



Pázmány Péter Katolikus Egyetem

Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola

**Melanóma-asszociált fibroblasztok interakciói makrofágokkal és
gamma delta T-sejtekkel**

PhD disszertáció

Hajdara Anna

Témavezető:

Dr. Mayer Balázs

Társ-témavezető:

Dr. Gyöngy Miklós

2023

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	2
2.1. Melanóma	2
2.2. A melanóma tumor mikrokörnyezet	3
2.2.1. Tumor asszociált makrofágok (TAM-ok).....	5
2.2.2. Tumort infiltráló limfociták (TIL-ek)	7
2.2.3. Melanóma asszociált fibroblasztok (MAF-ok).....	9
2.3. Gamma delta T-sejtek.....	12
2.4. MAF-ok immun-moduláló hatása	14
2.4 A zoledronsav hatásmechanizmusa	15
3. Célkitűzések.....	17
4. Anyagok és módszerek.....	19
4.1 Szövetminták és sejt kultúra	19
4.1.1 Primer Melanóma-asszociált fibroblasztok (MAF) és normál dermális fibroblasztok	19
4.1.2. MAF sejtek karakterizálása	20
4.1.3. Primer monocita izolálás	21
4.1.4 Monocita sejtek M1/M2 irányú makrofág differenciációja és karakterizálása	22
4.1.5. Primer $\gamma\delta$ T-sejt expanzió és izolálás	23
4.2. Funkcionális esszék.....	24
4.2.1. IL-10 citokin mérés MAF és primer makrofág kokultúrában.....	24
4.2.4. BTN2A1 és BTN3A1 fehérjék szerepének vizsgálata a $\gamma\delta$ T-sejtek target felismerésében	27
4.2.5. BTN3A1 expresszió sejtfelszíni vizsgálata NDF, MAF és SK-MEL-28 sejtekben	28
4.2.6. Áramlási citometriai apoptózis esszé normál dermális fibroblasztokban (NDF) és SK-MEL-28 sejt vonalban	28
4.3. Statisztikai analízis	29
5. Eredmények	30
5.1 A MAF-ok expresszálják a tradicionálisan elfogadott MSC markereket	30
5.2 Primer monociták <i>in vitro</i> makrofág irányú differenciációja	31
5.3 A MAF-ok növelik a primer makrofág sejtek IL-10 citokin termelését	33

5.4. A perifériás vér $\gamma\delta$ T-sejtjeinek száma növelhető <i>in vitro</i> zoledronsav stimuláció hatására	35
5.5. Áramlási citometriai apoptózis essék $\gamma\delta$ T-sejt és MAF kokultúrákban.....	36
5.5.1. A $\gamma\delta$ T-sejtek által indukált apoptózis MAF-okban MHC-független módon valósul meg.....	43
5.6 A MAF-ok és NDF-ek expresszálják az MHC I. osztályú polipeptidhez köthető szekvencia A és B, BTN2A1 és BTN3A1 molekulákat	45
5.6.1. Áramlási citometriai apoptózis esszé normál dermális fibroblasztokban (NDF) és SK-MEL-28 sejtvonalban	47
5.6.2. A $\gamma\delta$ T-sejtek által indukált MAF apoptózisban szerepe van a $\gamma\delta$ TCR-butirofilin tengelynek.....	49
7. Köszönetnyilvánítás	53
8. Publikációk.....	54
9. Irodalomjegyzék.....	56

Rövidítésjegyzék

Rövidítés	Angol megfelelő	Magyar megfelelő
α -SMA	α -Smooth Muscle Actin	Alfa-simaizom aktin
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor	Bázikus Fibroblaszt Növekedési Faktor
BSA	Bovine Serum Albumin	Szarvasmarha Szérum Albumin
CAF	Cancer associated fibroblast	Tumor Asszociált Fibroblaszt
CAR	Chimeric Antigen Receptor	Kiméra Antigén Receptor
CM	Cutaneous Melanoma	Cutan Melanóma
COX-2	Cyclooxygenase-2	Ciklooxigenáz-2
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte- associated protein 4	Citotoxikus T-limfocita asszociált antigén 4
DM	Distant Metastasis	Távoli Áttét
ECM	Extracellular Matrix	Extracelluláris mátrix
FAP	Fibroblast Activation Protein	Fibroblaszt Aktivációs Fehérje
FPPS	Farnesyl Pyrophosphate Synthase	Farnezil-pirofoszfát szintáz
ICI	Immune Checkpoint Inhibitor	Immunellenőrzőpont-gátló
IDO	Indoleamine 2,3- Dioxygenase	Indolamin 2,3-dioxigenáz
IPP	Isopentenyl- pyrophosphate	Izopentenil-pirofoszfát
ISCT	International Society for Cell and Gene Therapy	Nemzetközi Sejt-, és Génterápia Társaság
LNM	Lymph Node Metastasis	Nyirokcsomó áttét
MCP1	Monocyte Chemotactic Protein 1	Monocita Kemotaktikus Fehérje-1

MDSC	Myeloid Derived Suppressor Cell	Mieloid Eredetű Szupresszor Sejt
MHC	Major Histocompatibility Complex	Fő Hisztokompatibilitási Komplex
MI	Mitotic Index	Mitotikus Index
MMP	Matrix Metalloproteinase	Mátrix Metalloproteináz
MSC	Mesenchymal Stromal Cell	Mesenchymális stromasejt
NFκB	Nuclear Factor κ B	Sejtmagi Faktor κ B
NK	Natural Killer	Természetes Ölő
NM	Nodular Melanoma	Noduláris Melanóma
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog	Neuroblasztóma RAS virális onkogén homológ
OD	Optical Density	Optikai Denzitás
ORR	Objective Response Rate	Objektív Válaszadási Arány
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1	Vérlemezke-endothél Sejtadhéziós Molekula
PGE2	Prostaglandin E2	Prosztaglandin E2
PMA	Phorbol 12-Myristate 13- Acetate	Forbol-mirisztilacetát
PT	Primary Tumor	Primer Tumor
RGP	Radial Growth Phase	Radiális Növekedési Fázis
SDF1	Stromal Cell-derived Factor 1	Stromális sejt-eredetű faktor-1
SSM	Superficial Spreading Melanoma	Felszínesen terjedő melanóma
TAM	Tumor Associated Macrophage	Tumor asszociált makrofág
TIGIT	T cell Immunoreceptor with IgG and ITIM domains	T-sejt Immunreceptor IgG és ITIM doménnel
TLR	Toll-like Receptor	Toll-szerű Receptor
VGP	Vertical Growth Phase	Vertikális Növekedési Fázis
WT	Wild Type	Vad típus

Ábrajegyzék

1. ábra: A melanóma tumor mikrokörnyezete
2. ábra: Klasszikus és alternatív úton differenciálódott makrofág sejtek molekuláris szignáljai
3. ábra: Melanóma-asszociált fibroblasztok konfokális mikroszkópos felvétele
4. ábra: A $\gamma\delta$ T-sejtek és tumor sejtek molekuláris interakciói
5. ábra: A zoledronsav $\gamma\delta$ T-sejteket aktiváló mechanizmusa
6. ábra: MSC markerek expressziója MAF sejteken
7. ábra: *In vitro* differenciált M1 és M2 immunfenotípusú makrofágok karakterizálása
8. ábra: M1 és M2 immunfenotípusú differenciált makrofágok és MAF-ok IL-10 szekréciója
9. ábra: A MAF-ok IL-10 citokin szekrécióra kifejtett hatása egészséges donorokból származó makrofág sejteken
10. ábra: Zoledronsav és IL-2 mediált PBMC proliferáció és mágneses $\gamma\delta$ T-sejt szeparáció
11. ábra: Az áramlási citometriai apoptózis esszé optimalizálása $\gamma\delta$ T cell–MAF kokultúrákban.
12. ábra: A zoledronsav határa a MAF-ok életképességére
13. ábra: Áramlási citometriai apoptózis esszé $\gamma\delta$ T-sejt-MAF kokultúrákban optimalizált kondíciókkal
14. ábra: $\gamma\delta$ T-sejt és MAF interakció melanómás páciensekből származó sejtekkel
15. ábra: $\gamma\delta$ TCR target molekulák mRNS expressziója MAF-okban
16. ábra: BTN3A1 expresszió és $\gamma\delta$ T-sejt indukált apoptózis fibroblasztokban és SK-MEL-28 sejtekben
17. ábra: $\gamma\delta$ T-sejt és MAF interakció vizsgálata különböző $\gamma\delta$ TCR target molekulák célzó antitestek jelenléte mellett

Táblázatjegyzék:

1. táblázat: Klinikai patológiai tulajdonságai a melanóma páciensekből származó bőrmintáknak
2. táblázat: A target gének vizsgálatához felhasznált primer pár szekvenciák
3. táblázat: Alkalmazott stimulusok és antitestek a MAF- $\gamma\delta$ T-sejt kokultúra apoptózis esszéiben
4. táblázat: A MAF- $\gamma\delta$ T kokultúra apoptózis esszéiben alkalmazott antitestek forrásai

Absztrakt

A melanóma tumor mikrokörnyezetében a Melanóma-Asszociált Fibroblasztok (MAF-ok) meghatározó tagjai a tumor stromának. Képesek támogatni a daganatsejtek növekedését és befolyásolni az anti-tumor immunválaszokat, beleértve egyes limfocita populációk gátlását is. Fenotipikus és funkcionális hasonlóságai miatt, melyeken osztoznak a mesenchymális stromasejtekkel (MSC-k) vizsgálataim első, általános célkitűzése az volt, hogy megállapítsam, hogy a MAF-ok, hasonlóan mint az MSC-k, képesek-e a makrofág sejtek funkcióinak modulálására. A MAF-okat sebészi úton eltávolított melanóma bőr szövetekből kerültek izolálásra. Kutatócsoportunk korábbi eredményeit követően, melyek bemutatták a MAF-ok és a makrofágok közötti szoros kapcsolatot a tumor stromában, további vizsgálatokat végeztem a MAF-ok makrofágok működésére kifejtett hatásában. Humán perifériás vérből monocita sejteket izoláltam és azokat *in vitro* módon M1 (pro-inflammatórikus) és M2 (anti-inflammatórikus) makrofágokká differenciáltattam. Sikeresen beállítottam egy *in vitro* kokultúra esszét MAF-okkal és az előbb említett primer M1 és M2 makrofágokkal, valamint kimutattam az immunszuppresszív hatású IL-10 citokin szekrécióját.

Mivel a jelenlegi $\gamma\delta$ T-sejteket alkalmazó szolid tumorokat célzó kezelések vegyes eredményeket mutatnak, vizsgálataim második általános célkitűzése az volt, hogy mélyebb betekintést nyújtsak a $\gamma\delta$ T-sejtek biológiájába melanómában, és megvizsgáljam, hogy az aktivált $\gamma\delta$ T-sejtek képesek-e elpusztítani a MAF-okat. Ezen kérdés megválaszolásához kialakítottam egy *in vitro* kísérleti rendszert, frissen izolált V δ 2 típusú $\gamma\delta$ T-sejtekkel és melanóma betegekben származó MAF-ok kokultúrájával. Kimutattam, hogy a zoledronsav hozzáadása a $\gamma\delta$ T-sejtekhez szükséges a MAF-ok apoptózisának indukálásához. Továbbá vizsgáltam a $\gamma\delta$ T-sejtek citotoxicitását molekuláris szinten is, és kimutattam, hogy a stimuláló hatású anti-BTN3A1 antitest 20.1 klónjának használata esetén fokozott apoptózis érhető el MAF-okban. Ezzel szemben a gátló hatású anti-TCR $\gamma\delta$, vagy az anti-BTN2A1 antitestek használatakor csökkent a MAF-okon mért apoptózis. A kísérleti eredményeim azt mutatják, hogy a $\gamma\delta$ T-sejtek által zoledronsav segítségével indukált MAF apoptózis a $\gamma\delta$ TCR és a BTN2A1, valamint a BTN3A1 molekulákon keresztül valósul meg. Mivel a zoledronsav alkalmazása biztonságos és jól tolerálható a betegek számára, eredményeim kiinduló adatokkal szolgálhatnak a jövőbeli klinikai kutatások számára a melanóma kezelési stratégiáira vonatkozóan.

Abstract

Within the melanoma tumor microenvironment, Melanoma-Associated Fibroblasts (MAFs) are integral components of the stroma, creating a protective network for cancer cells and influencing anti-tumor immune responses, including the suppression of lymphocyte populations. Due to their phenotypical and functional similarities to Mesenchymal Stromal Cells (MSCs), we first wondered whether MAFs, such as MSCs, possess the capacity to modulate macrophage functions. MAFs were isolated from surgically resected melanoma skin tissue and subsequently biobanked. Our research group unveiled the intimate interaction between MAFs and macrophages within the tumor stroma, prompting further investigation on the influence of MAFs on primary macrophage function. Monocytes were isolated from human peripheral blood and differentiated into M1 (proinflammatory) and M2 (anti-inflammatory) macrophages *in vitro*. I successfully set up an *in vitro* co-culture assay employing MAFs and M1 and M2 macrophages and demonstrated the secretion of the anti-inflammatory cytokine, IL-10, by MAF-educated macrophages.

