди на 95°C, 15 секунди на 60°C, 20 минута температурног раста и потом 95°C.

Релативна квантификација експресије циљног гена у односу на експресију референте контроле одређена је компаративном Ct (енгл. *Cycle threshold, Ct*) методом. Релативна експресија гена је израчуната према формули  $2^{-(C_t - C_{tGAPDH})}$ , где је  $C_t$  праг циклуса интересног гена, а  $C_{tGAPDH}$  вредност прага циклуса контролног гена GAPDH (енгл. *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*) који је заправо *housekeeping* ген, (Табела 1). Подаци су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација и изражени су у односу на контролу (нетретиране туморске ћелије/ткиво плућа мишева третираних PBS-ом).

Ген	Секвенца прајмера <i>Sense</i> (5' to 3')	Секвенца прајмера <i>Antisense</i> (5' to 3')
<i>IL-33</i>	5'-TCCTTGCTTGGCAGTATCCA-3'	5'-TGCTCAATGTGTCAACAGACG-3'
<i>ST2</i>	5'-GCAATTCTGACACTTCCCATG-3'	5'-ACGATTTACTGCCCTCCGTA-3'
<i>MHC-I H-2b</i>	5'-GCGAGGGTGGCTCTCACACG-3'	5'-TCAGGGTGAGGGGCTCAGGC-3'
<i>TAP1b</i>	5'-CAAACCAGCCAAAGTCCAG-3'	5'-AGAAGAACCCTCCGAGAAGC-3'
<i>Foxp3</i>	5'-TGGTTTACTCGCATGTTCGC-3'	5'-CCCACSTTTTCTTGGTTTTG-3'
<i>IL-10</i>	5'-CCCTGGGTGAGAAGCTGAAG-3'	5'-CACTGCCTTGTCTTATTTTCACA-3'
<i>TGF-<math>\beta</math></i>	5'-ATTCTGGCGTTACCTTG-3'	5'-CTGTATCCGTCTCCTTGGTT-3'
<i>GAPDH</i>	5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'	5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3'

Табела 1. Прајмери за амплификацију секвенце гена од интереса

### 3.13. Мерење концентрације IL-33 у серуму пацијената са меланомом

Седамдесет два пацијента оболела од меланома су регрутована са Клинике за дерматовенерологију и пластичну хирургију, ВМА, Београд. У одређивању TNM стадијума и класификацији меланома коришћено је 8-мо издање *AJCC* (енгл. *American Joint Committee on Cancer*) (433). Узорци серума су добијени од пацијената пре третмана. Као контролни узорци коришћен је серум добијен од 29 здравих особа. Крв оболелих од меланома и здравих контрола је центрифугирана на 300G 10 минута, а узорци серума су чувани на температури од -70 °C до извођења анализе.

Концентрација IL-33 је одређивана колориметријском методом *ELISA* (енгл. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) помоћу *ELISA kits* (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) специфичног за хумани IL-33, према препорученом протоколу.

Најпре је припремљен стандард тако да се постигне почетна концентрација од 1500pg/mL. Направљени шток је серијски двоструко разблажен у растварачу *Reagent Diluent*, како би се добила стандардна крива са 7 тачака. "Везујуће" антитело (енгл. *Capture Antibody*) сипано је у бунарчиће микротитар плоче (енгл. *MicroTiter Plate*, МТП) која је затим остављена на собној температури преко ноћи. Након испирања у *Wash Buffer*-у додат је блокирајући пуфер *Block Buffer*. Након инкубације на собној температури, плоче су испране пуфером а онда су у њих сипани разблажени узоци (непосредно пре теста разблажени 10 пута у дејонизованој води). По истеку инкубације на собној температури, уследило је испирање микротитар плоча, а онда је у све бунарчиће додато детекционо антитело (енгл. *Detection Antibody*). Након инкубације уследило је испирање и додавање *Streptavidin* конјугован са ензимом *HRP* (енгл. *HorseRadish Peroxidase*). Након краће инкубације на собној температури у мраку, уследило је испирање микротитар плоча, а затим је сипан *Substrate Solution*. Инкубација на собној температури у мраку, у трајању од двадесетак минута, прекинута је додавањем раствора *Stop Solution* (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). После краткотрајног мешања на шејкеру, на уређају *Microplate reader* (Zenyth, Anthos, UK) измерена је оптичка густина на таласној дужини од 450nm.

Вредности за сваки појединачан узорак су израчунате помоћу стандардне криве која је направљена на основу измерених вредности стандарда. Подаци су представљени као средња вредност ± стандардна грешка

### 3.14. Статистичка обрада података

Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 21. Пре статистичке обраде података, прво је испитивана правилност расподеле добијених вредности. За вредности са правилном расподелом користишћен је параметарски *Student*-ов *t* тест, док ће се неправилна расподела поредила коришћењем непараметарског *Mann-Whitney* и *Fisher*-овог теста. Резултати експеримента су изражавани као вредност ± стандардна грешка (*SE*). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи  $p < 0.05$ , док је статистички веома значајна разлика када је  $p < 0.01$ .

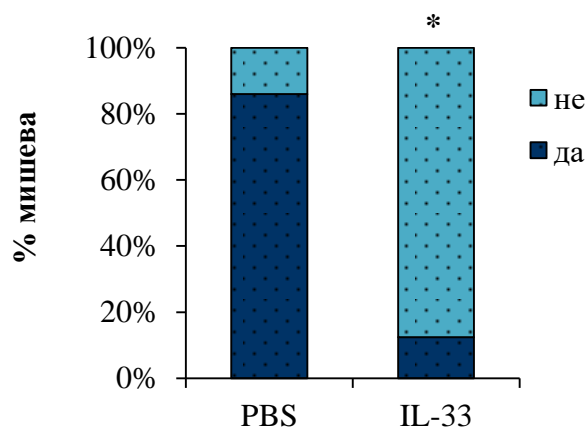
## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. IL-33 ефикасно инхибира раст мишјег варијетета меланома, и са мањим и са већим метастатским потенцијалом

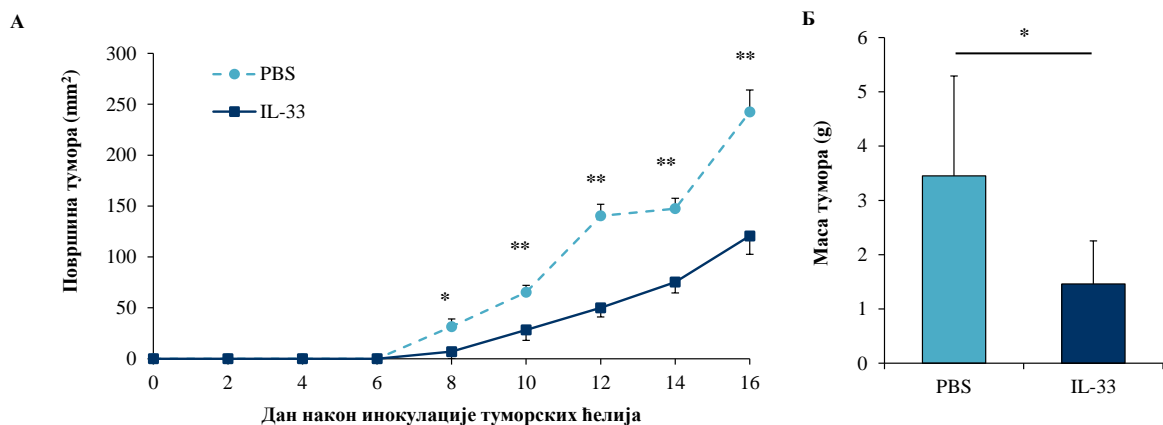
У студији је најпре испитан ефекат IL-33 на појаву и раст примарног тумора миша код два варијетета меланома (B16-F1 и B16-F10) које првенствено одликује различити метастатски потенцијал (111).

Уочено је да, осмог дана од субкутане имлантације ћелија B16-F1 варијетета меланома са slabим метастатским потенцијалом, процентуална заступљеност мишева са палпабилним тумором упадљиво је мања у групи третираних са IL-33 (12.5%) него у контролној групи мишева којима је апликован PBS (86%) (Графикон 1). Забележено је и да је IL-33 значајно редуковао како површину тумора, почев од 8.-ог до 16.-ог дана од апликације малигних ћелија (Графикон 2А), тако и масу примарног тумора измерену 20.-ог дана експеримента (Графикон 2Б).

#### Појава палпабилног тумора (8. дан)



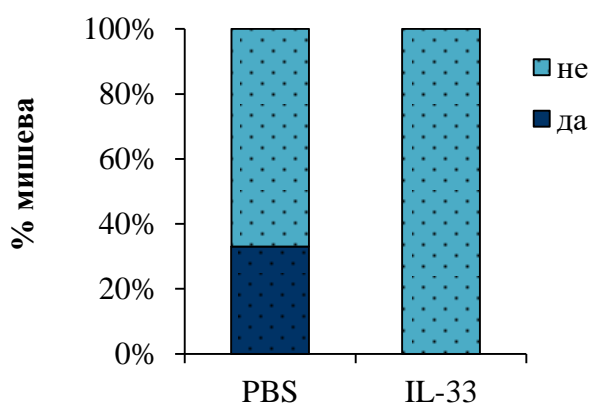
**Графикон 1. IL-33 значајно успорава појаву B16-F1 варијетета мишјег меланома са мањим метастатским потенцијалом.** C57BL/6 мишевима је субкутано убризгано  $0.8 \times 10^6$  малигних ћелија B16-F1. Овим мишевима је затим интраперитонеално апликован IL-33 (0.4 $\mu$ g по мишу) или PBS сваки други дан, укупно у пет доза, почев од нултог дана од имплантације туморских ћелија. Интраперитонеална апликација IL-33 резултовала је значајним смањењем процентуалне заступљености мишева са палпабилним тумором и то 8.-ог дана након апликације туморских ћелија. Резултати су приказани као средња вредност $\pm$ стандардна грешка (од 6 до 8 мишева по групи), Fisher's exact тест, \* $p < 0.05$ .



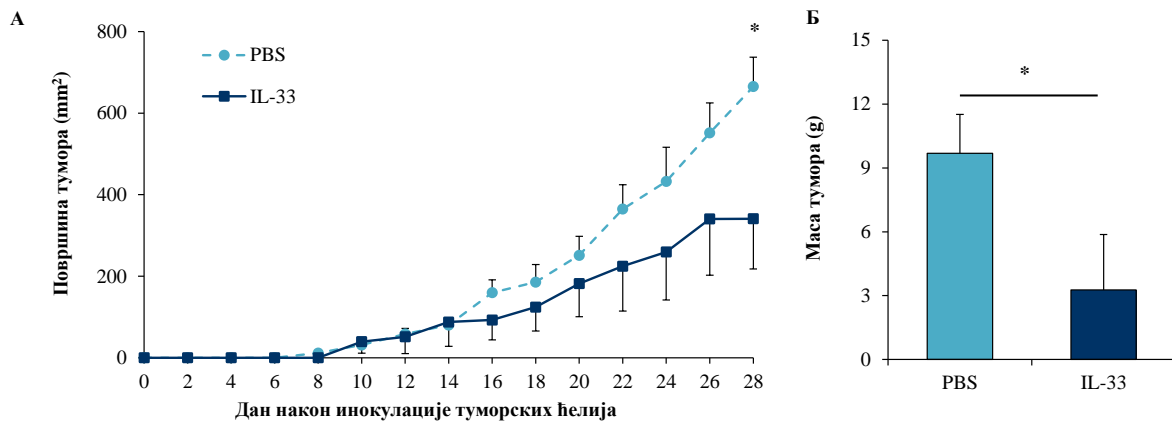
**Графикон 2. IL-33 значајно инхибира раст B16-F1 варијетета меланома миша. (А)** Код мишева интраперитонеално третираних са IL-33, површина примарног тумора је била знатно мања у односу на мишеве контролне групе. **(Б)** IL-33 битно је смањио масу тумора ресецираног након жртвовања мишева, 20.-ог дана експеримента. Резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка (од 6 до 8 мишева по групи), *Student-ов t/Mann-Whitney* тест, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Ако се пореди ефекат IL-33 на појаву и раст B16-F10 меланома, примећује се да IL-33 није битно успорио појаву овог варијетета меланома кога одликује изузетно изражен метастатски потенцијал (Графикон 3). Међутим, у групи мишева који су третирани са IL-33, површина примарног B16-F10 меланома је значајно мања ( $341 \pm 123.18 \text{ mm}^2$ ) у поређењу са мишевима третираних са PBS ( $665.28 \pm 72.12 \text{ mm}^2$ ), и ова разлика достиже статистичку значајност 28.-ог дана од убризгавања малигних меланоцита (Графикон 4А). Уз то, маса примарног тумора која је измерена 29.-ог дана експеримента је чак троструко мања у односу на контролну групу мишева ( $9.69 \pm 1.83 \text{ g}$  vs.  $3.27 \pm 2.61 \text{ g}$ ) (Графикон 4Б).

### Појава палпабилног тумора (8. дан)



**Графикон 3. IL-33 не утиче на појаву B16-F10 варијетета меланома са већим метастатским потенцијалом.** Мишевима соја C57BL/6 је субкутано апликовано  $0.8 \times 10^6$  B16-F10 ћелија, а онда су третирани са IL-33 ( $0.4 \mu\text{g}$  по мишу) или са PBS на исти начин који је претходно описан код мишева којима је субкутано трансплантиран B16-F1 варијетет меланома. Третман мишева са IL-33 није утицао на процентуалну заступљеност мишева са палпабилним тумором 8.-ог дана након апликације малигних меланоцита. Резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка (од 6 до 8 мишева по групи), *Fisher's exact* тест.



**Графикон 4. IL-33 редукује раст В16-F10 варијетета меланома.** IL-33 значајно редукује површину (А), као и масу примарног меланома кога одликује изражен метастатски потенцијал (Б) Маса тумора је измерена након жртвовања животиња и то 29.-ог дана од убризгавања туморских ћелија. Резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка (од 6 до 8 мишева по групи), *Student-ов t/Mann-Whitney* тест, \* $p<0.05$ .

Добијени налаз јасно указује на то да IL-33 ефикасно редукује раст примарног тумора код оба варијетета малигних меланоцита, а нарочито ћелијског варијетета са мањим метастатским потенцијалом (В16-F1).

#### 4.2. IL-33 индукује експанзиван раст плућних метастаза В16-F1 варијетета меланома са славим метастатским потенцијалом

Плућа су, код пацијената оболелих од меланома, често прва локација клинички приметних метастаза (434). Интересантно је да постоји претпоставка да интраназална примена терапеутика представља ефикасну стратегију за њихово директно допремање у плућа (435) што би потенцијално смањило успостављање метастаза на овој локацији. Узимајући у обзир ову чињеницу, испитан је ефекат интраназалне инстилације IL-33 на појаву и раст хематогених метастаза у плућима код оба ћелијска варијетета меланома.

Неочекивано, регистровано је да IL-33, примењен интраназално, подстиче раст метастаза код В16-F1 варијетета меланома са мањим метастатским потенцијалом, док је у актуелној студији интравенска апликација В16-F10 малигних меланоцита са израженим метастатским капацитетом резултовала развојем масивних метастаза код свих мишева независно од њиховог третмана.

Дакле, иако постоји тренд повећања просечног боја метастаза В16-F1 варијетета меланома у плућима мишева након интраназалног третмана IL-33 у поређењу са контролном групом, ова разлика није достигла статистичку значајност (Графикон 5А, Б). Када се пак пореди величина метастаза, јасно се уочава да IL-33 индукује интензиван раст хематогених метастаза (Графикон 5В).

С друге стране, када је реч о В16-F10 варијетету меланома, детектована су бројна и масивна метастатска жаришта у плућима свих мишева независно од примене IL-33 (Графикон 6А-В).

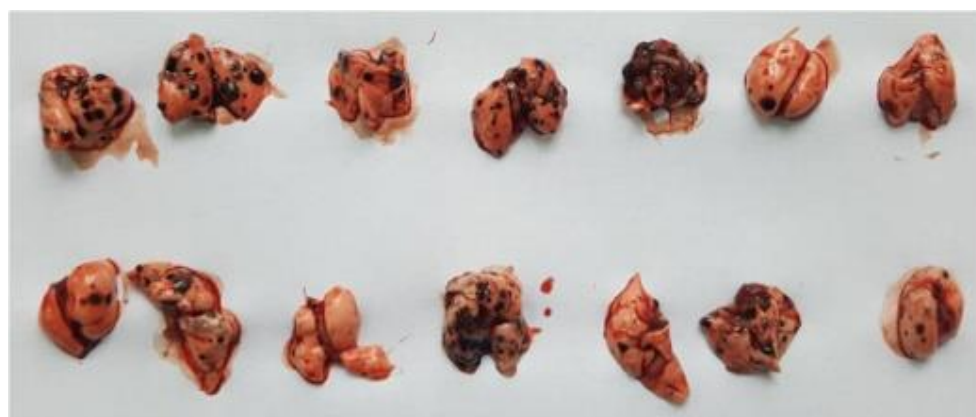


## B16-F1

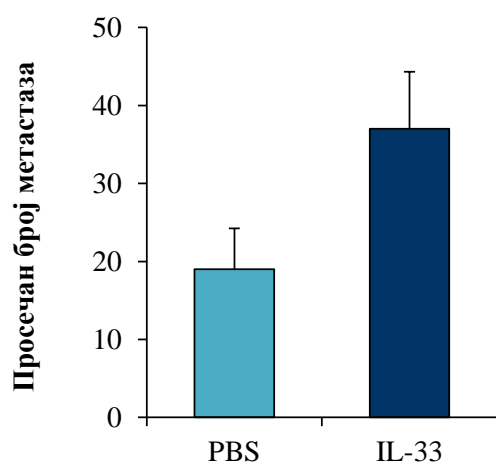
A

IL-33  
(и.п.)

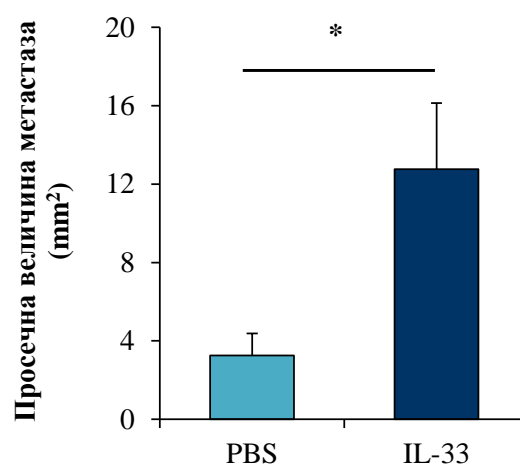
PBS



Б



В



**Графикон 5. Интраназална апликација IL-33 подстиче раст метастатских колонија B16-F1 варијетета меланома.** Мишевима соја C57BL/6 је интравенски апликовано  $0.3 \times 10^6$  малигнух меланоцита B16-F1 варијетета. Затим су животиње третиране са IL-33 у 4 интраназалне инстилације ( $2 \mu\text{g IL-33}/20 \mu\text{l PBS}$ ) и то: три узастопна дана пре, и шестог дана након инокулације туморских ћелија. Контролну групу чинили су мишеви којима је апликован PBS. **(А)** Хистопатологија плућа мишева са метастазама B16-F1 варијетета меланома, третираних са IL-33 или PBS. **(Б)** IL-33 не мења просечан број плућних метастаза B16-F1 варијетета меланома. **(В)** IL-33 значајно подстиче раст метастатских колонија B16-F1 варијетета меланома. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка (од 6 до 8 мишева по групи), Student-ов *t* тест \* $p < 0.05$ .

## B16-F10

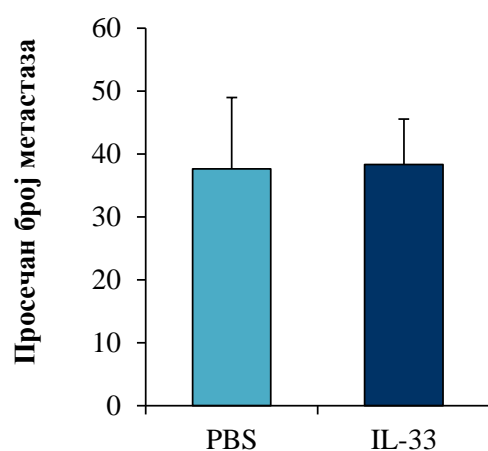
А

IL-33  
(и.н.)

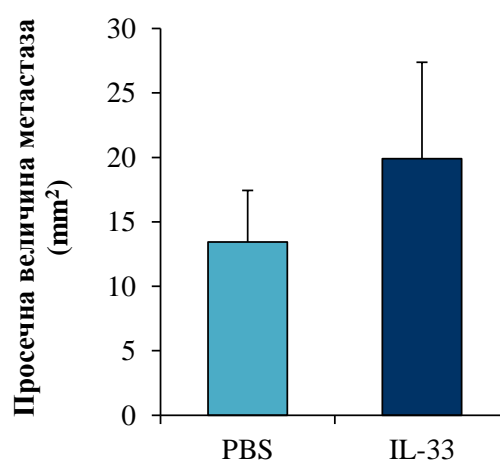
PBS



Б



В



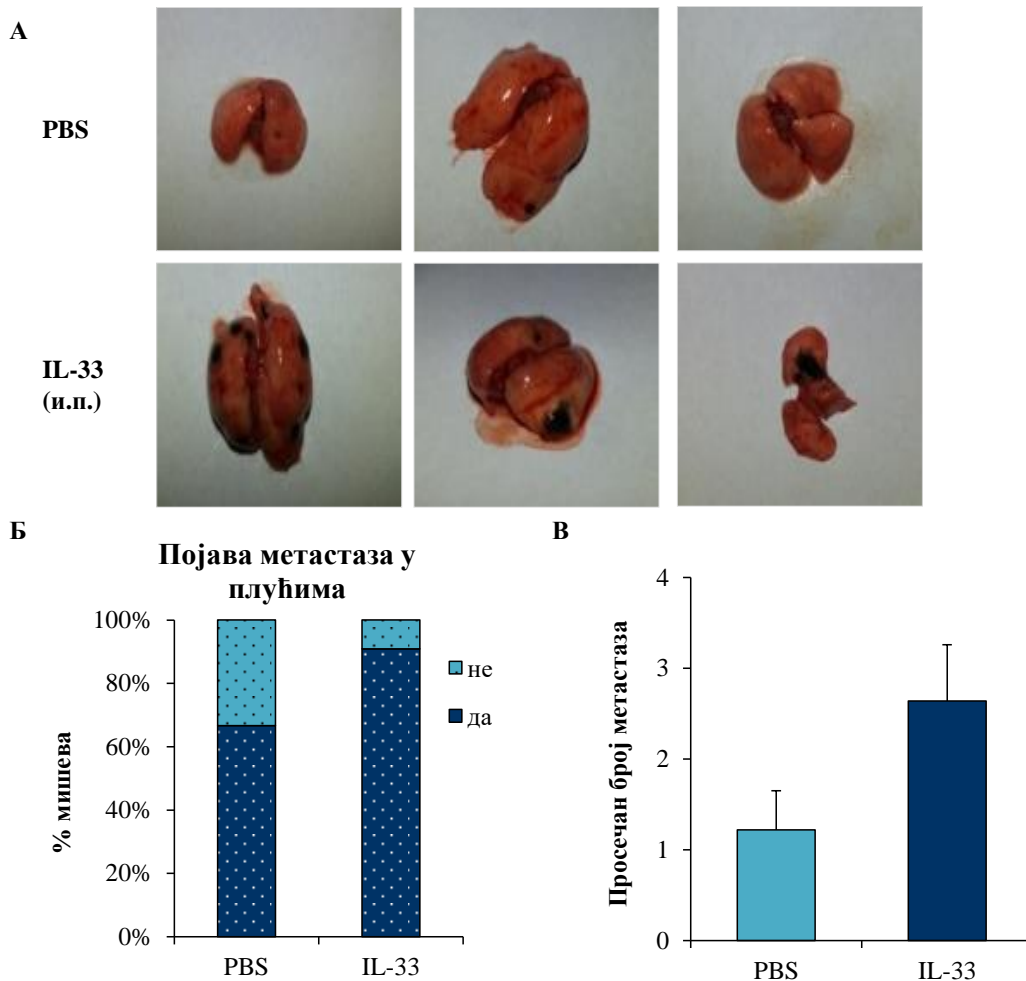
**Графикон 6. Интраназална апликација IL-33 не утиче на раст метастатских колонија B16-F10 варијетета меланома.** C57BL/6 мишевима је интравенски апликовано  $0.3 \times 10^6$  ћелија B16-F10, док је третман са IL-33 ( $2 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$  PBS) или са PBS спроведен на исти начин као и код мишева којима су интравенски апликоване ћелије B16-F1. (А) Патохистолошка слика плућа мишева са метастазама B16-F10 варијетета меланома, третираних са IL-33 или PBS. (Б) IL-33 не мења просечан број метастатских колонија меланома B16-F10 у плућима. (В) Код мишева третираних са IL-33, није битно измењена величина плућних метастаза. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка (од 6 до 8 мишева по групи), Student-ов *t* тест.

С обзиром да је системска апликација антиканцерских лекова најпогоднији начин за лечење метастатске болести, у следећем кораку истраживања испитан је ефекат интраперитонеалне примене IL-33 на успостављање плућних метастаза код B16-F1 варијетета меланома кога одликује мањи метастатски капацитет у односу на варијетет B16-F10. Уз то, како би се што приближније имитирали природни услови дисеминације туморских ћелија, у свим наредним експериментима је за индукцију експерименталних метастаза коришћен много мањи број туморских ћелија.

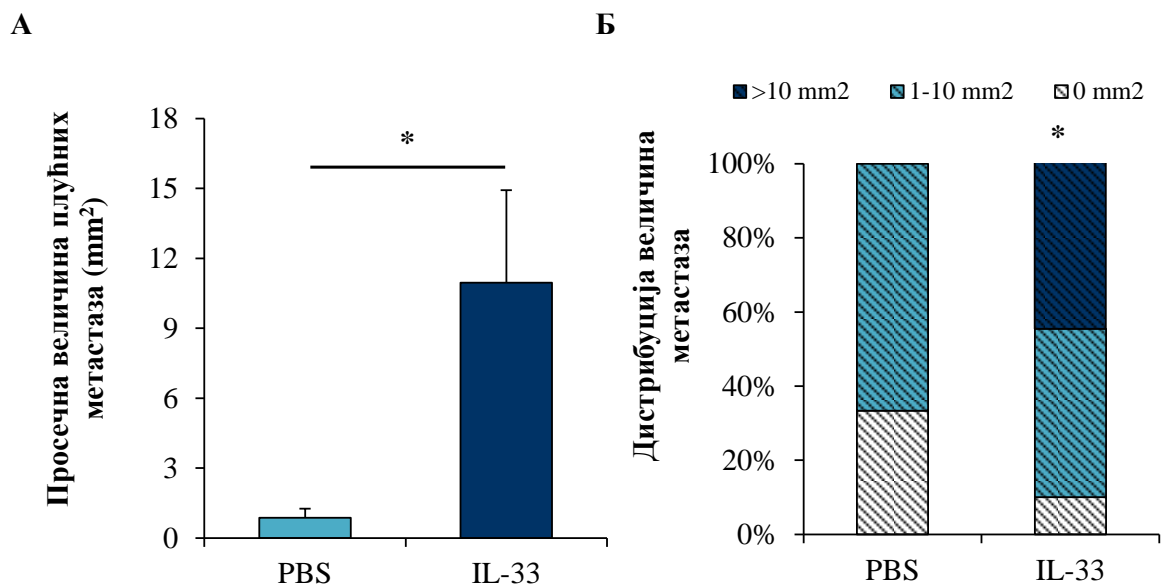
Мада је забележено да интаперитонеална примена IL-33 резултује повећањем инциденце ( $10/11$ ; 90.9% vs.  $6/9$ ; 66.7%) и броја метастаза ( $2.64 \pm 0.62$  vs.  $1.22 \pm 0.43$ ), ова разлика није достигла статистичку значајност (Графикон 7А-В). Упадљив налаз ове студије је драстично повећан раст метастатских колонија у групи мишева третираних са IL-33 (Графикон 8А, Слика 1). Другим речима, у групи мишева којима је апликован IL-33 величина плућних метастаза је чак десет пута већа него у мишевима контролне групе (Графикон 8А). Примећено је и то да метастазе, веће од  $10 \text{mm}^2$ , присутне су у чак

45% мишева третираних са IL-33, док у контролној групи, метастазе ове величине нису детектоване (Графикон 8Б).

На крају, у свим експериментима нису регистроване метастазе у јетри, нити у експерименталној нити у контролној групи животиња (подаци нису приказани).

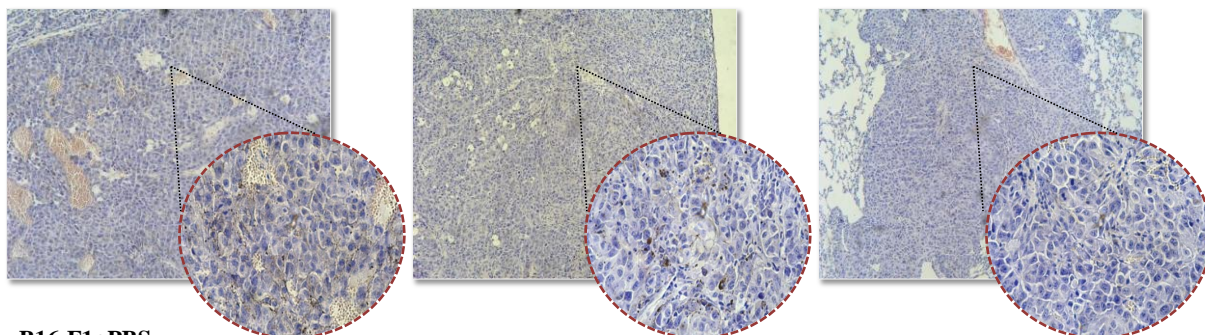


**Графикон 7. Системска апликација IL-33 не утиче на појаву и број метастатских колонија V16-F1 варијетета меланома у плућима.** C57BL/6 мишевима је најпре интравенски апликовано  $0.5 \times 10^5$  ћелија V16-F1. Затим је мишевима интраперитонеално убризгаван IL-33 у дози од  $0.4 \mu\text{g}$  сваки други дан, укупно пет доза, почев од нултог дана од убризгавања туморских ћелија. Контролну групу су чинили мишеви којима је апликован PBS (**А**) Хистопатолошка слика метастазама у плућима мишева третираних са IL-33 или PBS. (**Б**) IL-33 не мења проценат мишева са успостављеним метастазама у плућима. (**В**) IL-33 не мења број метастатских колонија V16-F1. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка (од 9 до 11 мишева по групи), Fisher's exact и Student-ов *t* тест.

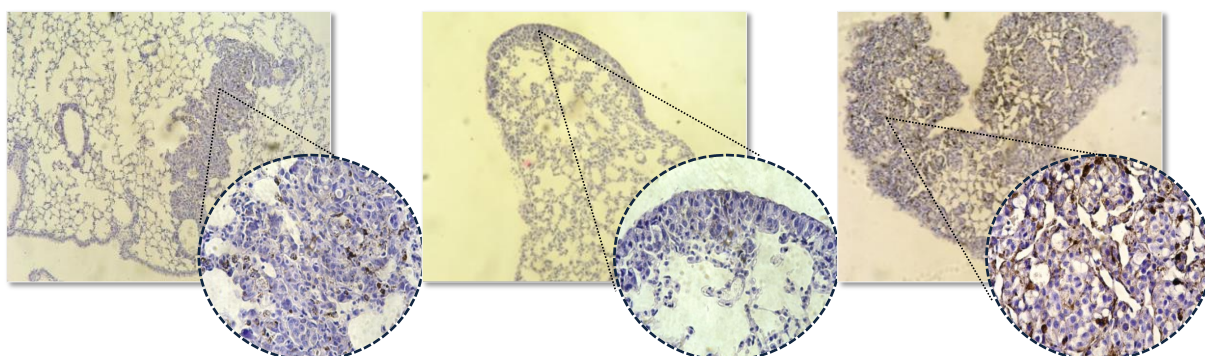


**Графикон 8. Системска апликација IL-33 подстиче раст метастатских колонија B16-F1 варијетета меланома у плућима.** C57BL/6 мишевима је интравенски апликовано  $0.5 \times 10^5$  ћелија. Мишеви су онда подвргнути интраперитонеалном третману са IL-33 или PBS. **(А)** Интраперитонеално апликован IL-33 подстиче раст плућних метастаза код B16-F1 варијетета меланома. **(Б)** Супротно од контролне групе, метастазе веће од  $10 \text{ mm}^2$  регистроване су само у групи мишева којима је апликован IL-33. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка (од 9 до 11 мишева по групи), *Fisher's exact* и *Mann-Whitney* тест,  $*p < 0.05$ .

#### B16-F1+IL-33



#### B16-F1+PBS



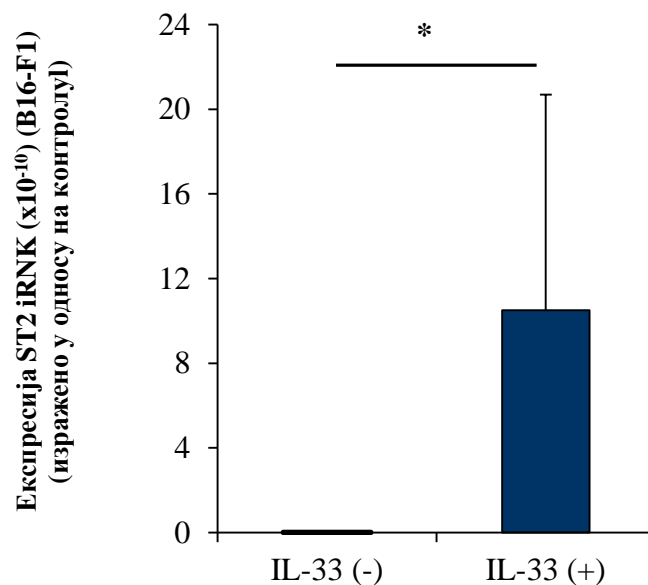
**Слика 1. Хистопатолошка слика метастаза мишијег меланома B16-F1.** Репрезентативни пресеци ткива плућа мишева третираног IL-33 или PBS на којима се јасно запажају хематогене метастазе (H&E; увећање од 100 X и 400X).

Супротно од рестриктивног деловања IL-33 на раст примарног меланома, резултати ове студије имплицирају значајан прометастатски ефекат IL-33 узимајући као параметар интензиван раст метастатских колонија у плућима код B16-F1 варијетета меланома.

#### 4.3. Мишеви којима је интраперитонеално апликован IL-33 имају повећану експресију рецептора ST2 у метастатском ткиву, док у примарном тумору повећано исказују IL-33

Пошто је јасно показано да IL-33, с једне стране, редукује раст примарног меланома, док с друге стране, подстиче раст метастатских колонија у плућима, следећи задатак овог истраживања је био да се испита утицај IL-33 на експресију рецептора за овај цитокин, молекул ST2, као и на IL-33 и то, у туморским ћелијама и у ћелијама имунског система.

Најпре је регистровано да туморске ћелије B16-F1, нити конститутивно нити након њиховог излагања IL-33, не експримирају iRNK за синтезу IL-33 (подаци нису приказани). Када је реч о експресији рецептора за IL-33, примећено је да ћелије B16-F1 одликује конститутивно ниска експресија iRNK за синтезу рецептора ST2. Међутим, интересантан налаз је да је у туморским ћелијама 48-часовни третман са IL-33 индуковао битан пораст експресије ST2 на нивоу iRNK (Графикон 9).

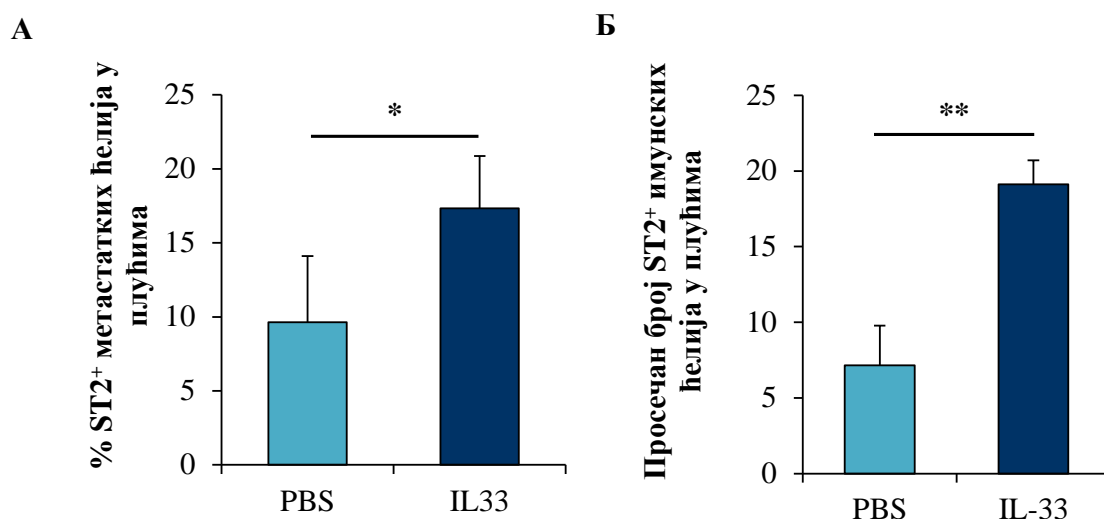


**Графикон 9. IL-33 повећава експресију iRNK за синтезу молекула ST2 у ћелијама B16-F1 варијетета меланома.** Након 48-часовне инкубације B16-F1 туморских ћелија са 200 ng/ml IL-33, екстрахована је укупна iRNK из ових ћелија, као и из нетретираних туморских ћелија. Уочено је да IL-33 битно повећава експресију iRNK за синтезу ST2 у B16-F1 ћелијама. Као контрола коришћена је iRNK за GAPDH. Резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка изражено у односу на контролу (нетретирани B16-F1 ћелије) *Mann-Whitney* тест \* $p < 0.05$ .