Given the mixed responses observed in current anti-cancer therapies employing $\gamma\delta$ T cells in solid tumors, my second research aim was to better understand $\gamma\delta$ T cell biology in melanoma by investigating the potential of activated $\gamma\delta$ T cells to eliminate MAFs. To answer this question, I set up an *in vitro* platform using freshly isolated V δ 2-type $\gamma\delta$ T cells and cultured MAFs, that were biobanked from our melanoma patients. My research demonstrated that the addition of zoledronic acid to $\gamma\delta$ T cells was essential for inducing apoptosis in MAFs. Moreover, the cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells against MAFs was explored at the molecular level, revealing increased apoptosis when utilizing the stimulatory clone 20.1 of the anti-BTN3A1 antibody but reduced cytotoxicity when anti-TCR $\gamma\delta$ or anti-BTN2A1 antibodies were employed. Based on my experiments, I concluded that zoledronic acid activated $\gamma\delta$ T cell induced apoptosis in MAFs operates through $\gamma\delta$ TCR, BTN2A1 and BTN3A1 axis. As the administration of zoledronic acid is known to be safe and tolerable in patients, my results offer valuable data for future clinical studies on melanoma treatment strategies.

1. Bevezetés

A rosszindulatú daganatképződésben szerepet játszó folyamatok tanulmányozása és terápiás célpont keresése kezdetben magán a transzformált sejten belül lezajló genetikai, molekuláris biológiai és metabolikus eseményekre irányult. A daganatsejtek osztódásához és a tumorok növekedéséhez azonban számos stromasejt és immunsejt összetett interakciója szükséges a tumor mikrokörnyezetén belül. Ezek közé a sejtek közé tartoznak a tumor-asszociált fibroblasztok, tumor asszociált makrofágok, dendritikus sejtek, mieloid sejtek, endothél sejtek, periciták és daganat őssejtek egyaránt. A legnagyobb mortalitással bíró bőrrák típus a melanóma, melynek esetszáma évről évre növekszik.

Melanómában a melanóma-asszociált fibroblasztok (MAF) által termelt struktúrfehérjék térbeli támasztó szerkezetet és protektív hálózatot biztosítanak a melanóma sejteknek. A MAF-ok eredetét tekintve számos lehetséges prekuzorra lehet gondolni, mint a tumor környezetben rezidens fibroblasztokra, csontvelői eredetű mesenchymális stromasejtekre, hematopoetikus őssejtekre, endothél sejtekre, vagy pedig helyi epitheliális sejtekre. Kutatócsoportunk korábbi eredményi alapján a MAF-ok olyan funkcionális hasonlóságokban osztoznak a mesenchymális stromasejtekkel, mint a citotoxikus T-limfociták aktivitásának gátlása. Továbbá elemeztük a MAF-ok differenciálódási potenciálját, immunosuppresszív hatásukat, valamint kolokalizációjukat más immunsejtekkel a tumor környezetben. Egyéni kutatómunkámat erre építve vizsgáltam a MAF-ok immunmoduláló hatását primer, humán monocita eredetű makrofágokon. Továbbá a MAF-ok citotoxikus CD8⁺ T-sejt aktivitásra kifejtett gátló hatás kimutatását követően, önálló munkám arra irányult, hogy milyen egyéb immunsejtek felhasználásával lehetne elérni citotoxikus hatást MAF-okban. Ehhez egy nem-konvencionális, $\gamma\delta$ T-sejt recepttorral rendelkező T-sejt alpopulációt vizsgáltam. A $\gamma\delta$ T-sejtek a konvencionális $\alpha\beta$ T-sejtekkel szemben nem peptid természetű antigéneket ismernek fel a célsejtek sejtfelszíni fő hisztokompatibilitási komplexeihez (MHC) kötve, hanem antigén felismerésük MHC független módon történik. Jelenleg a $\gamma\delta$ T-sejteket alkalmazó tumorelleses terápiás eljárások változó eredményekkel bírnak. Ebből kifolyólag kutatásom során $\gamma\delta$ T-sejtek biológiájának megértése volt a cél melanómában, fókuszba helyezve a $\gamma\delta$ T-sejtek és a MAF-ok kölcsönhatását.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Melanóma

A melanóma egy olyan rosszindulatú bőrdaganat, amelyben a tumorsejtek túlzott proliferatív aktivitással rendelkező, illetve genetikailag megváltozott, hám részben elhelyezkedő pigment termelő melanocitákból keletkeznek [1]. Kialakulásához többféle összetett folyamat vezet, amelyekben környezeti faktorok és az egyéni genetikai háttér is szerepet játszhatnak [2]. A melanóma daganatok 90%-a bőr eredetű, azonban előfordulnak szemben (uveális melanóma), nyálkahártya felületeken, illetve ismeretlen hátterű primer tumorként is jelentkezhettek [3]. Különböző rizikófaktorok hozzájárulnak a kialakulásához, mint a nem (férfiakban gyakoribb), a kor, a családon belüli előfordulás, a világos bőrtónus, többszörös napégés az egyén élete során, beltéri barnulás (szolárium használat), illetve a diszplasztikus, vagy nagyszámú anyajegy jelenléte [4].

A bőr melanóma korai stádiumban való észrevételét és műtéti beavatkozását követően jól kezelhető, azonban az előrehaladott tumor stádiumok rosszabb prognózissal járnak. A különféle bőrdaganatok közül a melanóma kevesebb, mint 3-5% gyakorisággal jelentkezik, ugyanakkor rendkívül agresszív daganattípus. A 20%-os mortalitási arány mellett a bőrdaganatokhoz köthető halálozások 80%-ért felelős [5], [6]. Ennek oka a heterogén tumor szerkezet, a tumort célzó terápiáknak való ellenállás, illetve a gyors áttét képző képesség további szövetekre kiterjedve [7]. Az elsődleges terápiás lehetőség a sebészeti eltávolítás, azonban a műtétet követően a reziduális tumorsejtek a tumor újbóli kialakulását és áttéteket okozhatnak. Egyéb terápiás lehetőségek közé tartozik a radioterápia, kemoterápia, immunterápia, illetve célzott terápia az eltávolított tumorban azonosított genetikai eltérések (szomatikus mutációk) alapján. [8].

A melanóma progressziója három fő fázisra osztható: 1) radiális növekedési fázis (Radial Growth Phase, RPG) alatt kizárólag a bőr epidermisz rétegében vannak jelen a tumorsejtek 2) RPG-korlátozott, mikroinvazív fázis, amikor a melanóma sejtek eléri a felszíni papilláris dermisz réteget 3) a vertikális növekedési fázis (Vertical Growth Phase, VGP) az a mitogén stádiuma a melanómának, amikor áttétek képződésével nyirokcsomókba és más szövetekbe is eljutnak a malignus sejtek [9], [10].

A két leggyakrabban előforduló szomatikus mutáció melanómában a BRAF, illetve az NRAS (neuroblasztoma RAS virális onkogén) gének mutációi. A leggyakoribb BRAF mutáció egy valin glutaminsav aminosavcserét eredményező pontmutáció (V600E) a BRAF gén 15-ös exonjában, mely a sejt proliferációjáért, túléléséért és differenciációjáért felelős MAP kináz kaskádban (MEK/ERK jelpálya) egy mutáns szerin-treonin kinázt eredményez [11]. A folyamatosan aktív szignál transzdukciós jelpálya így hozzájárul a tumor növekedéshez és a terjeszkedést biztosító metabolikus háttér megteremtéséhez. A Ras gének mutációi a daganatos betegségek 16-25%-ban megtalálhatóak [12]. Az NRAS a Ras proto-onkogén fehérjék közé tartozik, további két hasonló rokon fehérjével (KRAS, HRAS) együtt [12]. A Ras fehérjék jelátviteli funkcióikat tekintve kis GTP/GDP kötő fehérjékhez sorolhatók, melyek mintegy molekuláris kapcsoló szintén a MAP kináz jelpálya részét képezik. Mutáns változataik hasonlóan a mutáns BRAF fehérjéhez közvetetten hozzájárulnak a tumor növekedéshez. A familiáris malignus melanóma kialakulásában a hasnyálmirigyrákhoz is asszociálható ciklin dependens kináz inhibitor 2a (CDKN2a) gén mutációi játszanak szerepet [13]. A gén mutációit a familiáris melanóma betegek 20-40%-ában azonosították [14]. További gének, amelyek mutációi alacsony gyakorisággal következnek be és a familiáris melanómás betegek körülbelül 10%-ában találhatóak meg, a CDK4, BAP1, TERT, POT1, ACD, TERF2IP, és az MITF [14].

2.2. A melanóma tumor mikroökönyezet

Régóta ismert, hogy a tumor mikroökönyezet aktív résztvevője a tumorigenezisnek. A szolid tumorokra jellemző módon a tumor stromát a (melanocita) tumorsejtek mellett egyéb sejtes alkotóelemek építik fel: tumor-asszociált fibroblasztok (Cancer Associated Fibroblast: CAF), keratinociták, adipociták és immunsejtek [15]. A tumor összetétele nagymértékben befolyásolja a kezelésre adott választ, illetve a betegség lefolyását. A melanóma sejtek autokrin módon bázikus fibroblaszt növekedési faktort (bFGF) választanak ki, elősegítve a saját proliferációjukat és túlélésüket, valamint parakrin jelátviteli módokon hatnak a stromában elhelyezkedő fibroblaszt sejtekre is. Hatásuk a bFGF mellett, főként TGF- β és PDGF faktorok szekréciójával valósul meg [16].

A tumorsejtek mellett elhelyezkedő stromasejtek hozzájárulhatnak a tumor növekedéshez, érhalózat képzéshez (angiogenezis), illetve a tumor invazív tulajdonságának kialakításához különböző parakrin jelátviteli pályákon keresztül [17].

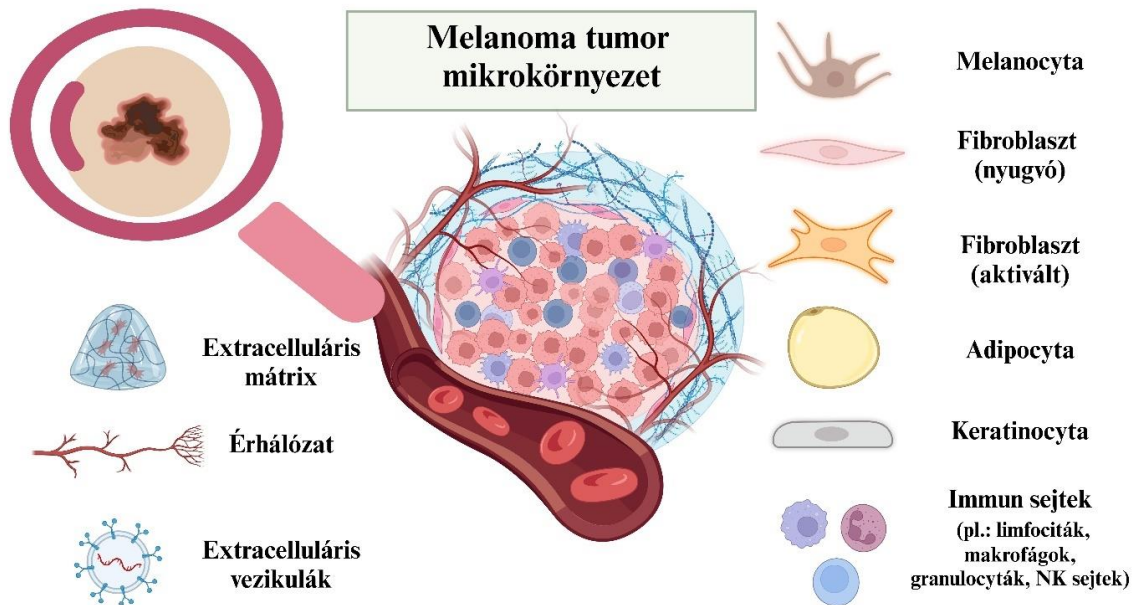
Mátrix metalloproteináz (MMP) szekréciójuk lehetővé teszi a bazális membrán áttörését és az extracelluláris mátrix (ECM) lebontását, elősegítve így a távoli áttétek képzését [18].

A tumor mikrokörnyezet sejtjes elemei mellett hangsúlyos szerepet tölt be az extracelluláris mátrix is. Különböző (főként fibroblaszt sejtek) által termelt fibrózus fehérjék alkotják, mint a kollagén, elasztin, glükózamino-glikánok (pl: hialuronsav), proteoglikánok (pl.: szindekán, heparán-szulfát) és egyéb szerkezeti glüko-konjugátumok (pl.: fibronektin, laminin, tenascin, vibronektin, oszteonektin, oszteopontin) [19]. Továbbá az ECM molekulák közül az intracelluláris jelátvitelben fontos szerepet töltenek be az integrinek is [19].

A tumor környezetében számos immunsejt megtalálható, beleértve a T-és; B-limfocitákat, természetes ölősejteket (Natural Killer - NK sejt), dendritikus sejteket, makrofágokat és az éretlen állapotú, mieloid eredetű szuppresszor sejteket (Myeloid Derived Suppressor Cell - MDSC).

A melanóma tumorsejtek képesek modulálni az adaptív immunválaszokat, valamint az immunsejtekkel való összetett kommunikációjuk alapján elmondható, hogy egy rendkívül immunogén tumor típus.

Az első FDA és EMEA által elfogadott immun-regulációs mechanizmusokat célzó immun ellenőrzőpont-gátló (Immune Checkpoint Inhibitor, ICI) antitesteket késői stádiumú melanómára fejlesztették ki. Ezek közé tartozik a citotoxikus T-limfocita asszociált 4-es antigént célzó Ipilimumab (Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4: anti-CTLA-4) és a programozott sejthalál fehérjét targetáló Nivolumab (anti-PD1) [20], melyeket az FDA 2011-ben és 2014-ben fogadott el.



1. ábra: A melanóma tumor mikrokörnyezete

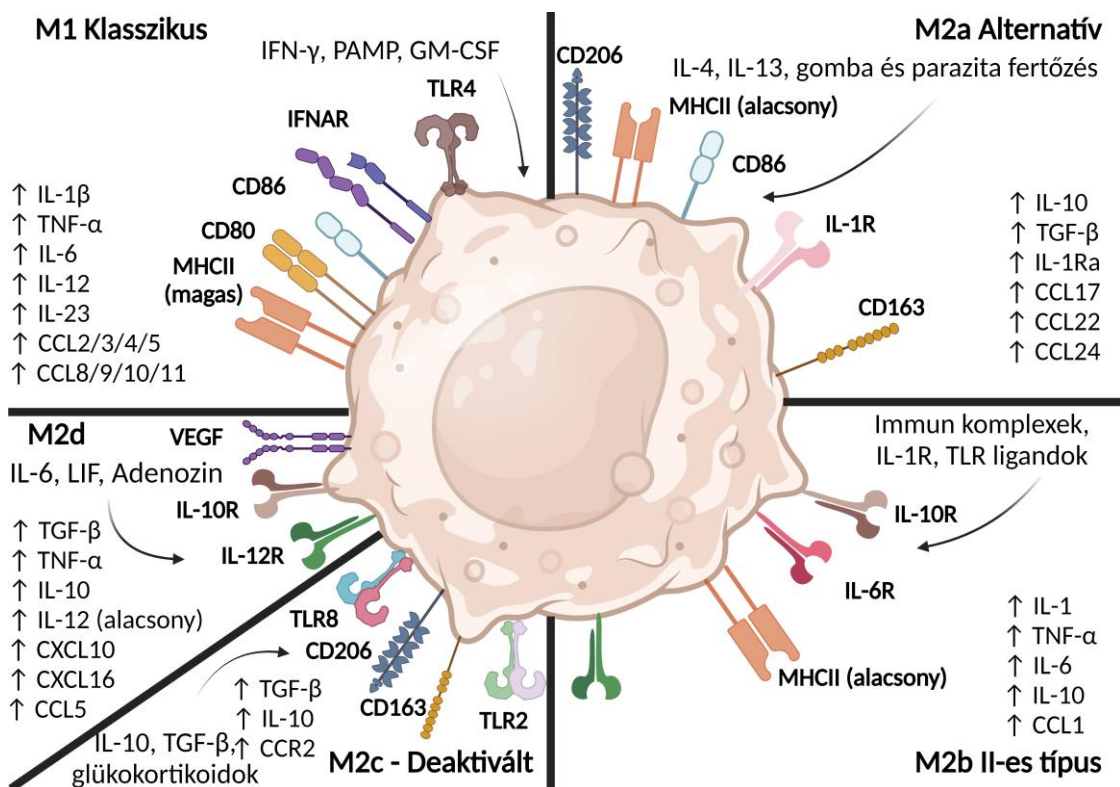
A heterogén tumor összetétel, magas mutációs ráta és az anti-tumor immunválaszokhoz való adaptációja miatt a melanóma további innovatív terápiás repertoárt igényel. Az ICI terápiák sikerességét és a visszaesés mentes felépülést azonban számos faktor befolyásolja, többek között a TME immunsejt összetétele. A tumor típustól függően az átlagos objektív válaszadási arány (Objective Response Rate, ORR) az anti-CTLA4 esetében 14%, míg az anti-PD1monoklonális antitestek esetében 33% [21]. Az ICI-k mellett továbbá az anti-tumor hatású vakcinák és kiméra antigén receptort tartalmazó T-sejt (CAR-T) terápiák is ígéretes kutatási és fejlesztési eredményeket mutatnak.

2.2.1. Tumor asszociált makrofágok (TAM-ok)

A természetes (veleszületett) immunitáshoz sorolt csontvelői eredetű monocita prekursorokból differenciálódott makrofágok a veleszületett és szerzett immunitás kialakításában is részt vesznek [22]. Immunfunkcióik közül hangsúlyos a fagocita aktivitásuk, antigén prezentáló képességük és a mikrobiális fertőzésekkel szembeni citokinek, valamint komplement komponens szekréciójuk [23]. Továbbá hozzájárulnak a szöveti regenerációhoz, az érképződéshez és az immunmodulációhoz [24], [25]. Emellett fontos kiemelni, hogy a különböző biológiai aktivitásuk eltérő tulajdonságú is lehet, mint ahogy a makrofág sejtek egyes populációi lehetnek immun folyamatokat serkentő, illetve

immuntolerancia kialakulásához hozzájárul is [22]. Ezek az ellentétes szerepek lehetővé teszik, hogy a szöveti lebontó és javító folyamatokban is egyaránt részt vegyenek [26].

A makrofágok számos szervben, illetve szövetben jelen vannak így elhelyezkedésük és funkcióik alapján is csoportosíthatóak. Ilyenek például a központi idegrendszer mikroglia sejtjei, a tüdő alveoláris makrofágjai, a csontrendszer oszteoklasztjai, vagy a máj Kuppfer sejtjei [27]–[31]. Képesek különböző molekuláris szignálokra megváltoztatni a funkciójukat, tehát plaszticitás jellemző rájuk. [32]. A szöveti környezettől és molekuláris szignáloktól függően két fő differenciálódási állapotot különböztetünk meg a makrofág sejtek esetében: klasszikusan aktivált, pro-inflammatórikus M1 és alternatív módon aktivált, anti-inflammatórikus tulajdonságokkal rendelkező M2 makrofágok (fontos kiemelni, hogy M2 makrofágokon belül többféle altípus különíthető el)



2. ábra: Klasszikus és alternatív úton differenciálódott makrofág sejtek molekuláris szignáljai Ricketts et. al alapján [33]

A tumort infiltráló leukociták egy jelentős részét teszik ki a TAM-ok, kapcsolódva a daganat asszociált gyulladásos folyamatokhoz [34]. Részt vehetnek a metasztázis képzésben, a tumorsejtek és endothél sejtek interakcióját követő extravazációban, így hozzájárulva a tumor növekedéséhez [35]. A tumor mikro környezetében lévő TAM populációk folyamatos M1 és M2 immunfenotípusok közötti átmenetben vannak.

Az M1 immunfenotípus-szerű TAM-ok polarizációjához olyan citokinek járulnak hozzá, mint az IFN- γ , IL-1 β , TNF- α és GM-CSF. Az M1 makrofágok a malignusan transzformált sejteket fagocitózissal, citotoxikus aktivitásukkal és gyulladásos citokinek szekretálásával célozzák meg [36].

Ezzel szemben az M2 immunfenotípus-szerű makrofágok Th-2 típusú citokinek által aktiválódnak, mint az IL-4, IL-13, IL-10 és M-CSF, és a tumor növekedést segítik elő immunosuppresszív hatásukkal. Ez főként TME átrendeződéssel, növekedést és érzékdzódést elősegítő faktorok, vagy pedig proteázok kiválasztásával valósul meg [23] [37], [38]. Azonban az M1/M2 polarizáció a TAM-ok esetében nem képez éles fenotipikus és funkcionális határt, hanem a tumor környezetében a sejtek dinamikusan változnak, illetve fenotipikusan és arányaikban is különbözőek az egyes tumorokon belül és tumorok között is.

2.2.2. Tumort infiltráló limfociták (TIL-ek)

Az emberi szervezet immunsejtjei folyamatosan ellenőrzik és eliminálják a malignusan transzformált sejteket, azonban a daganatsejtek egyik alapvető tulajdonsága, hogy képesek elkerülni az immunrendszer védekezőmechanizmusait. Ismert, hogy a tumor mikro környezetben a tumorsejteket célzó immunsejtek mellett jelen vannak olyan immunsejtek is, melyek a tumorsejtek átprogramozó hatása miatt melyek elősegítik a tumor növekedését. A TIL-ek pro-, és anti-tumor hatása közötti egyensúly nagymértékben függ a tumor mikro környezetétől, így jelenleg egy aktív és kiemelt fontosságú immunológiai kutatási terület a TIL-ek biológiája.

A melanóma tumor szövetben jelen lévő limfocita populációk összetétele a hisztopatológiai meghatározás mellett pre-klinikai és klinikai kutatásokban is vizsgált [39], [40]. Jelenleg a standard vizsgálati eljárás a biopszia, vagy az eltávolított tumor szövettani vizsgálatában a TIL-ek jelenlétének meghatározása. Ezen kívül egyre inkább

hangsúlyosabbá válik a limfociták kvalitatív immunológiai és molekuláris biológiai tulajdonságaira irányuló biomarkerek keresése [41], [42]. A TIL-ek jelenlétét melanómában Clark és munkatársa mutatták ki 1969-ben [43], és jellemzően három kategóriába sorolták őket: 1) hiányzó (*absent*) ha nincsenek jelen a tumorban [44] 2) nem-intenzív (*non-brisk*) TIL-ek azok a T-sejtek, amelyek fokálisan vannak jelen a tumorban, de nem találhatóak meg végig az invazív tumor alapon 3) intenzív (*brisk*) TIL-ek, melyek fellelhetőek a tumor invazív szerkezetében egészen a tumor vertikális növekedési részének alapján is [44], [45].

A TIL-ek lokalizációját tekintve megkülönböztetünk intratumorális, stromális és peritumorális infiltrációt [41] [46]. A T-sejtek alpopulációit nézve a CD8⁺ T-sejtek jelenléte pozitív, míg a FOXP3⁺ Treg sejtek a tumorban általában negatív prognózissal korrelálnak [39] [47]. A CD8⁺ citotoxikus T-sejtek az anti-tumor hatásukat perforin és granzim granulumok exocitózisával, illetve TNF- α és IFN- γ citokinek szekréciójával fejtik ki [48], [49]. Emellett a CD8⁺ T-sejtek hatásmechanizmusához a tumor mikro környezetben Böttcher és Sousa kutatásai alapján az egyes típusú konvencionális dendritikus sejtek (cDC1) hozzájárulása is elengedhetetlen [50]. Melanómás páciensekből származó nyirokcsomó áttétek analízisét követően azok a CD8⁺ T-sejtek, melyek kifejezik a CXCR3 és CCR9 kemokin receptorokat, a C-típusú lektint, vagy az NKG2D receptort pozitívabb prognózissal jártak [51]. A TIL-ek között szintén egy fontos minőségi különbség, hogy egyes CD39⁺ T-sejtek aktívan részt vesznek az tumor célba vételében (pl.: felismerik a tumor antigéneket) míg egyes sejtek olyan molekulákat, gátló receptorokat expresszálnak, mint a PD-1, vagy a TIGIT (T cell Immunoreceptor with IgG and ITIM domains), melyeket korábban a funkcionálisan kimerült T-sejtek jellegzetességeként írtak le [52], [53]

A CD8⁺ citotoxikus T-sejtek mellett CD4⁺ Th (Thelper) sejtek is részt vesznek az anti-tumor immunválaszban [54]. Szintén képesek az IFN- γ szekrécióra, valamint másodlagos nyirokszervekben hozzájárulnak a CD8⁺ T és B sejtek modulálásához [54], [55] Transzkripciós faktoraik és citokin termelésük alapján különböző differenciálódási irányokat írtak le a CD4⁺ T-sejtekben, melyek közül a leggyakoribb a Th1, Th2, Th17, TFH és FOXP3⁺ Treg irány [54]. A Th1 sejtek anti-tumor hatásukat a korábban említett IFN- γ termelés mellett az NK sejtek és M1 típusú makrofágok toborzásán keresztül fejtik ki, míg a Treg sejtek gátolhatják a tumoron belüli más T-sejt populációk funkciót, így hozzájárulva az immunszuppresszív hatáshoz [39] [56].

A Treg sejtek immunszuppresszív hatása eltérő módokon valósul meg: immunszuppresszív citokineken keresztül (IL-10, IL-35, TGF- β), direkt citotoxikus hatással (perforin, granzim), az antigén prezentálás direkt szabályozásán (CTLA-4), vagy pedig az effektor T-sejtek előli IL-2 megvonáson keresztül (ez főként a magas IL-2 receptor α alegység expresszióval történik, mely az effektor T-sejtek IL-2 szint csökkenéséhez vezet [57]–[59]).

A T-sejtek mellett B-sejtek és plazmasejtek is jelen vannak a tumort infiltráló limfociták között, és részt vesznek az anti-tumor immunválaszban. Önmagukban ritkán fordulnak elő, inkább közeli asszociációban állnak T-sejtekkel, mieloid sejtekkel és más immunsejtekkel [60]. Az anti-tumor immunválaszban kimerült CD4⁺ és CD8⁺ T-sejteken például gyakori a B-sejteket toborzó CXCL13 kemokin ligand, ami arra utal, hogy a tumor környezetébe vonzzák a B sejteket, hogy antigén prezentációjukkal, antitest termelésükkel, vagy pedig citokin szekréciójukkal hozzájáruljanak az anti-neoplasztikus immun hatáshoz [61], [62].