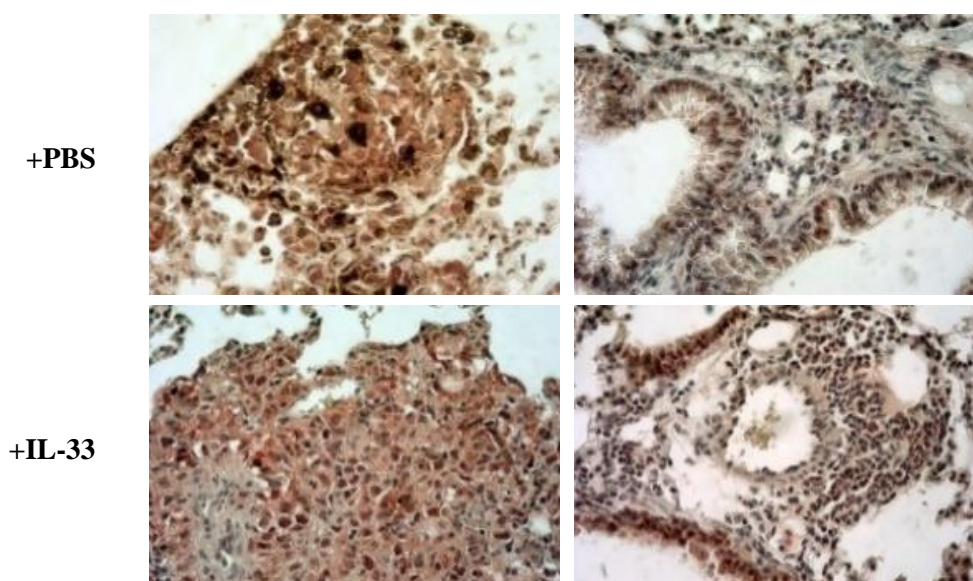
Додатно, анализирана је експресија молекула ST2 и IL-33 на нивоу протеина, у малигним ћелијама и ћелијама имунског система, и то у метастатском ткиву и примарном тумору мишева третираних са IL-33. Примећује се да интраперитонеална апликација IL-33 битно повећава процентуалну заступљеност метастатских ћелија, као

и број ћелија имунског система које исказују ST2 у плућима (Графикон 10А, Б; Слика 2). Уз то, у плућима са метастазама код мишева третираних са IL-33 детектовано је и повећање броја леукоцита који експримирају IL-33 (Графикон 11Б; Слика 3).

Међутим, у примарном меланому ситуација је другачија: присутан је пораст процентуалне заступљености туморских ћелија које експримирају IL-33 (Графикон 11А; Слика 3), док је експресија молекула ST2 непромењена у испитиваним групама мишева (подаци нису приказани). Такође, није детектована разлика у експресији овог молекула ни на ћелијама имунског система у примарном меланому мишева третираних са IL-33 или PBS (подаци нису приказани).

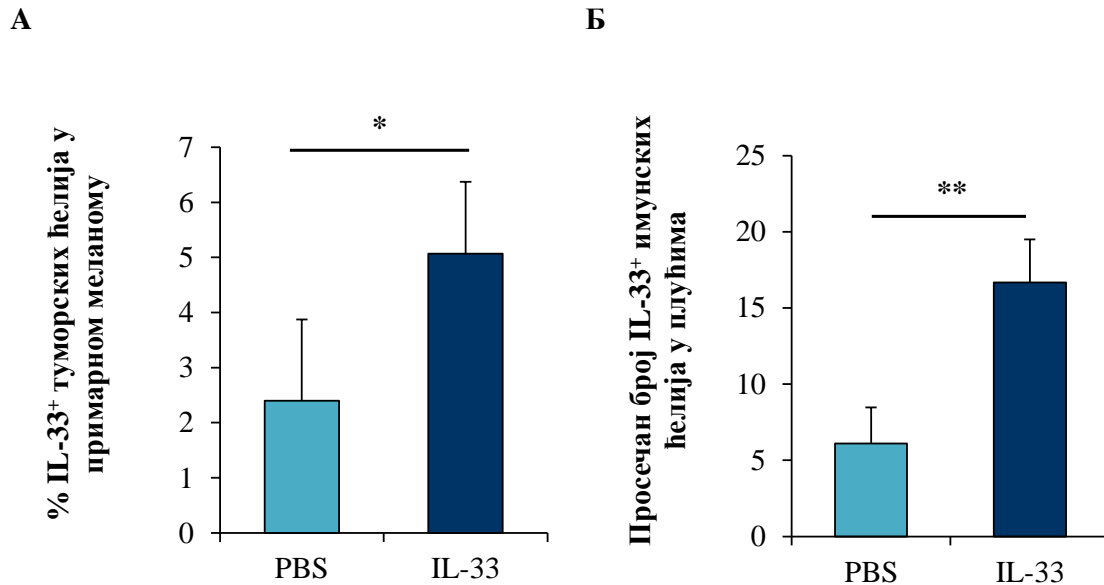


**Графикон 10. IL-33 повећава експресију молекула ST2 у метастатским ћелијама B16-F1, као и ћелијама имунског система у плућима.** Мишевима су субкутано убризгале малигне ћелије B16-F1 ( $8 \times 10^5$  ћелија/200  $\mu$ l DMEM). Од нултог дана експеримента је интраперитонеално убризгавано 0.4  $\mu$ g IL-33/100  $\mu$ l PBS или само PBS, сваки други дан, укупно 5 доза. (А) У плућима мишева третираних са IL-33 забележено је повећање процента метастатских ћелија које експримирају ST2. (Б) IL-33 значајно повећава број имунских ћелија које исказују ST2. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка (5 мишева по групи), Student-ов *t*/Mann-Whitney тест \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

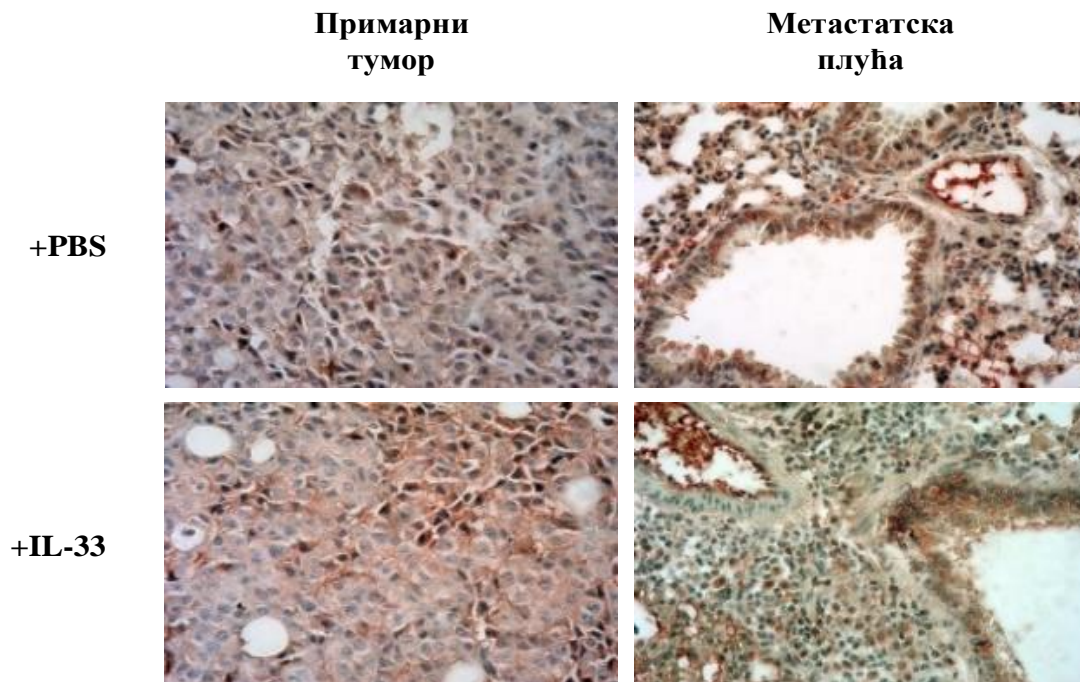


**Слика 2. Експресија молекула ST2 у плућима са успостављеним хематогеним метастазама.** Експресија молекула ST2 у туморским ћелијама и ћелијама имунског система

мишева третираних са IL-33 или са PBS анализирана је имунохистохемијском методом. Репрезентативни пресеци ткива плућа у којима се запажају метастатске ћелије и леукоцити који исказују ST2 (црвено обојено ћелије) на увећању од 400X.



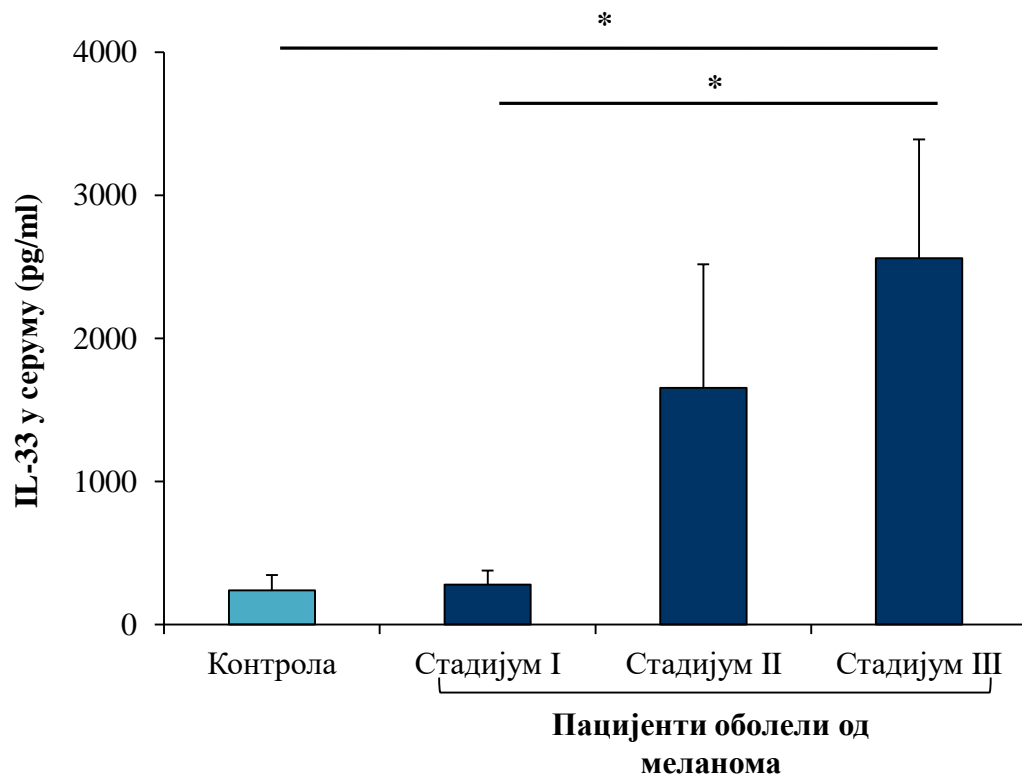
**Графикон 11.** Системска апликација IL-33 индукује повећану експресију IL-33 у примарном меланому, као и пораст броја ћелија имунског система које експримирају IL-33 у ткиву плућа. Код мишева третираних са IL-33 је у ткиву примарног тумора регистрован повећан проценат B16-F1 ћелија које експримирају IL-33 (А), док је у ткиву плућа забележен пораст броја али само имунских ћелија које исказују IL-33 (Б). Резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка (8 мишева по групи), *Student*-ов *t/Mann-Whitney* тест \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



**Слика 3.** Експресија IL-33 у ткиву примарног тумора и плућа са успостављеним метастазама. Експресија молекула IL-33 у туморским ћелијама примарног меланомског тумора и ћелијама имунског система у плућима мишева третираних са IL-33 или са PBS анализирана је имунохистохемијском методом (увећање 400X).

#### 4.4. Концентрација IL-33 је повећана у серуму оболелих у узнапредованом стадијуму меланома

Како би се утврдила релевантност ефекта забележеног на мишћем моделу меланома, у наредном експерименту анализирана је концентрација IL-33 у серуму пацијената са меланомом. Код пацијената у III стадијуму којима су детектоване метастазе у регионалним лимфним чворовима забележено је да је концентрација IL-33 драстично већа у односу на пацијенте у I стадијуму меланома, као и здраве контролне особе (Графикон 12). Ако се пореде вредности IL-33 код оболелих у I стадијуму меланома, примећује се да је концентрација IL-33 код ових особа остала неизмењена у поређењу са здравим особама.



**Графикон 12. Концентрација IL-33 у серуму је највећа код пацијената у III стадијуму меланома.** Код пацијената у III стадијуму меланома забележена је значајно већа концентрација IL-33 у односу на оболеле у I стадијуму меланома и на контролну групу. Резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка (20-30 пацијената по групи), *Mann-Whitney* тест \* $p < 0.05$ .

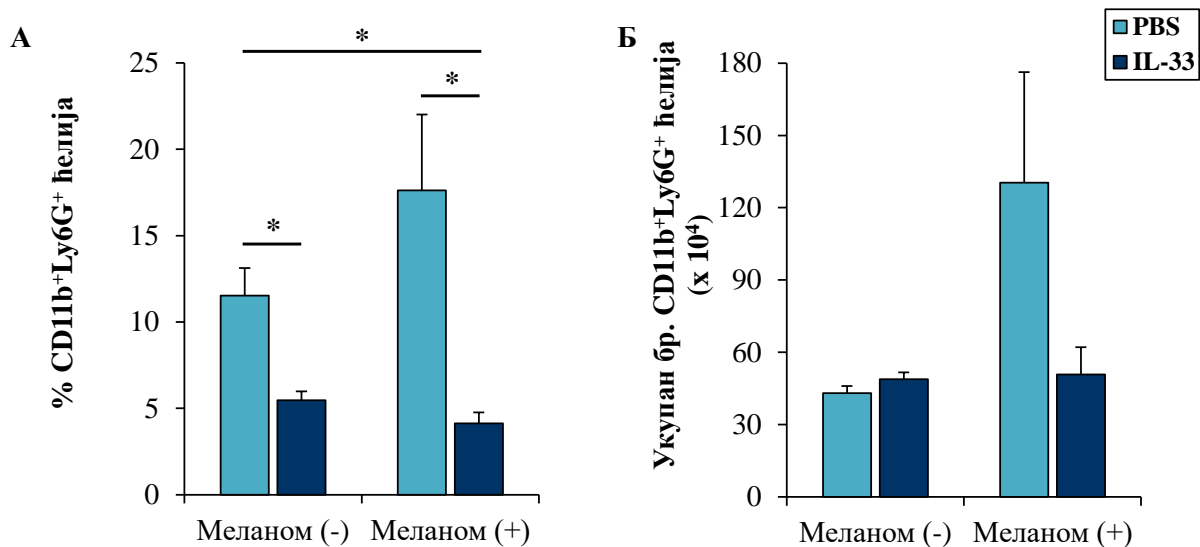
Добијени налаз упућује на то да пораст концентрације IL-33 у серуму оболелих од меланома корелира са регионалним метастазирањем.



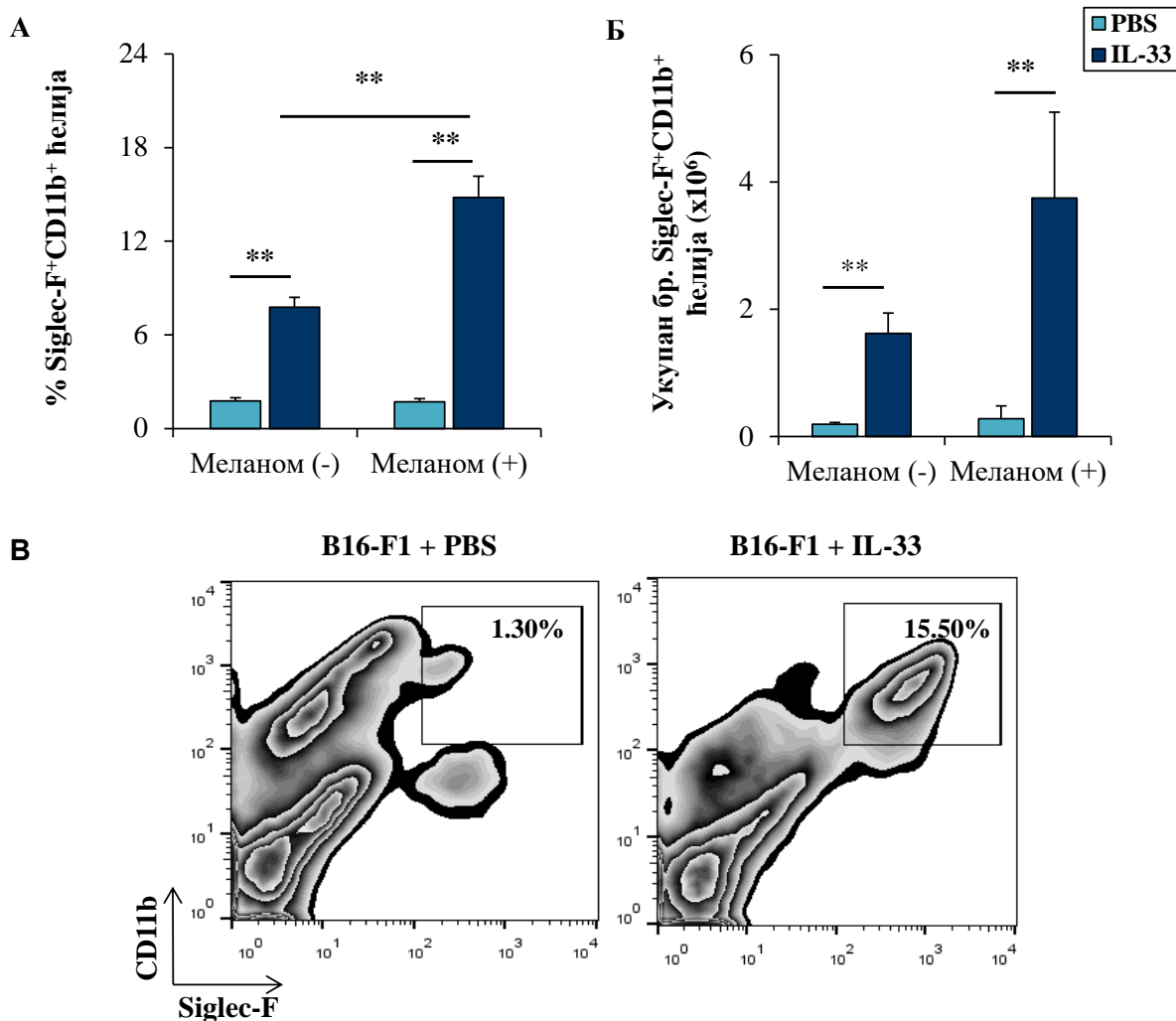
#### 4.5. IL-33 повећава заступљеност еозинофила и антитуморских NK ћелија у плућима

Наредни корак у студији био је да се испита ефекат IL-33 на модулацију урођеног имунског одговора. Мада неутрофиле и еозинофиле одликује фенотипска и функционална пластичност, налаз неких студија јасно имплицира туморицидну активност неутрофила (436) и еозинофила у меланому (161).

Резултати актуелног истраживања указују да IL-33 смањује процентуалну заступљеност CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> неутрофила у плућима независно од присуства меланом, али значајно не мења њихов апсолутан број (Графикон 13А, Б). Истовремено, примећује се да IL-33 битно повећава проценат и апсолутан број Siglec-F<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> еозинофила, нарочито у групи мишева са меланомом (Графикон 14А-В).

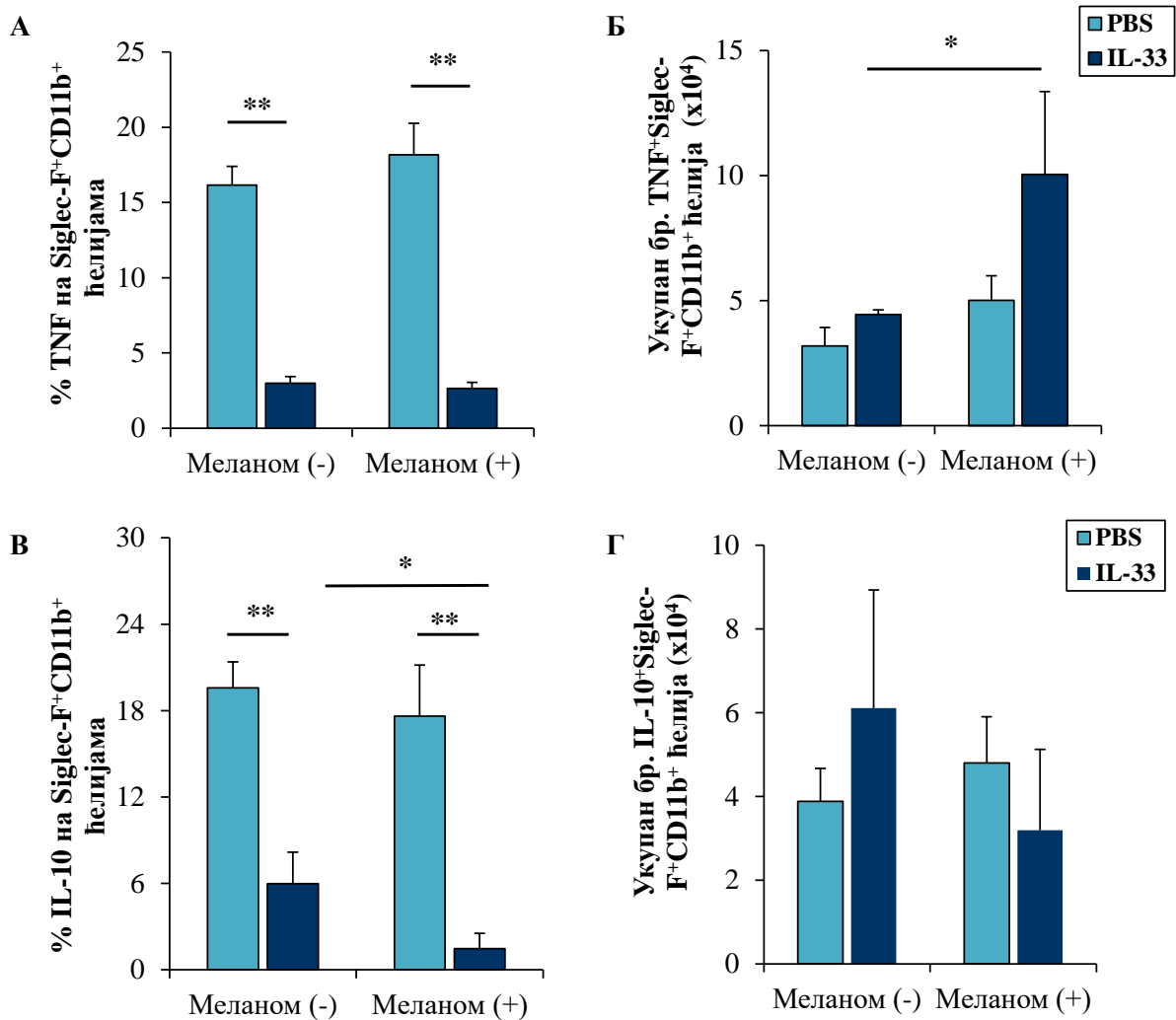


**Графикон 13. Процентуални удео и апсолутан број неутрофила у плућном паренхиму мишева третираних са IL-33.** Експерименталне метастазе су индуковане апликацијом B16-F1 варијетета меланом у дози од  $0.5 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$  DMEM. **(А)** IL-33 смањује процентуални удео CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> неутрофила у плућима независно од присуства тумора, **(Б)** док не утиче на укупан број неутрофила. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка (6 мишева по групи), Student-ов *t* тест, \* $p < 0.05$ .

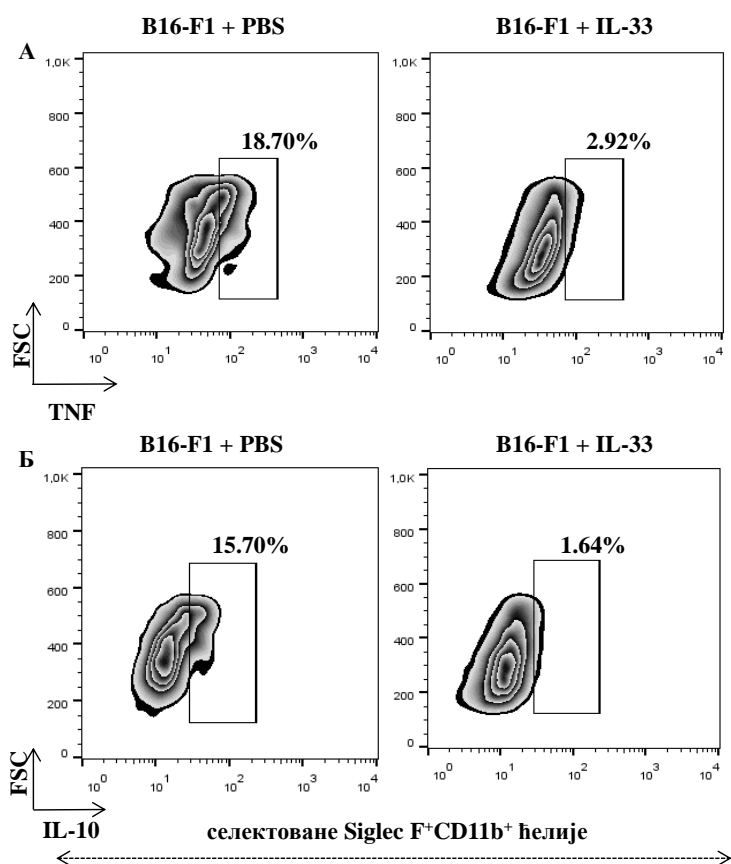


**Графикон 14. IL-33 подстиче акумулацију еозинофила у плућима.** Експерименталне метастазе су индуковане апликацијом B16-F1 варијетета меланома у дози од  $0.5 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$  DMEM. **(А)** Код мишева третираних са IL-33 повећана је процентуална заступљеност и **(Б)** апсолутан број еозинофила. **(В)** Репрезентативни дот плотови илуструју заступљеност Siglec-F<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> еозинофила код мишева са тумором који су третирани са IL-33 или PBS. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка (6 мишева по групи), Student-ов *t* тест,  $**p < 0.01$ .

Да би се проценио функционални статус еозинофила анализана је експресија цитокина TNF- $\alpha$  и IL-10 на Siglec-F<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> ћелијама. Добијени налаз упућује на то да IL-33 редукује проценат еозинофила који продукују TNF- $\alpha$  како у групи мишева са меланомом тако и у групи без меланома. Међутим, уочава се драстичан пораст апсолутног броја еозинофила који продукују TNF- $\alpha$  у плућима мишева са меланомом и то након њиховог третмана са IL-33 (Графикон 15А, Б; Слика 4А). Такође, IL-33 редукује проценат еозинофила који експримирају IL-10 независно од тумора, али не мења апсолутни број IL-10<sup>+</sup>Siglec-F<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> ћелија у плућима (Графикон 15В, Г; Слика 4Б).

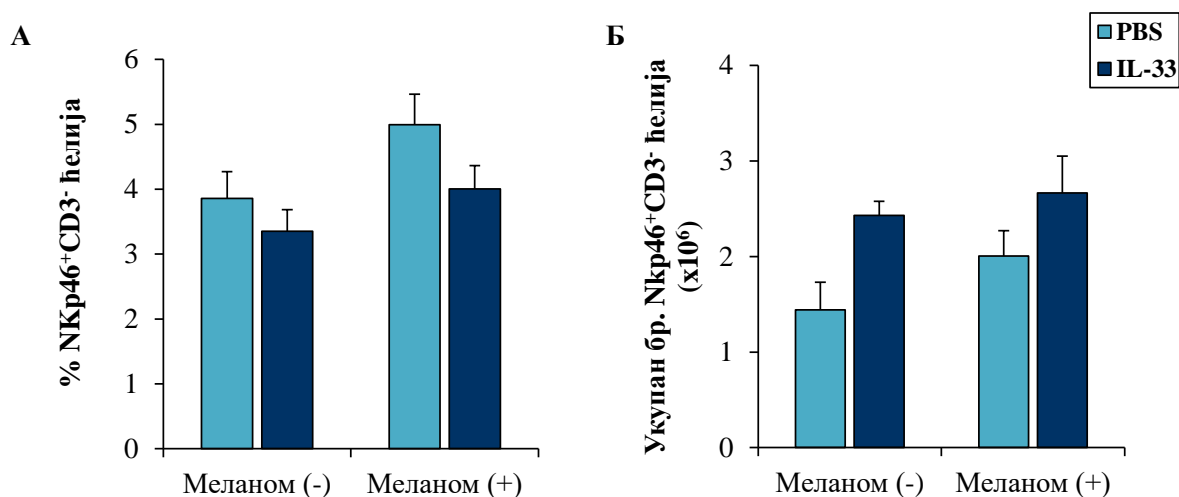


**Графикон 15.** Ефекат системске апликације IL-33 на експресију TNF- $\alpha$  и IL-10 на Siglec-F<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> еозинофилима изолованих из плућа. Проточном цитометријом одређена је процентуална заступљеност и апсолутан број Siglec-F<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> еозинофила који експримирају TNF- $\alpha$  и IL-10 (А) IL-33 редукује процентуални удео Siglec-F<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> еозинофила које експримирају TNF- $\alpha$ , (Б) док је апсолутан број TNF- $\alpha$ +Siglec-F<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> еозинофила повећан само код мишева са тумором који су третирани са IL-33. (В) IL-33 смањује процентуалну заступљеност Siglec-F<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> еозинофила које експримирају IL-10, (Г) али не утиче на апсолутан број IL-10+Siglec-F<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> еозинофила у плућима. Резултати су приказани као средња вредност $\pm$ стандардна грешка (6 мишева по групи), Student-ов *t* тест \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01.



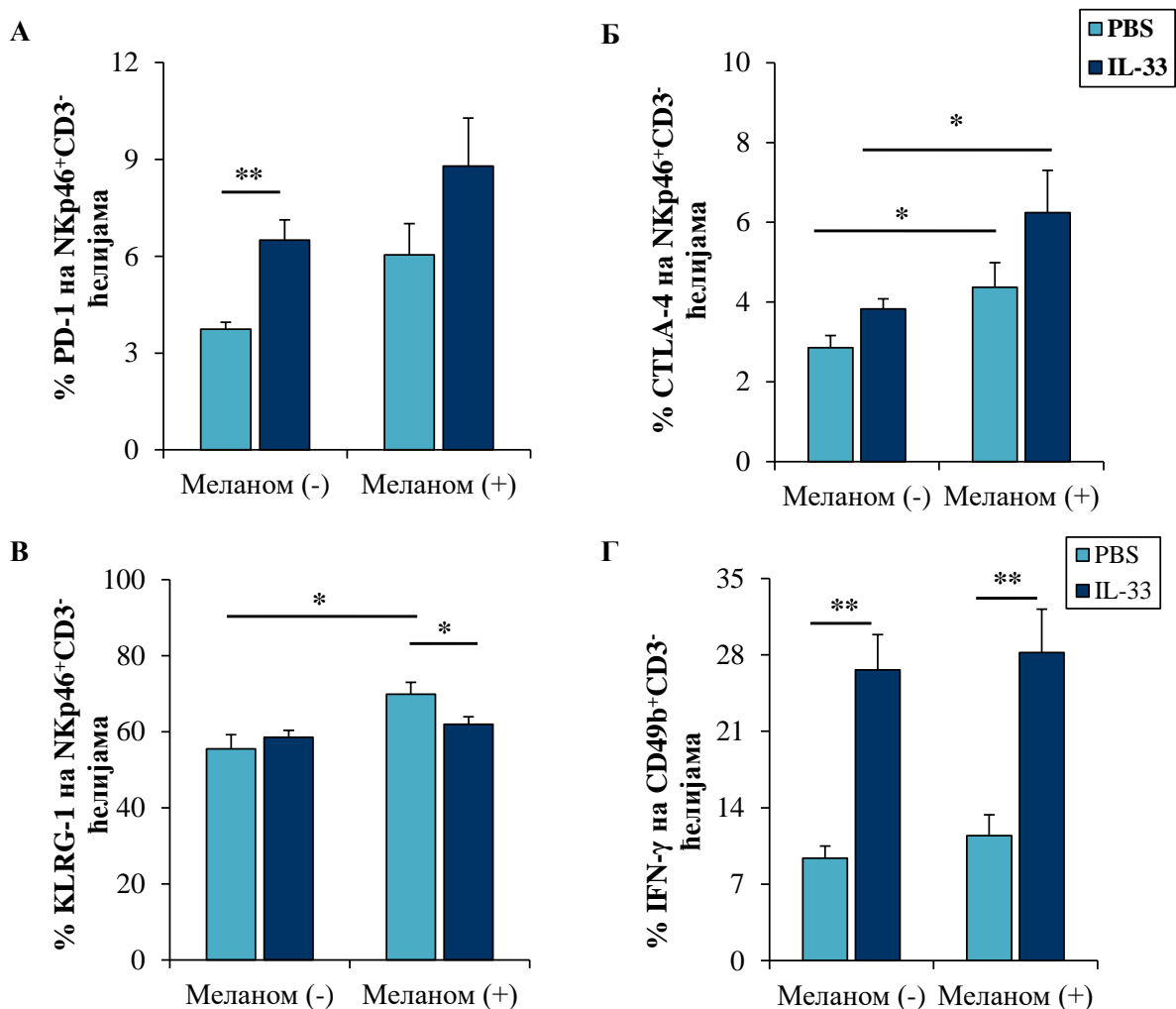
**Слика 4.** Репрезентативни дот плотови илуструју експресију TNF- $\alpha$  (А) и IL-10 (Б) у селектованим Siglec-F<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> еозинофилима код мишева са меланомом који су третирани са IL-33 или PBS.

Даљом анализом ћелијског састава у плућном ткиву уочено је да IL-33 не мења процентуалну заступљеност нити апсолутан број НК ћелија (Графикон 16 А, Б).



**Графикон 16.** IL-33 не утиче на инфлукс НК ћелија у плућни паренхим. Експерименталне метастазе су индуковане апликацијом ћелија B16-F1 у дози од  $0.5 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$  DMEM. Проточном цитометријом одређена је процентуална заступљеност и апсолутан број НКp46<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> ћелија у плућима мишева са или без меланома који су третирани IL-33 или PBS (А) Интраперитонеална апликација IL-33 не утиче на процентуалну заступљеност и (Б) апсолутан број НК ћелија у плућима. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка (6 мишева по групи), Student-ов *t*/Mann-Whitney тест.

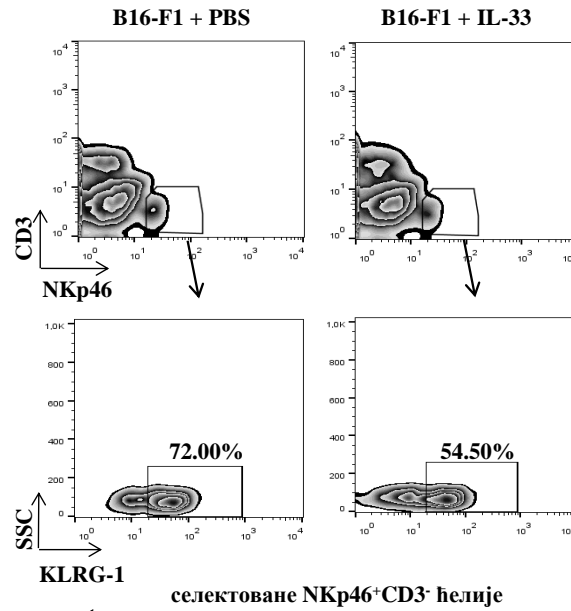
Међутим, IL-33 значајно повећава заступљеност NK ћелија које исказују инхибициони молекул PD-1 који истовремено представља маркер "истрошених" ћелија у групи мишева без меланом, док код мишева са меланомом ова разлика у процентуалном уделу PD-1<sup>+</sup>Nkr46<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK ћелија није достигла статистичку значајност (Графикон 17А). У групи мишева којима је трансплантиран меланом регистрована је значајно већа процентуална заступљеност CTLA-4<sup>+</sup>Nkr46<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK ћелија независно од третмана IL-33 (Графикон 17Б). Уз то, процентуални удео NK ћелија које исказују инхибициони рецептор KLRG-1 био је битно већи у групи мишева са меланомом, а третман IL-33 је значајно редуковао проценат оваквих NK ћелија и то само код мишева којима је трансплантиран меланом (Графикон 17В, Слика 5). Интересантан налаз је да је IL-33 битно повећао процентуални удео NK ћелија које исказују IFN- $\gamma$ , независно од присуства тумора (Графикон 17Г, Слика 6).



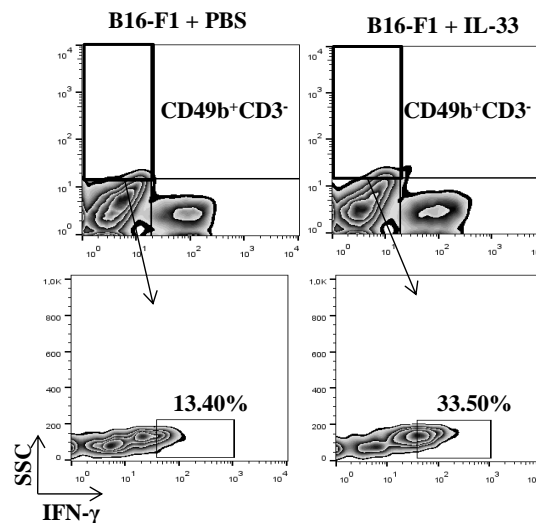
**Графикон 17. IL-33 повећава процентуални удео NK ћелија са антитуморским фенотипом.** Проточном цитометријом анализиран је функционални фенотип NK ћелија изолованих из плућа (А) IL-33 значајно повећава процентуалну заступљеност Nkr46<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> ћелија које исказују маркер "истрошених" ћелија PD-1 али само у контролној групи мишева код којих није трансплантиран меланом. (Б) У групи мишева са меланомом забележена је повећана заступљеност Nkr46<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> ћелија које исказују инхибициони молекул CTLA-4 независно од примене IL-33. (В) IL-33 битно смањује експресију инхибиционог молекула KLRG-1 на Nkr46<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK ћелијама у групи мишева са тумором. (Г) IL-33 значајно повећава проценат CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK ћелија које продукују IFN- $\gamma$  независно од присуства тумора. Резултати су

приказани као средња вредност±стандардна грешка (6 мишева по групи), *Student*-ов *t/Mann-Whitney* тест \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

На основу ових налаза очигледно је IL-33 подстиче урођени имунски одговор на меланом али он није довољно ефикасан у борби против хематогених метастаза.



Слика 5. Репрезентативни дот плотови илуструју процентуални удео KLRG-1<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> ћелија у метастатском ткиву плућа мишева третираних са IL-33 или PBS.

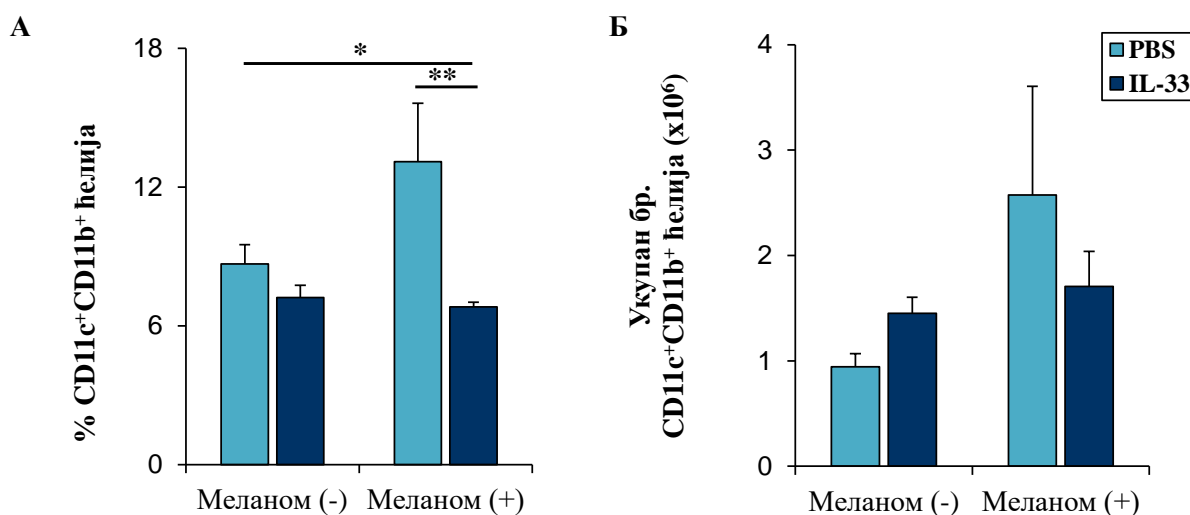


Слика 6. Репрезентативни дот плотови илуструју заступљеност IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> ћелија у плућима мишева са меланомом који су третиран са IL-33 или PBS.

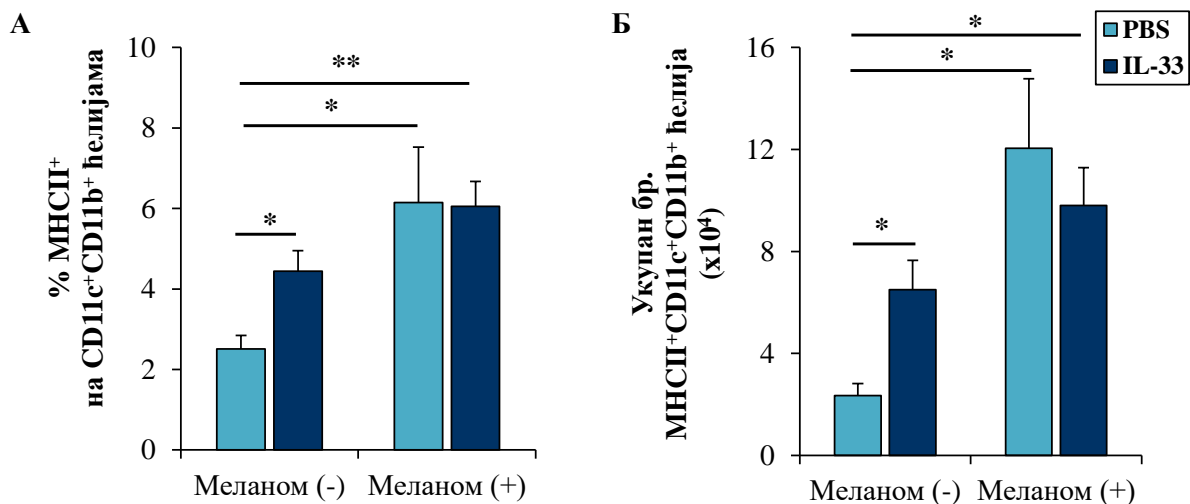
#### 4.6. IL-33 смањује удео, а не утиче на активациони статус дендритских ћелија после интравенског убризгавања малигнух меланоцита

Након што је показано да урођени имунски одговор активиран под контролом IL-33 није довољно снажан, односно пресудан у борби против метастатског меланома, следећи корак је био да се испита ефекат IL-33 на активацију и "обликовање" антитуморске стечене имуности. Добро је познато да су дендритске ћелије надзорне ћелије које су кључне како у иницијацији, тако и у регулацији и одржавању Т ћелијског имунског одговора. У складу са тим, проточном цитометријом је најпре одређен удео и активациони фенотип дендритских ћелија у плућима мишева свих испитиваних група.

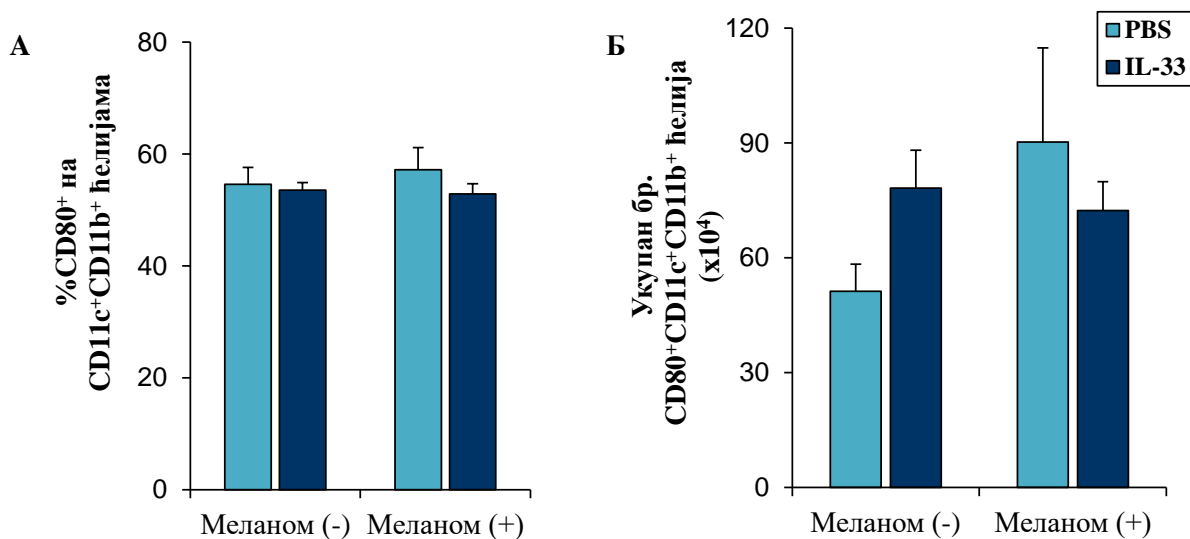
На левом панелу Графикана 18, јасно се уочава да IL-33 значајно смањује процентуалну заступљеност CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> дендритских ћелија у плућима мишева после убризгавања метастатских ћелија. Апсолутан број дендритских ћелија корелира са тим налазом, осим што ова разлика не досеже ниво статистичке значајности (Графикон 18, десни панел). Додатно, анализом експресије маркера активације на дендритским ћелијама у плућима, установљено је да IL-33 битно повећава проценат CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> дендритских ћелија које исказују МНС молекуле II класе и то само у групи мишева којима нису апликоване метастатске ћелије (Графикон 19А). Уз то, у групама мишева са метастатским меланомом примећује се упадљиво повећање процентуалне заступљености МНСII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> дендритских ћелија, али ово повећање је независно од апликације IL-33 (Графикон 19А). С друге стране, експресија костимулационог молекула CD80 непромењена је на дендритским ћелијама у плућима мишева свих испитиваних група (Графикон 20А). Када је реч о апсолутном броју, регистровано је да IL-33 изазива благо смањење експресије молекула МНСII и CD80 на дендритским ћелијама током антитуморског имунског одговора (Графикон 19Б, 20Б).



**Графикон 18. IL-33 смањује процентуални удео дендритских ћелија у плућима са метастазама.** Експерименталне метастазе су индуковане апликацијом B16-F1 варијетета меланома у дози од  $0.5 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$  DMEM. Проточном цитометријом одређена је процентуална заступљеност и апсолутан број CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> ћелија у плућима мишева са или без меланома који су третирани IL-33 или PBS. (А) IL-33 значајно смањује процентуалну заступљеност CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> дендритских ћелија код мишева са меланомом (Б) али не утиче на апсолутан број CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> ћелија. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка (6 мишева по групи), Student-ов *t*/Mann-Whitney *test*, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



**Графикон 19. IL-33 значајно повећава процентуалну заступљеност дендритских ћелија које експримирају МНС молекула II класе у плућима мишева пре убризгавања туморских ћелија.** Проточном цитометријом анализирана је експресија МНС молекула II класе на CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> дендритским ћелијама изолованих из плућа. **(А)** Код мишева без меланом IL-33 битно повећава проценат дендритских ћелија које експримирају МНС молекула II класе, док је код мишева са тумором експресија МНС молекула II класе повећана независно од апликације IL-33 **(Б)** што се уочава и посматрано кроз апсолутан број МНСII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> ћелија. Резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка (6 мишева по групи), *Student-ov t/Mann-Whitney test*, \*p<0.05, \*\*p<0.01.



**Графикон 20. IL-33 не утиче на експресију костимулационог молекула CD80 на дендритским ћелијама.** Проточном цитометријом анализирана је експресија молекула CD80 на CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> ћелијама изолованих из плућа, IL-33 не утиче на процентуалну заступљеност (А) и укупан број CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> ћелија које експримирају CD80 молекула (Б). Резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка (6 мишева по групи), *Student-ov t/Mann-Whitney test*.

Овакав налаз упућује на то да IL-33 смањује удео дендритских ћелија током антитуморског имунског одговора у плућима који није праћен разликом у погледу промене у активационом статусу ових антиген-презентујућих ћелија.



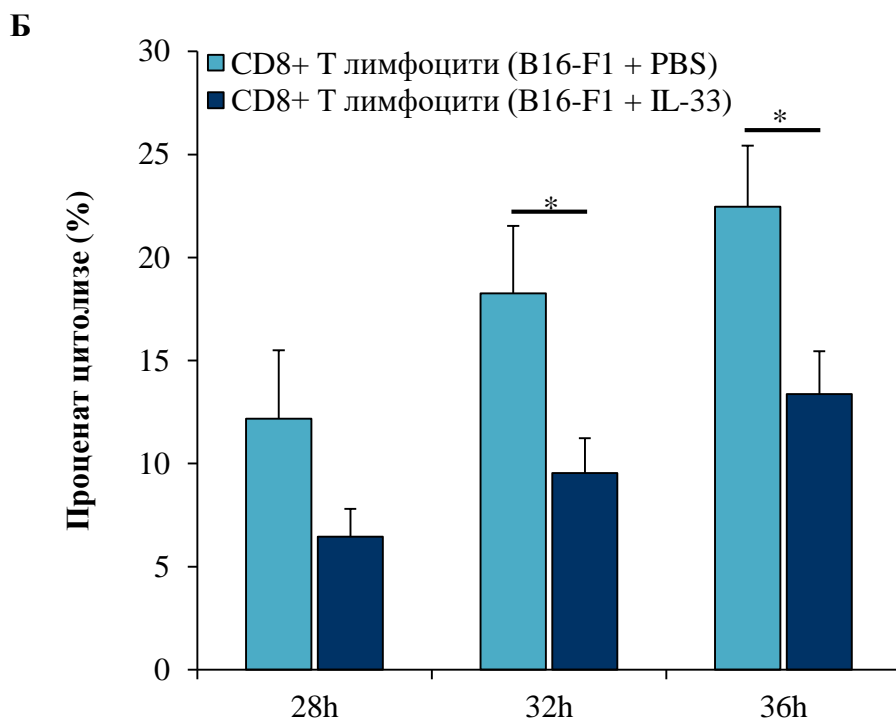
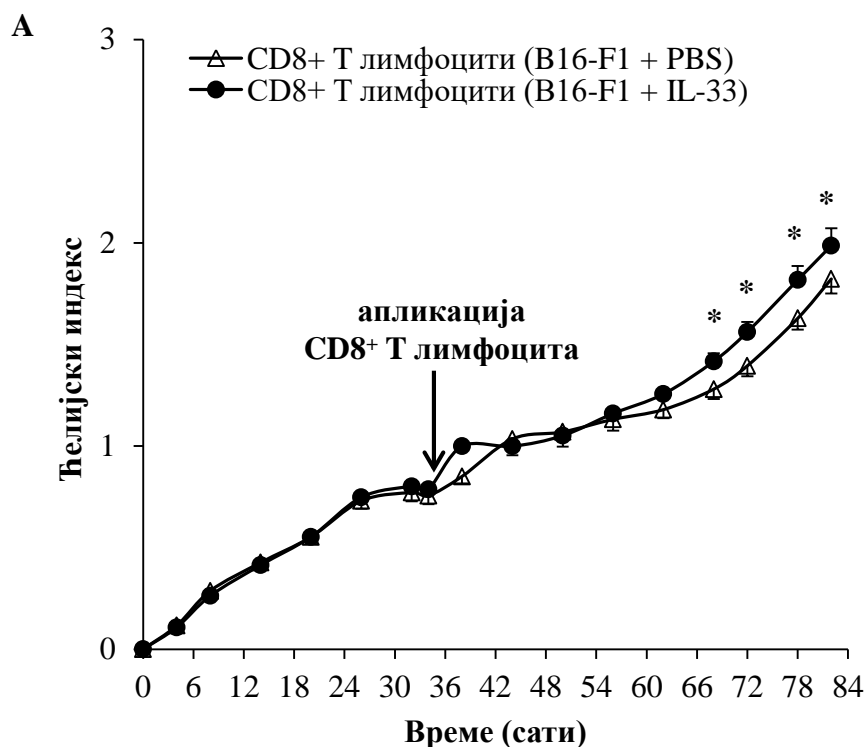
#### **4.7. IL-33 слаби туморицидну активност цитотоксичких CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита током формирања хематогених метастаза меланома**

##### **4.7а. IL-33 не мења процентуални удео али снижава туморицидни капацитет CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита**

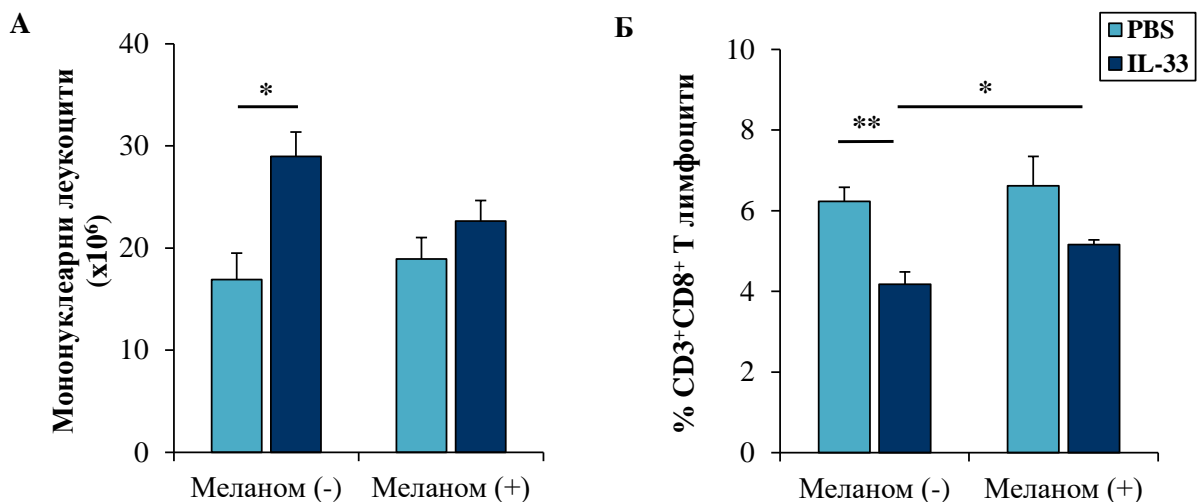
С обзиром на чињеницу да у стеченом имунском одговору, CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити представљају централну карику у борби против меланома, најпре је тестиран ефекат IL-33 на цитотоксички потенцијал CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита. Наиме, цитотоксичка активност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита изолованих из метастатских плућа је, након њихове кокултивације са B16-F1 ћелијама, индиректно одређена на основу ћелијског индекса туморских ћелија. Примећује се значајан пораст ћелијског индекса туморских (таргет) B16-F1 ћелија, почев од 32.-ог сата од кокултивације са ефекторским ћелијама односно CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима мишева са метастатским меланомом третираних са IL-33, што указује на јасну редукцију туморицидног капацитета CD8<sup>+</sup>Т лимфоцита која је последица деловања IL-33 (Графикон 21А). Тако, цитолитичка активност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита мишева са метастатским меланомом који су третирани са IL-33 значајно опада 32.-ог и 36.-ог часа од кокултивације са туморским ћелијама (Графикон 21Б).

У циљу да се расветле могући разлози смањене туморицидне активности CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита, следећи корак у овој студији је био да се испита ефекат IL-33 на заступљеност и функционални фенотип CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у плућима мишева свих испитиваних група. IL-33 битно повећава апсолутан број мононуклеарних леукоцита и снижава проценат CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у групи мишева без тумора, али не утиче на апсолутан број мононуклеарних леукоцита нити процентуални удео цитотоксичких CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у плућима мишева којима су убризгани метастатски меланоцити (Графикон 22А, Б). Примећује се и да IL-33 индукује већу заступљеност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у групи мишева са меланомом него код мишева без меланома (Графикон 22Б).

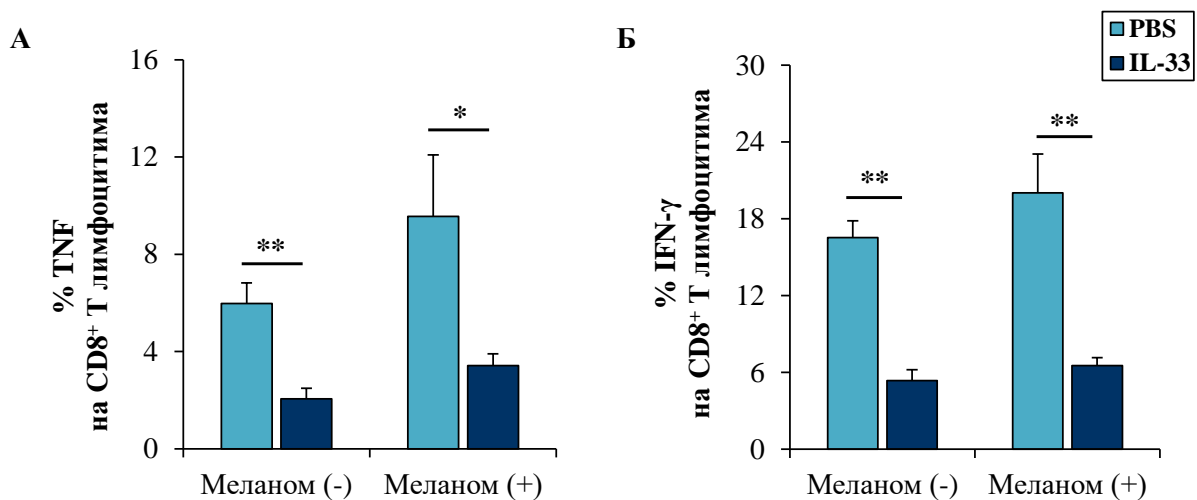
Међутим, интересантан налаз је да је IL-33 значајно смањио процентуалну заступљеност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита који продукују проинфламацијске цитокине, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , независно од присуства тумора (Графикон 23А, Б; Слика 7). Супротно, IL-33 индукује битно повећану заступљеност CD8<sup>+</sup>Т лимфоцитима који продукују имunosупресивни цитокин, IL-10, и то само у групи мишева са меланомом (Графикон 24; Слика 7).



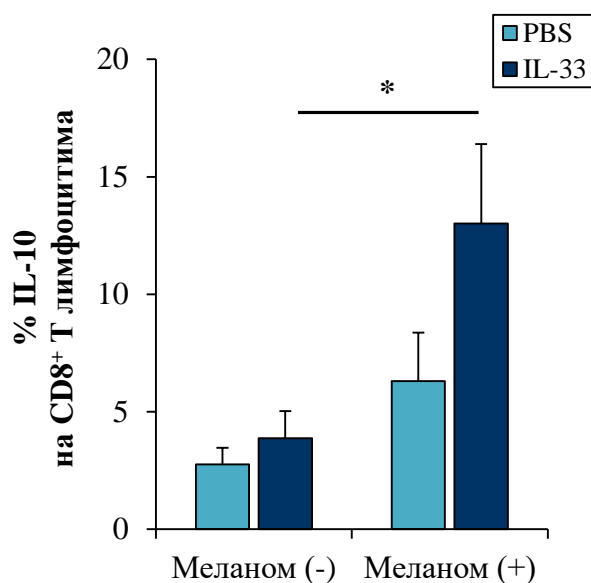
**Графикон 21. IL-33 редукује цитотоксички капацитет CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита.** Туморске ћелије (таргет) B16-F1 ћелије су коинкубирани са ефекторским ћелијама односно CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима изолованим из плућа мишева са метастатским меланомом који су третирани са IL-33 или PBS. Ћелијски индекс B16-F1 ћелија праћен је на апарату *Roche xCELLigence*. **(A)** Региструје се значајно повећање ћелијског индекса B16-F1 ћелија почев од 32.-ог сата од кокултивације са CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима изолованих из плућа мишева који су третирани са IL-33. **(B)** Цитолитичка активност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита која одражава проценат цитоллизе B16-F1 ћелија. Резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка (6 мишева по групи), *Student-ов t* тест \**p*<0.05.



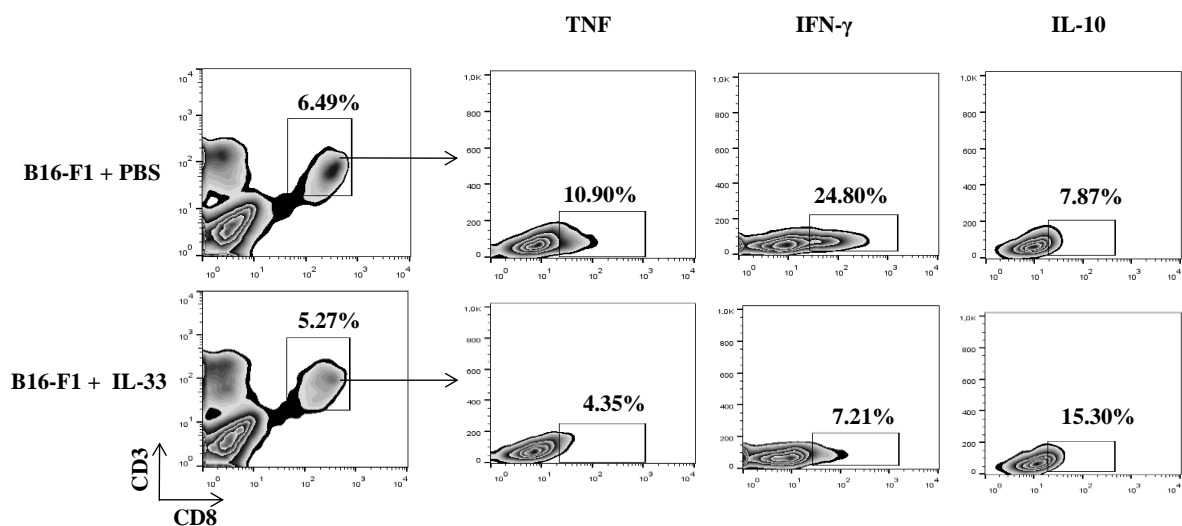
**Графикон 22. Ефекат ИЛ-33 на акумулацију мононуклеарних леукоцита и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у плућима.** Експерименталне метастазе су индуковане апликацијом малигнух меланоцита B16-F1 у дози од  $0.5 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$  DMEM. Проточном цитометријом одређен је апсолутан број мононуклеарних леукоцита и процентуална заступљеност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у плућима мишева са и без меланоматских метастаза, а који су третирани ИЛ-33 или PBS (А) ИЛ-33 је индуковао повећан апсолутан број мононуклеарних леукоцита у плућима мишева без меланоматских метастаза, али не и код мишева којима је трансплантиран меланом. (Б) ИЛ-33 не утиче на процентуалну заступљеност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита код мишева са меланоматским метастазама, док код мишева без меланоматских метастаза смањује проценат CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка (6 мишева по групи), Student-ов *t* тест, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



**Графикон 23. ИЛ-33 смањује проценат проинфламацијских CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у плућима.** (А) ИЛ-33 смањује процентуалну заступљеност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита који исказују TNF-α. (Б) Код мишева третираних ИЛ-33, смањен је проценат CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита који експримирају IFN-γ. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка (6 мишева по групи), Student-ов *t* тест, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



**Графикон 24.** IL-33 подстиче експресију IL-10 у CD8<sup>+</sup> T лимфоцитима код мишева са метастатским меланомом. Код мишева са меланомом који су третирани са IL-33 забележена је повећана експресија IL-10 на CD8<sup>+</sup> T лимфоцитима. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка (6 мишева по групи), *Student*-ов *t* тест, \**p*<0.05, \*\**p*<0.01.



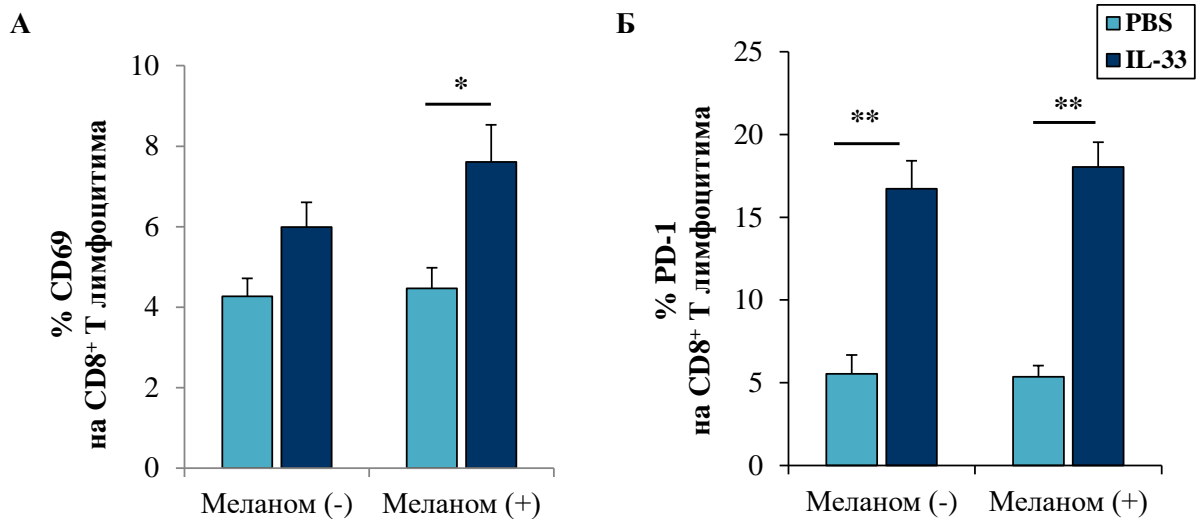
**Слика 7.** Репрезентативни дот плотови илустрјују селектоване CD8<sup>+</sup> T лимфоците који експримирају TNF-α, IFN-γ и IL-10 у метастаском ткиву плућа мишева третираних са IL-33 или PBS.

#### 4.76. IL-33 повећава заступљеност инхибиционих рецептора на цитотоксичким CD8<sup>+</sup> T лимфоцитима

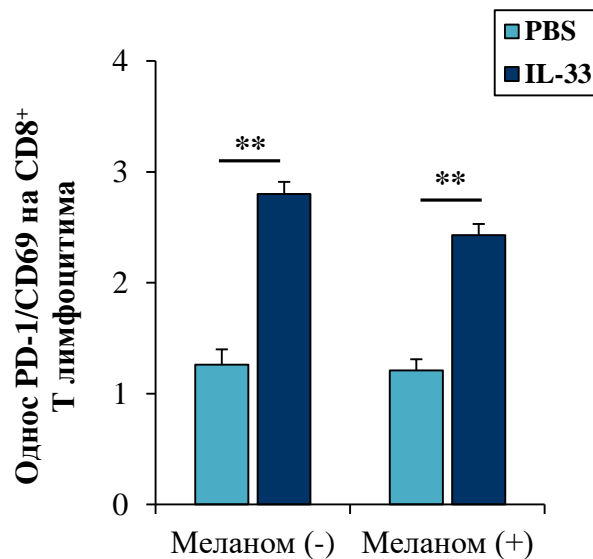
Даља анализа података добијених проточном цитометријом указала је да системска апликација IL-33 индукује битан пораст CD8<sup>+</sup> T лимфоцита који исказују рани активациони рецептор, CD69, и то у плућима мишева са метастатским меланомом (Графикон 25А). Истовремено, IL-33 повећава и процентуални удео "истрошених" односно мање ефикасних PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T лимфоцита како код мишева без меланома тако и код мишева са меланомом (Графикон 25Б; Слика 8А). Када се пак анализира однос инхибиционог наспрам активационог рецептора, јасно се види да је овакав однос PD-1/CD69 на CD8<sup>+</sup> T лимфоцитима битно повећан у групи мишева третираних са IL-33 и

то независно од присуства меланома (Графикон 26). Поред тога, IL-33 повећава заступљеност и других инхибиционих рецептора на CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима што додатно ремети туморицидни потенцијал цитотоксичких лимфоцита: забележен је значајан пораст KLRG-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у групи мишева са трансплантираним меланомом (Графикон 27А; Слика 8Б), као и CTLA-4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т лимфоцита и то независно од присуства тумора (Графикон 27Б; Слика 8В).

Добијени налази имплицирају да IL-33 јасно смањује туморицидни потенцијал цитотоксичких CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита, што може бити један од важних фацититирајућих механизма одговорних за интензиван раст хематогених метастаза мишијег меланома.

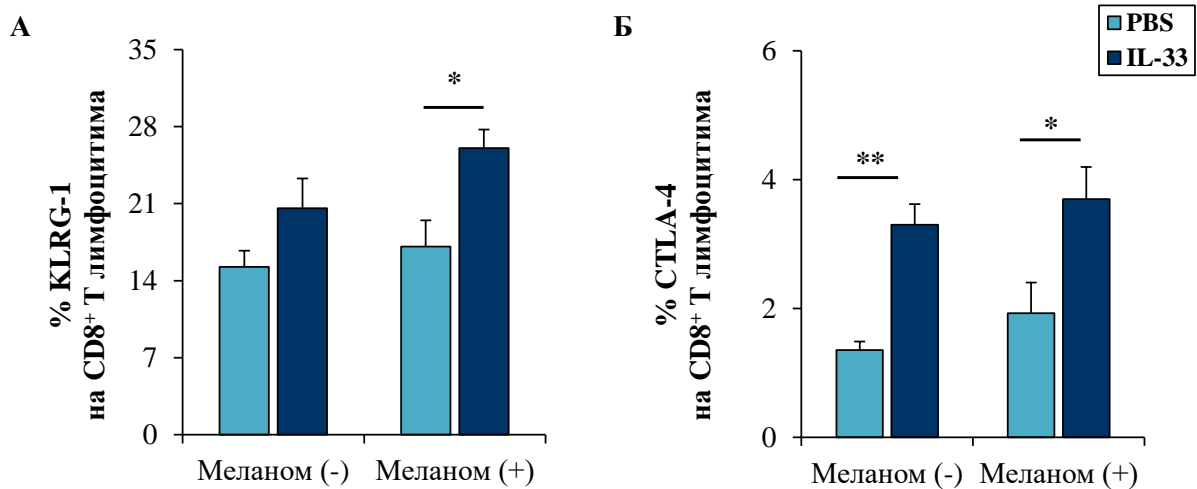


Графикон 25. Утицај IL-33 на експресију молекула CD69 и PD-1 на CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима плућа. (А) IL-33 повећава процентуалну заступљеност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита који експримирају CD69 у плућима мишева са меланомом. (Б) Код мишева третираних са IL-33 повећана је експресија PD-1 молекула на CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима независно од присуства меланома. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка (6 мишева по групи), Student-ов *t* тест, \**p*<0.05, \*\**p*<0.01.

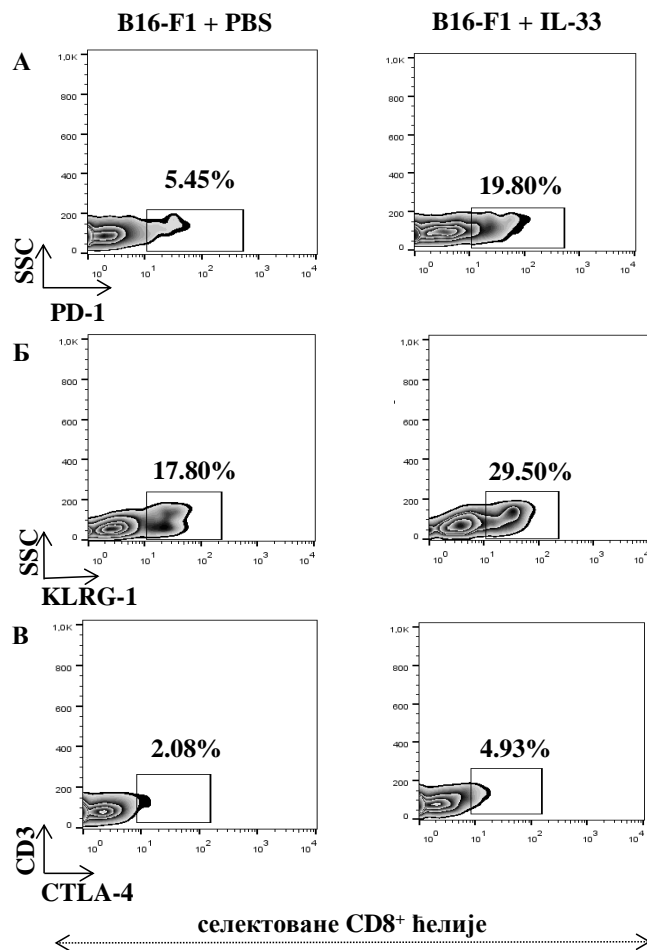


Графикон 26. IL-33 битно утиче на однос експресије молекула PD-1 наспрам CD69 на цитотоксичким CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима. IL-33 значајно повећава однос експресије PD-1/CD69

молекула на CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима независно од присуства меланома. Резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка (6 мишева по групи), *Student-ов t* тест, \*\**p*<0.01.



**Графикон 27. IL-33 повећава експресију инхибиционих молекула на цитотоксичким CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима. (А) IL-33 повећава процентуалну заступљеност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита који експримирају KLRG-1 у плућима мишева са меланомом. (Б) IL-33 повећава процентуални удео CTLA-4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита независно од присуства меланома. Резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка (6 мишева по групи), *Student-ов t/Mann-Whitney* тест, \**p*<0.05, \*\**p*<0.01.**

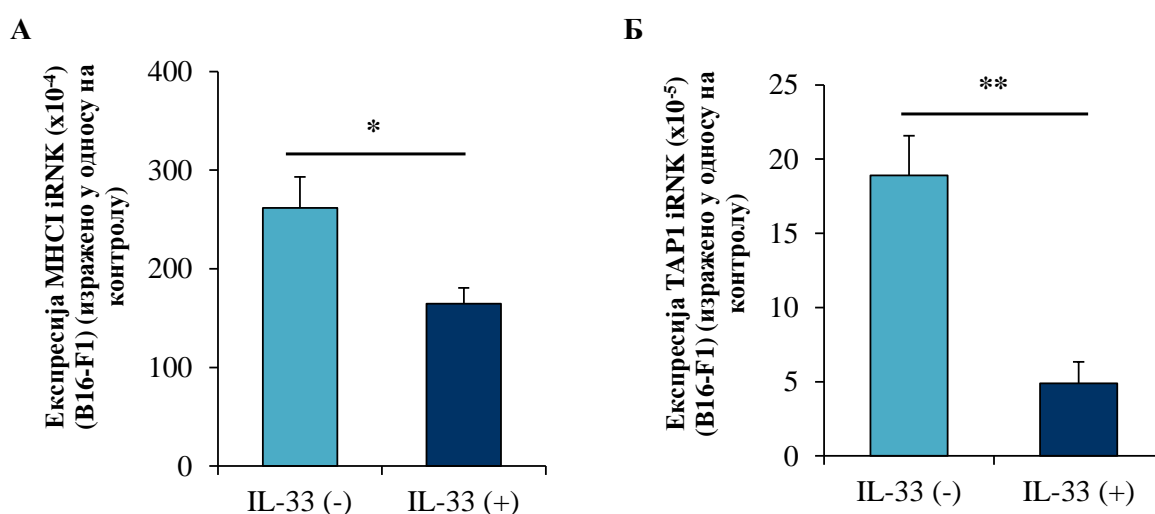


**Слика 8. Репрезентативни доп-плотови илуструју експресију молекула PD-1 (А), KLRG-1 (Б) и CTLA-4 (В) у оквиру популације CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита код мишева третираних са IL-33 или PBS.**

#### 4.7в. IL-33 редукује имуногеност малигних меланоцита В16-F1

Дефект у експресији МНС молекула I класе и других протеина укључених у машинерију за обраду антигена резултују смањеном презентацијом туморских антигена и последично избегавањем имунског надзора у коме значајан удео имају тумор-специфични CD8<sup>+</sup>T лимфоцити (437). Стога, у наставку истраживања је испитан утицај IL-33 на експресију МНС молекула I класе и TAP1 на туморским ћелијама В16-F1, на нивоу iRNK.

На Графикону 28 јасно се види да је третман В16-F1 ћелија са IL-33 драстично смањио експресију iRNK за МНС молекуле I класе и TAP1 у поређењу са нетретираним малигним ћелијама.



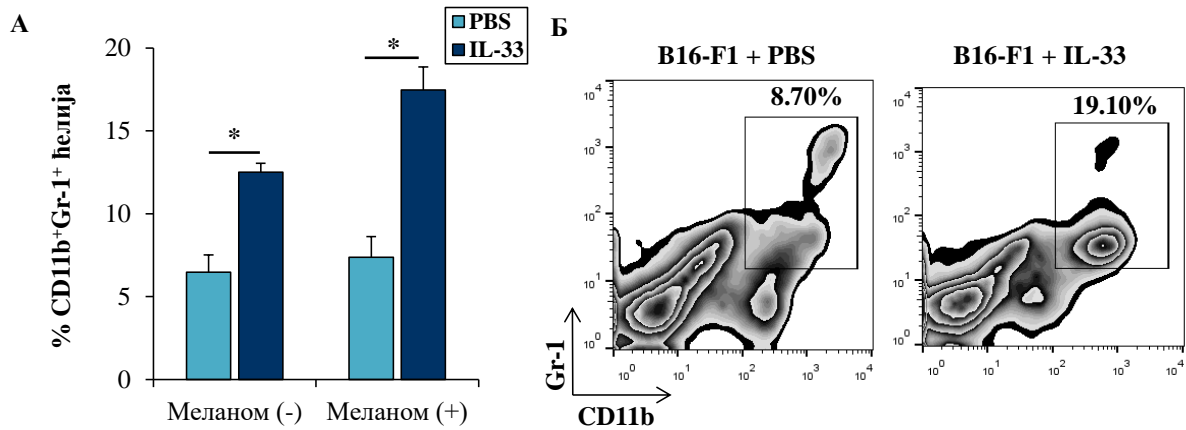
**Графикон 28. IL-33 редукује имуногеност туморских ћелија В16-F1.** Након 48-часовне инкубације са IL-33 (200 ng/ml) екстрахована је укупна iRNK. IL-33 смањује експресију iRNK за синтезу МНС молекула I класе (А) и TAP1 у В16-F1 ћелијама (Б). Опсег интензитета iRNK сваког узорка нормализован је у односу на GAPDH који је представљао ендегену контролу. Резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка и изражени су у односу на нетретирани В16-F1 ћелије. Student-ов *t* тест, \**p*<0.05, \*\**p*<0.01.