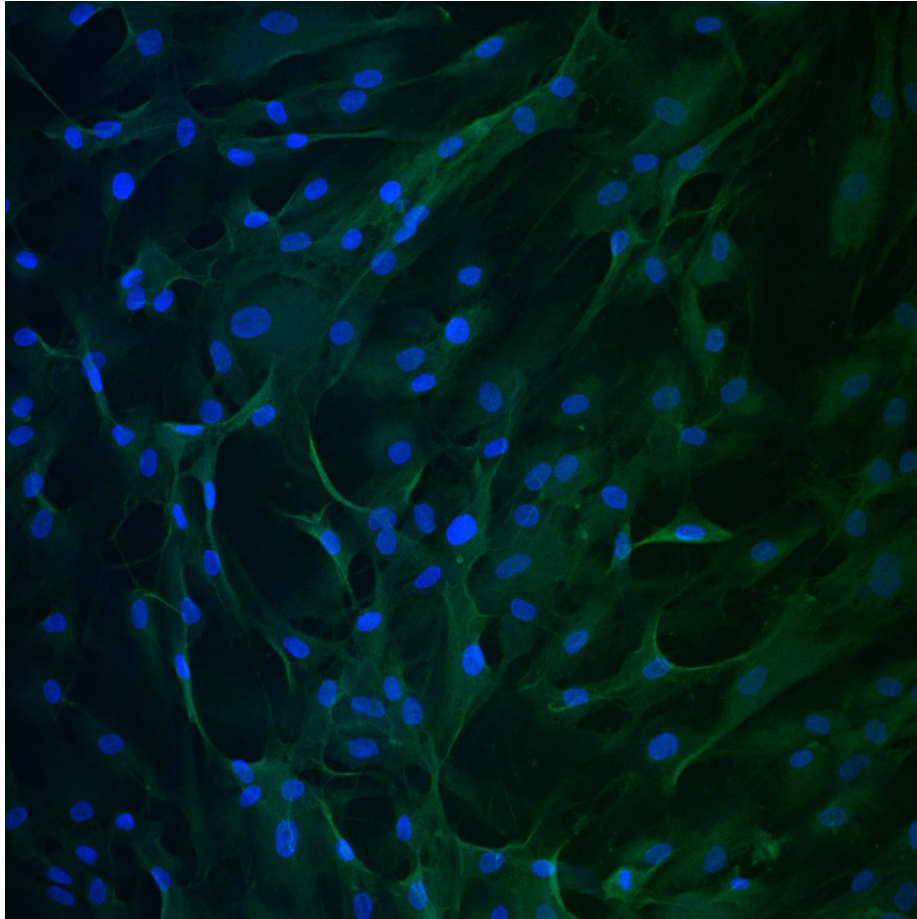
Melanómában a tumor stromán belül jelentős B-sejt populáció található. Az egészséges bőr szövethöz képes a CD22⁺ B-sejtek nagyobb mértékben találhatóak meg, valamint további CD20⁺ és CD22⁺ populációk fedezhetőek fel az áttétekben [63], [64]. Az anti-tumor immunválaszhoz melanóma antigének elleni antitest termeléssel járulnak hozzá, továbbá pro-inflammatórikus citokinek, mint a TNF- α , IL-2, vagy az IFN- γ szekréciójával [65], [66].

2.2.3. Melanóma asszociált fibroblasztok (MAF-ok)

A humán bőr fibroblaszt sejtek a bőr papilláris és retikuláris dermisz rétegében elhelyezkedő kötőszöveti sejtek, melyek fiziológiás körülmények között az epidermális regenerációban, sebgyógyulásban és ECM fenntartásában vesznek részt [67]–[69]. Többségük mezoderma eredetű primitív mesenchymából származik a gasztrulációt követően, míg egy kisebb részük az ektodermához tartozó dúclécből fejlődik ki [70], [71]. Egészséges, sérülésmentes bőrszövet esetén a dermális fibroblasztok nyugvó (quiescent) állapotban vannak jelen (kivétekt képeznek a hajciklus során aktív dermális papilla fibroblasztjai) [72].

A MAF-ok olyan tumort támogató strómális sejtek a tumor mikrokörnyezetében, melyek az extracelluláris mátrix átalakításával, növekedési faktorok termelésével és az érképződés befolyásolásával járulnak hozzá a tumor túléléséhez és az áttétek képződéséhez [65]. Az aktív és a nyugvó állapotú fibroblasztok egyaránt megtalálhatóak a tumor stromában. A két populáció elkülönítésében egyedi sejtfelszíni, illetve szekrációs markerek segítenek.

Az aktív fibroblasztokat magas alfa simaizom aktin (α -SMA), vérlemezke-eredetű növekedési faktor receptor alfa/béta (PDGFR α/δ) és fibroblaszt aktivációs fehérje (FAP) expressziójuk különbözteti meg a nyugvó dermális fibroblasztoktól [73], [74]. Az α -SMA expresszió mellett, kontraktilis stressz-szálakat és ED-A splice-variáns fibronektint is termelnek [75]. Emellett emelkedett expresszió figyelhető meg a fibroblaszt-specifikus fehérje-1 (FSP-1), oszteonektin, dezmin, podoplanin (PDPN), neurális-gliális antigén 2 (NG2), CD90/THY-1 és mesenchymális vimentin fehérjék szintjében is [76], [77]. Bizonyos markerek jelenléte, mint a FAP⁺ CD90⁺ és α -SMA⁺ fibroblaszt populációk predikciós markerként szolgálhatnak egyes terápiák hatékonyságának előrejelzésére, mint például az anti-PD1 monoterápiára melanómában [78]. Nemcsak immunterápiában, hanem BRAF gátló szerekre adott rezisztenciához is hozzájárulnak előrehaladott melanómában [79].



3. ábra: Melanóma-asszociált fibroblasztok konfokális mikroszkópos felvétele CD90/THY-1, Alexa488 és sejtmagi DAPI jelöléssel

Általánosan a CAF-ok aktivációjában részben inflammatorikus modulátorok játszanak szerepet, mint az IL-1 az NF κ B jelpályán keresztül, vagy az IL-6 a STAT transzkripció faktoron keresztül [80], [81]. Továbbá szerepe lehet az aktivációban a TGF- β Smad2 jelátviteli útvonalának, az extracelluláris mátrixnak, a CAF sejt DNS szerkezetében történő epigenetikai változásoknak [82], vagy a tumorsejtek által szekretált exoszómáknak is, melyek új receptorok, vagy mikro-RNS-ek (miRNS) és hírvivő RNS-ek (mRNS) felvételére ösztönzik a CAF-okat [83],[84]. Az exoszómális aktivációs út, melyben a melanóma sejtek által szekretált pigmentált vezikulumok (melanoszómák) eljutnak az epidermális réteg normál fibroblaszt sejtjeihez már bizonyított, hogy megtörténik a melanóma dermiszbe való áttörése előtt [85]. Ezzel együtt a parakrin mediátorok összehangolt működésével együtt kialakul a tumor mikrokörnyezet, melyben a fibroblasztok CAF-okká programozódnak át.

Emellett a TGF- β és más TGF családba tartozó molekulák, mint az Aktivin-A nem csak a CAF aktivációra hatnak, hanem kiemelt szerepük van a makrofágok polarizációjában is [86], mely szintén a tumor növekedését segíti elő.

Melanómában a MAF-ok jelenléte a tumor stromában növeli az áttétképződés kockázatát az ECM átalakításán keresztül, valamint terápiás készítményekre adott rezisztencián át [87]. Emellett növekvő számú tudományos bizonyíték támasztja alá, hogy a MAF-ok immunszuppresszív hatásának szerepe van a tumor és stromában elhelyezkedő immunsejtek közötti rendszerben [88], [89].

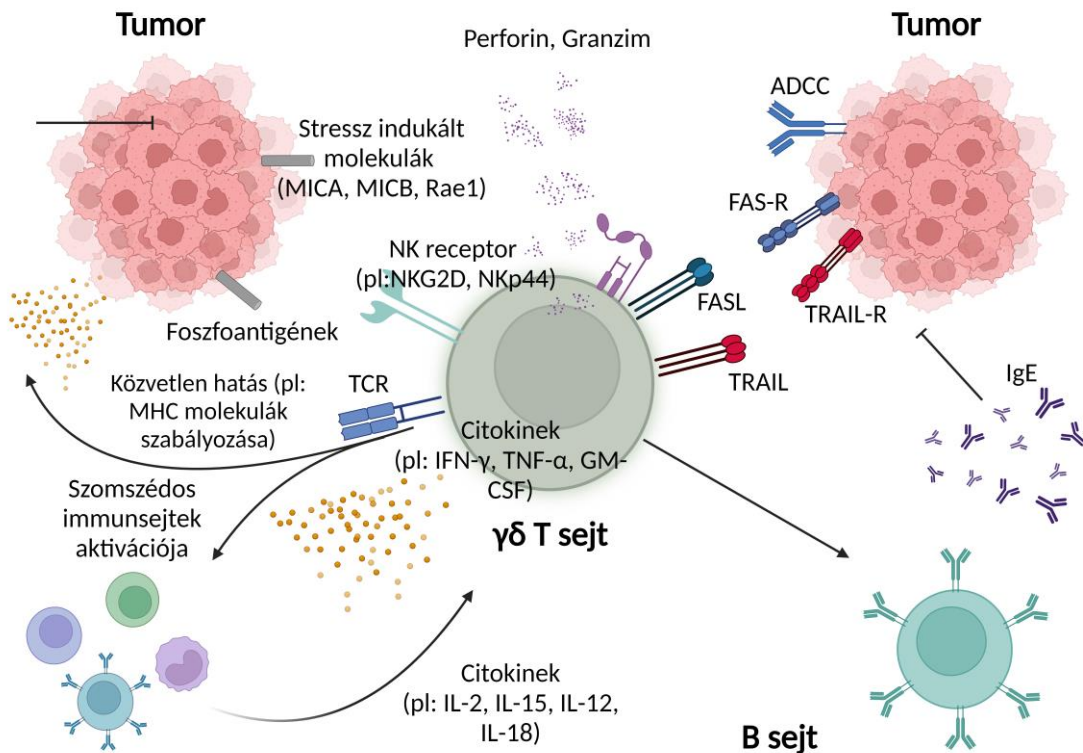
2.3. Gamma delta T-sejtek

A humán $\gamma\delta$ T-sejtek a perifériás vér limfocitáinak az 1-5%-át teszik ki [90]. Általánosan két fő csoportra oszthatóak a T-sejt receptoruk δ lánc alapján (fontos megemlíteni, hogy ezen kívül kisebb számban további csoportok is előfordulnak): V δ 1 és V δ 2 T-sejtekre [91]. A perifériás vérben a leggyakoribb $\gamma\delta$ T-sejt receptor (TCR) egy variábilis (V) V γ 9 és egy V δ 2 láncból áll (V γ 9V δ 2, rövidebben V δ 2) [92]. A V δ 2 láncot hordozó sejtek a vér $\gamma\delta$ T-sejtjeinek 50-95%-át teszik ki, mely arány egyénekenként nagymértékű változatosságot mutat [93]. A másik leggyakoribb alpopuláció a V δ 1 és V γ 2/3/4/5/8 láncsal rendelkező $\gamma\delta$ T-sejtek, melyek főként a gasztrointesztinális rendszer epitheliális részein, a bőr dermisz rétegében, vesében, valamint májban fordulnak elő, és az epitheliális szöveti integritásért felelősek [94].

A $\gamma\delta$ T-sejtek hidat képeznek a veleszületett és adaptív immunrendszer között. Hasonlóan az adaptív immunitás limfocitáihoz képesek a T-sejt receptoruk klonális szelekciójára, míg a veleszületett immunrendszer sejtjeihez hasonlóan nincs szükségük antigén prezentáló sejtekre az effektor funkciójuk betöltéséhez [95]. Továbbá osztoznak a veleszületett immunitás sejtjeinek receptoraiban, mint a természetes ölüsejtek receptorai: NKG2D, NKp30 és/vagy NKp44, melyek közvetlen módon aktiválják a sejtek citotoxikus funkcióit, vagy bizonyos toll-like receptorok (TLR), melyek kostimulációs jelként szolgálnak [96]–[99].

A konvencionális $\alpha\beta$ T-sejtekkel szemben az antigén felismerő képességük nem a fő hisztokompatibilitási komplexhez (MHC, emberi szervezetben: HLA-Humán Leukocita Antigen) kötött peptidekre, hanem foszfo-antigénekre irányul. Így MHC független módon

is képesek felismerni antigéneket [95]. Foszfo-antigének (P-Ag), mint a bakteriális hidroximetil-butyl-pirofoszfát (HDMAPP/HMBPP), vagy a humán az izopentenil-pirofoszfát (IPP) olyan molekuláris jelátviteli pályákon keletkeznek, mint a bakteriális nem-mevalonát útvonal (1-dezoxi-D-xilulóz 5-foszfát, vagy más néven MEP: 2-C-metil-D-eritrit 4-foszfát), vagy a humán mevalonát jelpálya [100]–[102]. A mevalonát, vagy HMG-KoA-reduktáz jelpálya eukariótákban, ősbaktériumokban és néhány bakteriális törzsből is jelen lévő anyagcsere útvonal, mely az acetil-koenzim A-ból indul ki és IPP vagy dimetil-allil-pirofoszfát termékeket eredményez [103]. A modern orvostudományban ezt a jelátviteli útvonalat célozzák meg a koleszterin szint csökkentésére irányuló statinok. Azok a sejtek, melyekben metabolikus zavar alakul ki (főként daganatsejtek) akkumulálják a mevalonát útvonal anyagcsere termékeit, mint az IPP, amelynek kötődését a target sejt butirofilin 3A1 (BTN3A1) molekulájához képesek érzékelni a $\gamma\delta$ T-sejtek. Ez az aktiváció megvalósítható exogén természetes, vagy szintetikus foszfo-antigénekkal, valamint a mevalonát útvonal farnezil-pirofoszfát-szintáz (FPPS) enzimét gátló N-tartalmú aminobiszfoszfonátokkal is [104]–[107].



4. ábra: A $\gamma\delta$ T-sejtek és tumor sejtek molekuláris interakciói Park és Lee alapján [108]

2.4. MAF-ok immun-moduláló hatása

A MAF-ok funkcionális hasonlósága a csontvelői stromasejtekkel adta azt a kezdeti hipotézist, hogy a MAF-ok is képesek immunmoduláló hatást kifejteni az immunsejtekre. A kísérleti adatok arra utalnak, hogy a tumor mikrokörnyezetben lévő immunsejtek gátlásával és modulálásával (CD8+ T-sejtek, NK sejtek,) a MAF-ok hozzájárulhatnak a melanóma tumor növekedéséhez és áttét képzéséhez [109], [110]. Emellett olyan kemokineket is szekretálnak (mint a monocita kemotaktikus fehérje 1: MCP-1/CCL-2 és a stromális sejt-eredetű faktor 1: SDF-1), melyek a tumor környezetébe vonzzák a monocitákat [111]. A TME-ben ismert más daganatok esetén, hogy a CAF-ok direkt interakció során készítetik a monocitákat illetve makrofágokat tumort támogató, immunszuppresszív fenotípus kialakítására [112], [113].