Осим што супримира цитотоксичку активност CD8<sup>+</sup>T лимфоцита, на основу добијеног налаза може се констатовати да IL-33 истовремено редукује и имуногеност малигних меланоцита и следствено њихово препознавање уз помоћ цитотоксичких CD8<sup>+</sup>T лимфоцита, што коначно резултује смањеном туморицидном активношћу CD8<sup>+</sup>T лимфоцита.

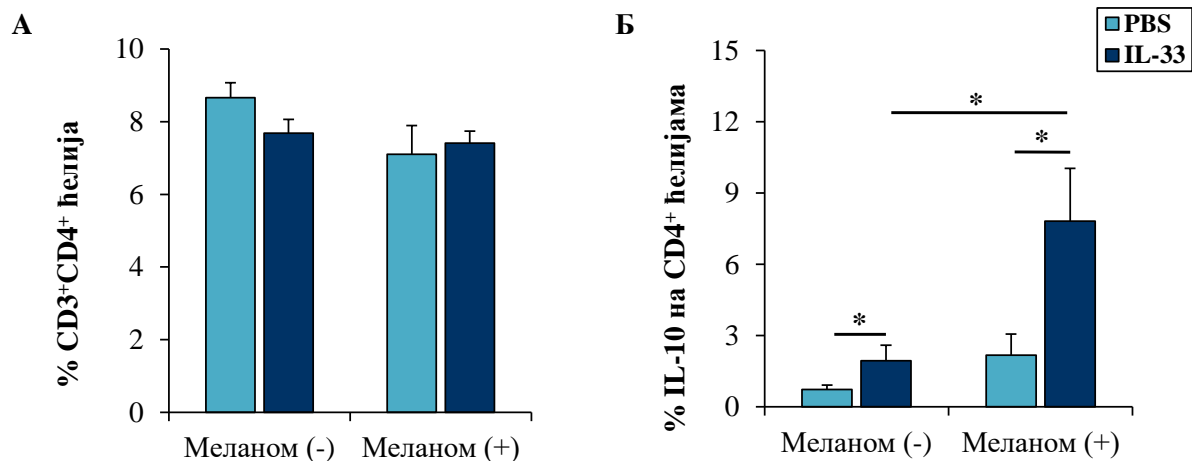
#### 4.8. IL-33 креира имуносупресивну микросредину у метастатском ткиву плућа

На крају, са циљем да се испита ефекат IL-33 на популацију имуносупресивних ћелија, анализиран је удео мијелоидних супресорских ћелија (MDSCs) и регулаторних T лимфоцита у оквиру популације моноклеарних ћелија плућа.

IL-33 битно повећава учесталост CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs како код мишева без меланома, тако и код мишева са метастатским меланомом (Графикон 29). Иако не мења процентуалну заступљеност CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T лимфоцита у плућима (Графикон 30А), IL-33 значајно повећава експресију IL-10 на помагачким CD4<sup>+</sup>T лимфоцитима и то независно од присуства тумора (Графикон 30Б; Слика 9А).



**Графикон 29. IL-33 повећава процентуалну заступљеност MDSCs у плућима.** Експерименталне метастазе су индуковане апликацијом B16-F1 варијетета меланоматских ћелија у дози од  $0.5 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$  DMEM. (А) У плућима мишева којима је апликован IL-33 уочава се повећан проценат CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs и то независно од присуства тумора, а што је илустровано репрезентативним дот-плотовима (Б). Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка (6 мишева по групи), Student-ов *t*/Mann-Whitney тест, \* $p < 0.05$ .



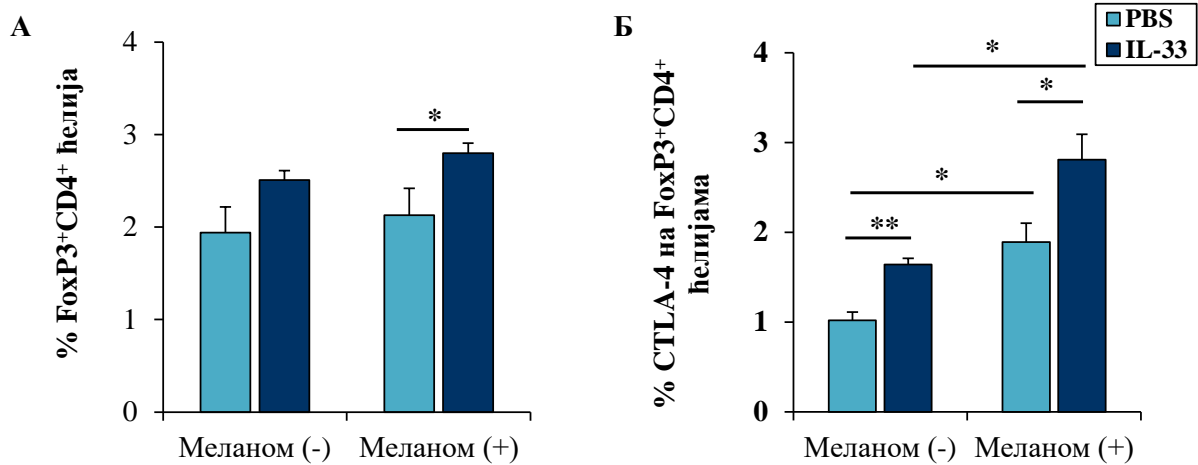
**Графикон 30. IL-33 не мења удео помагачких CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита али повећава заступљеност IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита.** Експерименталне метастазе су индуковане апликацијом ћелија B16-F1 ( $0.5 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$  DMEM). (А) IL-33 не утиче на процентуалну заступљеност CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита у плућима. (Б) Код мишева третираних са IL-33 повећана је експресија IL-10 у CD4<sup>+</sup> Т лимфоцитима, независно од тумора. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка (6 мишева по групи), Student-ов *t*/Mann-Whitney тест, \* $p < 0.05$ .

Поред наведеног, примећује се да IL-33 значајно повећава удео регулаторних FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита и то само у групи мишева са метастатским меланомом (Графикон 31А). Када се пореди експресија инхибиционог молекула CTLA-4 на регулаторним Т лимфоцитима, јасно се запажа битно већи проценат регулаторних CTLA-4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита у мишева третираних са IL-33 него у контролној групи, и то независно од присуства меланоматских метастаза (Графикон 31Б; Слика 9Б).

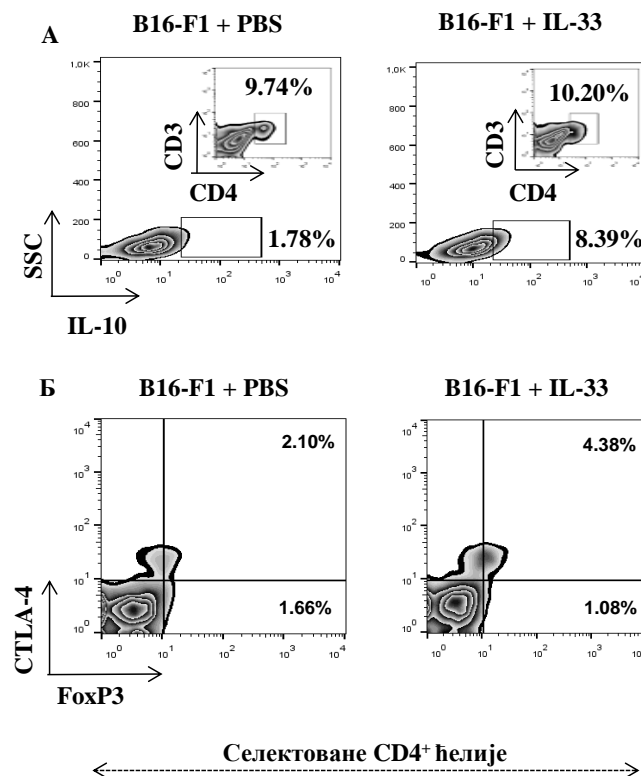
Овај очигледан налаз имуносупресивних ћелија током хематогеног метастазирања меланоматских ћелија је подстакао да се детаљније окарактерише микроокружење мишева у микроокружењу плућа са метастазама. Уочена је повећана експресија iRNK за синтезу



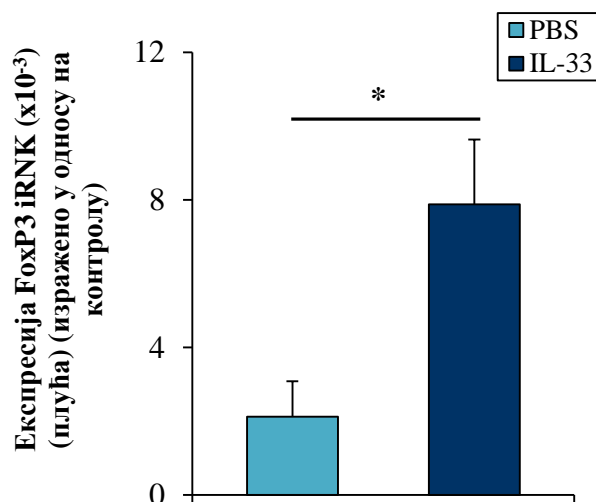
ФохР3, IL-10 и TGF- $\beta$  код мишева третираних са IL-33 што указује на то да IL-33 подстиче имуносупресивни миље у метастатском ткиву плућа (Графикон 32 и 33).



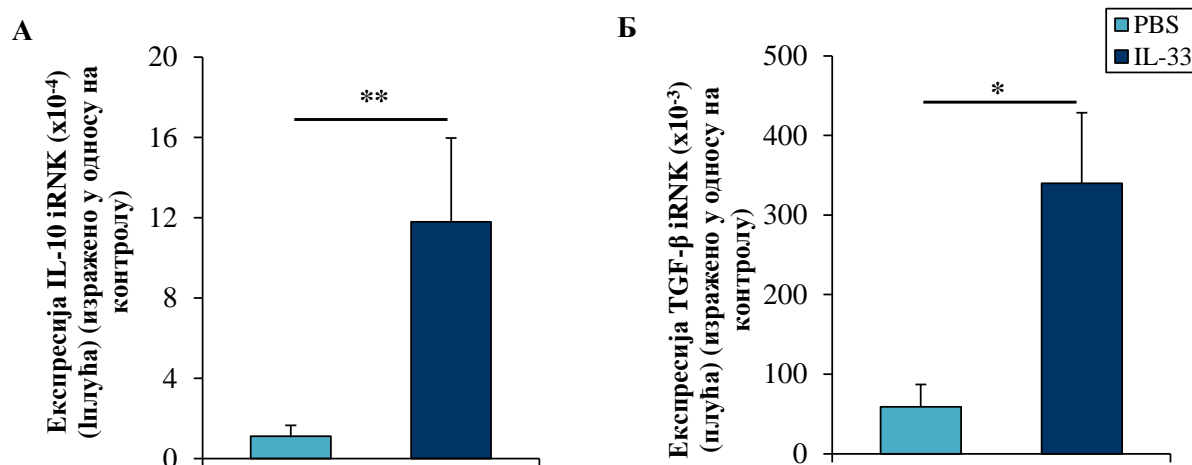
**Графикон 31. IL-33 повећава заступљеност регулаторних Т лимфоцита у метастатском ткиву плућа.** Експерименталне метастазе су индуковане апликацијом ћелија B16-F1 ( $0.5 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$  DMEM). (А) У плућима мишева са меланомом који су третиран са IL-33 детектована је повећана процентуална заступљеност регулаторних ФохР3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Т лимфоцита. (Б) IL-33 повећава заступљеност регулаторних Т лимфоцита који експримирају инхибициони молекула СТЛА-4, нарочито у групи мишева са метастатским меланомом. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка (6 мишева по групи), Student-ов *t* тест, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



**Слика 9.** Репрезентативни дот-плотови илустрирају удео IL-10<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита (А), као и експресију молекула ФохР3<sup>+</sup> и СТЛА-4<sup>+</sup> на селектованој популацији CD4<sup>+</sup> Т лимфоцит (Б) код мишева третираних са IL-33 или PBS.



**Графикон 32. IL-33 повећава експресију iRNA за синтезу FoxP3 у метастатском ткиву плућа.** Укупна iRNA је екстрахована из метастатских плућа мишева третираних IL-33 или PBS. Код мишева третираних IL-33 повећана је експресија iRNA за синтезу FoxP3 молекула. Као ендогена контрола коришћена је iRNA за GAPDH. Резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка изражено у односу на контролу (нетретиране мишеве) (6 мишева по групи), *Student*-ов *t* тест, \* $p < 0.05$ .



**Графикон 33. IL-33 повећава експресију iRNA за синтезу цитокина IL-10 и TGF-β у метастатском ткиву плућа.** Укупна iRNA је екстрахована из ткива плућа мишева третираних са IL-33 или PBS. Под утицајем IL-33 повећана је експресија iRNA за синтезу IL-10 (А) и TGF-β (Б). Молекула iRNA за синтезу GAPDH је коришћен као ендогена контрола. Резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка изражено у односу на нетретиране мишеве (6 мишева по групи), *Student*-ов *t* тест, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Добијени налаз имплицира могућност да IL-33 у мишјем меланому стимулише развој метастатске микросредине коју одликује повећана имunosупресија што је вероватно додатни механизам који погодује експанзији хематогених метастаза у плућима.

## 5. ДИСКУСИЈА

Цитокини су, као молекулски гласници ћелија имунског система, важна компонента у прогресији, али и у борби против тумора (438). Стога, разумевање механизма њихове експресије и активације, а нарочито разумевање утицаја цитокина на ћелије имунског система ангажоване у про- и анти-туморском имунском одговору, требало би да помогне у проналажењу новог и што ефикаснијег приступа у имунотерапији тумора (438,439), укључујући меланом.

Док бројне студије говоре да је IL-33 укључен у раст и метастазирање различитих врста тумора (380,382,384,386,391,397,399,400,407), подаци из доступне литературе сугеришу на антитуморску активност IL-33 у меланому. Наиме, IL-33, ектопично експримиран у туморским ћелијама, трансгено експримиран у плућима, као и интраназално апликован, значајно инхибира како раст примарног тумора тако и метастазирање мишјег меланома (161,440,441). Будући да је системска апликација најпогоднији начин давања терапеутика нарочито у стадијуму дисеминације метастатских ћелија, у актуелној студији процењен је ефекат системске апликације IL-33 у моделу меланома.

Резултати студије упућују на то да упркос рестриктивном ефекту на раст примарног мишјег меланома код оба ћелијска варијетета (B16-F1 и B16-F10), системска апликација IL-33 индукује интензиван раст метастатских колонија у плућима, а нарочито B16-F1 варијанте меланома са мањим метастатским потенцијалом. Чини се да овакав прометастатски ефекат у меланому, IL-33, остварује тако што "пригушује" туморицидни капацитет цитотоксичких CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита и истовремено генерише имуносупресивну микросредину у плућима што све заједно погодује експанзивном расту хематогених метастаза. Додатно, забележено је да је концентрација IL-33 значајно повећана у серуму оболелих у унапредованом стадијуму меланома кога одликује регионално метастазирање. Стога, добијени налази у актуелној студији доводе у питање евентуалну терапијску примену IL-33 код тумора.

### 5.1. Амбивалентна улога IL-33 у мишјем меланому у зависности од стадијума и метастатског капацитета тумора

Захваљујући плејотропној природи, IL-33 игра дихотомну улогу у различитим патолошким условима. Сматра се да IL-33, у зависности од ткивне и ћелијске локализације, нивоа експресије рецептора ST2, а такође и од цитокинског профила у микроокружењу, остварује вишеструку штетну или заштитну активност у аутоимунским, инфламацијским и инфективним обољењима (442,443,444,445,446). Када је реч о тумору, ситуација је слична: IL-33 игра про- или анти-туморску улогу, а коју ће улогу одиграти претпоставља се да зависи од врсте тумора, цитокинског миљеа, нивоа експресије, ћелијске дистрибуције и локализације. Документовано је да је IL-33 укључен у генезу и прогресију различитих врста тумора, као што су карцином дојке (377), желуца (447), плућа (448) и глиом (449). Међутим, у неким студијама откривен је антитуморски потенцијал осовине IL-33/ST2 који се првенствено темељи на оптималном имунском одговору (309,450). Претпоставља се да алармин IL-33, амплификацијом механизма урођене имуности, може да покрене снажну акутну инфламацију и тако последично спречи канцерогенезу на терену неких патолошких поремећаја (451). IL-33, као мултифункционални цитокин, укључен је и у имунорегулацију ефикасног тумор-специфичног целуларног имунског одговора (418).

У доступној литератури подаци о IL-33 у контексту меланома су мање-више контроверзни што упућује на сложену улогу IL-33 у меланому и намеће даља испитивања. Прве студије које се баве изучавањем IL-33 на моделу мишијег меланома говоре о његовој потенцијалној антитуморској улози. Gao и сарадници су показали да повећана ектопична експресија IL-33 у B16 малигним меланоцитима ефикасно инхибира раст примарног тумора (440). У актуелној студији је документовано да интраперитонеална апликација IL-33 ефикасно редукује раст примарног тумора B16-F1 и B16-F10 варијетета мишијег меланома, поготово варијетета са slabим метастатским потенцијалом (B16-F1). Осмог дана од субкутане имплантације ћелија B16-F1, инциденца палпабилног тумора у групи мишева третираних са IL-33 је била чак око 8 пута мања него у контролној групи (Графикон 1). Поред инциденце, код њих су и површина и маса примарног меланома били статистички значајно мањи (Графикон 2). Када је реч о утицају IL-33 на примарни раст ћелијског варијетета B16-F10 са израженим метастатским потенцијалом, иако испитиван цитокин није успео значајно да смањи инциденцу палпабилног тумора (Графикон 3), регистровано је да су мишеви након третмана IL-33 имали двостуко до троструко мању површину и масу тумора (Графикон 4). Овакав налаз је у складу са резултатима других истраживања које указују да системска примена IL-33 индукује регресију субкутано имплантираног B16-F10 варијетета меланома (161,452). Резултати већине студија сугеришу на то да се способност IL-33 да ефикасно редукује раст примарног меланома базира на ангажовању ефикасних механизма антитуморске имуности (161,440,452). Сматра се да IL-33 је, као алармин, кључан окидач за покретање локалне акутне инфламације и тиме на више начина учествује у "обликовању" урођеног и стеченог имунског одговора (453). У случају губитка ћелијског интегритета у епителу, у неким патолошким променама укључујући туморске лезије, IL-33 подстиче развој Th1 имунског одговора (339). Уз наведено, претходна истраживања су показала директан туморицидни ефекат IL-33 на HCT-116 ћелије колоректалног карцинома људи, а огледа се у инхибицији пролиферације и индукцији апоптозе (454). Наиме, детектовано је да је антипролиферативна активност IL-33 повезана са смањеном експресијом циклина B, циклина D и CDK2 у туморским ћелијама. IL-33 такође може да индукује апоптозу туморских ћелија тако што у њима смањује експресију антиапоптотских молекула, FLIP (енгл. *Flice-Like Inhibitory Protein*) и Bcl-2 (454), што све заједно вероватно доприноси успешној регресији тумора.

Метастазирање тумора је главни узрок смрти оболелих, а плућа су орган који је често погођен у току овог процеса. Добро је познато да меланом одликује изузетно изражен метастатски потенцијал, а плућа су, и код ове агресивне врсте тумора, предилекционо место висцералних метастаза (455). Када је испитан утицај IL-33 на метастазирање у овој студији ситуација је била изненађујућа с обзиром на његов рестриктивни ефекат на раст примарног тумора. Прво, IL-33 примењен интраназално, као вид локалне имуноterapiје, је у плућима стимулисао раст експерименталних метастаза B16-F1 варијетета меланома са мањим метастатским потенцијалом. Мада забележен пораст просечног броја метастаза није достигао статистичку значајност, величина метастаза била је драстично већа у плућима мишева третираних IL-33 (Графикон 5). Друго, у случају B16-F10 варијетета меланома са већим метастатским капацитетом развиле су се бројне и масивне метастазе код свих мишева и то независно од примене IL-33 (Графикон 6). Треће, иако пораст инциденце и броја метастатских колонија у мишева третираних IL-33 није достигао статистичку значајност (Графикон 7), актуелна студија по први пут је показала да IL-33 примењен системски, као најпогоднији начин апликације терапутика у лечењу метастатског тумора, индукује експанзивни раст метастатских колонија узимајући као параметар просечну величину

метастаза, као и заступљеност највећих метастаза у плућима (Графикон 8, Слика 1). Слично овом налазу, *Schuijs* и сарадници показали су да мала доза IL-33, апликована интраназално, индукује инфламацију руковођену типом 2 урођених лимфоидних ћелија (ILC2) што олакшава успостављање плућних метастаза код B16-F10 варијетета меланома, а и других врста тумора (448). Супротно томе, резултати других истраживања указују да трансгена експресија у плућима (441) или ектопична експресија IL-33 у туморским ћелијама (440), као и локална апликација рекомбинантног IL-33 (161) атенуира метастатски капацитет меланома тако што инхибира успостављање хематогених метастаза у плућима. Дакле, на основу резултата актуелне студије може се закључити да IL-33 игра врло комплексну улогу у меланому тако што у раној фази остварује антимеланомски ефекат који се огледа у ефикасној редукцији раста примарног тумора, док у каснијим фазама IL-33 стиче протуморску улогу и индукује експанзиван раст метастаза. Чини се да на ову амбивалентну улогу IL-33 утичу стадијум и метастатске карактеристике меланома.

Други малигноми такође сведоче о прометастатском ефекту IL-33. У колоректалном карциному мишева, IL-33 је укључен у ремоделовању туморске микросредине и процесу ангиогенезе и на тај начин стимулише експанзију метастаза у јетри (401). Показано је да осовина IL-33/ST2 подстиче метастазирање карцинома јајника и желуца тако што индукује абератну активацију киназа ERK и JNK и на тај начин стимулише секрецију молекула, MMP-3 и IL-6, одговорних за инвазију и миграцију туморских ћелија (388,456). То што важи за раст примарног тумора, тако и за метастазирање важи да брзу и неконтролисану пролиферацију метастатских ћелија у удаљеним органима одликује већа потреба за АТФ што захтева повећано преузимање глукозе. Претпоставља се да IL-33 функционише као ефикасан регулатор метаболизма тумора тако што повећава експресију мембранског транспортера глукозе (енгл. *Glucose Transporter 1*, GLUT1) у ћелијама неситноћелијског карцинома плућа и на тај начин повећава преузимање глукозе и гликолизу што коначно фацитира прогресију тумора (384). Јасно је да IL-33 на различите начине може да утиче на успешност метастазирања тумора.

## **5.2. Евалуација експресије IL-33 и рецептора ST2 у меланому**

Малигне ћелије живе у комплексном микроокружењу чији конституенти су бројне ћелије домаћина, познате под именом ћелије туморске строме (457). У туморској микросредини, малигне ћелије често дају различитим ћелијама строме па и ћелијама имунског система "инструкције" како да им пруже неопходну подршку у расту и метастазирању (458). Цитокини су централни гласници ових ћелијских интеракција у туморском микроокружењу (459). IL-33 је у малигнонима познат по различитим функцијама, а уз то, критичан је за функционисање бројних ћелија имунског система у туморској микросредини (460). Стога је у актуелној студији анализирана експресија IL-33 и његовог функционалног рецептора, ST2, у примарним и у метастатским лезијама мишијег меланома.

### **5.2.1. Интраперитонеална примена IL-33 повећава експресију рецептора ST2 у метастатским лезијама мишева, док у примарном тумору индукује повећану експресију IL-33**

Резултати неких истраживања имплицирају да се експресија IL-33 и ST2 динамично мења током транзиције из преканцерске у канцерску лезију и да је значајно већа у односу на здраво ткиво у колоректалној регији (381). Налаз повећане експресије

IL-33 и ST2 у туморским ћелијама и ћелијама строме, указује на мешовити ћелијски извор IL-33 и ST2 у туморском микроокружењу који заузима значајно место у прогресији колоректалног карцинома (381,461). Блокада овог сигналног пута укида протуморску активност IL-33. Протуморска улога IL-33 потврђена је *in vivo* у моделу тумора са прекомерном експресијом IL-33 или након третмана са IL-33, а која се огледа у рапидном расту и метастазирању колоректалног карцинома (461).

Резултати ранијег истраживања сугеришу да делеција гена за рецептор ST2 за последицу има појачање антитуморског имунског одговора и последично супресију раста и метастазирања мишјег карцинома дојке (397). У овој студији регистровано је да IL-33 значајно подстиче експресију iRNK за молекулу ST2 у ћелијама B16-F1 *in vitro* (Графикон 9), што указује на могуће директно дејство IL-33 на туморске ћелије. Fang и сарадници су регистровали да ћелијски третман IL-33 индукује повећану експресију ST2 у ћелијама колоректалног карцинома (461), што је сагласно са налазом ове студије. Један од директних ефеката IL-33 на туморске ћелије је активација матичног фенотипа у ћелијама колоректалног карцинома што је резултат повећане експресије гена, NANOG, NOTCH3 и OCT3/4, и овај ефекат се темељи на сигналној каскади која је покренута са рецептора ST2 (461). У литератури постоје и саопштење да третман IL-33 подстиче миграцију и инвазију ћелија карцинома плућа тако што повећава експресију ензима MMP-2 и MMP-9, и овај ефекат опет зависи од експресије рецептора ST2 (462). У другом моделу, показано још једно директно дејство IL-33 на ћелије карцинома дојке које исказују ST2, а огледа се у њиховој повећаној пролиферацији и формирању колонија што је резултат фосфорилације MAP3K8 услед активације сигналног пута IL-33/ST2 (377).

Туморска микросредина игра значајну улогу контролног система за пролиферацију, локалну инвазију и метастазирање туморских ћелија (463). IL-33, као важан регулатор у овој средини, обавља протуморске и ређе антитуморске функције, а што изгледа да зависи од природе туморског микроокружења (451). Наиме, IL-33 остварује своје претходно наведене ефекте у тумору тако што активира различите имунске ћелије које експримирају ST2, као и неимунске ћелије, укључујући туморске и ћелије строме, које све заједно представљају циљане ћелије, а такође учествује и у ремоделовању туморске микросредине (464). У актуелној студији је у плућима мишева који су третирани IL-33 уочена повећана експресија протеина ST2 у метастатским жариштима, а поред тога и пораст броја имунских ћелија који експримирају ST2 (Графикон 10; Слика 2). Додатно, код ових мишева забележена је повећана заступљеност леукоцита који исказују IL-33 (Графикон 11Б; Слика 3). Сличан је и налаз друге студије који упућује на то да је у туморским лезијама ниво експресије ST2, али не и IL-33, већи код пацијената у узнапредованом стадијуму колоректалног карцинома него код оних у раном стадијуму болести (381). Интравенска апликација IL-33 резултује повећањем инфилтрације ST2<sup>+</sup> регулаторних Т лимфоцита у туморском ткиву што подстиче раст мишјег колоректалног карцинома (465). IL-33, пореклом из тумора, регрутује CD11b<sup>+</sup>GR1<sup>+</sup> и CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> мијелоидне ћелије које учествују у ремоделовању туморске микросредине тако што подстичу ослобађање хемокина, а активацијом ендотелних ћелија стимулишу туморску ангиогенезу (401). Дакле, туморске ћелије помоћу IL-33 утичу и на функционисање бројних ST2<sup>+</sup> имунских ћелија, укључујући тумор-асоциране макрофаге (451).

Резултати ранијег истраживања указују да IL-33 подстиче снажан имунски одговор која се темељи на ангажовању оних ћелија које су најефикасније у борби против тумора, а то су цитотоксички CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити, T<sub>H</sub>1 лимфоцити, NK ћелије и γδТ лимфоцити (359,466,467). Saranchova и сарадници сугеришу на значајну улогу IL-

33 у имунском надзору против примарног тумора, а коју губи током метастатске транзиције када тумор развије механизме да избегне имунски надзор (414). У прилог овој претпоставци је налаз повећане заступљености туморских ћелија које експримирају IL-33 у примарном меланому мишева третираних IL-33 (Графикон 11А; Слика 3), што корелира са регресијом раста тумора. Сматра се да је смањење експресије IL-33 у туморском ткиву повезано са смањеном имуногеношћу туморских ћелија, док истовремено повећање експресије IL-33 у туморској строми доприноси прогресији тумора услед мобилизације регулаторних Т лимфоцита и MDSCs чиме се креира имуносупресивна микросредина (309) Добијени налаз повећане заступљености ST2<sup>+</sup> и IL-33<sup>+</sup> имунских ћелија у плућима мишева са меланомом који су третирани IL-33, сугерише на то да IL-33 остварује своју прометастатску активност вероватно модулацијом антитуморског имунског одговора.

### **5.2.2. Повећана концентрација IL-33 је детектована у серуму пацијената у унапредованом стадијуму меланома**

У бројним истраживањима документована је повећана концентрација IL-33 у серуму оболелих од различитих врста тумора укључујући карцином желуца и дојке, као и карцином главе и врата (373,375,376). Код пацијената у унапредованом стадијуму карцинома желуца, забележен пораст концентрације IL-33 у серуму је у корелацији са прогресијом болести и са смањеним преживљавањем оболелих из чега проистиче закључак да је IL-33 лош прогностички маркер (373). Регистровано је да је концентрација IL-33 чак двоструко већа у серуму пацијенткиња оболелих од карцинома дојке него код пацијената са хетерогеном групом неканцерских лезија означених једним именом бенигна обољења дојке (376). Серумска концентрација IL-33 такође је удружена са лошом прогнозом код оболелих од сквамозелуларног карцинома језика са позитивним ивицама ресекције тумора и метастазама у регионалним лимфним жлездама (375).

Да би се утврдила релевантност добијеног ефекта испитиваног цитокина у мишјем моделу меланома, у актуелној студији анализирана је и концентрација IL-33 у серуму оболелих од меланома. Код пацијената у III стадијуму, а кога карактеришу регионалне лимфне метастазе, примећен је драстичан пораст концентрације IL-33 у поређењу са пацијентима у I стадијуму без метастаза, као и са здравом контролном групом (Графикон 12). У литератури нема података који би потврдили или негирани налаз ове студије. Подаци о експресији IL-33 и ST2 у туморском ткиву оболелих од меланома такође су оскудни и иводе се само на пар студија. Наиме, детектовано је да две варијанте меланома хуманог порекла, A375 и MUM-2B, експримирају ST2 што имплицира на директан утицај IL-33 на сам меланом независно од његових ефеката на антитуморски имунски одговор (393). Примећено је да IL-33, након ангажовања ST2 рецептора, покреће сигнални пут који укључује активацију киназа ERK1 и ERK2 што за последицу има повећану експресију MMP-2 и MMP-9 у туморским ћелијама и последично њихову миграцију и инвазију *in vitro* (393). Уз то, сматра се да MMP-2 и MMP-9 имају важан удео у процесу васкуларне мимикрије тако што омогућују повећано стварање мреже тубула (81). Стога, претпоставља се да је осовина IL-33/ST2 укључена у регулацију васкуларне мимикрије тако што фосфорилацијом киназа ERK1 и ERK2 индукује појачану продукцију MMP-2 и MMP-9 и следствено повећано формирање тубула у меланому људи (393). Будући да мрежа судова, настала процесом васкуларне мимикрије, активно учествује у снабдевању тумора хранљивим материјама и тиме компензује евентуално недовољну густину крвних судова, сматра се да IL-33 на

овај начин појачава агресивни потенцијал меланома (393). Међутим, *Peng* и сарадници показали су да експресија IL-33 у ткиву примарног меланома нема прогностички значај, док повећана експресија IL-33 у метастатским лезијама је повезана са бољим преживљавањем оболелих од меланома (468). Уз то, аутори сугеришу на значај IL-33 у стимулацији активности антимеланомског имунитета (468).

Добијени налаз ове студије упућује на то да пораст концентрације IL-33 у серуму оболелих од меланома корелира са регионалним метастазирањем из чега се може закључити да IL-33 игра значајну улогу у прогресији меланома. Даљим испитивањима на истом животињском моделу покушано је да се утврде могући разлози експанзије хематогених метастаза након системске примене IL-33.

### **5.3. Имуномодулаторни ефекти IL-33 у одбрани од метастатског меланома**

Комплексност туморске микросредине, која између осталог се огледа у различитом саставу ћелија имунског система, једна је од кључних детерминанти судбине тумора, па стога од суштинског значаја је да се ојача ћелијски имунитет и истовремено минимизира или ослаби функција имуносупресивних ћелија. Претпоставља се да је IL-33 битан чинилац у обликовању имунског одговора у туморској микросредини тако што активира бројне имунске ћелије које исказују рецептор ST2 (451). Молекули који се регрутују низводно у осовини IL-33/ST2 су највероватније одговорни за природу имунског одговора који или сузбија или подстиче прогресију тумора (323,469). IL-33, на ST2-зависан и ST2-независан начин, утиче на бројне ћелије урођене имуности, укључујући еозинофиле, макрофаге, NK ћелије, дендритске ћелије, мијелоидне супресорске ћелије, као и ћелије стечене имуности, а то су пре свега CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити, и регулаторни Т лимфоцити (451).

#### **5.3.1. IL-33 активира ефекторске механизме антитуморске урођене имуности**

Ћелије урођене имуности су изузетно "пластичне" односно могу да стекну и про- и/или анти-туморску активност у зависности од међућелијских интеракција и солубилних фактора који су присутни у туморском микроокружењу (141,144). Функционалну пластичност неутрофила у тумору потврђују бројна истраживања која региструју њихову протуморску активност (470,471), док неке друге студије саопштавају супротан налаз где неутрофили функционишу као туморицидне ефекторске ћелије које могу активно да убију туморске ћелије (472,473). *Dissemond* и сарадници указују на директу антитуморску активност неутрофила у меланому хуманог порекла, а која је последица оксидативног оштећења туморских ћелија изазваног ослобађањем слободних кисеоничних радикала из неутрофила и то посредством цитокина (436). Уз то, еозинофили играју значајну улогу у антитуморском имунском одговору, а уочено је и да су тумор-инфилтришући еозинофили повезани са регресијом тумора у моделу мишијег меланома (157,160). Поред тога, повећан број еозинофила у крви пацијената са узнапредованим меланомом корелира са добрим терапијским одговором на *ipilimumab* који блокира CTLA-4 (474,475).

Познато је да су неутрофили и еозинофили циљне ћелије деловања IL-33. Наиме, током пнеумоније изазване Gram-негативном бактеријом *Klebsiella pneumoniae*, IL-33 побољшава локални имунитет тако што, поред моноцита, повећава и инфлукс неутрофила у плућа (476). Интраназална и интраперитонеална апликација IL-33, као и трансгена експресија IL-33 у плућима, удружени су са еозинофилном инфламацијом и хиперреактивношћу дисајних путева (477,478). Такође, показано је да еозинофили



играју важну улогу у ефикасном имунском одговору против меланома (161). Резултати актуелног истраживања указују да IL-33 смањује процентуалну заступљеност CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> неутрофила у плућима независно од присуства меланома, али значајно не мења њихов апсолутан број (Графикон 13). Међутим, IL-33 је индуковао изражену акумулацију Siglec-F<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> еозинофила у плућима, нарочито у групи мишева са меланомом (Графикон 14). Мада је проценат еозинофила који продукују TNF- $\alpha$  смањен у плућима мишева који су третирани IL-33, ипак се уочава да је апсолутни број оваквих еозинофила драстично повећан у групи мишева са метастатским меланомом (Графикон 15А,Б; Слика 4А). Поред наведеног, IL-33 смањује проценат еозинофила који експримирају IL-10 независно од присуства тумора, али значајно не утиче на њихов апсолутни број (Графикон 15В,Г; Слика 4Б). На основу налаза експанзивног раста метастаза B16-F1 варијанте мишијег меланома у групи мишева који су третирани IL-33, очигледно је да забележен пораст инфлуksа еозинофила са антитуморским фенотипом у плућима индукован IL-33 није пресудан и не утиче на раст метастаза код ових мишева. Међутим, резултати другог истраживања указују да IL-33 стимулише регрутовање еозинофила што резултује смањењем како раста примарног мишијег меланома, тако и плућних метастаза (161). Познато је да IL-33 индукује дегранулацију и покреће мобилизацију еозинофила у плућима (479,480). Уз то, IL-33 може да регрутује популацију ћелија урођене имуности која продукује IL-5 у плућа што за последицу има повећани инфлуks еозинофила који супримирају метастазирање мишијег меланома (160). С обзиром на чињеницу да се еозинофили често мобилишу у одговору на некрозу тумора, спекулише се и да је IL-33 "сигнал опасности" ослобођен из мртвих туморских ћелија и функционише као природни алармин што га чини битним медијатором ране запаљенске реакције (153,481), нарочито у примарном тумору.

Генерално, NK ћелије слабо инфилтришу примарни меланом коже и углавном се акумулирају у подручју око тумора, међутим, током регресије, примећено је да ове ћелије инфилтришу и само туморско ткиво (482,483,484). Активирани тумор-инфилтришуће NK ћелије могу индиректно да регулишу тумор-специфични имунски одговор тако што утичу на регрутовање и сазревање ћелија које презентују антиген, за које је добро познато да су критичне у оптималној активацији снажних механизма стечене имуности (124). Мада је активација NK ћелија строго контролисана равнотежом између сигнала покренутих са активационих и инхибиционих рецептора, бројни цитокини такође регулишу функцију ових ћелија: IL-15 је неопходан за преживљавање и функцију NK ћелија; IL-12 је кључан за покретање производње цитокина укључујући IFN- $\gamma$  у NK ћелијама; IL-18 је важан за активацију NK ћелија и продукцију IFN- $\gamma$  која је индукована IL-12 (485). Међутим, регулација функције NK ћелија у туморској микросредини није још увек у потпуности разјашњена. Подаци из литературе сугеришу на то да IL-33 може или да подстакне или да супримира антитуморску активност NK ћелија (161,397,398,440,441). У метастатском моделу мишијег B16 варијетета меланома и *Lewis*-овог карцинома плућа, трансгена експресија IL-33 у ткиву домаћина је подстакла регрутовање цитотоксичких NK ћелија у плућа што следствено инхибира формирање метастаза код ових врста тумора (441). Осим што повећава туморицидни капацитет NK ћелија, документовано је да IL-33 у NK ћелијама индукује фосфорилацију транскрипционог фактора NF- $\kappa$ B што резултује њиховом оптималном активацијом (441). Ектопична и повећана експресија IL-33 у мишијим туморским ћелијама B16 варијета меланома и 4T1 карцинома дојке индукује повећан инфлуks NK ћелија у туморско ткиво, као и повећану продукцију IFN- $\gamma$  у овим ћелијама (440). Овакав налаз несумњиво упућује на снажан антитуморски ефекат IL-33 који се огледа у ефикасној инхибицији туморског раста и метастазирања (440). Повећана заступљеност CD107a<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> NK ћелија са туморицидним фенотипом у

слезини и туморском ткиву код мишева којима је субкутано трансплантиран B16-F10 варијетет меланома сугерише на локалну и системску активацију NK ћелија након третмана са IL-33 (161). IL-33 ефикасно инхибира успостављање плућних метастаза у моделу мишијег карцинома дојке тако што стимулише продукцију TNF- $\alpha$  у макрофагима. Ова стимулисана продукција TNF- $\alpha$  за последицу има повећану експресију рецептора ST2 на NK ћелијама што је кључно за њихову активацију (419). Супротно овим саопштењима, у ранијим истраживањима је уочено да сигнални пут IL-33/ST2 омета активацију NK ћелија у мишијем карциному дојке. Делеција гена за молекул ST2 за последицу има повећану експресију IFN- $\gamma$  у NK ћелијама, као и повећан проценат активираних, цитотоксичких NK ћелија са бржим самообнављањем (397). С друге стране, системска апликација IL-33 редукује активацију и цитотоксичност NK ћелија и последично подстиче прогресију тумора (398), што имплицира штетну улогу IL-33 у антитуморском имунском одговору посредованом NK ћелијама.

У актуелној студији је регистровано да IL-33 битно не утиче на инфлукс NK ћелија у плућни паренхим мишева са метастатским меланомом (Графикон 16). У истој групи мишева, IL-33 не мења процентуалну заступљеност PD-1<sup>+</sup>Nkp46<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> и CTLA-4<sup>+</sup>Nkp46<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK ћелија, али значајно смањује проценат NK ћелија које експримирају KLRG-1 (Графикон 17, слика 5). Молекул KLRG-1 је инхибициони рецептор NK ћелија и ефекторских CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита (486) и укључен је у слабљењу антитуморског имунитета у туморској микросредини који се темељи на меморијским Т лимфоцитима са антигенским искуством и способошћу да брже реагују на туморске антигене (487). KLRG-1 је маркер зрелих NK ћелија за које је карактеристично спорије самообављање и слаб пролиферативни потенцијал у одговору на IL-15 (488). У овој студији уочено је и да IL-33 значајно повећава процентуалну заступљеност NK ћелија које исказују IFN- $\gamma$  (Графикон 17, Слика 6). Мада постоје бројна саопштења о антитуморским ефектима IFN- $\gamma$ , нека истраживања спекулишу да IFN- $\gamma$  може да супримира активацију CD8<sup>+</sup>Т лимфоцита тако што индукује повећану експресију PD-L1 на малигним меланоцитима и истовремено смањује експресију меланома- асоцираних антигена (489,490). Наиме, *Furuta* и сарадници су регистровали да ћелије меланома, након стимулације IFN- $\gamma$ , исказују PD-L1 и супресивни фактор CD271, што све заједно супримира активацију тумор-специфичних цитотоксичких Т лимфоцита (489). IFN- $\gamma$  такође је укључен у модулацију активности активираних CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита на тај начин што директно може да изазове њихову ћелијску смрт (491). Забележена повећана експресија PD-1 на CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима након третмана IL-33, сугерише на то да IL-33, стимулацијом продукције IFN- $\gamma$  у NK ћелијама, повећава експресију PD-L1 на ћелијама меланома што коначно резултује супресијом цитотоксичности CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита. Уз то, смањена експресија KLRG-1 је у обрнутој корелацији са продукцијом IFN- $\gamma$  у NK ћелијама (492), што је сагласно са налазом актуелне студије.

На основу добијених резултата може се констатовати да упркос стимулацији урођене имуности посредоване NK ћелијама у мишијем меланому, IL-33 остварује прометастатски ефекат и он се огледа у експанзивном расту метастатских колонија.

### **5.3.2. IL-33 смањује туморицидну активност цитотоксичких CD8<sup>+</sup>Т лимфоцита и на тај начин "пригушује" антитуморску стечену имуност**

Неспецифични механизми урођене имуности су критични не само у сузбијању и контроли ране фазе развоја меланома, већ и у развоју снажног стеченог имунитета који обезбеђује дуготрајни и тумор-специфични имунски надзор (124). Сматра се да су дендритске ћелије условно речено заповедници војске имунског система. Међу

професионалним ћелијама које презентују антиген, дендритске ћелије су најефикасније у активацији цитотоксичких Т лимфоцита који, у стеченом имунском одговору, функционишу као "командоси" за специјалне операције против вирусне инфекције и малигнома (124).

У ранијим истраживањима документовано је да IL-33 подстиче матурацију дендритских ћелија и усмерава диференцијацију наивних Th0 у Th1 лимфоците (493). Због своје способности да појача функционалност дендритских ћелија претпоставља се да IL-33 може да послужи и као имуноадјувант у терапији тумора. Наиме, IL-33 активира адаптерски протеин MyD88 у сигналној каскади унутар дендритских ћелија и на тај начин на њима повећава експресију костимулаторних молекула CD80, CD86 и CD40, као и CD205 који, осим што је рецептор за препознавање умирућих ћелија, учествује и у унакрсној презентацији антигена. Коначан резултат поменутог деловања IL-33 на дендритске ћелије је појачана цитотоксичност CD8<sup>+</sup>Т лимфоцита и NK ћелија и следставена регресија раста мишијег карцинома дојке (493). Показано је да у току алергијске инфламације, IL-33 индукује како мобилизацију тако и активацију дендритских ћелија у плућима (494). У овој студији забележено је да IL-33 значајно смањује проценат CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> дендритских ћелија, али не мења њихов апсолутан број у плућима мишева после убризгавања метастатских ћелија (Графикон 18). Анализом њиховог активационог статуса уочено је да IL-33 битно повећава проценат и апсолутан број дендритских ћелија које исказују МНС молекуле II класе пре убризгавања туморских ћелија, међутим, после убризгавања туморских ћелија оваква разлика се губи (Графикон 19). Додатно, регистровано је да IL-33 не утиче на експресију костимулационог молекула CD80 на дендритским ћелијама ни пре ни после убризгавања B16-F1 ћелија (Графикон 20). Друга истраживања документују да IL-33, системски примењен, "лиценцира" активацију и појачану унакрсну презентацију дендритских ћелија што резултира развојем потентних антилеукемијских CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита (495). Уз то, на моделу мишијег EG7 лимфома и B16 варијанте меланома забележено је да IL-33 активира мијелоидне дендритске ћелије у туморској микросредини и у њима повећава унакрсну презентацију антигена, што коначно резултује обнављањем и поправком антитуморске активности Т лимфоцита зависне од молекула ST2, MyD88 и STAT1 (452). На основу резултата може се закључити да експанзиван раст метастаза у плућима мишева након третама IL-33 регистрован у овој студији није условљен разликом ни у укупном броју, нити у активационом статусу дендритских ћелија током антимеланомског имунског одговора.

Подаци из литературе указују на то да цитотоксички CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити су кључни егзекутори у имунском надзору пацијената са меланомом (124,496). У складу са тим, примећено је да изражена инфилтрација CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у туморском ткиву повезана је са бољим преживљавањем оболелих од меланома (497), међутим, ова дифузна инфилтрација CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у туморској микросредини детектована је у мање од 10% метастатског меланома (497). Рецептор ST2 првобитно је идентификован на Th2 лимфоцитима (498), а касније и на површини других активираних ћелија укључујући Th1 и CD8<sup>+</sup> Т лимфоците (499). Експресија ST2 рецептора детектована је на ефекторским цитотоксичким CD8<sup>+</sup> Т и поларизованим Tc1 лимфоцитима (359). Наиме, повећана експресија молекула ST2 углавном зависи од молекула T-bet, главног регулатора транскрипције који доприноси развоју Th1 и Tc1 лимфоцита (500). У литератури има саопштења да IL-33 побољшава ефикасност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита тако што појачава њихове ефекторске функције, што имплицира да је IL-33 важан ефекторски цитокин и потенцијално може да се користи у имунотерапији тумора укључујући и меланом (359,440). Добро је познато да су цитотоксички CD8<sup>+</sup> Т

лимфоцити главни егзекутори туморских ћелија тако што их првенствено директно убијају помоћу перфорина, гранзима и рецептора смрти или индиректно, секрецијом цитокина IFN- $\gamma$  и TNF, учествују у регулацији антитуморског имунског одговора (501). Претходна истраживања показују да IL-33 појачава цитотоксичку активност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита тако што у њима повећава експресију CD107a и гранзима В, као и цитокина IFN- $\gamma$  и TNF- $\beta$ , а истовремено редукује продукцију IL-10 (502). Међутим, резултати ове студије указују да IL-33 изазива упадљиво смањен туморицидни капацитет CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита изолованих из плућа мишева са метастатским меланомом (Графикон 21А). Наиме, цитолитичка активност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита код мишева са успостављеним плућним метастазама значајно опада услед третмана са IL-33 (Графикон 21Б). Анализа података добијених проточном цитометријом, показује да IL-33 битно повећава апсолутан број моноклеарних леукоцита и истовремено снижава проценат CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у плућима мишева без меланома, међутим, ове разлике се губе након интравенског убризгавања B16-F1 ћелија (Графикон 22). Важно је истаћи да је IL-33 у метастатском меланому с једне стране значајно смањио удео CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита који продукују TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  (Графикон 23; Слика 7), док с друге стране индуковао је експанзију CD8<sup>+</sup>Т лимфоцитима који продукују IL-10 (Графикон 24; Слика 7), што указује на њихов нецитотоксички или Tc2 фенотип (503). Узимајући у обзир његову имunosупресивну улогу претпоставља се да IL-10 је једна од главних препрека у цитолитичкој активности CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита (504). Противно налазу ове студије, *Gao* и сарадници су показали да IL-33 стимулише фосфорилацију NF- $\kappa$ B и тако подстиче активацију и туморицидну активност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита, као и њихову инфилтрацију плућног паренхима. Ово све за резултат има смањено метастазирање B16 варијанте меланома у плућа (441). Антимеланомска активност IL-33 се огледа и у његовој способности да у CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима повећа производњу ефекторских молекула IFN- $\gamma$  и перфорина (440). Документовано је и да IL-33, синергистички са IL-12, индукује ослобађање IFN- $\gamma$  из Tc1 лимфоцита (359).

Међу главним "кривцима" за дисфункцију лимфоцита који инфилтришу туморску микросредину издвајају се неадекватна костимулација и појачана експресија инхибиционих молекула, нарочито на цитотоксичким Т лимфоцитима (505). Један од важних начина којим туморске ћелије избегавају имунски надзор и индукују имунску толеранцију је тако што на површини активираних CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита стимулишу експресију бројних инхибиционих молекула, као што су PD-1 и CTLA-4 (505). У туморској микросредини ангажовање ових рецептора, који представљају контролне тачке или "прекидаче" имунског одговора, за последицу има исцрпљивање и слабљење ефекторских функција CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита. Документовано је да меланом такође супримира активацију Т лимфоцита тако што стимулише експресију молекула PD-L1 (124,295,506) и да прекомерна експресија PD-1 на Т лимфоцитима које су континуирано изложени туморским антигенима узрокује њихову анергију (250). Другим речима, показано је да је дуготрајно и перманентно излагање антигену временом за последицу има дисфункцију и исцрпљеност CD8<sup>+</sup> лимфоцита тако да, упркос израженој имуногености меланома, цитотоксички Т лимфоцити не успевају да сузбију раст тумора. Са функционалне тачке гледишта, овакви Т лимфоцити који исказују инхибиционе рецепторе губе своје ефекторске функције, на пример цитотоксичност, и тако условно речено постају исцрпљене и истрошене ћелије (507). Самим тим, очекујуће је да терапијска примена анти-PD-1 и анти-CTLA-4 антитела значајно побољшава исход болести код различитих врста малигнома, нарочито меланома (508). Наиме, блокадом ових инхибиционих молекула, уз помоћ специфичних антитела, Т лимфоцити се рективирају а и побољшавају своју функцију, што коначно резултује поправком и/или јачањем механизма антитуморске имуности (505). Уз то, експресија

гена повезана са сигнализацијом која укључује IFN- $\gamma$  је регистрована код пацијената који добро реагују на терапију анти-PD-1 антителом (509).

Мада у оквиру популације CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита, IL-33, примењен системски, узроковао је значајан пораст експресије маркера ране активације, CD69 у мишева са метастатским меланомом (Графикон 25А), међутим, IL-33 је истовремено повећавао и процентуални удео "истрошених" односно мање ефикасних PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита, и пре и после убризгавања туморских ћелија (Графикон 25Б; Слика 8А). Анализом односа инхибиционог наспрам активационог рецептора, откривено је да IL-33 битно повећао однос PD-1/CD69 на CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима (Графикон 26), што сугерише на "исцрпљеност" и дисфункционалност оваквих ефекторских Т лимфоцита. Додатно, примењено је да IL-33 повећава проценат CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита који исказују инхибициони рецептор CTLA-4 (Графикон 27; Слика 8). У неким истраживањима забележено је да је IL-33 значајно побољшао ефикасност блокаде PD-1, а огледа се у потпуној регресији акутне мијелоидне леукемије у половини третираних мишева. Добијени налаз сугерише на то да би овај нови комбиновани приступ могао значајно да допринесе прекиду толеранције Т лимфоцита на тумор и следствено да побољша ефикасност имунотерапије леукемије (495). *Chen* и сарадници такође спекулишу да IL33, пореклом из тумора, је критичан за антитуморску ефикасност блокаде контролних тачака имунског одговора, и то тако што индукује јак имунски одговор у коме су главни "оперативци" CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити (510). У истој студији је забележено да IL33, трансгено експримиран у ћелијама В16 варијанте меланома, у комбинацији са анти-CTLA-4 и анти-PD-1 антителима, додатно побољшава преживљавање мишева са трансплантираним меланомом (510). Резултати актуелног истраживања указују на значајан пораст KLRG-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у обе групе мишева који су третирани IL-33, и пре и после убризгавања метастатских ћелија (Графикон 27; Слика 8). Примењено је да инхибициони молекул KLRG-1, експримиран на меморијским Т лимфоцитима, ограничава њихов пролиферативни потенцијал и на тај начин омета антитуморски имунски одговор (487). Уз то, цитотоксички Т лимфоцити, који експримирају молекул KLRG-1, одликују се ослабљеним ефекторским функцијама, а што је последица смањене продукције IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и гранзима В у оваквим лимфоцитима (487). На моделу примарног мишјег меланома варијанте В16-F10 показано је да истовремена примена анти-PD-1 и анти-KLRG-1 антитела синергистички остварује бољи ефекат у регресији раста тумора него појединачна блокада молекула PD-1 (511). На основу добијених резултата ове студије може се констатовати да IL-33, остварује свој прометастатски ефекат, тако што нарушава функционални капацитет имунског система у борби против меланома првенствено стеченог имунског одговора и то тако што индукује измене у функционалном статусу и туморицидном потенцијалу CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у плућима, што коначно резултује експанзивним растом хематогених метастаза.

Да би избегле сопствену елиминацију, туморске ћелије су еволуирале при чему, између осталог смањивањем своје имуногености, стекле су способност да игноришу имунски надзор. Тај њихов смањен потенцијал да упозоре тумор-специфичне механизме имуности, фенотипски се често манифестује смањеном експресијом неких од компоненти машинерије за обраду и презентацију антигена у туморским ћелијама, као што су МНС молекули I класе. *Saranchova* и сарадници спекулишу на нови механизам избегавања имунског система усмереног према туморским антигенима (414). Наиме, аутори су приметили да метастатске ћелије одликују смањена експресија IL-33 и активност машинерије за обраду и презентацију антигена у поређењу са ћелијама сингеног примарног тумора. Изгледа да ово истовремено смањење експресије

IL-33 и активности машинерије за обраду и презентацију антигена које се одиграва током прогресије примарног тумора у метастатску форму, представља нови покушај метастатског тумора да постане "невидљив" за имунски систем (414). У прилог томе говори и налаз да поновна имплементација IL-33 у метастатске ћелије за последицу има повећану експресију молекула укључених у обраду и презентацију туморских антигена, TAP-1 и MHC молекула I класе, што следствено повећава препознавање туморских антигена помоћу цитотоксичких T лимфоцита (414). Међутим, у овој студији је показано да IL-33, поред супресивног ефекта на CD8<sup>+</sup>T лимфоците, истовремено смањује експресију iRNK за MHC молекуле I класе и TAP-1 у B16-F1 ћелијама (Графикон 28) и на тај начин смањује имуногеност малигних меланоцита, због чега овакве туморске ћелије постају резистентне на препознавање и деструкцију посредовану цитотоксичким T лимфоцитима. Коначан исход свега наведеног је избегавање антимеланомског имунског одговора и напредовање метастатске болести.

#### 5.4. IL-33 креира имunosупресивно микроокружење у плућима

Резултати бројних истраживања указују на то да ћелије имунског система које инфилтришу тумор, укључујући T<sub>H</sub>1 и CD8<sup>+</sup> T лимфоците, су у стању ареактивности (512,513). Један од главних разлога оваквог стања и очигледног неуспеха антитуморске имуности су активни локални механизми имunosупресије и одсуство адекватних имуностимулативних сигнала у туморској микросредини (440). MDSCs и регулаторни T лимфоцити су главне карике имunosупресивне мреже формиране у туморској микросредини која активно доприноси слабљењу антитуморског имунског одговора и следствено избегавању имунског надзора (514,515). Доказано је да тумор мобилише имunosупресивне ћелије и да је ова мобилизација у великој мери под контролом паракриних сигнала, где малигне ћелије секретују широк репертоар цитокина, као што су CCL2, CCL5, CXCL1, GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-4 и IL-13, којима селективно привлаче ове имунске ћелије у потку тумора (516,517,518,519). Тако, на моделу карцинома панкреаса показано је да GM-CSF, пореклом из туморских ћелија, стимулише инфилтрацију хетерогене популације CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> мијелоидних ћелија (520). Присуство MDSCs је детектовано код бројних врста тумора мишјег и хуманог порекла и доводи се у тесну везу са прогресијом болести (521). MDSCs које инфилтришу тумор обављају бројне имunosупресивне функције и на тај начин успешно доприносе успостављању и одржавању имунске толеранције у туморском микроокружењу. Имуносупресија MDSCs је углавном антиген-специфична и зависна је од директног међућелијског контакта. Генерално, MDSCs своју имunosупресивну активност у тумору остварују на више начина: секрецијом имunosупресивних цитокина (TGF- $\beta$  и IL-10) и активацијом регулаторних T лимфоцита, производњом азот монооксида и слободних кисеоничних радикала MDSCs ометају активацију T лимфоцита, елиминацијом кључних нутритивних фактора (L-аргинина, L-триптофана и L-цистеина) ограничавају пролиферацију T лимфоцита, регулацијом експресије ADAM17, MDSCs ремете хоминг CD8<sup>+</sup> T лимфоцита у туморску микросредину (521).

У литератури постоје бројна саопштења о улози IL-33 на акумулацију и функционисање MDSCs током генезе и прогресије тумора. Регистровано је да IL-33, ослобођен у туморском ткиву, подстиче експанзију, регрутовање и преживљавање MDSCs у туморској микросредини мишјег колоректалног карцинома, као и код пацијенткиња са карциномом дојке, што је вероватно последица индукције аутокрине секреције GM-CSF (401,515). Ранија истраживања указују на то да системска апликација IL-33 у 4T1 мишјем карциному дојке повећава интратуморску и системску акумулацију CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs који експримирају TGF- $\beta$ 1 и IL-13 $\alpha$ 1R (398), а чини

се да утиче и на диференцијацију ових имуносупресивних ћелија што се огледа у већој инциденци моноцитних наспрам гранулоцитних MDSCs (424). У актуелној студији забележено је да IL-33, примењен интраперитонеално, повећава процентуалну заступљеност CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs у мишћем метастатском меланому (Графикон 29) и на тај начин је укључен у креирању имуносупресивне туморске микросредине која следствено подстиче раст метастатских колонија у плућима. Осим што утиче на њихову акумулацију у одређена места, IL-33 повећава имуносупресивну активност MDSCs тако што појачава експресију и активност аргиназе-1 и индукује активацију транскрипционих фактора MAPK и NF-κB унутар MDSCs (515,522). Насупрот претходним истраживањима, показано је да IL-33 смањује акумулацију MDSCs у слезини и туморској микросредини B16 варијанте мишјег меланома (161,424). Штавише, документовано је да MDSCs третиране IL-33 имају редуковану имуносупресивну активност која се огледа у њиховој смањеној способности да инхибирају пролиферацију и продукцију IFN-γ у Т лимфоцитима, као и у ограниченој синтези реактивних кисеоничних врста и смањеном капацитету MDSCs да индукују диференцијацију и експанзију регулаторних Т лимфоцита (424). Овакви контроверзни резултати који сугеришу да IL-33 подстиче или инхибира експанзију и активност имуносупресивних MDSCs су вероватно одраз стадијума тумора, а и експерименталног модела.

Регулаторни Т лимфоцити су специјализоване супресивне ћелије заступљене како у системској циркулацији тако и у свим ткивима. Ове супресивне ћелије су главни контролори аутолеранције и учествују у одржавању имунске хомеостазе. Уз то, регулаторни Т лимфоцити спречавају аутоимунску реакцију тако што координирају супресију имунске активације на сопствено. Да су ове моћне супресивне ћелије свеприсутне у тумору који у основи представља "измењено сопствено ткиво", први је описао Роберт Норт 1980. године (523,524). У већини солидних тумора укључујући меланом, регулаторни Т лимфоцити су детектовани у туморском микроокружењу, а примећено је и да акумулација ових ћелија је повезана са лошим преживљавањем оболелих (525,526,527). Уз то, смањени однос цитотоксичких наспрам регулаторних Т лимфоцита у туморској микросредини корелира са лошом прогнозом код неколико врста тумора (250,528,529). Наиме, експанзија регулаторних Т лимфоцита у потки тумора за последицу има инхибицију тумор-специфичних ефекторских Т лимфоцита и следствено избегавање имунског надзора (525). Ове моћне супресивне ћелије директно супримирају ефекторске Т лимфоците, индукују метаболичке поремећаје у Т лимфоцитима и модулирају сазревање и функцију дендритских ћелија неопходних за активацију тумор-специфичних Т лимфоцита (530). Другим речима, своју имуносупресивну улогу регулаторни Т лимфоцити остварују на различите начине: директно убијају ефекторске Т лимфоците уз помоћ интеракције Fas-FasL, помоћу инхибиционог молекула CTLA-4 супримирају ћелије које презентују антиген, продукују инхибиционе цитокине (IL-10, TGF-β и IL-35) и имуносупресивне метаболите, појачано троше IL-2 и учествују у разградњи АТФ (531,532). Такође се сматра да регулаторни Т лимфоцити играју важну улогу у развоју метастаза тако што олакшавају дисеминацију туморских ћелија, омогућују избегавање имунског надзора и стимулишу успостављање метастатских жаришта (533). Тако, повећана заступљеност регулаторних Т лимфоцита је тесно повезана са високим ризиком за развој метастаза код многих врста тумора, укључујући тумор коже (533,534,535). Сматра се да регулаторни Т лимфоцити у туморској микросредини, а нарочито у метастатским нишама активно доприносе прогресији тумора тако што припремају локално "тло" у циљним органима за раст метастаза односно "регенерацију тумора на новом месту", док истовремено метастатске ћелије као "семе" штите од одбацивања (525).

Документовано је да CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> регулаторни Т лимфоцити у плућима експримирају рецептор ST2 (460). IL-33 има директан ефекат на оне регулаторне Т лимфоците који исказују ST2 везујући се за свој рецептор (469). Под утицајем IL-33 регулаторни Т лимфоцити појачано експримирају канонски транскрипциони T<sub>h</sub>2 фактор, GATA-3 и молекула ST2, а и производе цитокине типа 2 (536). IL-33, не само што стимулише пролиферацију регулаторних Т лимфоцити, већ подстиче и њихову имunosупресивну активност. Наиме, регулаторни Т лимфоцити смањују продукцију IFN- $\gamma$ , уз то, повећавају експресију молекула GATA3 и ST2 (537). Примена IL-33 убрзава раст тумора и развој метастаза у јетри и плућима у моделу мишјег карцинома дојке што је повезано са повећаном акумулацијом MDSCs и регулаторних Т лимфоцита у потки тумора (398). Апликација rIL-33 подстиче експанзију ST2<sup>+</sup> регулаторних Т лимфоцита у туморском ткиву и у слезини код CT26 мишјег аденокарцинома колоректалне регије (465). Штавише, блокада IL-33 смањује акумулацију регулаторних Т лимфоцита у карциному плућа (385). У другој студији је на моделу карцинома плућа кога одликује мутација K-ras онкогена забележено да блокадом рецептора IL-33 са анти-ST2 антителом редукује се заступљеност регулаторних Т лимфоцита у тумору, што у коначном исходу омогућује обнављање и поправку активности NK ћелија и T<sub>h</sub>1 лимфоцита, а уз то, појачава се антитуморски имунски одговор посредован CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима (538). Додатно, код пацијената у узрапредованом стадијуму карцинома главе и врата повећана експресија IL-33 у строми позитивно корелира са инфилтрацијом регулаторних Т лимфоцита у туморско ткиво и истовремено IL-33 у строми може да послужи као маркер прогресије болести (514). У складу са овим налазом, системска апликација IL-33 повећава процентуалну заступљеност CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> регулаторних Т лимфоцита у групи мишева са метастатским меланомом (Графикон 31А). Мада не мења процентуалну заступљеност CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Т лимфоцита у плућима (Графикон 30А), IL-33 значајно је повећао експресију IL-10 на помагачким CD4<sup>+</sup>Т лимфоцитима (Графикон 30Б; Слика 9А). Детаљнијом функционалном анализом *Wen* и сарадници имплицирају да осим што повећава удео IL-33 појачава супресивне функцију регулаторних Т лимфоцита тако што стимулишу продукцију IL-10 и TGF- $\beta$ 1 и супримирају пролиферацију CD4<sup>+</sup>Т лимфоцита *in vitro* (514). Наиме, продукција IL-10 у регулаторним Т лимфоцитима представља важан механизам којим ови супресивни лимфоцити супримирају цитолитичку активност CD8<sup>+</sup>Т лимфоцита у току антитуморског имунског одговора (504). У овој студији регистрован је и битан пораст регулаторних Т лимфоцита који исказују инхибициони молекула CTLA-4 након третмана са IL-33 (Графикон 31Б; Слика 9Б). Сматра се да CTLA-4, конститутивно експримиран на регулаторним Т лимфоцитима, је критичан ефекторски молекула укључен у модулацију антитуморског имунског одговора (539,540). Повећана експресија CTLA-4 на ћелијској површини је критична за супресивну активност регулаторних Т лимфоцита коју остварују кључним механизмом, а то је снижавање експресије костимулационих молекула CD80 и CD86 на дендритским ћелијама (541,542).

Поред регрутовања имunosупресивних ћелија, тумор индукује и локалне промене у цитокинском профилу што резултује креирањем туморске микросредине са протумогеним својствима (543). Другим речима туморске ћелије "манипулишу" својим микроокружењем тако што на овом месту стимулишу продукцију имunosупресивних и протуморских сигналних молекула што све заједно подстиче прогресију тумора. Тако на пример, TGF- $\beta$  учествује у формирању повољне микросредине тако што индукује продукцију митогених фактора неопходних за пролиферацију и преживљавање метастатских ћелија, а уз то, стимулише ангиогенезу и имunosупресију (544). У овој



студији уочена је повећана експресија iRNK за синтезу FoxP3, IL-10 и TGF- $\beta$  што указује на доминацију имunosупресивног миљеа у метастатском ткиву плућа након третмана IL-33 (Графикон 32 и 33). Добијени налаз имплицира да у мишћем меланому IL-33 стимулише развој метастатске микросредине коју одликује повећана имunosупресија што је вероватно додатни механизам којим IL-33 доприноси експанзији хематогених метастаза у плућима.

На основу шареноликих података из литературе може се констатовати да тумор заједно са одређеним сетом медијатора који се локално ослобађа обликује туморску микросредину која затим утиче на равнотежу између протуморског и антитуморског имунског одговора "под диригенцијом" IL-33 (362,499). Поред различитог интензитета експресије и ћелијске дистрибуције IL-33 и његовог рецептора, учешће других цитокина такође утиче на амбивалентну активност IL-33 у тумору. Наиме, присуство проинфламацијских цитокина, као што је IL-12, заједно са IL-33, подстичу антитуморски имунски одговор типа 1. Већина студија саопштава да системска и/или локална производња IL-33 снажно инхибира раст тумора и развој метастаза тако што подстиче најефикасније механизме стечене и урођене имуности где централно место заузимају CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити, NK ћелије и еозинофили. Супротно томе, IL-33, заједно са имunosупресивним медијаторима и цитокинима, као што је TGF- $\beta$  у туморској микросредини потенцира изражен супресивни миље за имунски одговор, што доприноси прогресији тумора и то ангажовањем углавном имunosупресивних ћелија као што су регулаторни Т лимфоцити, MDSCs и TAM2 (499).

Чини се да су, стадијум тумора, метастатски потенцијал и/или експресија IL-33 и ST2 на великом опсегу циљаних ћелија, критични за усмеравање про- и анти-туморске активности IL-33.

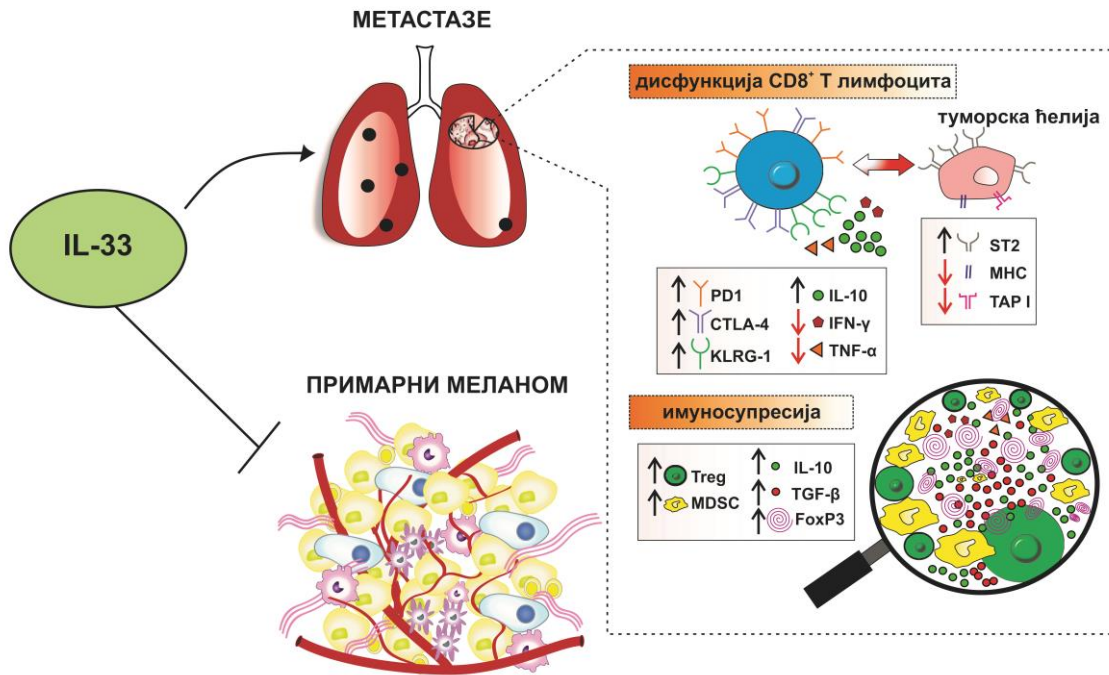
## 6. ЗАКЉУЧАК

IL-33 супримира и/или подстиче прогресију меланома, тако што, с једне стране, ефикасно редукује раст примарног тумора, док с друге стране, подстиче експанзиван раст метастатских колонија. Чини се да овај "дуални парадокс" IL-33 у прогресији меланома зависи од стадијума тумора и метастатског потенцијала. Добијени налаз имплицира да IL-33 своју прометастатску активност остварује тако што "пригушује" туморицидну активност цитотоксичких CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита и креира имуносупресивну микросредину у плућима, што све заједно погодује прогресивном расту метастатских колонија меланома. Погодан учинак IL-33 на метастазирање додатно је потврђен и налазом повећане концентрације IL-33 у серуму оболелих од меланома са детектованим регионалним метастазама. Забележени дуални ефекат системске апликације IL-33 у студији може да лимитира његову потенцијалну примену у имунотерапији тумора.

Овакав закључак проистиче из следећих експерименталних налаза:

1. IL-33 редукује раст примарног тумора код оба варијетета малигних меланоцита (B16-F1 и B16-F10), а нарочито B16-F1 ћелијског варијетета са мањим метастатским потенцијалом
2. IL-33 остварује и јасан прометастатски ефекат који се огледа у интензивном расту хематогених метастаза B16-F1 варијетета меланома у плућима
3. Излагање B16-F1 ћелија IL-33 индукује повећану експресију iRNK за рецептор овог цитокина, ST2
4. Интраперитонеална апликација IL-33 индукује повећану експресију рецептора ST2, како на метастатским меланоцитима тако и на ћелијама имунског система у плућима мишева са експерименталним метастазама
5. Интраперитонеална апликација IL-33 за последицу има повећану експресију IL-33 на туморским ћелијама примарног меланома, док је у плућима са успостављеним метастазама оваква експресија ограничена на ћелије имунског система
6. Концентрација IL-33 у серуму оболелих од меланома се повећава са прогресијом болести што додатно потврђује његову прометастатску улогу
7. Мада системска апликација IL-33 подстиче урођени имунски одговор на меланом који одликује повећани удео NK ћелија са антитуморским фенотипом у плућима, јасно је да он није довољно ефикасан у борби против хематогених метастаза
8. Иако интраперитонеална апликација IL-33 смањује заступљеност дендритских ћелија током антитуморског имунског одговора, притом не мењајући њихов активациони статус, IL-33 сузбија стечену имуност тако што смањује цитотоксичност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита и фаворизује имуносупресивни фенотип ових ћелија
9. Измењена регулација стеченог антимеланомског имунског одговора је барем делимично последица смањене имуногености B16-F1 ћелија након излагања IL-33, а огледа се у смањеној експресији iRNK за MHC молекул I класе и iRNK за TAP1

10. Прометастатска активност IL-33 се манифестује и способношћу овог цитокина да креира имуносупресивну микросредину у метастатском меланому: интраперитонеална апликација IL-33 узрокује акумулацију MDSCs и регулаторних Т лимфоцита, као и повећану експресију iRNK за синтезу транскрипционог фактора FoxP3 и цитокина IL-10 и TGF- $\beta$  у плућима.