A makrofágok átprogramozása anti-inflammatórikus (M2) fenotípussá ismert mesenchymális őssejtek (MSC-k) esetében [114]–[116]. Az M2 irányú polarizáció indukálása a ciklooxygenáz-2 (COX-2) jelpályán keresztül valósul meg [116]: Az MSC-k és MAF-ok esetében is az exogén gyulladásos folyamatok toll-szerű receptor (TLR) interakción keresztül elindítják a nukleáris faktor kappa B (NF κ B) fehérje expresszióját, amely emelkedett COX-2 szintet eredményez. Az emelkedett COX-2 enzimszint több prosztaglandin E2 (PGE2) szintézishez vezet. A kibocsátott PGE2 a makrofág sejtek PGE2 receptoraival lép kapcsolatba, így növelve az anti-inflammatórikus IL-10 citokin termelését, és ezzel párhuzamosan lecsökken a pro-inflammatórikus TNF- α termelés [116], [117]. Habár a MAF-makrofág interakcióban szerepet játszó teljes molekuláris repertoár feltérképezése hatalmas kihívás, egyes kulcs molekulák azonosítása információval szolgálhat az anti-tumor immunválasz kivédéséről. Ebből kifolyólag az egyik legpotensebb immunszuppresszív citokin, az IL-10 vizsgálata előrejelzés lehet a tumor progressziójáról és a csökkent túlélési esélyekről. [118].

Melanómában a COX-2 expressziója a tumor vertikális inváziójával, az angiogenezissel, valamint a BRAF gátlók és ICI terápiákra adott rezisztenciával mutat korrelációt [119]. A melanóma egyik kulcs immun szabályozó molekulája az indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO) [119]. Az IDO enzim a kinurenin jelátviteli úton átalakítja a triptofánt kinureninné, amely

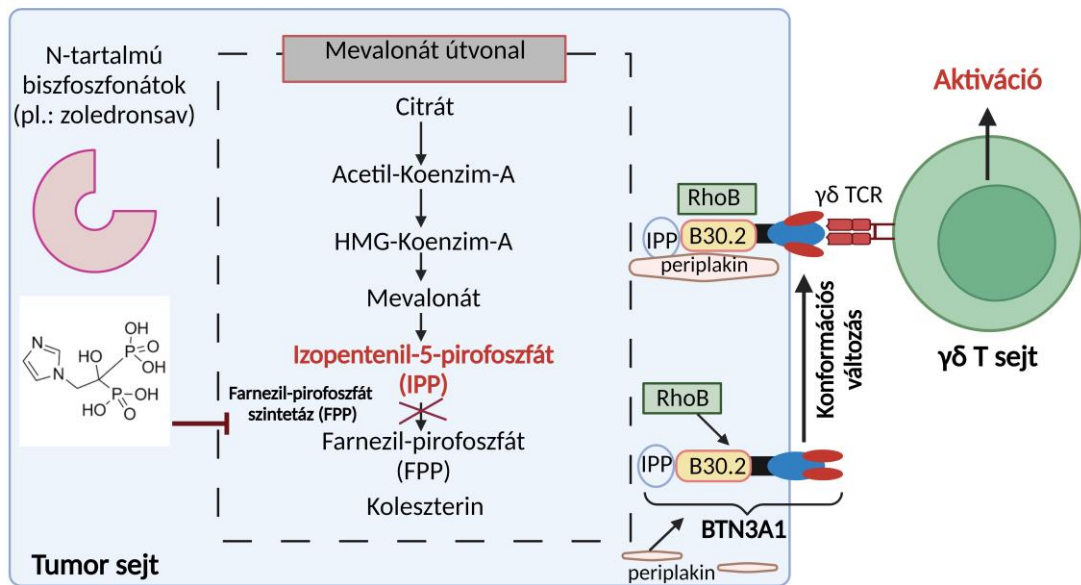
képes a citotoxikus CD8⁺ T-sejtek és NK sejtek gátlására, valamint hozzájárul a regulációs T-sejtek és MDSC-k toborzásához a tumor mikrokörnyezetbe [120]. Melanóma sejtekben az IDO növeli a PGE2 expresszióját [121], így közvetetten létrehozva az anti-inflammatórikus környezetet.

2.4 A zoledronsav hatásmechanizmusa

A zoledronsav egy harmadik generációs nitrogén tartalmú biszfoszfonát gyógyszer, amelyet az amerikai Élelmiszer-, és Gyógyszerellenőrző Hivatal (US FDA: United States Food and Drug Administration) 2007-ben fogadott el. A biszfoszfonátok közel 50 éve vannak jelen a gyógyszerpiacon, melyeket klinikai alkalmazásban kalcium reszorpciót gátló tulajdonságuk miatt különböző csontrendszert érintő jó-, és rosszindulatú elváltozásokban alkalmaznak [122], [123]. Az indikációk közé tartoznak bővebben a posztmenopauzális osteoporózis, a glükokortikoid-indukált osteoporózis, Paget kór, malignus hiperkalcémia, myeloma multiplex, és primer tumorok csontáttétei [124]–[128]

A nitrogén tartalmú biszfoszfonátok, mint a zoledronsav nagyobb affinitással képesek kötődni a csont szöveti állományának ásványi anyag részéhez (például a Ca²⁺-hoz), mint az új csont rész kialakulásánál szerepet játszó inorganikus pirofoszfát (PPi), így képesek az aktív csont átrendeződés alatt álló szöveti részekhez kötődni. A zoledronsav ezután az oszteoklasztok lebontó folyamatai során válik szabaddá. Az oszteoklasztokon belül a mevalonát jelpálya farnezil-pirofoszfát szintáz (FPPS) enzim aktivitását gátolja [129]. A jelpálya blokkolásával nem valósulnak meg azok a fehérje poszttranszlációs módosítások, melyek az oszteoklasztok túléléséhez szükségesek [129], így azok apoptózisához vezet. Fontos kiemelni, hogy az oszteoblasztok aktivitására nincs hatással a zoledronsav. Így a csontképződési egyensúlyi folyamatokat tekintve a metabolikus irány a csontképződés felé tolódik el.

A FPPS enzim blokkolásával a N-tartalmú biszfoszfonátok, (mint a zoledronsav) képesek bizonyos sejttípusokban indukálni a foszfo-antigének akkumulációját olyan mértékben, amely végső soron a $\gamma\delta$ T-sejtek aktivációjához vezet (lásd 5. ábra) [130].



5. ábra: A zoledronsav $\gamma\delta$ T-sejteket aktiváló mechanizmusa Miyashita et. al alapján [131]

A tumorsejtek mellett a perifériás vér immunsejtjei (leginkább a monociták) is képesek felvenni a zoledronsavat, és közvetetten termelni foszfo-antigéneket, hozzájárulva a perifériás $\gamma\delta$ T-sejtek aktiválásához [132]. Ezt a hatást felhasználva a biszfoszfonátok (zoledronsav, pamidronát), és a szintetikus foszfo-antigén (pl.: bromohidrin-pirofoszfát: BrHPP, vagy 2-metil-butinil-1-pirofoszfát: 2M3B1PP) daganatterápiás potenciálja egyéb $\gamma\delta$ sejteket aktiváló (pl.:IL-2) citokin kombinációjával ígéretes eredményeket mutat [133], [134].

3. Célkitűzések

A melanómával kapcsolatos jelenlegi kutatások jelentős része a tumor sejtekre irányul. Ezzel szemben a doktori dolgozatom célja nem a tumorsejtek, hanem a tumor mikrokörnyezet egyéb sejtjeinek tanulmányozása, ezen belül a tumor stromát képező MAF-ok és egyes immunsejtpopulációk kölcsönhatásának elemzése volt. Először a MAF-ok és primer makrofágok interakcióját vizsgáltam, a MAF-ok immun-moduláló, immunszuppresszív hatását tekintve. Ezt követően, a MAF-ok és egy sajátos tumorellenes hatású immunsejt populáció, a $\gamma\delta$ T-sejtek kölcsönhatását vizsgáltam abból a szempontból, hogy vajon képesek lehetnek-e a $\gamma\delta$ T-sejtek elpusztítani az immunszuppresszív MAF-okat. Kutatásomhoz az alábbi részletesebb célkitűzéseket fogalmaztam meg:

1. A mesenchymális stromasejtek egyik fő ismérve az immunmoduláció. Mivel a MAF-ok funkcionális hasonlóságot mutatnak az MSC-kkel, mint például a citotoxikus CD8⁺ T-sejtek aktivitásának gátlása, először arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a MAF-ok hogyan befolyásolják a makrofágok immunfunkcióit. Első célkitűzésem az volt, hogy az immunmoduláció vizsgálatához primer monocitákból M1 és M2 makrofágokat hozzak létre egy *in vitro* differenciációs esszé kidolgozásával.
2. A második célkitűzésem során a monocitákból differenciáltatott M1 és M2 makrofágokat terveztem vizsgálni egy olyan kokultúra esszében, amelyben a makrofágokat a már korábban izolált MAF sejtekkel együtt tartom, és a kokultúra LPS stimulálását követően az immunszuppresszív hatású IL-10 citokin mennyiségét mérem a sejtes felülúszóból.
3. A $\gamma\delta$ T-sejtek felhasználása ígéretes terület a sejterápiás kutatásban és fejlesztésben. Mivel különböző daganattípusokban a tumorsejtek és $\gamma\delta$ T-sejtek interakciója extenzív módon vizsgált, a vizsgálataim a $\gamma\delta$ T-sejtek és MAF-ok interakciójára irányultak, abból a szempontból, hogy vajon az immunszuppresszív hatású MAF-ok elpusztíthatók-e az anti tumor hatású $\gamma\delta$ T-sejtekkel. Ehhez a harmadik kitűzött céloom a $\gamma\delta$ T-sejtek perifériás vérből való felszaporítása és izolálása volt.

4. A továbbiakban a negyedik célom az volt, hogy az izolált $\gamma\delta$ T-sejtek és MAF-ok segítségével megállapítsam, hogy lehet-e olyan *in vitro* feltételeket teremteni, amelyek mellett képesek a $\gamma\delta$ T-sejtek a MAF-okban apoptózist indukálni.
5. A $\gamma\delta$ T-sejtek MHC-független antigén felismerő tulajdonsággal rendelkeznek. Ötödik célkitűzésként azt vizsgáltam, hogy a megfelelően beállított apoptózis esszékben a melanóma kórtörténettel rendelkező páciensekből izolált $\gamma\delta$ T-sejtek képesek-e MHC független módon az azonos páciensből származó MAF-okban apoptózist indukálni.
6. Hatodik célkitűzésként azoknak a molekuláknak a felderítését terveztem, amelyek az *in vitro* esszékben a $\gamma\delta$ T-sejtek által indukált MAF apoptózis mechanizmusában szerepet játszanak.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Szövetminták és sejtkultúra

4.1.1 Primer Melanóma-asszociált fibroblasztok (MAF) és normál dermális fibroblasztok

2015 és 2019 között kutatócsoportunk Clark szerint III-V-es stádiumú melanóma pácienseket vont be a vizsgálatainkba, melyek a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani-, és Bőronkológiai Klinikáján zajlottak. A betegek tájékoztatását és írásos beleegyezését követően a kimetszett primer tumorrészek, illetve áttétek szövetállományának a szövettani vizsgálathoz nem szükséges részét összegyűjtöttük és a mintákból sejteket izoláltunk az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság jóváhagyásával (ETT TUKEB 32/2007, kiegészítve: 32-2/2007 és 32-3/2007). A tudományos kutatásainkat a Helsinkai Deklaráció etikai irányelvei alapján végeztük.

A MAF sejtek melanómás betegek primer tumor részéből, illetve metasztatikus szövetállományból kerültek izolálásra. A tumor belső szöveti részét körülbelül 1 mm³ méretre daraboltam majd 20 mL Dulbecco's Modified Eagle Mediumban (DMEM) 200 U/mL IV-es típusú kollagenáz és 0,6 U/mL diszpáz (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) enzimek segítségével disszociáltam (Thermo Scientific) [135]. A MAF sejtek elkülönítése a tumor sejtektől differenciál adhézióval történt (30 perc elteltével a fibroblaszt sejtek a sejtenyésző flaskák alján letapadtak, míg a melanóma sejtek a médiumból a felülúszóval együtt eltávolításra kerültek) Az NDF sejtek izolálása hasonlóan történt nem melanómás donorok *naevus* kimetszéseinek ép bőr részéből.

Páciens ID	MAF Eredet	Nem	Kor	Primer Melanóma Részletei				BRAF	LNM	DM	REF
				Altípus	Breslow (mm)	Clark	MI				
MAF17	PT	N	50	SSM	2,93	IV	14	pozitív	n/e	van	<i>Cakir et. al (2021)</i>
MAF22	PT	F	74	NM	6,23	IV	18	wt	van	n/e	<i>Cakir et. al (2021)</i>
MAF31	CM	N	54	nem osztályozható	18,21	V	42	wt	van	van	<i>Cakir et. al (2021)</i>
MAF32	PT	N	61	SSM	0,41	II	0	wt	nincs	nincs	<i>Hajdara et. al (2023)</i>
MAF41	CM	F	43	SSM	0,95	III	4	pozitív	van	van	<i>Cakir et. al (2021)</i>
MAF43	PT	F	48	nem osztályozható	17,50	V	26	wt	nincs	van	<i>Hajdara et. al (2023)</i>
MAF45	PT	N	90	NM	13,24	IV	46	n/e	n/e	n/e	<i>Cakir et. al (2021)</i>
MAF47	CM	F	67	SSM	6,18	IV	5	pozitív	van	van	<i>Cakir et. al (2021)</i>
MAF54	PT	F	74	NM	13,24	V	48	pozitív	n/e	van	<i>Cakir et. al (2021)</i>
MAF55	PT	F	57	nem osztályozható	12,30	V	18	pozitív	van	van	<i>Cakir et. al (2021)</i>
MAF56	CM	N	71	SSM	3,40	IV	12	pozitív	nincs	van	<i>Cakir et. al (2021)</i>

1. táblázat: Klinikai patológiai tulajdonságai a melanóma páciensekből származó bőrmintáknak, melyekből a MAF-ok kerültek izolálásra. CM: cutan melanóma, DM: távoli áttét (distant metastasis), N-nő, LNM: nyirokcsomó áttét (Lymph Node Metastasis), F-férfi, MI-mitózis index, n/e- nem elérhető adat, NM-noduláris melanóma, PT-primer tumor, SSM-felszínen terjedő melanóma, wt-vad típus

4.1.2. MAF sejtek karakterizálása

A MAF sejtek extenzív karakterizálását kutatócsoportunk tagjai végezték [109]. Fontos volt megállapítani, hogy az *in vitro* sejt kultúrák valóban csak MAF-okat tartalmaznak, és nem tartalmaznak melanóma sejteket. Ehhez három sejt felszíni marker áramlási citometriai vizsgálata járult hozzá: a melanóma specifikus gp100 és MelanA, illetve a CAF specifikus FAP. Kísérleteinkhez csak olyan MAF sejt kultúrákat használtunk fel, melyek gp100 és Melan-A pozitivitása nem haladta meg a 3-4%-ot.

A MAF sejtek csontvelői MSC-hez hasonló tulajdonságait vizsgálva a differenciálódási kapacitásuk (oszteogén és adipogén differenciálódási irány) [117] mellett az MSC-kre jellemző sejt felszíni markereket is vizsgáltam. A fluoreszcein-izotiocianát (FITC) konjugált CD44, CD73, CD90, CD105 pozitív és CD31, CD45 negatív markerek analízise áramlási citometriával történt Cytoflex V5-B5-R3 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) készüléken és FlowJo® szoftver segítségével (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

A citometriai adatok kiértékelésének kapuzási stratégiája a következőképp valósult meg: a fő populáció meghatározása, és a 7AAD festék segítségével elkülönített halott sejtek kizárását követően az élő sejteket elemeztem. Az MSC markerekre pozitív populációk meghatározását festetlen kontroll mintákhoz hasonlítva végeztem el.

4.1.3. Primer monocita izolálás

A primer monociták izolálását egészséges önkéntesek perifériás vérének mononukleáris sejtjeiből (PBMC) végeztem. A vénás vért 1:1 arányban hígítottam foszfát pufferelt sóoldattal (PBS). Ezt követően a hígított vért 25 milliliterként 15 mL Ficoll-Paque Plus tartalmú 50 mL-es Leukosep csövekbe osztottam szét, majd 15 percig centrifugáltam 800 g sebességgel, szobahőmérsékleten, illetve a centrifuga fék kikapcsolása mellett. A gradiens centrifugálást követően a PBMC felhőt („buffy coat”) összegyűjtve a sejteket PBS-sel mostam, centrifugáltam, majd a monocita izoláláshoz szükséges gyártói protokollban leírt 0,05% szarvasmarha szérum albumin (BSA) és 2 mM EDTA tartalmú PBS oldatban szuszpendáltam.

Az izolálási lépéseknél a gyártói protokollt pontosan követtem [Miltenyi Biotec katalógusszám: 130-050-201]. Röviden, a heterogén immunsejtekből álló populációból a monocitákat azok sejt felszínén található CD14 markerre specifikus mágneses gyöngyökhöz kötött CD14 antitesttel mágneses 'LS' méretű oszlopon izoláltam ('Mágnes-Aktívált Sejtválogatás': MACS) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

A mágneses szeparáció hatékonyságát CD14-FITC (FITC, Biolegend, San Diego, CA, USA) jelöléssel és áramlási citométerrel (BD FACSCalibur™ rendszer, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) ellenőriztem, összevetve a mágneses oszlopon átfolyó (CD14 monocitákra nézve negatív) frakciót az oszlopon maradt, majd eluált (CD14 monocitákra nézve pozitív) frakcióval.

4.1.4 Monocita sejtek M1/M2 irányú makrofág differenciációja és karakterizálása

A humán vérből izolált primer monocita differenciációt megelőzően a megfelelő citokin miliőt és koncentrációkat THP-1 humán monocita sejtvonalon állítottuk be. Az M0, M1, illetve M2-szerű immunfenotípussá való polarizáció alapjául egy publikált protokoll szolgált [136].

A THP-1 monocitákat $2 \cdot 10^5$ sejt számban 96-lyukú sejtenyésző lemezre ültettük ki, majd 20 ng/mL forbol-12-mirisztil-13-acetát (PMA, Sigma Aldrich) hozzáadásával 24 óráig inkubáltuk a sejteket. Ezt követően 24 óráig friss Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1650 médiumban tartottuk őket, majd újabb 24 óra múlva elérték a THP-1 sejtek az M0 makrofág fenotípust. A polarizáció elérése érdekében ezután az M0-THP-1 sejtek 24 óra 20 ng/mL IFN- γ (R&D Systems) és 10 pg/mL bakteriális lipopoliszacharid (LPS, Sigma-Aldrich) inkubáció után M1-THP1 fenotípussá differenciálódtak. Az M2-THP1 polarizációhoz az M0-THP-1 sejteket 72 órán keresztül 20 ng/mL IL-4 (Peprotech) és 20 ng/mL IL-13 (Peprotech) citokinekkal kezeltük.

Az M1-szerű CD38 (BioLegend) [137], [138] és M2-szerű CD209 (BioLegend) [138], [139] sejt felszíni markerek expresszióját a THP-1-makrofág sejteken áramlási citometriával határoztam meg (BD FACSCalibur™ system, BD Biosciences, San Diego, CA, USA). A citometriai adatok kiértékeléséhez FlowJo® szoftvert használtam.

A friss PBMC-ből izolált primer monocita sejtek M1 és M2 irányú differenciációja különböző citokin miliőben zajlott 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin, 1% L-glutamin tartalmú (RPMI) médiumban.

A pro-inflammatórikus, M1 irányú makrofágok polarizációja kilenc napig tartott 20-20 ng/mL granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF, Peprotech), IFN- γ (Peprotech), LPS (Sigma-Aldrich) és IL-6 (Peprotech) jelenlétében.

Az anti-inflammatórikus M2 irányú differenciáció szintén 20-20 ng/mL makrofág kolónia stimuláló faktor (M-CSF, Peprotech), IL-4 (Peprotech), IL-6 (Peprotech) és IL-13 (Peprotech) környezetben történt. Mindkét immunfenotípus esetében a differenciáció kezdetétől számított ötödik napon médiumcsere történt és a citokineket a kezdeti koncentrációval megegyező módon pótoltam.

A makrofágokon az immunfenotípusokra jellemző markerek közül M1-re jellemző CD11c (BioLegend) [140], [141], és M2 sejtekre jellemző CD163 (BioLegend) [142] és CD206 (BioLegend) [143], [144], markereket áramlási citometriával ellenőriztem Cytoflex V5-B5-R3 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) készüléken és FlowJo® szoftverrel. Fontos megemlíteni, hogy M1 és M2 immunfenotípusú makrofágokat *in vitro* körülmények között nem lehet sejtfelszíni markerek alapján homogén populációként elkülöníteni, így a felsorolt markerek különböző arányban vannak jelen az M1 és M2 sejteken.

4.1.5. Primer $\gamma\delta$ T-sejt expanszió és izolálás

A primer $\gamma\delta$ T-sejteket egészséges önkéntesek PBMC-jéből izoláltam (PBMC izolálás a 4.1.3. pontban leírt módon). A PBMC-k 3 millió sejt/lyuk kezdeti sejtszáman lettek kiültetve 6-lyukú sejttenyésztő lemezekre, 4 mL RPMI médiumban, kiegészítve 10% FBS-sel, 1% L-glutaminnal és 1% Penicillin-Streptomycinnel 7 napig. A $\gamma\delta$ T-sejtek expansziójához 5 μ M zoledronsavat (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) és 100 IU/mL IL-2 (IL-2; Peprotech, Offenbach, Germany) citokint használtam. A negyedik napon a teljes médiumot lecseréltem és friss RPMI médiummal, zoledronsavval és IL-2 citokinnel pótoltam a sejt kultúrát.

A $\gamma\delta$ T-sejteket pozitív szelekcióval anti-humán TCR $\gamma\delta$ antitesthez kötött mikrogöngyök és 'LS' méretű mágneses oszlop (Miltenyi Biotec) segítségével izoláltam. Követve a gyártó által biztosított protokollt a heterogén PBMC populációból az oszlopra kötött, majd eluált $\gamma\delta$ T-sejteket gyűjtöttem össze. A szeparáció tisztaságát $\gamma\delta$ TCR-FITC jel alapján ellenőriztem a negatív (átfolyó) és pozitív (eluált) frakciókból BD FACSCalibur™ áramlási citométer segítségével.

A $\gamma\delta$ T-sejtek expanszióját és izolálását melanómás páciensek véréből a leírt protokollal megegyező módon végeztem el.

4.2. Funkcionális esszék

4.2.1. IL-10 citokin mérés MAF és primer makrofág kokultúrában

A MAF sejteket 5×10^4 sejtszámban ültettem ki 96-lyukú sejttenyésztő lemezekre, majd $2,5 \times 10^4$ differenciált makrofág sejt került a MAF-okhoz 10% FBS, 1% L-glutamin, 1% penicillin-streptomycin tartamú DMEM médiumban. 24 óra kokultúrát követően a citokin termelés növelése (és mérhető tartományba kerülése) érdekében $1 \mu\text{g/mL}$ bakteriális LPS-t adtam a sejtekhez és 18 órán keresztül inkubáltam. A sejtes lemezeket ezt követően 400g fordulatszámra 5 percig centrifugáltam, majd a sejtmentes felülúszókat összegyűjtöttem, és az IL-10 mérés időpontjáig $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltam.

Az IL-10 citokin szint Enzimmel Kapcsolt Immunsorbens vizsgálattal történt (ELISA) R&D Systems IL-10 kit (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) a gyártói protokollt követve. Az egyes mérési pontokat négy technikai párhuzamos mintával 405 nm látható fény hullámhosszon mértem (630 nm OD korrekcióval).

4.2.2. Apoptózis esszé $\gamma\delta$ T-sejtekkel és MAF-okkal

A MAF sejteket 2×10^5 sejt/lyuk denzitásban ültettem ki 6-lyukú sejttenyésztő lemezekre. A MAF sejtek felszíni adhézióját követően a $\gamma\delta$ T-sejteket 1:1 arányban adtuk a fibroblasztokhoz.

A kokultúrában az aktivált $\gamma\delta$ T-sejtek $1 \mu\text{M}$, illetve $2,5 \mu\text{M}$ zoledronsav és IL-2 citokin stimulációt kaptak. Két különböző kontrolként MAF sejteket egyedül, illetve MAF- $\gamma\delta$ T-sejteket alkalmaztam stimulus hozzáadása nélkül. A sejteket öt napig tartottam kokultúrában médiumcsere nélkül. Az apoptózis detektálásához a zoledronsav optimális koncentrációját és a kokultúra optimális időtartamát előzetesen határoztam meg (**10. ábra**). Emellett vizsgáltam a kiválasztott koncentráció tartományban a zoledronsav hatását a MAF-ok apoptózisára $\gamma\delta$ T-sejtek nélkül.

Az apoptotikus populációkat áramlási citometriai mérésekkel határoztam meg Cytoflex V5-B5-R3 készüléken és FlowJo® szoftver segítségével. A kiértékelés során a következő kapuzási stratégiát alkalmaztam a fő sejtpopulációkban CD73^+ (Miltenyi Biotec) CD45^- (BioLegend) jelöléssel elkülönítettük a MAF sejteket a $\text{CD45}^+ \text{CD73}^- \gamma\delta$ T-sejtektől.

Mindkét populációban a korai (Annexin V⁺, 7AAD⁻) (BioLegend) és késői (Annexin V⁺, 7AAD⁺) apoptotikus populációkat analizáltam. Az esszéhez nyolc melanóma páciens MAF sejtjeit és egészséges önkéntesek $\gamma\delta$ T-sejtjeit használtam. Az egyes kokultúra esszékben a $\gamma\delta$ T sejt mindig azonos donortól származott, hogy a MAF-ok közötti, különböző donorok által okozott különbségek láthatóak legyenek.

Az apoptózis esszét az optimális feltételekkel megismételtem donor-azonos MAF és $\gamma\delta$ T-sejtekkel is. Ehhez két korábbi melanóma páciens friss perifériás véréből proliferáltatott és izolált $\gamma\delta$ T-sejtjeit használtam kokultúrában a korábban izolált MAF-okkal.

4.2.3. BTN2A1, BTN3A1, MICA és MICB gének expressziójának vizsgálata kvantitatív polimeráz láncreakció (PCR) módszerrel

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy tumorsejtek, mint a $\gamma\delta$ T-sejtek célsejtjei kifejezik a butirofilin fehérjéket [145]–[147]. Ezért a MAF-okban a $\gamma\delta$ T-sejtek által indukált apoptózis miatt megvizsgáltam egyes butirofileinek (BTN2A1, BTN3A1), és más- a $\gamma\delta$ T-sejtek által felismert egyéb célmolekulák (MICA és MICB) mRNS expresszióját. Összehasonlításként dermális fibroblasztokat és pozitív kontrollként az SK-MEL-28 melanóma sejtvonalat (B-Raf V600E mutáns és N-Ras vad genotípusú, katalógus szám: HTB72; American Type Culture Collection, ATCC; Rockville, MD, USA) használtam.