Слика 10. Механизми деловања IL-33 у меланому

## 7. СКРАЋЕНИЦЕ

<b>AJCC</b>	American Joint Committee on Cancer
<b>AP-1</b>	Activator Protein-1
<b>Apaf-1</b>	Apoptotic protease activating factor-1
<b>Apc</b>	Adenomatous polyposis coli
<b>Bad</b>	Bcl-2 associated agonist of cell death
<b>BAGE</b>	B Melanoma Antigen
<b>BCG</b>	Bacillus Calmette-Guerin
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma-2
<b>BCP</b>	1-Bromo-3-chloropropane
<b>BRAF</b>	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma B-type
<b>CAF</b>	Cancer-Associated Fibroblasts
<b>CDKN2A</b>	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
<b>CDKs</b>	Cyclin-Dependent Kinases
<b>COT</b>	Cancer Osaka Thyroid
<b>COX-2</b>	Cyclooxygenase-2
<b>Ct</b>	Cycle threshold
<b>CTA</b>	Cancer-Testis Antigens
<b>CTLA-4</b>	Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Protein-4
<b>DISC</b>	Death-Inducing Signaling Complex
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>EDTA</b>	Etilen-Diamin-Tetraacetat
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>EMT</b>	Epithelial-Mesenchymal Transition
<b>EREs</b>	Estrogen-Response Elements
<b>ERK</b>	Extracellular signal-Regulated Kinase
<b>EVMM</b>	Extravascular Migratory Metastasis
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>FLIP</b>	Flice-Like Inhibitory Protein
<b>GAGE</b>	G Antigen
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
<b>G-CSF</b>	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
<b>GLUT1</b>	Glucose Transporter 1
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
<b>Gp100</b>	Glycoprotein 100
<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>HMGB1</b>	High Mobility Group Box 1
<b>HPV</b>	Human Papilloma Virus
<b>HRP</b>	HorseRadish Peroxidase
<b>ICAM-1</b>	Intercellular Adhesion Molecule-1
<b>IDO</b>	Indoleamine 2,3-Dioxygenase
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>IL-1RAcP</b>	IL-1 Receptor Accessory Protein
<b>IL1RL1</b>	IL-1 receptor-like 1
<b>IL-33</b>	Interleukin-33
<b>IL-33FL</b>	Full Length IL-33
<b>ILC2s</b>	Type 2 Innate Lymphoid Cells
<b>iNOS</b>	inducible Nitric Oxide Synthase

<b>IRAK</b>	IL-1 Receptor-Associated Kinase
<b>ISRE</b>	Interferon Stimulated Response Element
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal Kinase
<b>KRAS</b>	Kirsten Ras
<b>LAG-3</b>	Lymphocyte-Activation Gene-3
<b>LFA-1</b>	Lymphocyte Function-Associated Antigen-1
<b>LPA</b>	Lysophosphatidic Acid
<b>MAA</b>	Melanoma-Associated Antigens
<b>Mac-1</b>	Macrophage-1 antigen
<b>MAGE</b>	Melanoma-Associated Antigen
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MBP</b>	Major Basic Protein
<b>MCAM</b>	Melanoma Cell Adhesion Molecule
<b>MCSP</b>	Melanoma Chondroitin Sulfate Proteoglycan
<b>MDA</b>	Melanocyte Differentiation Antigens
<b>MDSC</b>	Myeloid-Derived Suppressor Cell
<b>Melan-A/MART-1</b>	Melanoma Antigen Recognized by T cells-1
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex
<b>MITF</b>	Microphthalmia Associated Transcription Factor
<b>MMP</b>	Matrix Metalloproteinase
<b>MT1-MMP</b>	Membrane-Type 1-Matrix Metalloproteinase
<b>MTf</b>	Melanotransferrin
<b>MTP</b>	MicroTiter Plate
<b>MyD88</b>	Myeloid Differentiation Primary Response 88
<b>NCAM</b>	Neural Cell Adhesion Molecule
<b>NF1</b>	Neurofibromin 1
<b>NF-HEV</b>	Nuclear Factor From High Endothelial Venules
<b>NF-κB</b>	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
<b>NKG2D</b>	Natural Killer Group 2D receptor
<b>NRAS</b>	Neuroblastoma RAS
<b>NY-ESO-1</b>	New York-Esophageal Squamous Cell Carcinoma-1
<b>p14<sup>ARF</sup></b>	p14 alternate reading frame
<b>p16<sup>INK4A</sup></b>	p16 inhibitor of cyclin-dependent kinase 4A
<b>PAF</b>	Platelet-Activating Factor
<b>PAR-1</b>	Protease-Activated Thrombin Receptor-1
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PD-1</b>	Programmed Cell Death Protein-1
<b>PDGF-C</b>	Platelet Derived Growth Factor-C
<b>PD-L1</b>	Programmed Death-Ligand 1
<b>PEDF</b>	Pigment Epithelium-Derived Factor
<b>PI3K/Akt</b>	Phosphatidylinositol 3-Kinase/protein kinase B
<b>PMA</b>	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
<b>PTEN</b>	Phosphatase and Tensin homolog
<b>qRT-PCR</b>	quantitative Real Time-PCR
<b>RAS-GDP</b>	RAS-Guanosine Diphosphate
<b>RAS-GTP</b>	RAS-Guanosine Triphosphate
<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>SIGIRR</b>	Single Ig IL-1-Related Receptor
<b>SNP</b>	Single-Nucleotide Polymorphism
<b>SSX</b>	Synovial Sarcoma X

<b>ST2</b>	Suppression of Tumorigenicity 2
<b>TAP</b>	Transporter Associated with Antigen Processing
<b>TERT</b>	Telomerase Reverse Transcriptase
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor- $\beta$
<b>TIL</b>	Tumor Infiltrating Lymphocytes
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
<b>TRAF6</b>	TNF Receptor Associated Factor 6
<b>TRAIL/Apo2L</b>	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand/Apo2 Ligand
<b>TRP</b>	Tyrosinase-Related Proteins
<b>uPA</b>	urokinase-type Plasminogen Activator
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>VCAM-1</b>	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor

## 8. ЛІТЕРАТУРА

1. Hsu MY, Meier F, Herlyn M. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation*. 2002;70(9-10):522-536.
2. Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghì A, Spandidos DA, Mccubrey JA, Candido S, Libra M. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol*. 2018;52(4):1071-1080.
3. Ali Z, Yousaf N, Larkin J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC Suppl*. 2013;11(2):81-91.
4. Motwani J, Eccles MR. Genetic and Genomic Pathways of Melanoma Development, Invasion and Metastasis. *Genes (Basel)*. 2021;12(10):1543.
5. Fisher DE, Kwong LN, Chin L. Melanoma. Chapter 48 In: DeVita, Hellman, and Rosenberg's *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 8th edition, Lippincott Williams & Wilkins 2008;p1889-1965.
6. Ng MF, Simmons JL, Boyle GM. Heterogeneity in Melanoma. *Cancers (Basel)*. 2022;14(12):3030.
7. Fattore L, Ruggiero CF, Liguoro D, Mancini R, Ciliberto G. Single cell analysis to dissect molecular heterogeneity and disease evolution in metastatic melanoma. *Cell Death Dis*. 2019;10(11):827.
8. Bauer J, Garbe C. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res*. 2003;16(3):297-306.
9. Hawkes JE, Truong A, Meyer LJ. Genetic predisposition to melanoma. *Semin Oncol*. 2016;43(5):591-597.
10. Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: An integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:239-271.
11. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, Dicara D, Ramos AH, Lawrence MS, Cibulskis K, Sivachenko A, Voet D, Saksena G, Stransky N, Onofrio RC, Winckler W, Ardlie K, Wagle N, Wargo J, Chong K, Morton DL, Stenke-Hale K, Chen G, Noble M, Meyerson M, Ladbury JE, Davies MA, Gershenwald JE, Wagner SN, Hoon DS, Schadendorf D, Lander ES, Gabriel SB, Getz G, Garraway LA, Chin L. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 2012;150(2):251-263.
12. Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, Bäsecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Mazzarino MC, Nicoletti F, Libra M, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Montalto G, Cervello M, Laidler P, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Evangelisti C, Cocco L, Martelli AM, McCubrey JA. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: Rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget*. 2011;2(3):135-164.
13. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007;26(22):3100-3112.
14. Davies MA. The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *Cancer J*. 2012;18(2):142-147.
15. Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res*. 2003;9(17):6483-6488.
16. Weber C.K, Slupsky JR, Kalmes HA, Rapp UR. Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf. *Cancer Res*. 2001;61(9):3595-3598
17. Nissan MH, Pratilas CA, Jones AM, Ramirez R, Won H, Liu C, Tiwari S, Kong L, Hanrahan AJ, Yao Z, Merghoub T, Ribas A, Chapman PB, Yaeger R, Taylor BS, Schultz

- N, Berger MF, Rosen N, Solit DB. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Res.* 2014;74(8):2340-2350.
18. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, Dummer R, North J, Pincus L, Ruben B, Rickaby W, D'Arrigo C, Robson A, Bastian BC. The genetic evolution of melanoma from precursor lesions. *N Engl J Med.* 2015;373(20):1926-1936.
  19. Read J, Wadt KA, Hayward NK. Melanoma genetics. *J Med Genet.* 2016;53(1):1-14.
  20. Goldstein AM, Chan M, Harland M, Gillanders EM, Hayward NK, Avril MF, Azizi E, Bianchi-Scarra G, Bishop DT, Bressac-de Paillerets B, Bruno W, Calista D, Cannon Albright LA, Demenais F, Elder DE, Ghiorzo P, Gruis NA, Hansson J, Hogg D, Holland EA, Kanetsky PA, Kefford RF, Landi MT, Lang J, Leachman SA, Mackie RM, Magnusson V, Mann GJ, Niendorf K, Newton Bishop J, Palmer JM, Puig S, Puig-Butille JA, de Snoo FA, Stark M, Tsao H, Tucker MA, Whitaker L, Yakobson E. High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res.* 2006;66(20):9818-9828.
  21. Nikolaou V, Kang X, Stratigos A, Gogas H, Latorre MC, Gabree M, Plaka M, Njauw CN, Kypreou K, Mirmigi I, Stefanaki I, Tsao H. Comprehensive mutational analysis of CDKN2A and CDK4 in Greek patients with cutaneous melanoma. *Br J Dermatol.* 2011;165(6):1219-1222.
  22. Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol.* 2004;122(2):337-341.
  23. Nogueira C, Kim KH, Sung H, Paraiso KH, Dannenberg JH, Bosenberg M, Chin L, Kim M. Cooperative interactions of PTEN deficiency and RAS activation in melanoma metastasis. *Oncogene.* 2010;29(47):6222-6232.
  24. Cairns J . Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature.* 1975;255(5505):197-200.
  25. Weston A, Harris CC. Multistage Carcinogenesis In: Holland-Frei Cancer Medicine, 6th edition. Editors: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC, Gansler TS, Holland JF, Frei E. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.
  26. Nowell PC. Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(4):261-266.
  27. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry Dt, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol.* 1984;15(12):1147-1165.
  28. Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med.* 2006;355(1):51-65.
  29. Braig M, Schmitt CA. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res.* 2006;66(6):2881-2884.
  30. You MJ, Castrillon DH, Bastian BC, O'Hagan RC, Bosenberg MW, Parsons R, Chin L, DePinho RA. Genetic analysis of Pten and Ink4a/Arf interactions in the suppression of tumorigenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(3):1455-1460.
  31. Gimotty PA, Van Belle P, Elder DE, Murry T, Montone KT, Xu X, Hotz S, Raines S, Ming ME, Wahl P, Guerry D. Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2005;23(31):8048-8056.
  32. Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, Kester M, Sandirasegarane L, Robertson GP. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.* 2004;64(19):7002-7010.
  33. Johnson JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(3):345-57.



34. Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell–cell adhesion. *Ann Rev Biochem.* 1990;59:237-252.
35. Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 1996;1(2):188-194.
36. Hsu M, Andl T, Li G, Meinkoth JL, Herlyn M. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci.* 2000;113(Pt 9):1535-1542.
37. Qi J, Chen N, Wang J, Siu CH. Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway. *Mol Biol Cell.* 2005;16(9):4386-4397.
38. Widlund HR, Horstmann MA, Price ER, Cui J, Lessnick SL, Wu M, He X, Fisher DE. Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *J Cell Biol.* 2002;158(6):1079-1087.
39. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(10):5522-5227.
40. Widlund HR, Fisher DE. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* 2003;22(20):3035-3041.
41. McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, Lin YL, Ramaswamy S, Avery W, Ding HF, Jordan SA, Jackson IJ, Korsmeyer SJ, Golub TR, Fisher DE. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell.* 2002;109(6):707-718.
42. Danen EH, Ten Berge PJ, Van Muijen GN, Van 't Hof-Grootenboer AE, Brocker EB, Ruiter DJ. Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression. *Histopathology.* 1994;24(3):249-256.
43. Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Becker JC, Ruiter DJ, van Muijen GN. Coexpression of integrin alpha(v)beta3 and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: correlation with melanoma progression. *J Invest Dermatol.* 2000;115(4):625-632.
44. Petitclerc E, Stromblad S, von Schalscha TL, Mitjans F, Piulats J, Montgomery AM, Chersesh DA, Brooks PC. Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res.* 1999;59(11):2724-2730.
45. Li X, Regezi J, Ross FP, Blystone S, Ilić D, Leong SP, Ramos DM. Integrin alphavbeta3 mediates K1735 murine melanoma cell motility in vivo and in vitro. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 14):2665-2672.
46. Bogenrieder T, Herlyn M. Cell-surface proteolysis, growth factor activation and intercellular communication in the progression of melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002;44(1):1-15.
47. Huttenlocher A, Horwitz AR. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(9):a005074.
48. Seftor RE, Seftor EA, Hendrix MJ. Molecular role(s) for integrins in human melanoma invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(3):359-375.
49. Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2005;24(2):195-222.
50. Rathinam R, Alahari SK. Important role of integrins in the cancer biology. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(1):223-237.

51. Price MA, Colvin Wanshura LE, Yang J, Carlson J, Xiang B, Li G, Ferrone S, Dudek AZ, Turley EA, McCarthy JB. CSPG4, a potential therapeutic target, facilitates malignant progression of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24(6):1148-1157.
52. Campoli M, Ferrone S, Wang X. Functional and clinical relevance of chondroitin sulfate proteoglycan 4. *Adv Cancer Res.* 2010;109:73-121.
53. Gaggioli C, Sahai E. Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res.* 2007;20(3):161-172.
54. Tas F. Metastatic behavior in melanoma: timing, pattern, survival, and influencing factors. *J Oncol.* 2012;2012:647684.
55. Gómez-Cuadrado L, Tracey N, Ma R, Qian B, Brunton VG. Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Dis Model Mech.* 2017;10(9):1061-1074.
56. Gupta PB, Kuperwasser C, Brunet JP, Ramaswamy S, Kuo WL, Gray JW, Naber SP, Weinberg RA. The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet.* 2005;37(10):1047-1054.
57. Folkman, J. Angiogenesis. *Annu Rev Med.* 2006;57:1-18.
58. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407(6801):249-257.
59. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell.* 2009;139(5):871-890.
60. Tang Y, Durand S, Dalle S, Caramel J. EMT-Inducing Transcription Factors, Drivers of Melanoma Phenotype Switching, and Resistance to Treatment. *Cancers (Basel).* 2020;12(8): 2154.
61. Alonso SR, Tracey L, Ortiz P, Pérez-Gómez B, Palacios J, Pollán M, Linares J, Serrano S, Sáez-Castillo AI, Sánchez L, Pajares R, Sánchez-Aguilera A, Artiga MJ, Piris MA, Rodríguez-Peralto JL. A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res.* 2007;67(7):3450-3460.
62. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell.* 2011;147(2):275-292.
63. Lugassy C, Zadrán S, Bentolila LA., Wadehra M, Prakash R, Carmichael ST, Kleinman HK, Peault B, Larue L, Barnhill RL. Angiotropism, pericytic mimicry and extravascular migratory metastasis in melanoma: an alternative to intravascular cancer dissemination. *Cancer Microenviron.* 2014;7(3):139-152.
64. Landsberg J, Tüting T, Barnhill RL, Lugassy C. The role of neutrophilic inflammation, angiotropism, and pericytic mimicry in melanoma progression and metastasis. *J Invest Dermatol.* 2016;136(2):372-377.
65. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LMG, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999;155(3):739-752.
66. Bailey CM, Morrison JA, Kulesa PM. Melanoma revives an embryonic migration program to promote plasticity and invasion. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012;25(5):573-583.
67. Arozarena I, Wellbrock C. Targeting invasive properties of melanoma cells. *FEBS J.* 2017;284(14):2148-2162.
68. Damsky WE, Rosenbaum LE, Bosenberg M. Decoding melanoma metastasis. *Cancers (Basel).* 2010;3(1):126-163.
69. Plebanek MP, Angeloni NL, Vinokour E, Li J, Henkin A, Martinez-Marin D, Filleur S, Bhowmick R, Henkin J, Miller SD, Ifergan I, Lee Y, Osman I, Thaxton CS, Volpert OV. Pre-metastatic cancer exosomes induce immune surveillance by patrolling monocytes at the metastatic niche. *Nat Commun.* 2017;8(1):1319.

70. Ju RJ, Stehbens SJ, Haass NK. The Role of Melanoma Cell-Stroma Interaction in Cell Motility, Invasion, and Metastasis. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:307.
71. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Mannel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res*. 1999;59(6):1295-1300.
72. Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A. Pictures in molecular medicine: three-dimensional visualization of intravascular tumor cells in mice. *Trends Mol Med*. 2001;7(8):377.
73. Depasquale I, Thompson WD. Prognosis in human melanoma: PAR-1 expression is superior to other coagulation components and VEGF. *Histopathology*. 2008;52(4):500-509.
74. Strell C, Entschladen F. Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Commun Signal*. 2008;6:10.
75. Dittmar T, Heyder C, Gloria-Maercker E, Hatzmann W, Zänker KS. Adhesion molecules and chemokines: the navigation system for circulating tumor (stem) cells to metastasize in an organ-specific manner. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(1):11-32.
76. Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res*. 1996;32(4):733-742.
77. Liang S, Slattery MJ, Wagner D, Simon SI, Dong C. Hydrodynamic shear rate regulates melanoma-leukocyte aggregation, melanoma adhesion to the endothelium, and subsequent extravasation. *Ann Biomed Eng*. 2008;36(4):661-671.
78. Liang S, Sharma A, Peng HH, Robertson G, Dong C. Targeting mutant (V600E) B-Raf in melanoma interrupts immunoediting of leukocyte functions and melanoma extravasation. *Cancer Res*. 2007;67(12):5814-5820.
79. Klemke M, Weschenfelder T, Konstandin MH, Samstag Y. High affinity interaction of integrin  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers. *J Cell Physiol*. 2007;212(2):368-374.
80. Zbytek B, Carlson JA, Granese J, Ross J, Mihm MC Jr, Slominski A. Current concepts of metastasis in melanoma. *Expert Rev Dermatol*. 2008;3(5):569-585.
81. Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS, Gardner LM, Bilban M, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V, Hendrix MJ. Cooperative interactions of laminin 5  $\gamma 2$  chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res*. 2001;61(17):6322-6327.
82. Quintanilla-Dieck MJ, Codriansky K, Keady M, Bhawan J, Runger TM. Cathepsin K in melanoma invasion. *J Invest Dermatol*. 2008;128(9):2281-2288.
83. Frohlich E, Schlagenhauff B, Mohrle M, Weber E, Klessen C, Rassner G. Activity, expression, and transcription rate of the cathepsins B, D, H, and L in cutaneous malignant melanoma. *Cancer*. 2001;91(5):972-982.
84. Poczka P, Suli-Vargha H, Darvas Z, Falus A. Locally generated VGVAPG and VAPG elastin-derived peptides amplify melanoma invasion via the galectin-3 receptor. *Int J Cancer*. 2008;122(9):1972-1980.
85. Radosavljevic G, Jovanovic I, Majstorovic I, Mitrovic M, Lisnic VJ, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. Deletion of galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. *Clin Exp Metastasis*. 2011;28(5):451-462.
86. Lacal PM, Ruffini F, Pagani E, D'Atri S. An autocrine loop directed by the vascular endothelial growth factor promotes invasiveness of human melanoma cells. *Int J Oncol*. 2005;27(6):1625-1632.

87. Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong S. Cutaneous Melanoma. 4th edition. Quality Medical Publishing; St. Louis, MO, USA; 2003.
88. Richmond A, Yang J, Su Y. The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22(2):175-186.
89. Sandru A, Voinea S, Panaitescu E, Blidaru A. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *J Med Life.* 2014;7(4):572-576.
90. Bergmeier W, Piffath CL, Goerge T, Cifuni SM, Ruggeri ZM, Ware J, Wagner DD. The role of platelet adhesion receptor GPIIb/IIIa far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(45):16900-16905.
91. Jain S, Zuka M, Liu J, Russell S, Dent J, Guerrero JA, Forsyth J, Maruszak B, Gartner TK, Felding-Habermann B, Ware J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa supports experimental lung metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(21):9024-9028.
92. Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new soughts. *Sem Cancer Biol.* 2011;21(2):139-146.
93. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature.* 2005;438(7069):820-827.
94. Weidle UH, Birzele F, Kollmorgen G, Ruger R. Molecular Basis of Lung Tropism of Metastasis. *Cancer Genomics Proteomics.* 2016;13(2):129-139.
95. Krishnan K, Khanna C, Helman LJ. The molecular biology of pulmonary metastasis. *Thorac Surg Clin.* 2006;16(2):115-124.
96. Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(10):727-739.
97. Braeuer RR, Watson IR, Wu CJ, Mobley AK, Kamiya T, Shoshan E, Bar-Eli M. Why is melanoma so metastatic? *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27(1):19-36.
98. Bar-Eli, M. Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma. *Pathobiology.* 1999;67(1):12-18.
99. Varney ML, Johansson SL, Singh RK. Distinct expression of CXCL8 and its receptors CXCR1 and CXCR2 and their association with vessel density and aggressiveness in malignant melanoma. *Am J Clin Pathol.* 2006;125(2):209-216.
100. Melnikova VO, Bar-Eli M. Inflammation and melanoma metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22(3):257-267.
101. Melnikova VO, Bar-Eli M. Bioimmunotherapy for melanoma using fully human antibodies targeting MCAM/MUC18 and IL-8. *Pigment Cell Res.* 2006;19(5):395-405.
102. Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, Arestad A, Cioce V, Schiffmann E, Liotta LA. Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem.* 1992;267(4):2524-2529.
103. Braeuer RR, Zigler M, Kamiya T, Dobroff AS, Huang L, Choi W, McConkey DJ, Shoshan E, Mobley AK, Song R, Raz A, Bar-Eli M. Galectin-3 contributes to melanoma growth and metastasis via regulation of NFAT1 and autotaxin. *Cancer Res.* 2012;72(22):5757-5766.
104. Melnikova V, Bar-Eli M. Inflammation and melanoma growth and metastasis: the role of platelet-activating factor (PAF) and its receptor. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26(3-4):359-371.
105. Giaccotti FG. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell.* 2013;155(4):750-764.

106. Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC, Chambers AF, MacDonald IC. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res.* 2000;60(9):2541-2546.
107. Teicher BA. *Tumor Models in Cancer Research.* Humana Press; New York, Dordrecht, Heidelberg and London: 2010.
108. McKinney AJ, Holmen SL. Animal models of melanoma: a somatic cell gene delivery mouse model allows rapid evaluation of genes implicated in human melanoma. *Chin J Cancer.* 2011;30(3):153-162.
109. Kuzu OF, Nguyen FD, Noory MA, Sharma A. Current State of Animal (Mouse) Modeling in Melanoma Research. *Cancer Growth Metastasis.* 2015;8(Suppl 1):81-94.
110. Giavazzi R, Decio A. Syngeneic Murine Metastasis Models: B16 Melanoma. *Methods Mol Biol.* 2014;1070:131-140.
111. Fidler IJ. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat New Biol.* 1973;242(118):148-149.
112. Overwijk WW, Restifo NP. B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr Protoc Immunol.* 2001 May;Chapter 20:Unit 20.1.
113. Damsky WE Jr, Bosenberg M. Mouse melanoma models and cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23(6):853-859.
114. Zhu DZ, Cheng CF, Pauli BU. Mediation of lung metastasis of murine melanomas by a lung-specific endothelial cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(21):9568-9572.
115. Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC, Pauli BU. The breast cancer beta 4 integrin and endothelial human Clca2 mediate lung metastasis. *J Biol Chem.* 2001;276(27):25438-25446.
116. Fidler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res.* 1975;35(1):218-224.
117. Maiorana A, Cavallari V, Maiorana MC, Fano RA, Scimone S, Fante R, Garbisa S. Metastatic capacity and differentiation in murine melanoma cell lines. A morphometric study. *Pathol Res Pract.* 1992;188(4-5):657-662.
118. Hart D A, Smith R. Differences between the F10, BL6 and F1 sublines of the B16 melanoma in the enhancement of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor secretion by phorbol myristate acetate. *Cancer Lett.* 1987;35(1):27-38.
119. Rudrabhatla SR, Mahaffey CL, Mummert ME. Tumor microenvironment modulates hyaluronan expression: the lactate effect. *J Invest Dermatol.* 2006;126(6):1378-1387.
120. Nanni P, Colombo MP, De Giovanni C, Lollini PL, Nicoletti G, Parmiani G, Prodi G. Impaired H-2 expression in B16 melanoma variants. *J Immunogenetics.* 1983;10(5):361-370.
121. Gehlsen KR, Hendrix MJ. In vitro assay demonstrates similar invasion profiles for B16F1 and B16F10 murine melanoma cells. *Cancer Lett.* 1986;30(2):207-212.
122. Poste G, Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature.* 1980;283(5743):139-146.
123. Nakamura K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sci.* 2002;70(7):791-798.
124. Marzagalli M, Ebelt ND, Manuel ER. Unraveling the crosstalk between melanoma and immune cells in the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol.* 2019;59:236-250.
125. Polak ME, Borthwick NJ, Gabriel FG, Johnson P, Higgins B, Hurren J, McCormick D, Jager MJ, Cree IA. Mechanisms of local immunosuppression in cutaneous melanoma. *Br J Cancer.* 2007;96(12):1879-1887.

126. Marcus A, Gowen BG, Thompson TW, Iannello A, Ardolino M, Deng W, Wang L, Shifrin N, Raulet DH. Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Adv Immunol.* 2014;122:91-128.
127. Verdegaal EM, de Miranda NF, Visser M, Harryvan T, van Buuren MM, Andersen RS, Hadrup SR, van der Minne CE, Schotte R, Spits H, Haanen JB, Kapiteijn EH, Schumacher TN, van der Burg SH. Neoantigen landscape dynamics during human melanoma-T cell interactions. *Nature.* 2016;536(7614):91-95.
128. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol.* 2013;14(10):1014-1022.
129. Wehner R, Dietze K, Bachmann M, Schmitz M. The bidirectional crosstalk between human dendritic cells and natural killer cells. *J Innate Immun.* 2011;3(3):258-63.
130. Lakshmikanth T, Burke S, Ali TH, Kimpfler S, Ursini F, Ruggeri L, Capanni M, Umansky V, Paschen A, Sucker A, Pende D, Groh V, Biassoni R, Höglund P, Kato M, Shibuya K, Schadendorf D, Anichini A, Ferrone S, Velardi A, Kärre K, Shibuya A, Carbone E, Colucci F. NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 2009;119(5):1251-1263.
131. Li Y, Wang W, Yang F, Xu Y, Feng C, Zhao Y. The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. *Cell Commun Signal.* 2019;17(1):147.
132. Zhu EF, Gai SA, Opel CF, Kwan BH, Surana R, Mihm MC, Kauke MJ, Moynihan KD, Angelini A, Williams RT, Stephan MT, Kim JS, Yaffe MB, Irvine DJ, Weiner LM, Dranoff G, Wittrup KD. Synergistic innate and adaptive immune response to combination immunotherapy with anti-tumor antigen antibodies and extended serum half-life IL-2. *Cancer Cell.* 2015;27(4):489-501.
133. Keirsse J, Van Damme H, Van Ginderachter JA, Laoui D. Exploiting tumor-associated dendritic cell heterogeneity for novel cancer therapies. *J Leukoc Biol.* 2017;102(2):317-324.
134. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature.* 2007;449(7161):419-426.
135. J Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.
136. Tucci M, Stucci S, Passarelli A, Giudice G, Dammacco F, Silvestris F. The immune escape in melanoma: role of the impaired dendritic cell function. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014;10(10):1395-1404.
137. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev.* 2010;234(1):45-54.
138. Niu G, Bowman T, Huang M, Shivers S, Reintgen D, Daud A, Chang A, Kraker A, Jove R, Yu H. Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene.* 2002;21(46):7001-7010.
139. Amatschek S, Lucas R, Eger A, Pflueger M, Hundsberger H, Knoll C, Grosse-Kracht S, Schuett W, Koszik F, Maurer D, Wiesner C. CXCL9 induces chemotaxis, chemorepulsion and endothelial barrier disruption through CXCR3-mediated activation of melanoma cells. *Br J Cancer.* 2011;104(3):469-479.
140. Chheda ZS, Sharma RK, Jala VR, Luster AD, Haribabu B. Chemoattractant Receptors BLT1 and CXCR3 Regulate Antitumor Immunity by Facilitating CD8+ T Cell Migration into Tumors. *J Immunol.* 2016;197(5):2016-2026.
141. Mignogna C, Scali E, Camastra C, Presta I, Zeppa P, Barni T, Donato G, Bottoni U, Di Vito A. Innate immunity in cutaneous melanoma. *Clin Exp Dermatol.* 2017;42(3):243-250.

142. Ladányi A, Kiss J, Somlai B, Gilde K, Fejos Z, Mohos A, Gaudi I, Tímár J. Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56(9):1459-1469.
143. Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, Donskov F, Høyer M, Sjoegren P, Christensen IJ, Steiniche T. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer.* 2012;118(9):2476-2485.
144. Gonzalez-Gugel E, Saxena M, Bhardwaj N. Modulation of innate immunity in the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother.* 2016;65(10):1261-1268.
145. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel).* 2014;6(3):1670-1690.
146. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:323-350.
147. Hussain SF, Yang D, Suki D, Grimm E, Heimberger AB. Innate immune functions of microglia isolated from human glioma patients. *J Transl Med.* 2006;4:15.
148. Peppicelli S, Bianchini F, Calorini L. Inflammatory cytokines induce vascular endothelial growth factor-C expression in melanoma-associated macrophages and stimulate melanoma lymph node metastasis. *Oncol Lett.* 2014;8(3):1133-1138.
149. Marconi C, Bianchini F, Mannini A, Mugnai G, Ruggieri S, Calorini L. Tumoral and macrophage uPAR and MMP-9 contribute to the invasiveness of B16 murine melanoma cells. *Clin Exp Metastasis.* 2008;25(3):225-231.
150. Giese MA, Hind LE, Huttenlocher A. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood.* 2019;133(20):2159-2167.
151. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS, Albelda SM. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell.* 2009;16(3):183-194.
152. Reichman H, Karo-Atar D, Munitz A. Emerging Roles for Eosinophils in the Tumor Microenvironment. *Trends Cancer.* 2016;2(11):664-675.
153. Cormier SA, Taranova AG, Bedient C, Nguyen T, Protheroe C, Pero R, Dimina D, Ochkur SI, O'Neill K, Colbert D, Lombardi TR, Constant S, McGarry MP, Lee JJ, Lee NA. Eosinophil Infiltration of Solid Tumors Is an Early and Persistent Inflammatory Host Response. *J Leukoc Biol.* 2006;79(6):1131-1139.
154. Simon SCS, Utikal J, Umansky V. Opposing roles of eosinophils in cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2019;68(5):823-833.
155. Pandit R, Scholnik A, Wulfekuhler L, Dimitrov N. Non-small-cell lung cancer associated with excessive eosinophilia and secretion of interleukin-5 as a paraneoplastic syndrome. *Am J Hematol.* 2007;82(3):234-237.
156. Curran CS, Evans MD, Bertics PJ. GM-CSF production by glioblastoma cells has a functional role in eosinophil survival, activation, and growth factor production for enhanced tumor cell proliferation. *J Immunol.* 2011;187(3):1254-1263.
157. Carretero R, Sektioglu IM, Garbi N, Salgado OC, Beckhove P, Hämmerling GJ. Eosinophils orchestrate cancer rejection by normalizing tumor vessels and enhancing infiltration of CD8(+) T cells [published correction appears in *Nat Immunol.* 2016;17(2):214]. *Nat Immunol.* 2015;16(6):609-617.
158. Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(4):651-663.
159. Mattes J, Hulett M, Xie W, Hogan S, Rothenberg ME, Foster P, Parish C. Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process. *J Exp Med.* 2003;197(3):387-393.

160. Ikutani M, Yanagibashi T, Ogasawara M, Tsuneyama K, Yamamoto S, Hattori Y, Kouro T, Itakura A, Nagai Y, Takaki S, Takatsu K. Identification of innate IL-5-producing cells and their role in lung eosinophil regulation and antitumor immunity. *J Immunol.* 2012;188(2):703-713.
161. Lucarini V, Ziccheddu G, Macchia I, La Sorsa V, Peschiaroli F, Buccione C, Sistigu A, Sanchez M, Andreone S, D'Urso MT, Spada M, Macchia D, Afferni C, Mattei F, Schiavoni G. IL-33 restricts tumor growth and inhibits pulmonary metastasis in melanoma-bearing mice through eosinophils. *Oncoimmunology.* 2017;6(6):e1317420.
162. Mahmoud F, Shields B, Makhoul I, Avaritt N, Wong HK, Hutchins LF, Shalin S, Tackett AJ. Immune surveillance in melanoma: From immune attack to melanoma escape and even counterattack. *Cancer Biol Ther.* 2017;18(7):451-469.
163. Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingsluff C, McKee M, Gajewski TF. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer Res.* 2009;69(7):3077-3085.
164. Salerno EP, Olson WC, McSkimming C, Shea S, Slingsluff CL Jr. T cells in the human metastatic melanoma microenvironment express site-specific homing receptors and retention integrins. *Int J Cancer.* 2014;134(3):563-574.
165. Garrido F, Cabrera T, Aptsiauri N. "Hard" and "soft" lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: Implications for immunotherapy. *Int J Cancer.* 2010;127(2):249-256.
166. Fruci D, Benevolo M, Cifaldi L, Lorenzi S, Lo Monaco E, Tremante E, Giacomini P. Major histocompatibility complex class I and tumour immuno-evasion: How to fool T cells and natural killer cells at one time. *Curr Oncol.* 2012;19(1):39-41.
167. Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol.* 1998;10(5):581-587.
168. Jazirehi AR, Arle D. Epigenetic regulation of the TRAIL/Apo2L apoptotic pathway by histone deacetylase inhibitors: An attractive approach to bypass melanoma immunotherapy resistance. *Am J Clin Exp Immunol.* 2013;2(1):55-74.
169. Schmitz I, Kirchhoff S, Krammer PH. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32(11-12):1123-1136.
170. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(1):63-67.
171. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: How pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(1):67-71.
172. van den Broek ME, Kagi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, Melief CJ, Zinkernagel RM, Hengartner H. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med.* 1996;184(5):1781-1790.
173. Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature.* 1994;369(6475):31-37.
174. Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell.* 1994;76(6):977-987.
175. Medema JP, Toes RE, Scaffidi C, Zheng TS, Flavell RA, Melief CJ, Peter ME, Offringa R, Krammer PH. Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur J Immunol.* 1997;27(12):3492-3498.
176. Heibein JA, Goping IS, Barry M, Pinkoski MJ, Shore GC, Green DR, Bleackley RC. Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the bcl-2 family members bid and bax. *J Exp Med.* 2000;192(10):1391-1402.



177. Passarelli A, Mannavola F, Stucci LS, Tucci M, Silvestris F. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget*. 2017;8(62):106132-106142.
178. Miller JF, Sadelain M. The Journey from Discoveries in Fundamental Immunology to Cancer Immunotherapy. *Cancer Cell*. 2015;27(4):439-449.
179. Attrill GH, Ferguson PM, Palendira U, Long GV, Wilmott JS, Scolyer RA. The tumour immune landscape and its implications in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2021;34(3):529-549.
180. Eddy K, Chen S. Overcoming Immune Evasion in Melanoma. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23):8984.
181. Seliger B, Ritz U, Abele R, Bock M, Tampé R, Sutter G, Drexler I, Huber C, Ferrone S. Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway. *Cancer Res*. 2001;61(24):8647-8650.
182. Pitcovski J, Shahar E, Aizenshtein E, Gorodetsky R. Melanoma antigens and related immunological markers. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;115:36-49.
183. Hodi FS. Well-defined melanoma antigens as progression markers for melanoma: insights into differential expression and host response based on stage. *Clin Cancer Res*. 2006;12(3 Pt 1):673-678.
184. Castelli C, Rivoltini L, Andreola G, Carrabba M, Renkvist N, Parmiani G. T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):323-331.
185. Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, Cebon J. Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res*. 2006;12(3 Pt 1):764-771.
186. Fogal S, Carotti M, Giaretta L, Lanciai F, Nogara L, Bubacco L, Bergantino E. Human tyrosinase produced in insect cells: a landmark for the screening of new drugs addressing its activity. *Mol Biotechnol*. 2015;57(1):45-57.
187. del Marmol V, Beermann F. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett*. 1996;381(3):165-168.
188. Topalian SL, Gonzales MI, Parkhurst M, Li YF, Southwood S, Sette A, Rosenberg SA, Robbins PF. Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *J Exp Med*. 1996;183(5):1965-1971.
189. Tjin EP, Konijnenberg D, Krebbers G, Mallo H, Drijfhout JW, Franken KL, van der Horst CM, Bos JD, Nieweg OE, Kroon BB, Haanen JB, Melief CJ, Vyth-Dreese FA, Luiten RM. T-cell immune function in tumor, skin, and peripheral blood of advanced stage melanoma patients: implications for immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2011;17(17):5736-5747.
190. Sarangarajan R, Zhao Y, Babcock G, Cornelius J, Lamoreux ML, Boissy RE. Mutant alleles at the brown locus encoding tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) affect proliferation of mouse melanocytes in culture. *Pigment Cell Res*. 2000;13(5):337-344.
191. Fang D, Hallman J, Sangha N, Kute TE, Hammarback JA, White WL, Setaluri V. Expression of microtubule-associated protein 2 in benign and malignant melanocytes: implications for differentiation and progression of cutaneous melanoma. *Am J Pathol*. 2001;158(6):2107-2115.
192. Khalil DN, Postow MA, Ibrahim N, Ludwig DL, Cosaert J, Kambhampati SR, Tang S, Grebennik D, Kauh JS, Lenz HJ, Flaherty KT, Hodi FS, Lawrence DP, Wolchok JD. An Open-Label, Dose-Escalation Phase I Study of Anti-TYRP1 Monoclonal Antibody IMC-20D7S for Patients with Relapsed or Refractory Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2016;22(21):5204-5210.

193. Bloom MB, Perry-Lalley D, Robbins PF, Li Y, el-Gamil M, Rosenberg SA, Yang JC. Identification of tyrosinase-related protein 2 as a tumor rejection antigen for the B16 melanoma. *J Exp Med.* 1997;185(3):453-459.
194. Pak BJ, Chu W, Lu SJ, Kerbel RS, Ben-David Y. Lineage-specific mechanism of drug and radiation resistance in melanoma mediated by tyrosinase-related protein 2. *Cancer Metastasis Rev.* 2001;20(1-2):27-32.
195. Busam KJ, Chen YT, Old LJ, Stockert E, Iversen K, Coplan KA, Rosai J, Barnhill RL, Jungbluth AA. Expression of melan-A (MART1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Surg Pathol.* 1998;22(8):976-982.
196. Hoashi T, Watabe H, Muller J, Yamaguchi Y, Vieira WD, Hearing VJ. MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *J Biol Chem.* 2005;280(14):14006-14016.
197. Bissig C, Rochin L, van Niel G. PMEL Amyloid Fibril Formation: The Bright Steps of Pigmentation. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9):1438.
198. Raposo G, Tenza D, Murphy DM, Berson JF, Marks MS. Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol.* 2001;152(4):809-824.
199. Vennegeoor C, Hageman P, Van Nouhuijs H, Ruiter DJ, Calafat J, Ringens PJ, Rümke P. A monoclonal antibody specific for cells of the melanocyte lineage. *Am J Pathol.* 1988;130(1):179-192.
200. Gjerstorff MF, Harkness L, Kassem M, Frandsen U, Nielsen O, Lutterodt M, Møllgård K, Ditzel HJ. Distinct GAGE and MAGE-A expression during early human development indicate specific roles in lineage differentiation. *Hum Reprod.* 2008;23(10):2194-2201.
201. Fratta E, Coral S, Covre A, Parisi G, Colizzi F, Danielli R, Nicolay HJ, Sigalotti L, Maio M. The biology of cancer testis antigens: putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol Oncol.* 2011;5(2):164-182.
202. Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci.* 2009;100(11):2014-2021.
203. Sang M, Wang L, Ding C, Zhou X, Wang B, Wang L, Lian Y, Shan B. Melanoma-associated antigen genes - an update. *Cancer Lett.* 2011;302(2):85-90.
204. Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T, Lucas S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res.* 2001;61(14):5544-5551.
205. Ruault M, van der Bruggen P, Brun ME, Boyle S, Roizès G, De Sario A. New BAGE (B melanoma antigen) genes mapping to the juxtacentromeric regions of human chromosomes 13 and 21 have a cancer/testis expression profile. *Eur J Hum Genet.* 2002;10(12):833-840.
206. Boël P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur R, Renauld JC, Coulie P, Boon T, van der Bruggen P. BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity.* 1995;2(2):167-175.
207. Gjerstorff MF, Ditzel HJ. An overview of the GAGE cancer/testis antigen family with the inclusion of newly identified members. *Tissue Antigens.* 2008;71(3):187-192.
208. Bazhin AV, Wiedemann N, Schnölzer M, Schadendorf D, Eichmüller SB. Expression of GAGE family proteins in malignant melanoma. *Cancer Lett.* 2007;251(2):258-267.
209. Gnjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Güre AO, Ritter G, Jäger E, Knuth A, Chen YT, Old LJ. NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Adv Cancer Res.* 2006;95:1-30.
210. Velazquez EF, Jungbluth AA, Yancovitz M, Gnjatic S, Adams S, O'Neill D, Zavilevich K, Albukh T, Christos P, Mazumdar M, Pavlick A, Polsky D, Shapiro R, Berman R, Spira J, Busam K, Osman I, Bhardwaj N. Expression of the cancer/testis antigen NY-ESO-1 in

- primary and metastatic malignant melanoma (MM)--correlation with prognostic factors. *Cancer Immun.* 2007;7:11.
211. Smith HA, McNeel DG. The SSX family of cancer-testis antigens as target proteins for tumor therapy. *Clin Dev Immunol.* 2010;2010:150591.
  212. Suryo Rahmanto Y, Dunn LL, Richardson DR. The melanoma tumor antigen, melanotransferrin (p97): a 25-year hallmark--from iron metabolism to tumorigenesis. *Oncogene.* 2007;26(42):6113-6124.
  213. Madureira PA, O'Connell PA, Surette AP, Miller VA, Waisman DM. The biochemistry and regulation of S100A10: a multifunctional plasminogen receptor involved in oncogenesis. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:353687.
  214. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33(7):637-668.
  215. Gaynor R, Herschman HR, Irie R, Jones P, Morton D, Cochran A. S100 protein: a marker for human malignant melanomas? *Lancet.* 1981;1(8225):869-871.
  216. Bitton RJ, Guthmann MD, Gabri MR, Carnero AJ, Alonso DF, Fainboim L, Gomez DE. Cancer vaccines: an update with special focus on ganglioside antigens. *Oncol Rep.* 2002;9(2):267-276.
  217. Hamilton WB, Helling F, Lloyd KO, Livingston PO. Ganglioside expression on human malignant melanoma assessed by quantitative immune thin-layer chromatography. *Int J Cancer.* 1993;53(4):566-573.
  218. Bielas JH, Loeb KR, Rubin BP, True LD, Loeb LA. Human cancers express a mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(48):18238-18242.
  219. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976;194(4260):23-28.
  220. Blanchard T, Srivastava PK, Duan F. Vaccines against advanced melanoma. *Clin Dermatol.* 2013;31(2):179-190.
  221. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949-954.
  222. McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R, Ramskov S, Lyngaa R, Saini SK, Jamal-Hanjani M, Wilson GA, Birkbak NJ, Hiley CT, Watkins TB, Shafi S, Murugaesu N, Mitter R, Akarca AU, Linares J, Marafioti T, Henry JY, Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Schadendorf D, Garraway LA, Makarov V, Rizvi NA, Snyder A, Hellmann MD, Merghoub T, Wolchok JD, Shukla SA, Wu CJ, Peggs KS, Chan TA, Hadrup SR, Quezada SA, Swanton C. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science.* 2016;351(6280):1463-1469.
  223. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan MH, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung

- SY, Wooster R, Futreal PA, Stratton MR. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. 2007;446(7132):153-158.
224. Huang AC, Zappasodi R. A decade of checkpoint blockade immunotherapy in melanoma: understanding the molecular basis for immune sensitivity and resistance. *Nat Immunol*. 2022;23(5):660-670.
  225. da Gama Duarte J, Woods K, Andrews MC, Behren A. The good, the (not so) bad and the ugly of immune homeostasis in melanoma. *Immunol Cell Biol*. 2018;96(5):497-506.
  226. Sha D, Jin Z, Budczies J, Kluck K, Stenzinger A, Sinicrope FA. Tumor Mutational Burden as a Predictive Biomarker in Solid Tumors. *Cancer Discov*. 2020;10(12):1808-1825.
  227. Morales L, Simpson D, Ferguson R, Cadley J, Esteva E, Monson K, Chat V, Martinez C, Weber J, Osman I, Kirchhoff T. Tumor immunogenomic signatures improve a prognostic model of melanoma survival [published correction appears in *J Transl Med*. 2023;21(1):234]. *J Transl Med*. 2021;19(1):78.
  228. Hölzel M, Bovier A, Tüting T. Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nat Rev Cancer*. 2013;13(5):365-376.
  229. Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Molecular plasticity of human melanoma cells. *Oncogene*. 2003;22(20):3070-3075.
  230. White RM, Zon LI. Melanocytes in development, regeneration, and cancer. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):242-252.
  231. Gener Lahav T, Adler O, Zait Y, Shani O, Amer M, Doron H, Abramovitz L, Yofe I, Cohen N, Erez N. Melanoma-derived extracellular vesicles instigate proinflammatory signaling in the metastatic microenvironment. *Int J Cancer*. 2019;145(9):2521-2534.
  232. Tung KH, Ernstoff MS, Allen C, Shu S. A Review of Exosomes and their Role in The Tumor Microenvironment and Host-Tumor "Macroenvironment". *J Immunol Sci*. 2019;3(1):4-8.
  233. Izar B, Joyce CE, Goff S, Cho NL, Shah PM, Sharma G, Li J, Ibrahim N, Gold J, Hodi FS, Garraway LA, Novina CD, Bertagnolli MM, Yoon CH. Bidirectional cross talk between patient-derived melanoma and cancer-associated fibroblasts promotes invasion and proliferation. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016;29(6):656-668.
  234. Khalili JS, Liu S, Rodríguez-Cruz TG, Whittington M, Wardell S, Liu C, Zhang M, Cooper ZA, Frederick DT, Li Y, Zhang M, Joseph RW, Bernatchez C, Ekmekcioglu S, Grimm E, Radvanyi LG, Davis RE, Davies MA, Wargo JA, Hwu P, Lizée G. Oncogenic BRAF(V600E) promotes stromal cell-mediated immunosuppression via induction of interleukin-1 in melanoma. *Clin Cancer Res*. 2012;18(19):5329-5340.
  235. Ziani L, Safta-Saadoun TB, Gourbeix J, Cavalcanti A, Robert C, Favre G, Chouaib S, Thiery J. Melanoma-associated fibroblasts decrease tumor cell susceptibility to NK cell-mediated killing through matrix-metalloproteinases secretion. *Oncotarget*. 2017;8(12):19780-19794.
  236. Nesbit M, Schaider H, Miller TH, Herlyn M. Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells. *J Immunol*. 2001;166(11):6483-6490.
  237. Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, Schirner M, Wolf GL, Alitalo K, Detmar M. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol*. 2001;159(3):893-903.
  238. Wang H, Yang L, Wang D, Zhang Q, Zhang L. Pro-tumor activities of macrophages in the progression of melanoma. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(7):1556-1562.
  239. Muenst S, Läubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *J Intern Med*. 2016;279(6):541-562.