Először MAF, NDF sejtekből és SKMEL-28 sejtvonalból teljes RNS-t izoláltam ($5 \cdot 10^5$ sejt/minta) RNEasy mini kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével követve a gyártói protokollt. A cDNS szintézishez 1000 ng RNS-t írtam át M-MLV reverz transzkriptáz (Promega™, Madison, Wisconsin, USA) enzimet és oligo(dT) primereket alkalmazva. A génekre specifikus primerek tapadási hőmérsékletének optimalizálásához Boline Immomix Red PCR mixet (Meridian Bioscience, London, UK) használtam. A BTN2A1, BTN3A1, MICA és MICB transzkriptumokat korábban publikált primerekkel amplifikáltam [148], [149], [150]. A PCR termékeket 3%-os agaróz gélen futtattam meg.

Ezt követően a gének expressziós vizsgálatához kvantitatív PCR reakciót végeztem Roche Lightcycler® 480 készüléken Lightcycler® 480 SYBR Green I Master PCR mixet (Roche, Basel, Switzerland) alkalmazva. A reakcióhoz 35 ciklust futtattam le 95 °C-os denaturációs, 62 °C-os tapadási és 72 °C-os extenziós hőmérséklet beállítással. Emellett

a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) háztartási gén expresszióját is mértem (GAPDH- Δ Ct). A qPCR kiértékeléshez $\Delta\Delta$ Ct értékeket határoztam meg figyelembe véve a GAPDH expresszióját az összes vizsgált target sejtnek, majd összevetve az NDF minta GAPDH expressziójával (Δ Ct-control)

Célzott gén	Primer szekvencia (5'-3')
BTN3A1	FWD: AGAGGGGAATGCTAAGAGGTG REV: CAAGTATGGTGACCGAAGAAGA
BTN2A1	FWD: CACCTCGTAGTGGCAGGAC REV: GCTTTGGGTACCACCCTCT
MICA	FWD: CCTTGGCCATGAACGTCAGG REV: CCTCTGAGGCCTCGCTGCG
MICB	FWD: ACCTTGGCTATGAACGTCACA REV: CCCTCTGAGACCTCGCTGCA
GAPDH	FWD: TGCACCACCAACTGCTTAGC REV: GGCATGGACTGTGGTCATGAG

2. táblázat: A target gének vizsgálatához felhasznált primer pár szekvenciák

4.2.4. BTN2A1 és BTN3A1 fehérjék szerepének vizsgálata a $\gamma\delta$ T-sejtek target felismerésében

A MAF és $\gamma\delta$ T-sejtek interakciójának további vizsgálataihoz a sejteket 1:1 arányban kiültettem többlyukú sejt kultúra lemezekre. A BTN3A1 szerepének bemutatására egy stimuláló hatású anti-BTN3A1 antitestet alkalmaztam (20.1 klón, eBioBT3.1, Thermo Fisher Scientific) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ koncentrációban vagy önmagában, vagy 1 μM zoledronsavval kiegészítve. A 20.1 anti-BTN3A1 antitest klón hozzájárul a BTN3A1 fehérje aktív konformációjának kialakításához, így növelve a $\gamma\delta$ T-sejtek citotoxikus hatását [151].

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IL-2 [100 IU/mL]	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Zoledronsav [1 μM]	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
Anti-BTN3A1 (20.1 klón) [1 μM]	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
Anti-BTN2A1 [5 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
Anti-TCR (B1 klón) [5 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)

3. táblázat: Alkalmazott stimulusk és antitestek a MAF- $\gamma\delta$ T-sejt kultúra apoptózis esszéiben. A táblázat számozása 1-10 az **16. ábra** oszlopdiagramjait jelöli.

Antitest	Gyártó cég
Egér IgG κ 1 izotípus kontroll [P3.6.2.8.1]	eBioscience™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts)
Anti-TCR γ / δ antitest (Klón B1)	Biolegend® (San Diego, CA, USA)
Anti-BTN3A1 monoklonális antitest (eBioBT3.1 (20.1))	eBioscience™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts)
Anti-BTN2A1 poliklonális antitest	Prestige Antibodies® Merck (Darmstadt, Németország)
Nyúl IgG izotípus kontroll	Southern Biotech (Birmingham, AL, USA)

4. táblázat: A MAF- $\gamma\delta$ T kokultúra apoptózis esszéiben alkalmazott antitestek forrásai

4.2.5. BTN3A1 expresszió sejt felszíni vizsgálata NDF, MAF és SK-MEL-28 sejtekben

A BTN3A1 fehérje szintű expresszióját sejt felszíni jelöléssel vizsgáltam NDF, MAF és SK-MEL-28 sejtekben áramlási citometria segítségével, Cytoflex V5-B5-R3 (Beckman Coulter) készülék és FlowJo® szoftver segítségével.

A sejteket PE- konjugált anti-BTN3A1 (CD277) antitesttel (Miltenyi Biotec) jelöltük. A citometriai adatok kiértékelése során a kapuzási stratégia során a fő fibroblaszt, vagy melanóma sejt populáció meghatározását követően BTN3A1 pozitív sejteket jelöletlen kontroll mintákhoz hasonlítottam. Minden sejt típusnak saját jelöletlen kontroll minta megfelelője volt.

4.2.6. Áramlási citometriai apoptózis esszé normál dermális fibroblasztokban (NDF) és SK-MEL-28 sejt vonalban

Az NDF sejtek (n=3) és SK-MEL-28 melanóma sejteket 12-lyukú sejt kultúra lemezekre ültettem ki 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin és 1% L-glutamin tartalmú RPMI médiumba. Felső felületi adhéziót követően a $\gamma\delta$ T-sejtek 100 IU/mL IL-2 mellett és 1-2,5 μ M zoledronsav mellett adtam hozzá a fibroblaszt és melanóma sejtekhez. Az apoptotikus populációkat áramlási citometriai módszerrel analizáltam, olyan módon, ahogy 4.2.2.

fejezetben írtam le. Az SK-MEL-28 és NDF sejtek apoptotikus populációit a CD73⁺ és CD45⁺ populáción belül kvantifikáltam.

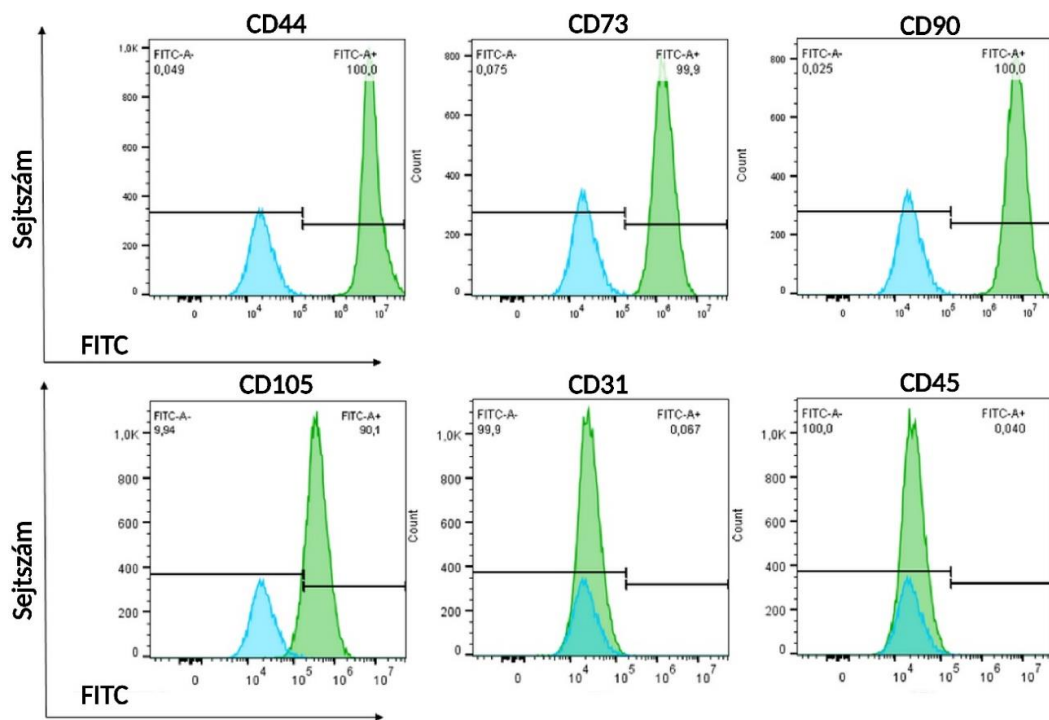
4.3. Statisztikai analízis

Az adatsorokon a Graphpad Prism 7.0 szoftverrel statisztikai egyutas ANOVA vizsgálatot végeztem kiegészítve a Dunnett-féle „post-hoc” teszttel. Az 4.2.6. fejezetben leírt NDF és SK-MEL-28 apoptotikus populációk közti korrelációt kétutas ANOVA vizsgálattal és Tukey-féle post-hoc teszttel analizáltam. Statisztikailag szignifikáns különbségnek a <0.05 alatti P-értékeket fogadtam el. Az apoptózis esszé optimalizálási kísérleteinél a zoledronsav dózis-válasz összefüggés vizsgálatához az apoptotikus populációk százalékos értékein Speerman-féle rang korrelációs tesztet végeztem.

5. Eredmények

5.1 A MAF-ok expresszálják a tradicionálisan elfogadott MSC markereket

Feltételezve a MAF-ok és MSC-k közötti funkcionális hasonlóságokat, megvizsgáltam a sejt felszíni expresszióját az alábbi Nemzetközi Sejt-, és Génterápia Társaság (International Society for Cell and Gene Therapy, ISCT) által definiált MSC markereknek (6. ábra). A CD44, CD73, CD90 és CD105 markerek 90% feletti pozitivitást mutattak, míg a CD31 vérlemezke-endothél sejtadhéziós molekula (PECAM-1) markerre és a CD45 pánleukocita markerre nézve az expresszió 1% alatt volt.



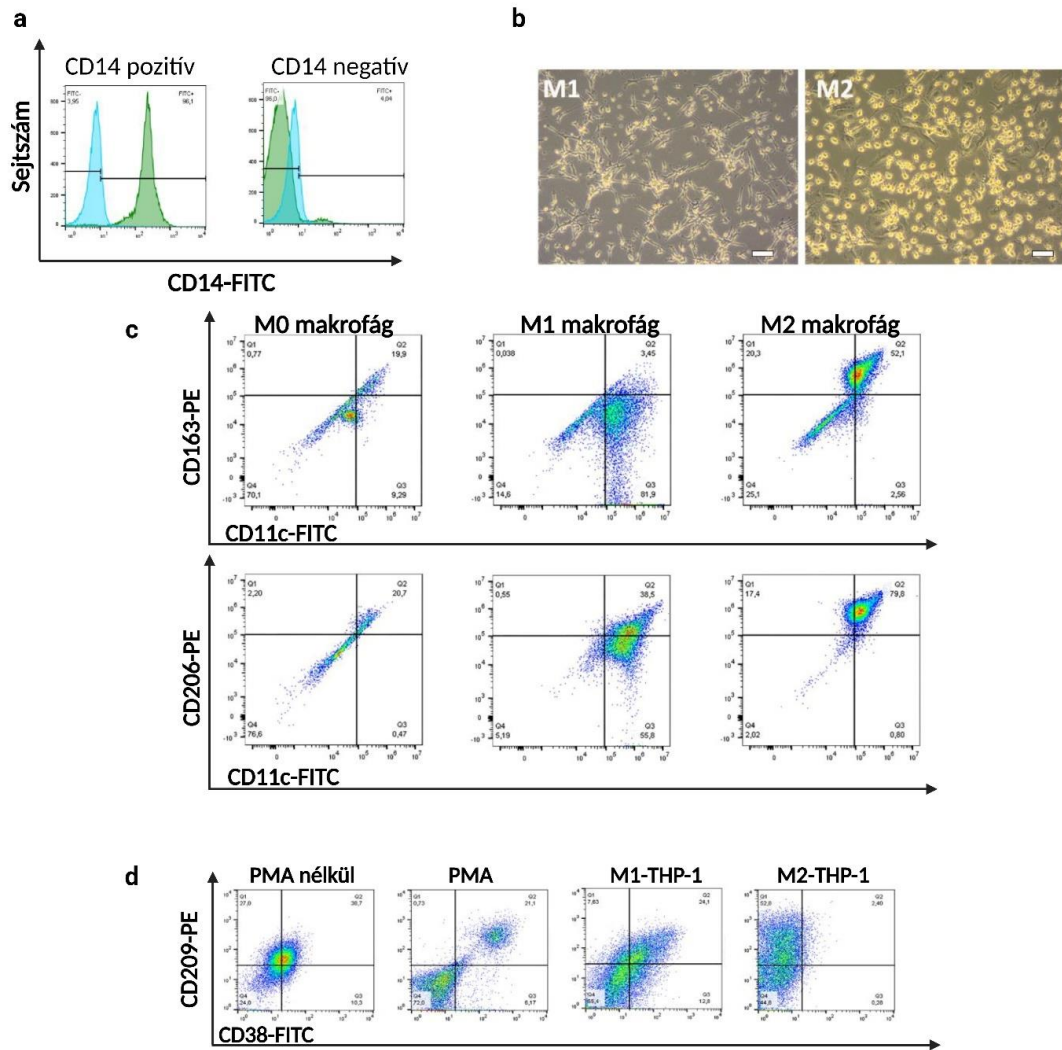
6. ábra: MSC markerek expressziója MAF sejteken. A hisztogramon a sejt felszíni antigén expresszióját mutatják zöld színnel a kék hisztogrammal ábrázolt (jelöletlen) kontroll mintához viszonyítva (n=3)

5.2 Primer monociták *in vitro* makrofág irányú differenciációja

A primer monocita sejtek CD14 marker alapú kiválogatása 96% feletti tisztaságú volt (**7. ábra** a rész). A kilenc nap alatt differenciáltatott M1 makrofágok morfológia alapján kerek sejttesttel, valamint hosszabb, vékonyabb citoplazmikus nyúlványokkal rendelkeztek. Ezzel szemben az M2 makrofágok morfológiája rövidebb, vastagabb citoplazmikus nyúlványokat mutatott (**7. ábra** b rész).