240. Navarini-Meury AA, Conrad C. Melanoma and innate immunity--aActive inflammation or just erroneous attraction? Melanoma as the source of leukocyte-attracting chemokines. *Semin Cancer Biol.* 2009;19(2):84-91.
241. Mishalian I, Bayuh R, Levy L, Zolotarov L, Michaeli J, Fridlender ZG. Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer Immunol Immunother.* 2013;62(11):1745-1756.
242. Granot Z, Jablonska J. Distinct Functions of Neutrophil in Cancer and Its Regulation. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:701067.
243. Li YC, Zou JM, Luo C, Shu Y, Luo J, Qin J, Wang Y, Li D, Wang SS, Chi G, Guo F, Zhang GM, Feng ZH. Circulating tumor cells promote the metastatic colonization of disseminated carcinoma cells by inducing systemic inflammation. *Oncotarget.* 2017;8(17):28418-28430.
244. Glodde N, Bald T, van den Boorn-Konijnenberg D, Nakamura K, O'Donnell JS, Szczepanski S, Brandes M, Eickhoff S, Das I, Shridhar N, Hinze D, Rogava M, van der Sluis TC, Ruotsalainen JJ, Gaffal E, Landsberg J, Ludwig KU, Wilhelm C, Riek-Burchardt M, Müller AJ, Gebhardt C, Scolyer RA, Long GV, Janzen V, Teng MWL, Kastenmüller W, Mazzone M, Smyth MJ, Tüting T, Hölzel M. Reactive Neutrophil Responses Dependent on the Receptor Tyrosine Kinase c-MET Limit Cancer Immunotherapy. *Immunity.* 2017;47(4):789-802.e9.
245. haul ME, Fridlender ZG. Cancer-related circulating and tumor-associated neutrophils - subtypes, sources and function. *FEBS J.* 2018;285(23):4316-4342.
246. O'Donnell JS, Long GV, Scolyer RA, Teng MW, Smyth MJ. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition. *Cancer Treat Rev.* 2017;52:71-81.
247. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(8):579-591.
248. Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature.* 2015;523(7559):231-5.
249. Gide TN, Wilmott JS, Scolyer RA, Long GV. Primary and Acquired Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res.* 2018;24(6):1260-1270.
250. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, Rosenberg SA. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood.* 2009;114(8):1537-1544.
251. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res.* 2020;10(3):727-742.
252. Schietinger A, Philip M, Krisnawan VE, Chiu EY, Delrow JJ, Basom RS, Lauer P, Brockstedt DG, Knoblaugh SE, Hämmerling GJ, Schell TD, Garbi N, Greenberg PD. Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. *Immunity.* 2016;45(2):389-401.
253. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:515-548.
254. Yao S, Zhu Y, Zhu G, Augustine M, Zheng L, Goode DJ, Broadwater M, Ruff W, Flies S, Xu H, Flies D, Luo L, Wang S, Chen L. B7-h2 is a costimulatory ligand for CD28 in human. *Immunity.* 2011;34(5):729-740.
255. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol.* 2000;74:181-273.
256. Harlin H, Kuna TV, Peterson AC, Meng Y, Gajewski TF. Tumor progression despite massive influx of activated CD8(+) T cells in a patient with malignant melanoma ascites. *Cancer Immunol Immunother.* 2006;55(10):1185-97.

257. Huang L, Guo Y, Liu S, Wang H, Zhu J, Ou L, Xu X. Targeting regulatory T cells for immunotherapy in melanoma. *Mol Biomed.* 2021;2(1):11.
258. Facciabene A, Motz GT, Coukos G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res.* 2012;72(9):2162-2171.
259. Chen X, Fosco D, Kline DE, Meng L, Nishi S, Savage PA, Kline J. PD-1 regulates extrathymic regulatory T-cell differentiation. *Eur J Immunol.* 2014;44(9):2603-2616.
260. Viguier M, Lemaître F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol.* 2004;173(2):1444-1453.
261. Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, Blay JY, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchencker W, Martin F, Zitvogel L. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med.* 2005;202(8):1075-1085.
262. Horton BL, Williams JB, Cabanov A, Spranger S, Gajewski TF. Intratumoral CD8<sup>+</sup> T-cell Apoptosis Is a Major Component of T-cell Dysfunction and Impedes Antitumor Immunity. *Cancer Immunol Res.* 2018;6(1):14-24.
263. Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ, Bettini ML, Gravano DM, Vogel P, Liu CL, Tansombatvisit S, Grosso JF, Netto G, Smeltzer MP, Chaux A, Utz PJ, Workman CJ, Pardoll DM, Korman AJ, Drake CG, Vignali DA. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res.* 2012;72(4):917-927.
264. Jacobs SR, Herman CE, Maciver NJ, Wofford JA, Wieman HL, Hammen JJ, Rathmell JC. Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. *J Immunol.* 2008;180(7):4476-4486.
265. Najjar YG, Menk AV, Sander C, Rao U, Karunamurthy A, Bhatia R, Zhai S, Kirkwood JM, Delgoffe GM. Tumor cell oxidative metabolism as a barrier to PD-1 blockade immunotherapy in melanoma. *JCI Insight.* 2019;4(5):e124989.
266. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S, Mueller-Klieser W, Hoves S, Andreesen R, Mackensen A, Kreutz M. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood.* 2006;107(5):2013-2021.
267. Brand A, Singer K, Koehl GE, Kolitzus M, Schoenhammer G, Thiel A, Matos C, Bruss C, Klobuch S, Peter K, Kastenberger M, Bogdan C, Schleicher U, Mackensen A, Ullrich E, Fichtner-Feigl S, Kesselring R, Mack M, Ritter U, Schmid M, Blank C, Dettmer K, Oefner PJ, Hoffmann P, Walenta S, Geissler EK, Pouyssegur J, Villunger A, Steven A, Seliger B, Schreml S, Haferkamp S, Kohl E, Karrer S, Berneburg M, Herr W, Mueller-Klieser W, Renner K, Kreutz M. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab.* 2016;24(5):657-671.
268. Carr EL, Kelman A, Wu GS, Gopaul R, Senkevitch E, Aghvanyan A, Turay AM, Frauwirth KA. Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *J Immunol.* 2010;185(2):1037-1044.
269. Kim SH, Roszik J, Grimm EA, Ekmekcioglu S. Impact of l-Arginine Metabolism on Immune Response and Anticancer Immunotherapy. *Front Oncol.* 2018;8:67.
270. Bronte V, Serafini P, Mazzoni A, Segal DM, Zanovello P. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol.* 2003;24(6):302-306.
271. Yarlagadda K, Hassani J, Foote IP, Markowitz J. The role of nitric oxide in melanoma. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2017;1868(2):500-509.
272. Rubel F, Kern JS, Technau-Hafsi K, Uhrich S, Thoma K, Häcker G, von Bubnoff N, Meiss F, von Bubnoff D. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Primary Cutaneous

- Melanoma Correlates with Breslow Thickness and Is of Significant Prognostic Value for Progression-Free Survival. *J Invest Dermatol.* 2018;138(3):679-687.
273. Chevolet I, Speeckaert R, Schreuer M, Neyns B, Krysko O, Bachert C, Hennart B, Allorge D, van Geel N, Van Gele M, Brochez L. Characterization of the *in vivo* immune network of IDO, tryptophan metabolism, PD-L1, and CTLA-4 in circulating immune cells in melanoma. *Oncoimmunology.* 2015;4(3):e982382.
  274. Pietra G, Manzini C, Rivara S, Vitale M, Cantoni C, Petretto A, Balsamo M, Conte R, Benelli R, Minghelli S, Solari N, Gualco M, Queirolo P, Moretta L, Mingari MC. Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activating receptors and cytolytic activity. *Cancer Res.* 2012;72(6):1407-1415.
  275. Labadie BW, Bao R, Luke JJ. Reimagining IDO Pathway Inhibition in Cancer Immunotherapy via Downstream Focus on the Tryptophan-Kynurenine-Aryl Hydrocarbon Axis. *Clin Cancer Res.* 2019;25(5):1462-1471.
  276. Linnemann C, Schildberg FA, Schurich A, Diehl L, Hegenbarth SI, Endl E, Lacher S, Müller CE, Frey J, Simeoni L, Schraven B, Stabenow D, Knolle PA. Adenosine regulates CD8 T-cell priming by inhibition of membrane-proximal T-cell receptor signalling. *Immunology.* 2009;128(1 Suppl):e728-737.
  277. Ohta A, Kini R, Ohta A, Subramanian M, Madasu M, Sitkovsky M. The development and immunosuppressive functions of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Front Immunol.* 2012;3:190.
  278. Cekic C, Day YJ, Sag D, Linden J. Myeloid expression of adenosine A2A receptor suppresses T and NK cell responses in the solid tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2014;74(24):7250-7259.
  279. Wieckowski EU, Visus C, Szajnik M, Szczepanski MJ, Storkus WJ, Whiteside TL. Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 2009;183(6):3720-3730.
  280. Chen G, Huang AC, Zhang W, Zhang G, Wu M, Xu W, Yu Z, Yang J, Wang B, Sun H, Xia H, Man Q, Zhong W, Antelo LF, Wu B, Xiong X, Liu X, Guan L, Li T, Liu S, Yang R, Lu Y, Dong L, McGettigan S, Somasundaram R, Radhakrishnan R, Mills G, Lu Y, Kim J, Chen YH, Dong H, Zhao Y, Karakousis GC, Mitchell TC, Schuchter LM, Herlyn M, Wherry EJ, Xu X, Guo W. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature.* 2018;560(7718):382-386.
  281. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, Squarcina P, Accornero P, Lozupone F, Lugini L, Stringaro A, Molinari A, Arancia G, Gentile M, Parmiani G, Fais S. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med.* 2002;195(10):1303-1316.
  282. Sharma P, Wagner K, Wolchok JD, Allison JP. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(11):805-812.
  283. Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med.* 2016;14:73.
  284. Ralli M, Botticelli A, Visconti IC, Angeletti D, Fiore M, Marchetti P, Lambiase A, de Vincentiis M, Greco A. Immunotherapy in the Treatment of Metastatic Melanoma: Current Knowledge and Future Directions. *J Immunol Res.* 2020;2020:9235638.
  285. Green J, Ariyan C. Update on immunotherapy in melanoma. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015;24(2):337-346.
  286. Feld E, Mitchell TC. Immunotherapy in melanoma. *Immunotherapy.* 2018;10(11):987-998.
  287. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol.* 1999;17(7):2105-2116.

288. Rothermel LD, Sarnaik AA, Khushalani NI, Sondak VK. Current Immunotherapy Practices in Melanoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2019;28(3):403-418.
289. Lugowska I, Teterycz P, Rutkowski P. Immunotherapy of melanoma. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2018;22(1A):61-67.
290. Leonardi GC, Candido S, Falzone L, Spandidos DA, Libra M. Cutaneous melanoma and the immunotherapy revolution (Review). *Int J Oncol*. 2020;57(3):609-618.
291. Bommareddy PK, Shettigar M, Kaufman HL. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(8):498-513.
292. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(11):651-668.
293. Franklin C, Livingstone E, Roesch A, Schilling B, Schadendorf D. Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions. *Eur J Surg Oncol*. 2017;43(3):604-611.
294. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704.
295. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;8(8):793-800.
296. Gambichler T, Schröter U, Höxtermann S, Susok L, Stockfleth E, Becker JC. Decline of programmed death-1-positive circulating T regulatory cells predicts more favourable clinical outcome of patients with melanoma under immune checkpoint blockade. *Br J Dermatol*. 2020;182(5):1214-1220.
297. Kohlhapp FJ, Kaufman HL. Molecular pathways: mechanism of action for talimogene laherparepvec, a new oncolytic virus immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2016;22(5):1048-1054.
298. Liu BL, Robinson M, Han ZQ, Branston RH, English C, Reay P, McGrath Y, Thomas SK, Thornton M, Bullock P, Love CA, Coffin RS. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther*. 2003;10(4):292-303.
299. Hersey P, Gallagher S. Intralesional immunotherapy for melanoma. *J Surg Oncol*. 2014;109(4):320-326.
300. Toda M, Martuza RL, Rabkin SD. Tumor growth inhibition by intratumoral inoculation of defective herpes simplex virus vectors expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Mol Ther*. 2000;2(4):324-329.
301. Hercus TR, Thomas D, Guthridge MA, Ekert PG, King-Scott J, Parker MW, Lopez AF. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease. *Blood*. 2009;114(7):1289-1298.
302. Eddy K, Shah R, Chen S. Decoding Melanoma Development and Progression: Identification of Therapeutic Vulnerabilities. *Front Oncol*. 2021;10:626129.
303. Colombino M, Capone M, Lissia A, Cossu A, Rubino C, De Giorgi V, Massi D, Fonsatti E, Staibano S, Nappi O, Pagani E, Casula M, Manca A, Sini M, Franco R, Botti G, Caracò C, Mozzillo N, Ascierto PA, Palmieri G. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol*. 2012;30(20):2522-2529.
304. Long GV, Dummer R, Hamid O, Gajewski TF, Caglevic C, Dalle S, Arance A, Carlino MS, Grob JJ, Kim TM, Demidov L, Robert C, Larkin J, Anderson JR, Maleski J, Jones M, Diede SJ, Mitchell TC. Epcadostat plus pembrolizumab versus placebo plus pembrolizumab in patients with unresectable or metastatic melanoma (ECHO-301/KEYNOTE-252): a phase 3, randomised, double-blind study. *Lancet Oncol*. 2019;20(8):1083-1097.



305. Khushalani N, Markowitz J, Eroglu Z, Giuroiu I, Ladanova V, Reiersen P, Rich J, Thapa R, Schell MJ, Sotomayor EM, Weber JF. A phase I trial of panobinostat with ipilimumab in advanced melanoma. *J Clin Oncol.* 2017;35(supplement 15):9547.
306. Ascierto PA, Melero I, Bhatia S, Bono P, Sanborn R, Lipson E, Callahan MK, Gajewski T, Gomez-Roca CA, Stephen Hodi F, Curigliano G, Nyakas M, Preusser M, Koguchi Y, Maurer M, Clynes R, Mitra P, Suryawanshi S, Munoz-Couselo E. Initial efficacy of anti-lymphocyte activation gene-3 (anti-LAG-3; BMS-986016) in combination with nivolumab (nivo) in pts with melanoma (MEL) previously treated with anti-PD-1/PD-L1 therapy. *J Clin Oncol.* 2017;35(supplement 15):9520.
307. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 2005;23(5):479-490.
308. C. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One.* 2008;3(10):e3331.
309. Lu B, Yang M, Wang Q. Interleukin-33 in tumorigenesis, tumor immune evasion, and cancer immunotherapy. *J Mol Med (Berl).* 2016;94(5):535-543.
310. Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL, Amalric F, Brandtzaeg P, Erard M, Haraldsen G, Girard JP. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol.* 2003;163(1):69-79.
311. Girard JP, Moussion C, Forster R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(11):762-773.
312. Onda H, Kasuya H, Takakura K, Hori T, Imaizumi T, Takeuchi T, Inoue I, Takeda J. Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19(11):1279-1288.
313. Liew FY, Girard JP, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(11):676-689.
314. Tsuda H, Komine M, Tominaga SI, Ohtsuki M. Identification of the promoter region of human IL-33 responsive to induction by IFN $\gamma$ . *J Dermatol Sci.* 2017;85(2):137-140.
315. Talabot-Ayer D, Calo N, Vigne S, Lamacchia C, Gabay C, Palmer G. The mouse interleukin (IL)33 gene is expressed in a cell type- and stimulus-dependent manner from two alternative promoters. *J Leukoc Biol.* 2012;91(1):119-125.
316. Grotenboer NS, Ketelaar ME, Koppelman GH, Nawijn MC. Decoding asthma: Translating genetic variation in IL33 and IL1RL1 into disease pathophysiology. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(3):856-865.
317. Cayrol C, Girard JP. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev.* 2018;281(1):154-168.
318. Smith D, Helgason H, Sulem P, Bjornsdottir US, Lim AC, Sveinbjornsson G, Hasegawa H, Brown M, Ketchum RR, Gavalala M, Garrett L, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Sigurdsson A, Magnusson OT, Eyjolfsson GI, Olafsson I, Onundarson PT, Sigurdardottir O, Gislason D, Gislason T, Ludviksson BR, Ludviksdottir D, Boezen HM, Heinzmann A, Krueger M, Porsbjerg C, Ahluwalia TS, Waage J, Backer V, Deichmann KA, Koppelman GH, Bønnelykke K, Bisgaard H, Masson G, Thorsteinsdottir U, Gudbjartsson DF, Johnston JA, Jonsdottir I, Stefansson K. A rare IL33 loss-of-function mutation reduces blood eosinophil counts and protects from asthma. *PLoS Genet.* 2017;13(3):e1006659.
319. Hong J, Bae S, Jhun H, Lee S, Choi J, Kang T, Kwak A, Hong K, Kim E, Jo S, Kim S. Identification of constitutively active interleukin 33 (IL-33) splice variant. *J Biol Chem.* 2011;286(22):20078-20086.

320. Gordon ED, Simpson LJ, Rios CL, Ringel L, Lachowicz-Scroggins ME, Peters MC, Wesolowska-Andersen A, Gonzalez JR, MacLeod HJ, Christian LS, Yuan S, Barry L, Woodruff PG, Ansel KM, Nocka K, Seibold MA, Fahy JV. Alternative splicing of interleukin-33 and type 2 inflammation in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(31):8765-8770.
321. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, Bouche G, Girard JP. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(1):282-287.
322. Liu X, Hammel M, He Y, Tainer JA, Jeng US, Zhang L, Wang S, Wang X. Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(37):14918-14923.
323. Larsen KM, Minaya MK, Vaish V, Peña MMO. The Role of IL-33/ST2 Pathway in Tumorigenesis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):2676.
324. Roussel L, Erard M, Cayrol C, Girard JP. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep*. 2008;9(10):1006-1012.
325. Zhang F, Tossberg JT, Spurlock CF, Yao SY, Aune TM, Sriram S. Expression of IL-33 and its epigenetic regulation in Multiple Sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014;1(5):307-318.
326. Ali S, Mohs A, Thomas M, Klare J, Ross R, Schmitz ML, Martin MU. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF- $\kappa$ B to dampen NF- $\kappa$ B-stimulated gene transcription. *J Immunol*. 2011;187(4):1609-1616.
327. Gautier V, Cayrol C, Farache D, Roga S, Monsarrat B, Burlet-Schiltz O, Gonzalez de Peredo A, Girard JP. Extracellular IL-33 cytokine, but not endogenous nuclear IL-33, regulates protein expression in endothelial cells. *Sci Rep*. 2016;6:34255.
328. Bessa J, Meyer CA, de Vera Mudry MC, Schlicht S, Smith SH, Iglesias A, Cote-Sierra J. Altered subcellular localization of IL-33 leads to non-resolving lethal inflammation. *J Autoimmun*. 2014;55:33-41.
329. Cayrol C, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(22):9021-9026.
330. Lüthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, Brumatti G, Taylor RC, Kersse K, Vandenabeele P, Lavelle EC, Martin SJ. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity*. 2009;31(1):84-98.
331. Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Gabay C, Palmer G. Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem*. 2009;284(29):19420-19426.
332. Ali S, Nguyen DQ, Falk W, Martin MU. Caspase 3 inactivates biologically active full length interleukin-33 as a classical cytokine but does not prohibit nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391(3):1512-1516.
333. Lefrançois E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Girard JP, Cayrol C. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(5):1673-1678.
334. Lefrançois E, Duval A, Mirey E, Roga S, Espinosa E, Cayrol C, Girard JP. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(43):15502-15507.
335. Lefrançois E, Cayrol C. Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members. *Eur Cytokine Netw*. 2012;23(4):120-127.
336. Waern I, Lundquist A, Pejler G, Wernersson S. Mast cell chymase modulates IL-33 levels and controls allergic sensitization in dust-mite induced airway inflammation. *Mucosal Immunol*. 2013;6(5):911-920.

337. Bae S, Kang T, Hong J, Lee S, Choi J, Jhun H, Kwak A, Hong K, Kim E, Jo S, Kim S. Contradictory functions (activation/termination) of neutrophil proteinase 3 enzyme (PR3) in interleukin-33 biological activity. *J Biol Chem.* 2012;287(11):8205-8213.
338. Cohen ES, Scott IC, Majithiya JB, Rapley L, Kemp BP, England E, Rees DG, Overed-Sayer CL, Woods J, Bond NJ, Veyssier CS, Embrey KJ, Sims DA, Snaith MR, Vousden KA, Strain MD, Chan DT, Carmen S, Huntington CE, Flavell L, Xu J, Popovic B, Brightling CE, Vaughan TJ, Butler R, Lowe DC, Higazi DR, Corkill DJ, May RD, Sleeman MA, Mustelin T. Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. *Nat Commun.* 2015;6:8327.
339. Molofsky AB, Savage AK, Locksley RM. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury, and inflammation. *Immunity.* 2015;42(6):1005-1019.
340. Tominaga S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS Lett.* 1989;258(2):301-304.
341. Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, Tetsuka T, Tominaga S. Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1. *FEBS Lett.* 1993;318(1):83-87.
342. Hardman C, Ogg G. Interleukin-33, friend and foe in type-2 immune responses. *Curr Opin Immunol.* 2016;42:16-24.
343. Bergers G, Reikerstorfer A, Braselmann S, Graninger P, Busslinger M. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *EMBO J.* 1994;13(5):1176-1188.
344. Tominaga Si, Kuroiwa K, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, Komatsu N. Presence and expression of a novel variant form of ST2 gene product in human leukemic cell line UT-7/GM. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;264(1):14-18.
345. Tago K, Noda T, Hayakawa M, Iwahana H, Yanagisawa K, Yashiro T, Tominaga S. Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;285(5):1377-1383.
346. Iwahana H, Hayakawa M, Kuroiwa K, Tago K, Yanagisawa K, Noji S, Tominaga S. Molecular cloning of the chicken ST2 gene and a novel variant form of the ST2 gene product, ST2LV. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1681(1):1-14.
347. Oshikawa K, Yanagisawa K, Tominaga S, Sugiyama Y. Expression and function of the ST2 gene in a murine model of allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy.* 2002;32(10):1520-1526.
348. Iwahana H, Yanagisawa K, Ito-Kosaka A, Kuroiwa K, Tago K, Komatsu N, Katashima R, Itakura M, Tominaga S. Different promoter usage and multiple transcription initiation sites of the interleukin-1 receptor-related human ST2 gene in UT-7 and TM12 cells. *Eur J Biochem.* 1999;264(2):397-406.
349. Baba Y, Maeda K, Yashiro T, Inage E, Kasakura K, Suzuki R, Niyonsaba F, Hara M, Tanabe A, Ogawa H, Okumura K, Ohtsuka Y, Shimizu T, Nishiyama C. GATA2 is a critical transactivator for the human IL1RL1/ST2 promoter in mast cells/basophils: opposing roles for GATA2 and GATA1 in human IL1RL1/ST2 gene expression. *J Biol Chem.* 2012;287(39):32689-32696.
350. Funakoshi-Tago M, Tago K, Hayakawa M, Tominaga S, Ohshio T, Sonoda Y, Kasahara T. TRAF6 is a critical signal transducer in IL-33 signaling pathway. *Cell Signal.* 2008;20(9):1679-86.
351. Bulek K, Swaidani S, Qin J, Lu Y, Gulen MF, Herjan T, Min B, Kastelein RA, Aronica M, Kosz-Vnenchak M, Li X. The essential role of single Ig IL-1 receptor-related

- molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response. *J Immunol.* 2009;182(5):2601-2609.
352. Zhao J, Wei J, Mialki RK, Mallampalli DF, Chen BB, Coon T, Zou C, Mallampalli RK, Zhao Y. F-box protein FBXL19-mediated ubiquitination and degradation of the receptor for IL-33 limits pulmonary inflammation. *Nat Immunol.* 2012;13(7):651-658.
  353. Pichery M, Mirey E, Mercier P, Lefrancais E, Dujardin A, Ortega N, Girard JP. Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel Il-33-LacZ gene trap reporter strain. *J Immunol.* 2012;188(7):3488-3495.
  354. K uchler AM, Pollheimer J, Balogh J, Sponheim J, Manley L, Sorensen DR, De Angelis PM, Scott H, Haraldsen G. Nuclear interleukin-33 is generally expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation. *Am J Pathol.* 2008;173(4):1229-1242.
  355. Cayrol C, Girard JP. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr Opin Immunol.* 2014;31:31-37.
  356. Lott JM, Sumpter TL, Turnquist HR. New dog and new tricks: evolving roles for IL-33 in type 2 immunity. *J Leukoc Biol.* 2015;97(6):1037-1048.
  357. Reichenbach DK, Schwarze V, Matta BM, et al. The IL-33/ST2 axis augments effector T-cell responses during acute GVHD [published correction appears in *Blood.* 2016;128(9):1311]. *Blood.* 2015;125(20):3183-3192.
  358. Bonilla WV, Fr ohlich A, Senn K, Kallert S, Fernandez M, Johnson S, Kreutzfeldt M, Hegazy AN, Schrick C, Fallon PG, Klemenz R, Nakae S, Adler H, Merkler D, L hning M, Pinschewer DD. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8<sup>+</sup> T cell responses. *Science.* 2012;335(6071):984-989.
  359. Yang Q, Li G, Zhu Y, Liu L, Chen E, Turnquist H, Zhang X, Finn OJ, Chen X, Lu B. IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol.* 2011;41(11):3351-3360.
  360. Baumann C, Bonilla WV, Fr ohlich A, Helmstetter C, Peine M, Hegazy AN, Pinschewer DD, L hning M. T-bet- and STAT4-dependent IL-33 receptor expression directly promotes antiviral Th1 cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(13):4056-4061.
  361. Shen JX, Liu J, Zhang GJ. Interleukin-33 in Malignancies: Friends or Foes? *Front Immunol.* 2018;9:3051.
  362. Andreone S, Gambardella AR, Mancini J, Loffredo S, Marcella S, La Sorsa V, Varricchi G, Schiavoni G, Mattei F. Anti-Tumorigenic Activities of IL-33: A Mechanistic Insight. *Front Immunol.* 2020;11:571593.
  363. Alonso-Curbelo D, Ho YJ, Burdziak C, Maag JLV, Morris JP 4th, Chandwani R, Chen HA, Tsanov KM, Barriga FM, Luan W, Tasdemir N, Livshits G, Azizi E, Chun J, Wilkinson JE, Mazutis L, Leach SD, Koche R, Pe'er D, Lowe SW. A gene-environment-induced epigenetic program initiates tumorigenesis. *Nature.* 2021;590(7847):642-648.
  364. Huang N, Cui X, Li W, Zhang C, Liu L, Li J. IL-33/ST2 promotes the malignant progression of gastric cancer via the MAPK pathway. *Mol Med Rep.* 2021;23(5):361.
  365. Yang Y, Wang JB, Li YM, Zhao YU, Wang R, Wu Q, Zheng RS, Ou YR. Role of IL-33 expression in oncogenesis and development of human hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* 2016;12(1):429-436.
  366. Yamada D, Rizvi S, Razumilava N, Bronk SF, Davila JJ, Champion MD, Borad MJ, Bezerra JA, Chen X, Gores GJ. IL-33 facilitates oncogene-induced cholangiocarcinoma in mice by an interleukin-6-sensitive mechanism. *Hepatology.* 2015;61(5):1627-1642.
  367. Liu J, Liu L, Su Y, Wang Y, Zhu Y, Sun X, Guo Y, Shan J. IL-33 Participates in the Development of Esophageal Adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2022;28:1610474.

368. Maywald RL, Doerner SK, Pastorelli L, De Salvo C, Benton SM, Dawson EP, Lanza DG, Berger NA, Markowitz SD, Lenz HJ, Nadeau JH, Pizarro TT, Heaney JD. IL-33 activates tumor stroma to promote intestinal polyposis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(19):E2487-E2496.
369. Taniguchi S, Elhance A, Van Duzer A, Kumar S, Leitenberger JJ, Oshimori N. Tumor-initiating cells establish an IL-33-TGF- $\beta$  niche signaling loop to promote cancer progression. *Science*. 2020;369(6501):eaay1813.
370. Wang S, Zhao G, Zhao S, Qiao Y, Yang H. The Effects of Interleukin-33 (IL-33) on Osteosarcoma Cell Viability, Apoptosis, and Epithelial-Mesenchymal Transition are Mediated Through the PI3K/AKT Pathway. *Med Sci Monit*. 2020;26:e920766.
371. Wang Y, Luo H, Wei M, Becker M, Hyde RK, Gong Q. IL-33/IL1RL1 axis regulates cell survival through the p38 MAPK pathway in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2020;96:106409.
372. Tare N, Li H, Morschauser A, Cote-Sierra J, Ju G, Renzetti L, Lin TA. KU812 cells provide a novel in vitro model of the human IL-33/ST2L axis: functional responses and identification of signaling pathways. *Exp Cell Res*. 2010;316(15):2527-2537.
373. Sun P, Ben Q, Tu S, Dong W, Qi X, Wu Y. Serum interleukin-33 levels in patients with gastric cancer. *Dig Dis Sci*. 2011;56(12):3596-3601.
374. Bergis D, Kassis V, Ranglack A, Koeberle V, Piiper A, Kronenberger B, Zeuzem S, Waidmann O, Radeke HH. High Serum Levels of the Interleukin-33 Receptor Soluble ST2 as a Negative Prognostic Factor in Hepatocellular Carcinoma. *Transl Oncol*. 2013;6(3):311-318.
375. Ishikawa K, Yagi-Nakanishi S, Nakanishi Y, Kondo S, Tsuji A, Endo K, Wakisaka N, Murono S, Yoshizaki T. Expression of interleukin-33 is correlated with poor prognosis of patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Auris Nasus Larynx*. 2014;41(6):552-557.
376. Liu J, Shen JX, Hu JL, Huang WH, Zhang GJ. Significance of interleukin-33 and its related cytokines in patients with breast cancers. *Front Immunol*. 2014;5:141.
377. Kim JY, Lim SC, Kim G, Yun HJ, Ahn SG, Choi HS. Interleukin-33/ST2 axis promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via upregulation of COT activity. *Oncogene*. 2015;34(38):4928-4938.
378. Gillibert-Duplantier J, Duthey B, Sisirak V, Salaün D, Gargi T, Trédan O, Finetti P, Bertucci F, Birnbaum D, Bendriss-Vermare N, Badache A. Gene expression profiling identifies sST2 as an effector of ErbB2-driven breast carcinoma cell motility, associated with metastasis. *Oncogene*. 2012;31(30):3516-3524.
379. Yang ZP, Ling DY, Xie YH, Wu WX, Li JR, Jiang J, Zheng JL, Fan YH, Zhang Y. The Association of Serum IL-33 and sST2 with Breast Cancer. *Dis Markers*. 2015;2015:516895.
380. Milosavljevic MZ, Jovanovic IP, Pejnovic NN, Mitrovic SL, Arsenijevic NN, Simovic Markovic BJ, Lukic ML. Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(14):18106-18115.
381. Cui G, Qi H, Gundersen MD, Yang H, Christiansen I, Sørbye SW, Goll R, Florholmen J. Dynamics of the IL-33/ST2 network in the progression of human colorectal adenoma to sporadic colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2015;64(2):181-190.
382. Liu X, Zhu L, Lu X, Bian H, Wu X, Yang W, Qin Q. IL-33/ST2 pathway contributes to metastasis of human colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;453(3):486-492.
383. Mertz KD, Mager LF, Wasmer MH, Thiesler T, Koelzer VH, Ruzzante G, Joller S, Murdoch JR, Brümmendorf T, Genitsch V, Lugli A, Cathomas G, Moch H, Weber A,

- Zlobec I, Junt T, Krebs P. The IL-33/ST2 pathway contributes to intestinal tumorigenesis in humans and mice. *Oncoimmunology*. 2015;5(1):e1062966.
384. Wang C, Chen Z, Bu X, Han Y, Shan S, Ren T, Song W. IL-33 signaling fuels outgrowth and metastasis of human lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;479(3):461-468.
385. Wang K, Shan S, Yang Z, Gu X, Wang Y, Wang C, Ren T. IL-33 blockade suppresses tumor growth of human lung cancer through direct and indirect pathways in a preclinical model. *Oncotarget*. 2017;8(40):68571-68582.
386. Chen SF, Nieh S, Jao SW, Wu MZ, Liu CL, Chang YC, Lin YS. The paracrine effect of cancer-associated fibroblast-induced interleukin-33 regulates the invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol*. 2013;231(2):180-189.
387. Ding L, Ren J, Zhang D, Li Y, Huang X, Hu Q, Wang H, Song Y, Ni Y, Hou Y. A novel stromal lncRNA signature reprograms fibroblasts to promote the growth of oral squamous cell carcinoma via lncRNA-CAF/interleukin-33. *Carcinogenesis*. 2018;39(3):397-406.
388. Tong X, Barbour M, Hou K, Gao C, Cao S, Zheng J, Zhao Y, Mu R, Jiang HR. Interleukin-33 predicts poor prognosis and promotes ovarian cancer cell growth and metastasis through regulating ERK and JNK signaling pathways. *Mol Oncol*. 2016;10(1):113-125.
389. Gramatzki D, Frei K, Cathomas G, Moch H, Weller M, Mertz KD. Interleukin-33 in human gliomas: Expression and prognostic significance. *Oncol Lett*. 2016;12(1):445-452.
390. Fang KM, Yang CS, Lin TC, Chan TC, Tzeng SF. Induced interleukin-33 expression enhances the tumorigenic activity of rat glioma cells. *Neuro Oncol*. 2014;16(4):552-566.
391. Mager LF, Riether C, Schürch CM, Banz Y, Wasmer MH, Stuber R, Theodorides AP, Li X, Xia Y, Saito H, Nakae S, Baerlocher GM, Manz MG, McCoy KD, Macpherson AJ, Ochsenbein AF, Beutler B, Krebs P. IL-33 signaling contributes to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *J Clin Invest*. 2015;125(7):2579-2591.
392. Levescot A, Flamant S, Basbous S, Jacomet F, Féraud O, Anne Bourgeois E, Bonnet ML, Giraud C, Roy L, Barra A, Chomel JC, Turhan A, Guilhot F, Girard JP, Gombert JM, Herbelin A. BCR-ABL-induced deregulation of the IL-33/ST2 pathway in CD34+ progenitors from chronic myeloid leukemia patients. *Cancer Res*. 2014;74(10):2669-2676.
393. Yang F, Wen M, Pan D, Lin X, Mo J, Dong X, Liao S, Ma Y. IL-33/ST2 Axis Regulates Vasculogenic Mimicry via ERK1/2-MMP-2/9 Pathway in Melanoma. *Dermatology*. 2019;235(3):225-233.
394. Xing J, Li Y, Chen Y, Han Y. A novel inflammatory response-related signature predicts the prognosis of cutaneous melanoma and the effect of antitumor drugs. *World J Surg Oncol*. 2022;20(1):263.
395. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19(11):1423-1437.
396. Milovanovic M, Volarevic V, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pejnovic N, Arsenijevic N, Lukic ML. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol Res*. 2012;52(1-2):89-99.
397. Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Juranic VL, McKenzie AN, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur J Immunol*. 2011;41(7):1902-1912.
398. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Pantic JM, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, Lukic ML. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int J Cancer*. 2014;134(7):1669-1682.

399. Schmieder A, Multhoff G, Radons J. Interleukin-33 acts as a pro-inflammatory cytokine and modulates its receptor gene expression in highly metastatic human pancreatic carcinoma cells. *Cytokine*. 2012;60(2):514-521.
400. Li J, Razumilava N, Gores GJ, Walters S, Mizuochi T, Mourya R, Bessho K, Wang YH, Glaser SS, Shivakumar P, Bezerra JA. Biliary repair and carcinogenesis are mediated by IL-33-dependent cholangiocyte proliferation. *J Clin Invest*. 2014;124(7):3241-3251.
401. Zhang Y, Davis C, Shah S, Hughes D, Ryan JC, Altomare D, Peña MM. IL-33 promotes growth and liver metastasis of colorectal cancer in mice by remodeling the tumor microenvironment and inducing angiogenesis. *Mol Carcinog*. 2017;56(1):272-287.
402. He Z, Chen L, Souto FO, Canasto-Chibuque C, Bongers G, Deshpande M, Harpaz N, Ko HM, Kelley K, Furtado GC, Lira SA. Epithelial-derived IL-33 promotes intestinal tumorigenesis in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice. *Sci Rep*. 2017;7(1):5520.
403. Petersen CP, Meyer AR, De Salvo C, Choi E, Schlegel C, Petersen A, Engevik AC, Prasad N, Levy SE, Peebles RS, Pizarro TT, Goldenring JR. A signalling cascade of IL-33 to IL-13 regulates metaplasia in the mouse stomach. *Gut*. 2018;67(5):805-817.
404. Meyer AR, Goldenring JR. Injury, repair, inflammation and metaplasia in the stomach. *J Physiol*. 2018;596(17):3861-3867.
405. Mishra R, Polic B, Welsh RM, Szomolanyi-Tsuda E. Inflammatory cytokine-mediated evasion of virus-induced tumors from NK cell control. *J Immunol*. 2013;191(2):961-970.
406. Byrne SN, Beaugie C, O'Sullivan C, Leighton S, Halliday GM. The immune-modulating cytokine and endogenous Alarmin interleukin-33 is upregulated in skin exposed to inflammatory UVB radiation. *Am J Pathol*. 2011;179(1):211-222.
407. Yue Y, Lian J, Wang T, Luo C, Yuan Y, Qin G, Zhang B, Zhang Y. Interleukin-33-nuclear factor- $\kappa$ B-CCL2 signaling pathway promotes progression of esophageal squamous cell carcinoma by directing regulatory T cells. *Cancer Sci*. 2020;111(3):795-806.
408. Hatzioannou A, Banos A, Sakelaropoulos T, Fedonidis C, Vidali MS, Köhne M, Händler K, Boon L, Henriques A, Koliaraki V, Georgiadis P, Zoidakis J, Termentzi A, Beyer M, Chavakis T, Boumpas D, Tsirigos A, Verginis P. An intrinsic role of IL-33 in T<sub>reg</sub> cell-mediated tumor immunoevasion. *Nat Immunol*. 2020;21(1):75-85.
409. Long A, Dominguez D, Qin L, Chen S, Fan J, Zhang M, Fang D, Zhang Y, Kuzel TM, Zhang B. Type 2 Innate Lymphoid Cells Impede IL-33-Mediated Tumor Suppression. *J Immunol*. 2018;201(11):3456-3464.
410. Brunner SM, Rubner C, Kesselring R, Martin M, Griesshammer E, Ruemmele P, Stempf T, Teufel A, Schlitt HJ, Fichtner-Feigl S. Tumor-infiltrating, interleukin-33-producing effector-memory CD8(+) T cells in resected hepatocellular carcinoma prolong patient survival. *Hepatology*. 2015;61(6):1957-1967.
411. Yang M, Feng Y, Yue C, Xu B, Chen L, Jiang J, Lu B, Zhu Y. Lower expression level of IL-33 is associated with poor prognosis of pulmonary adenocarcinoma. *PLoS One*. 2018;13(3):e0193428.
412. O'Donnell C, Mahmoud A, Keane J, Murphy C, White D, Carey S, O'Riordain M, Bennett MW, Brint E, Houston A. An antitumorigenic role for the IL-33 receptor, ST2L, in colon cancer. *Br J Cancer*. 2016;114(1):37-43.
413. Xia Y, Ohno T, Nishii N, Bhingare A, Tachinami H, Kashima Y, Nagai S, Saito H, Nakae S, Azuma M. Endogenous IL-33 exerts CD8<sup>+</sup> T cell antitumor responses overcoming pro-tumor effects by regulatory T cells in a colon carcinoma model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;518(2):331-336.
414. Saranchova I, Han J, Huang H, Fenninger F, Choi KB, Munro L, Pfeifer C, Welch I, Wyatt AW, Fazli L, Gleave ME, Jefferies WA. Discovery of a Metastatic Immune Escape

- Mechanism Initiated by the Loss of Expression of the Tumour Biomarker Interleukin-33. *Sci Rep.* 2016;6:30555.
415. Kretschmer C, Sterner-Kock A, Siedentopf F, Schoenegg W, Schlag PM, Kemmner W. Identification of early molecular markers for breast cancer. *Mol Cancer.* 2011;10(1):15.
  416. Noordhuis MG, Fehrmann RS, Wisman GB, Nijhuis ER, van Zanden JJ, Moerland PD, Ver Loren van Themaat E, Volders HH, Kok M, ten Hoor KA, Hollema H, de Vries EG, de Bock GH, van der Zee AG, Schuurung E. Involvement of the TGF-beta and beta-catenin pathways in pelvic lymph node metastasis in early-stage cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(6):1317-30.
  417. Wang L, Li H, Liang F, Hong Y, Jiang S, Xiao L. Examining IL-33 expression in the cervix of HPV-infected patients: a preliminary study comparing IL-33 levels in different stages of disease and analyzing its potential association with IFN- $\gamma$ . *Med Oncol.* 2014;31(9):143.
  418. Villarreal DO, Wise MC, Walters JN, Reuschel EL, Choi MJ, Obeng-Adjei N, Yan J, Morrow MP, Weiner DB. Alarmin IL-33 acts as an immunoadjuvant to enhance antigen-specific tumor immunity. *Cancer Res.* 2014;74(6):1789-1800.
  419. Qi L, Zhang Q, Miao Y, Kang W, Tian Z, Xu D, Xiao W, Fang F. Interleukin-33 activates and recruits natural killer cells to inhibit pulmonary metastatic cancer development. *Int J Cancer.* 2020;146(5):1421-1434.
  420. Duault C, Betous D, Bezombes C, Roga S, Cayrol C, Girard JP, Fournié JJ, Poupot M. IL-33-expanded human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells have anti-lymphoma effect in a mouse tumor model. *Eur J Immunol.* 2017;47(12):2137-2141.
  421. Duault C, Franchini DM, Familliades J, Cayrol C, Roga S, Girard JP, Fournié JJ, Poupot M. TCRV $\gamma$ 9  $\gamma\delta$  T Cell Response to IL-33: A CD4 T Cell-Dependent Mechanism. *J Immunol.* 2016;196(1):493-502.
  422. Kim J, Kim W, Moon UJ, Kim HJ, Choi HJ, Sin JI, Park NH, Cho HR, Kwon B. Intratumorally Establishing Type 2 Innate Lymphoid Cells Blocks Tumor Growth. *J Immunol.* 2016;196(5):2410-2423.
  423. He H, Shi L, Meng D, Zhou H, Ma J, Wu Y, Wu Y, Gu Y, Xie W, Zhang J, Zhu Y. PD-1 blockade combined with IL-33 enhances the antitumor immune response in a type-1 lymphocyte-mediated manner. *Cancer Treat Res Commun.* 2021;28:100379.
  424. Lim HX, Choi S, Cho D, Kim TS. IL-33 inhibits the differentiation and immunosuppressive activity of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Immunol Cell Biol.* 2017;95(1):99-107.
  425. Andreone S, Spadaro F, Buccione C, Mancini J, Tinari A, Sestili P, Gambardella AR, Lucarini V, Ziccheddu G, Parolini I, Zanetti C, D'Urso MT, De Ninno A, Businaro L, Afferni C, Mattei F, Schiavoni G. IL-33 Promotes CD11b/CD18-Mediated Adhesion of Eosinophils to Cancer Cells and Synapse-Polarized Degranulation Leading to Tumor Cell Killing. *Cancers (Basel).* 2019;11(11):1664.
  426. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002;296(5566):301-305.
  427. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989;24(3):148-154.
  428. Heidenhain M. Noch einmal uber die darstellung der centralkorper durch eishnamatoxylin nebst einigen allgemeinen bemerkungen uber die hamatoxylinfarben. *Z Wiss Mikrosk.* 1896;13:186.
  429. Gurr AB. Biological staining methods. Hopkin and Williams Chadowell Heath, 1976.
  430. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671-675.



431. Pala P, Hussell T, Openshaw PJ. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods*. 2000;243(1-2):107-24.
432. Fregni G, Perier A, Pittari G, Jacobelli S, Sastre X, Gervois N, Allard M, Bercovici N, Avril MF, Caignard A. Unique functional status of natural killer cells in metastatic stage IV melanoma patients and its modulation by chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2011;17(9):2628-2637.
433. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley JD, Gaspar LE, Schilsky RL, Balch CM. *AJCC Cancer Staging Manual* (8th edition). Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer, Switzerland, 2017.
434. Petersen RP, Hanish SI, Haney JC, Miller CC 3rd, Burfeind WR Jr, Tyler DS, Seigler HF, Wolfe W, D'Amico TA, Harpole DH Jr. Improved survival with pulmonary metastasectomy: an analysis of 1720 patients with pulmonary metastatic melanoma. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;133(1):104-110.
435. Dao DT, Vuong JT, Anez-Bustillos L, Pan A, Mitchell PD, Fell GL, Baker MA, Bielenberg DR, Puder M. Intranasal delivery of VEGF enhances compensatory lung growth in mice. *PLoS One*. 2018;13(6):e0198700.
436. Dissemmond J, Weimann TK, Schneider LA, Schneeberger A, Scharffetter-Kochanek K, Goos M, Wagner SN. Activated neutrophils exert antitumor activity against human melanoma cells: reactive oxygen species-induced mechanisms and their modulation by granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor. *J Invest Dermatol*. 2003;121(4):936-938.
437. Leone P, Shin E-C, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(16):1172-1187.
438. Setrerrahmane S, Xu H. Tumor-related interleukins: old validated targets for new anti-cancer drug development. *Mol Cancer*. 2017;16(1):153.
439. Chulpanova DS, Kitaeva KV, Green AR, Rizvanov AA, Solovyeva VV. Molecular Aspects and Future Perspectives of Cytokine-Based Anti-cancer Immunotherapy. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:402.
440. Gao X, Wang X, Yang Q, Zhao X, Wen W, Li G, Lu J, Qin W, Qi Y, Xie F, Jiang J, Wu C, Zhang X, Chen X, Turnquist H, Zhu Y, Lu B. Tumoral expression of IL-33 inhibits tumor growth and modifies the tumor microenvironment through CD8<sup>+</sup> T and NK cells. *J Immunol*. 2015;194(1):438-445.
441. Gao K, Li X, Zhang L, Bai L, Dong W, Gao K, Shi G, Xia X, Wu L, Zhang L. Transgenic expression of IL-33 activates CD8(+) T cells and NK cells and inhibits tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Lett*. 2013;335(2):463-471.
442. Rostan O, Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Robert-Gangneux F, Gangneux JP, Samson M. Crucial and diverse role of the interleukin-33/ST2 axis in infectious diseases. *Infect Immun*. 2015;83(5):1738-1748.
443. Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, Pitman N, Kurowska-Stolarska M, McKenzie AN, McInnes IB, Liew FY. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(31):10913-10918.
444. Beltran CJ, Nunez LE, Diaz-Jimenez D, Farfan N, Candia E, Heine C, Lopez F, Gonzalez MJ, Quera R, Hermoso MA. Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(7):1097-1107.
445. Miller AM, Asquith DL, Hueber AJ, Anderson LA, Holmes WM, McKenzie AN, Xu D, Sattar N, McInnes IB, Liew FY. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. *Circ Res*. 2010;107(5):650-658.

446. Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, Baker AH, McInnes IB, Liew FY. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med*. 2008;205(2):339-346.
447. Zhou Q, Wu X, Wang X, Yu Z, Pan T, Li Z, Chang X, Jin Z, Li J, Zhu Z, Liu B, Su L. The reciprocal interaction between tumor cells and activated fibroblasts mediated by TNF- $\alpha$ /IL-33/ST2L signaling promotes gastric cancer metastasis. *Oncogene*. 2020;39(7):1414-1428.
448. Schuijs MJ, Png S, Richard AC, Tsyben A, Hamm G, Stockis J, Garcia C, Pinaud S, Nicholls A, Ros XR, Su J, Eldridge MD, Riedel A, Serrao EM, Rodewald HR, Mack M, Shields JD, Cohen ES, McKenzie ANJ, Goodwin RJA, Brindle KM, Marioni JC, Halim TYF. ILC2-driven innate immune checkpoint mechanism antagonizes NK cell antimetastatic function in the lung. *Nat Immunol*. 2020;21(9):998-1009.
449. Lin L, Li Y, Liu M, Li Q, Liu Q, Li R. The Interleukin-33/ST2 axis promotes glioma mesenchymal transition, stemness and TMZ resistance via JNK activation. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(2):1685-1703.
450. Kienzl M, Hasenoehrl C, Valadez-Cosmes P, Maitz K, Sarsembayeva A, Sturm E, Heinemann A, Kargl J, Schicho R. IL-33 reduces tumor growth in models of colorectal cancer with the help of eosinophils. *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1776059.
451. Jiang W, Lian J, Yue Y, Zhang Y. IL-33/ST2 as a potential target for tumor immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2021;51(8):1943-1955.
452. Dominguez D, Ye C, Geng Z, Chen S, Fan J, Qin L, Long A, Wang L, Zhang Z, Zhang Y, Fang D, Kuzel TM, Zhang B. Exogenous IL-33 restores dendritic cell activation and maturation in established cancer. *J Immunol*. 2017;198(3):1365-1375.
453. Martin NT, Martin MU. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol*. 2016;17(2):122-131.
454. Chen X, Lu K, Timko NJ, Weir DM, Zhu Z, Qin C, Mann JD, Bai Q, Xiao H, Nicholl MB, Wakefield MR, Fang Y. IL-33 notably inhibits the growth of colon cancer cells. *Oncol Lett*. 2018;16(1):769-774.
455. Barth A, Wanek LA, Morton DL. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg*. 1995;181(3):193-201.
456. Yu XX, Hu Z, Shen X, Dong LY, Zhou WZ, Hu WH. IL-33 Promotes Gastric Cancer Cell Invasion and Migration Via ST2-ERK1/2 Pathway. *Dig Dis Sci*. 2015;60(5):1265-1272.
457. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
458. Andersson P, Yang Y, Hosaka K, Zhang Y, Fischer C, Braun H, Liu S, Yu G, Liu S, Beyaert R, Chang M, Li Q, Cao Y. Molecular mechanisms of IL-33-mediated stromal interactions in cancer metastasis. *JCI Insight*. 2018;3(20):e122375.
459. Candido J, Hagemann T. Cancer-related inflammation. *J Clin Immunol*. 2013;33(Suppl 1):S79-S84.
460. Zhang X, Chen W, Zeng P, Xu J, Diao H. The Contradictory Role of Interleukin-33 in Immune Cells and Tumor Immunity. *Cancer Manag Res*. 2020;12:7527-7537.
461. Fang M, Li Y, Huang K, Qi S, Zhang J, Zgodzinski W, Majewski M, Wallner G, Gozdz S, Macek P, Kowalik A, Pasiarski M, Grywalska E, Vatan L, Nagarsheth N, Li W, Zhao L, Kryczek I, Wang G, Wang Z, Zou W, Wang L. IL33 Promotes Colon Cancer Cell Stemness via JNK Activation and Macrophage Recruitment. *Cancer Res*. 2017;77(10):2735-2745.
462. Yang Z, Gao X, Wang J, Xu L, Zheng Y, Xu Y. Interleukin-33 enhanced the migration and invasiveness of human lung cancer cells. *Onco Targets Ther*. 2018;11:843-849.
463. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21(3):309-322.

464. Wasmer MH, Krebs P. The Role of IL-33-Dependent Inflammation in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2017;7:682.
465. Zhou Y, Ji Y, Wang H, Zhang H, Zhou H. IL-33 Promotes the Development of Colorectal Cancer Through Inducing Tumor-Infiltrating ST2L<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Mice. *Technol Cancer Res Treat.* 2018;17:1533033818780091.
466. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol.* 2008;20(8):1019-1030.
467. Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, Gombert JM, Schneider E, Dy M, Gourdy P, Girard JP, Herbelin A. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur J Immunol.* 2009;39(4):1046-1055.
468. Peng L, Sun W, Wei F, Chen L, Wen W. Interleukin-33 modulates immune responses in cutaneous melanoma in a context-specific way. *Aging (Albany NY).* 2021;13(5):6740-6751.
469. Fournié JJ, Poupot M. The Pro-tumorigenic IL-33 Involved in Antitumor Immunity: A Yin and Yang Cytokine. *Front Immunol.* 2018;9:2506.
470. Furumaya C, Martinez-Sanz P, Bouti P, Kuijpers TW, Matlung HL. Plasticity in Pro- and Anti-tumor Activity of Neutrophils: Shifting the Balance. *Front Immunol* 2020;11:2100.
471. Kalafati L, Mitroulis I, Verginis P, Chavakis T, Kourtzelis I. Neutrophils as Orchestrators in Tumor Development and Metastasis Formation. *Front Oncol.* 2020;10:581457.
472. Treffers LW, Hiemstra IH, Kuijpers TW, van den Berg TK, Matlung HL. Neutrophils in cancer. *Immunol Rev.* 2016;273(1):312-328.
473. Fridlender ZG, Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis.* 2012;33(5):949-955.
474. Delyon J, Mateus C, Lefeuvre D, Lanoy E, Zitvogel L, Chaput N, Roy S, Eggermont AM, Routier E, Robert C. Experience in daily practice with ipilimumab for the treatment of patients with metastatic melanoma: An early increase in lymphocyte and eosinophil counts is associated with improved survival. *Ann Oncol.* 2013;24(6):1697-1703.
475. Gebhardt C, Sevko A, Jiang H, Lichtenberger R, Reith M, Tarnanidis K, Holland-Letz T, Umansky L, Beckhove P, Sucker A, Schadendorf D, Utikal J, Umansky V. Myeloid Cells and Related Chronic Inflammatory Factors as Novel Predictive Markers in Melanoma Treatment with Ipilimumab. *Clin Cancer Res.* 2015;21(24):5453-5459.
476. Ramirez-Moral I, Blok DC, Bernink JH, Garcia-Laorden MI, Florquin S, Boon L, van't Veer C, Mack M, Saluzzo S, Knapp S, Spits H, de Vos AF, van der Poll T. Interleukin-33 improves local immunity during Gram-negative pneumonia by a combined effect on neutrophils and inflammatory monocytes. *J Pathol.* 2021;253(4):374-383.
477. Oboki K, Nakae S, Matsumoto K, Saito H. IL-33 and Airway Inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011;3(2):81-88.
478. Zhiguang X, Wei C, Steven R, Wei D, Wei Z, Rong M, Zhanguo L, Lianfeng Z. Over-expression of IL-33 leads to spontaneous pulmonary inflammation in mIL-33 transgenic mice. *Immunol Lett.* 2010;131(2):159-165.
479. Cherry WB, Yoon J, Bartemes KR, Iijima K, Kita H. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(6):1484-1490.
480. Price AE, Liang HE, Sullivan BM, Reinhardt RL, Eislely CJ, Erle DJ, Locksley RM. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in Type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(25):11489-11494.

481. Lotfi R, Lee JJ, Lotze MT. Eosinophilic granulocytes and damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs): Role in the inflammatory response within tumors. *J Immunother.* 2007;30(1):16-28.
482. Freeman A, Bridge JA, Maruthayanar P, Overgaard NH, Jung JW, Simpson F, Prow TW, Soyer HP, Frazer IH, Freeman M, Wells JW. Comparative immune phenotypic analysis of cutaneous Squamous Cell Carcinoma and Intraepidermal Carcinoma in immune-competent individuals: proportional representation of CD8<sup>+</sup> T-cells but not FoxP3<sup>+</sup> Regulatory T-cells is associated with disease stage. *PLoS One.* 2014;9(10):e110928.
483. Kernohan NM, Sewell HF, Walker F. Natural killer cells in cutaneous malignant melanoma. *J Pathol.* 1990;161(1):35-40.
484. López-Cobo S, Pieper N, Campos-Silva C, García-Cuesta EM, Reyburn HT, Paschen A, Valés-Gómez M. Impaired NK cell recognition of vemurafenib-treated melanoma cells is overcome by simultaneous application of histone deacetylase inhibitors. *Oncoimmunology.* 2017;7(2):e1392426.
485. Souza-Fonseca-Guimaraes F, Cursons J, Huntington ND. The Emergence of Natural Killer Cells as a Major Target in Cancer Immunotherapy. *Trends Immunol.* 2019;40(2):142-158.
486. Ibegbu CC, Xu YX, Harris W, Maggio D, Miller JD, Kourtis AP. Expression of killer cell lectin-like receptor G1 on antigen-specific human CD8<sup>+</sup> T lymphocytes during active, latent, and resolved infection and its relation with CD57. *J Immunol.* 2005;174(10):6088-6094.
487. Li L, Wan S, Tao K, Wang G, Zhao E. KLRG1 restricts memory T cell antitumor immunity. *Oncotarget.* 2016;7(38):61670-61678.
488. Huntington ND, Tabarias H, Fairfax K, Brady J, Hayakawa Y, Degli-Esposti MA, Smyth MJ, Tarlinton DM, Nutt SL. NK cell maturation and peripheral homeostasis is associated with KLRG1 up-regulation. *J Immunol.* 2007;178(8):4764-4770.
489. Furuta J, Inozume T, Harada K, Shimada S. CD271 on melanoma cell is an IFN- $\gamma$ -inducible immunosuppressive factor that mediates downregulation of melanoma antigens. *J Invest Dermatol.* 2014;134(5):1369-1377.
490. Lin L, Rayman P, Pavicic PG Jr, Tannenbaum C, Hamilton T, Montero A, Ko J, Gastman B, Finke J, Ernstoff M, Diaz-Montero CM. Ex vivo conditioning with IL-12 protects tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells from negative regulation by local IFN- $\gamma$ . *Cancer Immunol Immunother.* 2019;68(3):395-405.
491. Refaeli Y, Van Parijs L, Alexander SI, Abbas AK. Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes [published correction appears in *J Exp Med.* 2012;209(5):1049]. *J Exp Med.* 2002;196(7):999-1005.
492. Wang JM, Cheng YQ, Shi L, Ying RS, Wu XY, Li GY, Moorman JP, Yao ZQ. KLRG1 negatively regulates natural killer cell functions through the Akt pathway in individuals with chronic hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2013;87(21):11626-11636.
493. Xu L, Zheng Y, Wang J, Xu Y, Xie Y, Yang ZP. IL33 activates CD8<sup>+</sup>T and NK cells through MyD88 pathway to suppress the lung cancer cell growth in mice. *Biotechnol Lett.* 2020;42(7):1113-1121.
494. Gabriele L, Schiavoni G, Mattei F, Sanchez M, Sestili P, Butteroni C, Businaro R, Mirchandani A, Niedbala W, Liew FY, Afferni C. Novel allergic asthma model demonstrates ST2-dependent dendritic cell targeting by cypress pollen. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(3):686-695.e7.
495. Qin L, Dominguez D, Chen S, Fan J, Long A, Zhang M, Fang D, Zhang Y, Kuzel TM, Zhang B. Exogenous IL-33 overcomes T cell tolerance in murine acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2016;7(38):61069-61080.

496. Paczesny S, Banchereau J, Wittkowski KM, Saracino G, Fay J, Palucka AK. Expansion of melanoma-specific cytolytic CD8<sup>+</sup> T cell precursors in patients with metastatic melanoma vaccinated with CD34<sup>+</sup> progenitor-derived dendritic cells. *J Exp Med.* 2004;199(11):1503-1511.
497. Erdag G, Schaefer JT, Smolkin ME, Deacon DH, Shea SM, Dengel LT, Patterson JW, Slingluff CL Jr. Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. *Cancer Res.* 2012;72(5):1070-1080.
498. Xu D, Chan WL, Leung BP, Huang Fp, Wheeler R, Piedrafita D, Robinson JH, Liew FY. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J Exp Med.* 1998;187(5):787-794.
499. Choi MR, Sosman JA, Zhang B. The Janus Face of IL-33 Signaling in Tumor Development and Immune Escape. *Cancers (Basel).* 2021;13(13):3281.
500. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000;100(6):655-669.
501. Durgeau A, Virk Y, Corgnac S, Mami-Chouaib F. Recent Advances in Targeting CD8 T-Cell Immunity for More Effective Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2018;9:14.
502. Li X, Lv Q, Feng Y, Gu Y, Xia R, Ma J, He H, Zhu Y. Interleukin-33, a Potential Cytokine Expressed in Tumor Microenvironment Involves in Antitumor Immunotherapy Through Facilitates CD8<sup>+</sup> T Cells [published correction appears in *J Interferon Cytokine Res.* 2019;39(5):314]. *J Interferon Cytokine Res.* 2018;38(11):491-499.
503. Le Gros G, Erard F. Non-cytotoxic, IL-4, IL-5, IL-10 producing CD8<sup>+</sup> T cells: their activation and effector functions. *Curr Opin Immunol.* 1994;6(3):453-457.
504. Dennis KL, Blatner NR, Gounari F, Khazaie K. Current status of interleukin-10 and regulatory T cells in cancer. *Curr Opin Oncol.* 2013;25(6):637-645.
505. Liu H, Weber A, Morse J, Kodumudi K, Scott E, Mullinax J, Sarnaik AA, Pilon-Thomas S. T cell mediated immunity after combination therapy with intralesional PV-10 and blockade of the PD-1/PD-L1 pathway in a murine melanoma model. *PLoS One.* 2018;13(4):e0196033.
506. Gatalica Z, Snyder C, Maney T, Ghazalpour A, Holterman DA, Xiao N, Overberg P, Rose I, Basu GD, Vranic S, Lynch HT, Von Hoff DD, Hamid O. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(12):2965-2970.
507. Miller BC, Sen DR, Al Aboosy R, Bi K, Virkud YV, LaFleur MW, Yates KB, Lako A, Felt K, Naik GS, Manos M, Gjini E, Kuchroo JR, Ishizuka JJ, Collier JL, Griffin GK, Maleri S, Comstock DE, Weiss SA, Brown FD, Panda A, Zimmer MD, Manguso RT, Hodi FS, Rodig SJ, Sharpe AH, Haining WN. Subsets of exhausted CD8<sup>+</sup> T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade [published correction appears in *Nat Immunol.* 2019;20(11):1556]. *Nat Immunol.* 2019;20(3):326-336.
508. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol.* 2018;8:86.
509. Ribas A, Robert C, Hodi FS, Wolchok JD, Joshua AM, Hwu WJ, Weber JS, Zarour HM, Kefford R, Loboda A, Albright A, Kang SP, Ebbinghaus S, Yearley J, Murphy E, Nebozhyn M, Lunceford JK, McClanahan T, Ayers M, Daud A. Association of response to programmed death receptor 1 (PD-1) blockade with pembrolizumab (MK-3475) with an interferon-inflammatory immune gene signature. *J Clin Oncol.* 2015;33:3001.
510. Chen L, Sun R, Xu J, Zhai W, Zhang D, Yang M, Yue C, Chen Y, Li S, Turnquist H, Jiang J, Lu B. Tumor-Derived IL33 Promotes Tissue-Resident CD8<sup>+</sup> T Cells and Is Required for Checkpoint Blockade Tumor Immunotherapy. *Cancer Immunol Res.* 2020;8(11):1381-1392.

511. Greenberg SA, Kong SW, Thompson E, Gulla SV. Co-inhibitory T cell receptor KLRG1: human cancer expression and efficacy of neutralization in murine cancer models. *Oncotarget*. 2019;10(14):1399-1406.
512. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(4):263-274.
513. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(4):295-307.
514. Wen YH, Lin HQ, Li H, Zhao Y, Lui VWY, Chen L, Wu XM, Sun W, Wen WP. Stromal interleukin-33 promotes regulatory T cell-mediated immunosuppression in head and neck squamous cell carcinoma and correlates with poor prognosis. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68(2):221-232.
515. Xiao P, Wan X, Cui B, Liu Y, Qiu C, Rong J, Zheng M, Song Y, Chen L, He J, Tan Q, Wang X, Shao X, Liu Y, Cao X, Wang Q. Interleukin 33 in tumor microenvironment is crucial for the accumulation and function of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology*. 2015;5(1):e1063772.
516. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood*. 2004;104(8):2224-2234.
517. Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, Kaiser EA, Snyder LA, Pollard JW. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011;475(7355):222-225.
518. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-271.
519. Li J, Byrne KT, Yan F, Yamazoe T, Chen Z, Baslan T, Richman LP, Lin JH, Sun YH, Rech AJ, Balli D, Hay CA, Sela Y, Merrell AJ, Liudahl SM, Gordon N, Norgard RJ, Yuan S, Yu S, Chao T, Ye S, Eisinger-Mathason TSK, Faryabi RB, Tobias JW, Lowe SW, Coussens LM, Wherry EJ, Vonderheide RH, Stanger BZ. Tumor Cell-Intrinsic Factors Underlie Heterogeneity of Immune Cell Infiltration and Response to Immunotherapy. *Immunity*. 2018;49(1):178-193.e7.
520. Bayne LJ, Beatty GL, Jhala N, Clark CE, Rhim AD, Stanger BZ, Vonderheide RH. Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer. *Cancer Cell*. 2012;21(6):822-835.
521. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabilovich DI. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol*. 2016;37(3):208-220.
522. Tcyganov E, Mastio J, Chen E, Gabilovich DI. Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Curr Opin Immunol*. 2018;51:76-82.
523. Huppert LA, Green MD, Kim L, Chow C, Leyfman Y, Daud AI, Lee JC. Tissue-specific Tregs in cancer metastasis: opportunities for precision immunotherapy. *Cell Mol Immunol*. 2022;19(1):33-45.
524. Berendt MJ, North RJ. T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J Exp Med* 1980;151(1):69-80.
525. Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(6):356-371.
526. Saleh R, Elkord E. FoxP3+ T regulatory cells in cancer: prognostic biomarkers and therapeutic targets. *Cancer Lett*. 2020;490:174-185.
527. Shang B, Liu Y, Jiang SJ, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2015;5:15179.

528. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(51):18538-18543.
529. Watanabe M, Kanao K, Suzuki S, Muramatsu H, Morinaga S, Kajikawa K, Kobayashi I, Nishikawa G, Kato Y, Zennami K, Nakamura K, Tsuzuki T, Yoshikawa K, Ueda R, Sumitomo M. Increased infiltration of CCR4-positive regulatory T cells in prostate cancer tissue is associated with a poor prognosis. *Prostate*. 2019;79(14):1658-1665.
530. Kryczek I, Wei S, Zou L, Zhu G, Mottram P, Xu H, Chen L, Zou W. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol*. 2006;177(1):40-44.
531. Wang H, Franco F, Ho PC. Metabolic Regulation of Tregs in Cancer: Opportunities for Immunotherapy. *Trends Cancer*. 2017;3(8):583-592.
532. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):490-500.
533. Halvorsen EC, Mahmoud SM, Bennewith KL. Emerging roles of regulatory T cells in tumour progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2014;33(4):1025-1041.
534. Lai C, August S, Albibas A, Behar R, Cho SY, Polak ME, Theaker J, MacLeod AS, French RR, Glennie MJ, Al-Shamkhani A, Healy E. OX40+ Regulatory T Cells in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Suppress Effector T-Cell Responses and Associate with Metastatic Potential. *Clin Cancer Res*. 2016;22(16):4236-4248.
535. Vidotto T, Saggiaro FP, Jamaspishvili T, Chesca DL, Picanço de Albuquerque CG, Reis RB, Graham CH, Berman DM, Siemens DR, Squire JA, Koti M. PTEN-deficient prostate cancer is associated with an immunosuppressive tumor microenvironment mediated by increased expression of IDO1 and infiltrating FoxP3+ T regulatory cells. *Prostate*. 2019;79(9):969-979.
536. Chen CC, Kobayashi T, Iijima K, Hsu FC, Kita H. IL-33 dysregulates regulatory T cells and impairs established immunologic tolerance in the lungs. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(5): 1351-1363.e7.
537. Biton J, Khaleghparast Athari S, Thiolat A, Santinon F, Lemeiter D, Hervé R, Delavallée L, Levescot A, Roga S, Decker P, Girard JP, Herbelin A, Boissier MC, Bessis N. In Vivo Expansion of Activated Foxp3+ Regulatory T Cells and Establishment of a Type 2 Immune Response upon IL-33 Treatment Protect against Experimental Arthritis. *J Immunol*. 2016;197(5):1708-1719.
538. Kim BS, Clinton J, Wang Q, Chang SH. Targeting ST2 expressing activated regulatory T cells in Kras-mutant lung cancer. *Oncoimmunology*. 2019;9(1):1682380.
539. Suttmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, Toes RE, Offringa R, Melief CJ. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*. 2001;194(6):823-832.
540. Quezada SA, Peggs KS, Curran MA, Allison JP. CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1935-1945.
541. Cha E, Klinger M, Hou Y, Cummings C, Ribas A, Faham M, Fong L. Improved survival with T cell clonotype stability after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients. *Sci Transl Med*. 2014;6(238):238ra70.
542. Adeegbe DO, Liu Y, Lizotte PH, Kamihara Y, Aref AR, Almonte C, Dries R, Li Y, Liu S, Wang X, Warner-Hatten T, Castrillon J, Yuan GC, Poudel-Neupane N, Zhang H,

- Guerrero JL, Han S, Awad MM, Barbie DA, Ritz J, Jones SS, Hammerman PS, Bradner J, Quayle SN, Wong KK. Synergistic Immunostimulatory Effects and Therapeutic Benefit of Combined Histone Deacetylase and Bromodomain Inhibition in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2017;7(8):852-867.
543. Chang RB, Beatty GL. The interplay between innate and adaptive immunity in cancer shapes the productivity of cancer immunosurveillance. *J Leukoc Biol.* 2020;108(1):363-376.
544. Haque S, Morris JC. Transforming growth factor- $\beta$ : A therapeutic target for cancer. *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13(8):1741-1750.



## БИОГРАФИЈА

Андра Јевтовић, доктор медицине, рођен је 07.12.1986. године у Крагујевцу. Завршио је основну школу "Радоје Домановић" у Крагујевцу, а након тога Прву крагујевачку гимназију. Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписао је школске 2005/2006. године, а дипломирао 06.07.2012. године на студијском програму Интегрисане академске студије медицине са просечном оценом 9.55. Стручни испит је положио 22.04.2013. године. Школске 2013/2014. године је уписао Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, на изборном подручју Имунологија, инфекција и инфламација. 15.12.2016. године је положио усмени докторски испит са оценом 10. Од 2016. године запослен је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, где и данас обавља послове сарадника у звању асистента за ужу научну област Оториноларингологија. Од 2014. године запослен је у Универзитетском клиничком центру Крагујевац, на Клиници за Оториноларингологију. Специјалистичке студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, из гране медицине Оториноларингологија, уписао је 06.04.2017. године. и положио је специјалистички испит 13.05.2021. године са оценом одличан (пет).

Аутор је и коаутор више оригиналних научних радова у часописима од међународног и националног значаја са рецензијом:

1. **Jevtovic A**, Pantic J, Jovanovic I, Milovanovic M, Stanojevic I, Vojvodic D, Arsenijevic N, Lukic ML, Radosavljevic GD. Interleukin-33 Pretreatment Promotes Metastatic Growth of Murine Melanoma by Reducing the Cytotoxic Capacity of CD8 + T Cells and Enhancing Regulatory T Cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2020;69(8):1461-1475.
2. Skuletic V, Radosavljevic GD, Pantic J, Markovic BS, Jovanovic I, Jankovic N, Petrovic D, **Jevtovic A**, Dzodic R, Arsenijevic N. Angiogenic and lymphangiogenic profiles in histological variants of papillary thyroid carcinoma. *Pol Arch Intern Med.* 2017;127(6):429-437.
3. Benazic S, Besser Silconi Z, **Jevtovic A**, Jurisevic M, Milovanovic J, Mijajlovic M, Nikolic M, Kanjevac T, Potočňák I, Samol'ová E, Ratkovic ZR, Radic G, Milovanovic M, Pantic J, Arsenijevic N, Radosavljevic GD. The Zn( S-pr-thiosal) 2 Complex Attenuates Murine Breast Cancer Growth by Inducing Apoptosis and G1/S Cell Cycle Arrest. *Future Med Chem.* 2020;12(10):897-914.
4. **Jevtovic A**, Belic B, Stojanovic J. Combined surgical approach in the treatment of oculo-orbital complications of frontal sinus mucocele: a case report. *Ser J Exp Clin Res.* 2021;22(2):175-180.
5. Zornic S, Lukovic B, **Jevtovic A**, Dimitrijevic J, Markovic B, Pantic J, Radosavljevic G, Arsenijevic N. Overview of Host Defense Peptides with Promising Anti-Breast Cancer Activity. *Experimental and Applied Biomedical Research (EABR).* 2022;0(0). <https://doi.org/10.2478/sjecr-2021-0052>.

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

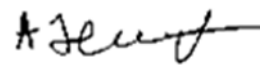
Ефекти системске апликације ПЛ-33 на прогресију мишјег меланома

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 12.06.2023. године,



ПОТПИС АУТОРА

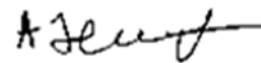
**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

Ефекти системске апликације IL-33 на прогресију мишћег меланома

истоветне.

У Крагујевцу, 12.06.2023. године,



\_\_\_\_\_  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја,                    Андра Јевтовић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Ефекти системске апликације ПЛ-33 на прогресију мишћег меланома

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

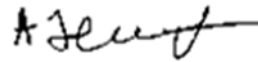
припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

---

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>**

У Крагујевцу, 12.06.2023. године,



\_\_\_\_\_  
потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>