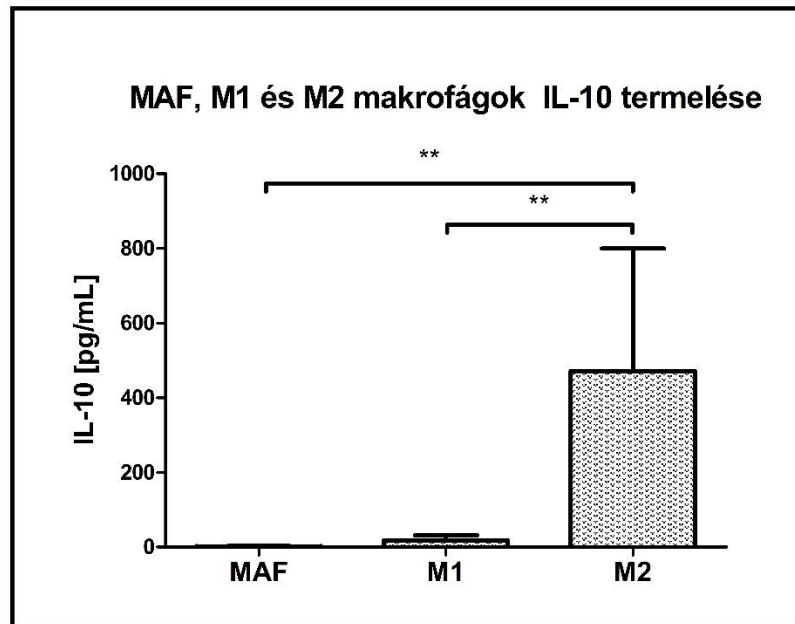
Sejtfelszíni markereket tekintve az M1 specifikus CD11c marker 85% felett jelen volt az általam M1 irányba differenciáltatott makrofágokon, azonban az M2 makrofágok is 50% feletti pozitívítást mutattak rá (**7. ábra** c rész). Az M2 specifikus CD163 marker 70% feletti pozitívítással rendelkeztek, míg a szintén M2 specifikus CD206 marker 90% felett volt jelen az M2 irányba differenciáltatott makrofágokon (**7. ábra** c rész). Az M2 makrofágokra jellemző markerek esetén is igaz az, hogy kisebb mértékben, de jelen voltak az M1 irányban differenciáltatott makrofágokon is. Ez az eredmény arra utal, hogy az M1-M2 immunfenotípus makrofágoknál nem különíthető el két homogén csoportra. M1-M2 kevert immunfenotípusú csoportok alakulnak ki, amelyek funkcionális tulajdonságait feltehetően az adott citokin környezet határozza meg.

Ugyanígy a THP-1-makrofág sejtek esetén is hasonló tapasztaltam sejtfelszíni marker expressziója terén: az M1-specifikus marker 35%-ban volt jelen az M1-THP-1, míg 2% körül az M2-THP-1 sejteken is (**7. ábra** d rész). Az M2-specifikus CD209 50% feletti pozitívítást mutatott M2-THP-1 sejteken, de 30%-ban az M1-THP-1 sejteken is jelen volt (**7. ábra** d rész).



7. ábra: *In vitro* differenciált M1 és M2 immunfenotípusú makrofágok karakterizálása (a) CD14-pozitív (bal oldal) és -negatív (jobb oldal) PBMC frakciók mágneses szeparációt követően. (b) Monocitákból származó M1 (bal oldal) és M2 (jobb oldal) makrofágok morfológiája, méretskála=20 μm . (c) CD163, CD206, CD11c sejtfelszíni markerek expressziója M0, M1 és M2 immunfenotípusú makrofág sejteken (d) CD38 és CD209 sejtfelszíni markerek expressziója PMA nélküli, PMA-indukált, M1-szerű THP-1 és M2-szerű THP-1 sejteken.

5.3 A MAF-ok növelik a primer makrofág sejtek IL-10 citokin termelését



8. ábra: M1 és M2 immunfenotípusú differenciált makrofágok és MAF-ok IL-10 szekrécója (n=3). A hibasávok az A hibasávok átlag értékeket és \pm a standard hibát (SD) mutatják. *** $p < 0.001$

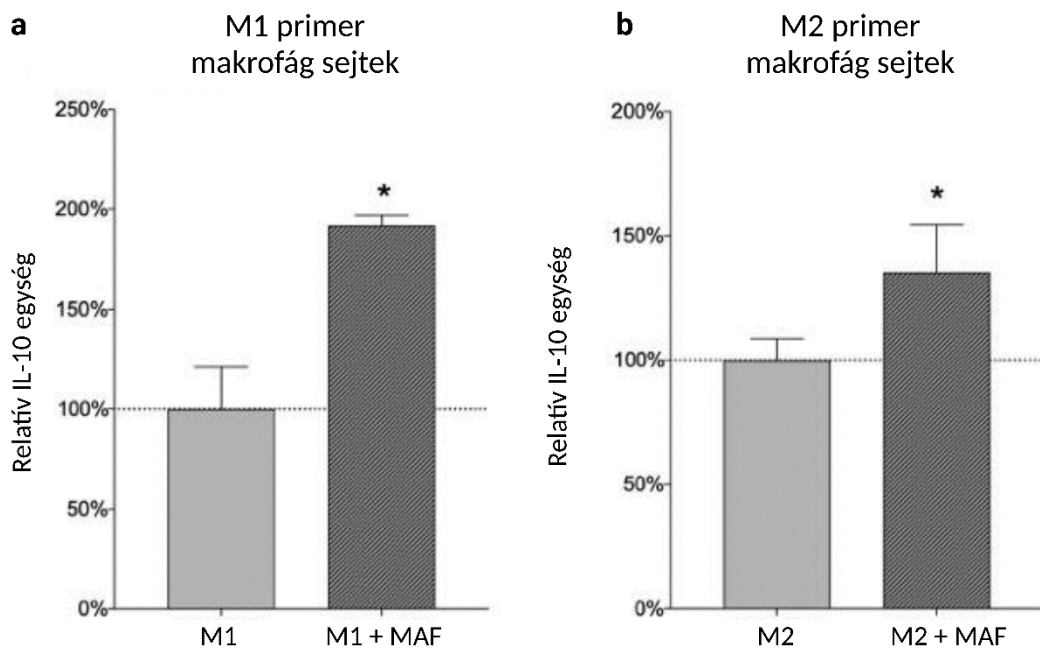
A humán perifériás vérből származó monociták inflammatórikus M1 és M2 immunfenotípus irányukat a morfológia és sejtfelszíni markerek expressziója mellett IL-10 citokin szekrécójuk alapján is meg tudtam különböztetni.

Az MSC-k és MAF-ok közötti hasonlóságokat feltételezve megvizsgáltam, hogy hogyan hatnak a MAF-ok a makrofágok IL-10 szekrécójára. A kérdés vizsgálatához egy olyan kokultúra rendszert hoztam létre, amelyben a MAF-okat és a makrofágokat LPS-sel stimuláltam majd a sejt kultúra felülúszójából mértem az IL-10 koncentrációját.

A válaszadó sejtek ebben a modellben lehetnek primer eredetű differenciált makrofágok, vagy immortalizált sejtvonalak (mint a THP-1 monocita sejtvonalból differenciáltatott makrofág szerű sejtek) [152]. Továbbá a kokultúra rendszer felülúszójából egyéb gyulladásos folyamatokban szerepet játszó citokineket is meg lehet mérni. A sejtvonalak könnyen tenyésztethetők és robosztus választ adnak, ezért például olyan szűrési rendszerre is alkalmasak lehetnek, melyekben több különböző donorból származó stromasejtek immunszuppresszív potenciálját kell meghatározni. A sejtvonalak

alkalmazásával szemben viszont a primer M1 illetve M2 makrofágok alkalmazása a rendszerben nagyobb klinikai relevanciával bír.

Az immunszuppresszív tulajdonsággal rendelkező M2 makrofágok szignifikánsan magasabb IL-10 termelést mutattak az M1 makrofág sejtekhez képest. A MAF-ok önmagukban nem termelnek IL-10-et, ezért a továbbiakban azt vizsgáltam, hogy milyen módon képesek módosítani a makrofágok tulajdonságait az immunszuppresszív hatású IL-10 termelés elősegítésén keresztül.

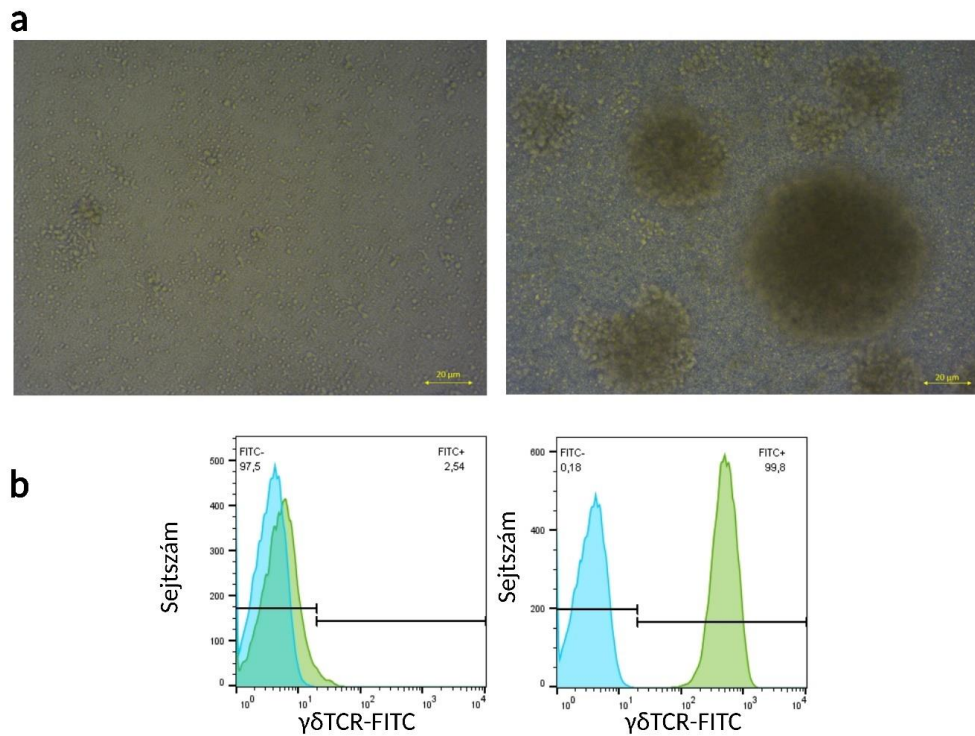


9. ábra: A MAF-ok IL-10 citokin szekrécióna kifejtett hatása egészséges donorokból származó makrofág sejteken. A relatív IL-10 koncentráció MAF/M1 (a) és MAF/M2 (b) differenciált primer makrofág-MAF kokultúrákban makrofág monokultúrához képest (n=3). A hibásávok átlag értékeket és \pm az átlag standard hibáját (SEM) mutatják. * $p < 0.05$

A MAF-ok jelenléte szignifikáns növekedést eredményezett a makrofágok IL-10 szekréciónjában beleértve a polarizált THP-1 sejteket és primer monocitákból differenciáltatott M1 és M2 típusú makrofágokat is. Ezen eredmények alapján igazoltam, hogy a MAF-ok más immunsejtek mellett a makrofágokat is befolyásolják, úgy, hogy azok immunszuppresszív hatású IL-10 termelését megnövelik.

5.4. A perifériás vér $\gamma\delta$ T-sejtjeinek száma növelhető *in vitro* zoledronsav stimuláció hatására

A perifériás vér $\gamma\delta$ T-sejtjeinek alacsony százalékos aránya miatt (1-5%) [153] az *in vitro* kísérleteimhez zoledronsav hozzáadásával növeltem az arányukat egy korábban publikált protokoll alapján [154]. A proliferáció látható jeleként az aktív T-sejtekre jellemző aggregátumok (**10. ábra** a rész) jelentek meg a sejt kultúrában. A stimulus hozzáadását követő hetedik napon a PBMC kultúrákat mágnesesen szeparáltam, és a szeparációs folyamat két frakcióját áramlási citometriával ellenőriztem. A mágneses oszlop által megkötött, majd eluált frakció homogén $\gamma\delta$ T-sejteket tartalmazott (a sejtpopuláció tisztasága 99% körül volt) minden elválasztási lépésnél a kísérleteim során (**10. ábra** b rész).



10. ábra: Zoledronsav és IL-2 mediált PBMC proliferáció és mágneses $\gamma\delta$ T-sejt szeparáció (a) A nem-stimulált (bal oldal) és zoledronsav-IL-2 stimulált PBMC sejtek morfológiája 7 napos stimulációt követően. Méretskála=20 μ m. (b) Reprezentatív áramlási citometriai hisztogramok a $\gamma\delta$ TCR-negatív (bal oldal) és -pozitív (jobb oldal) frakcióknak mágneses szeparációt követően. Kék szín: jelöletlen kontroll minta, zöld szín: $\gamma\delta$ TCR-FITC jelölt sejtek. A szeparációs tisztasága a sejteknek (n=4) 99.2 ± 0.43 % felett volt.

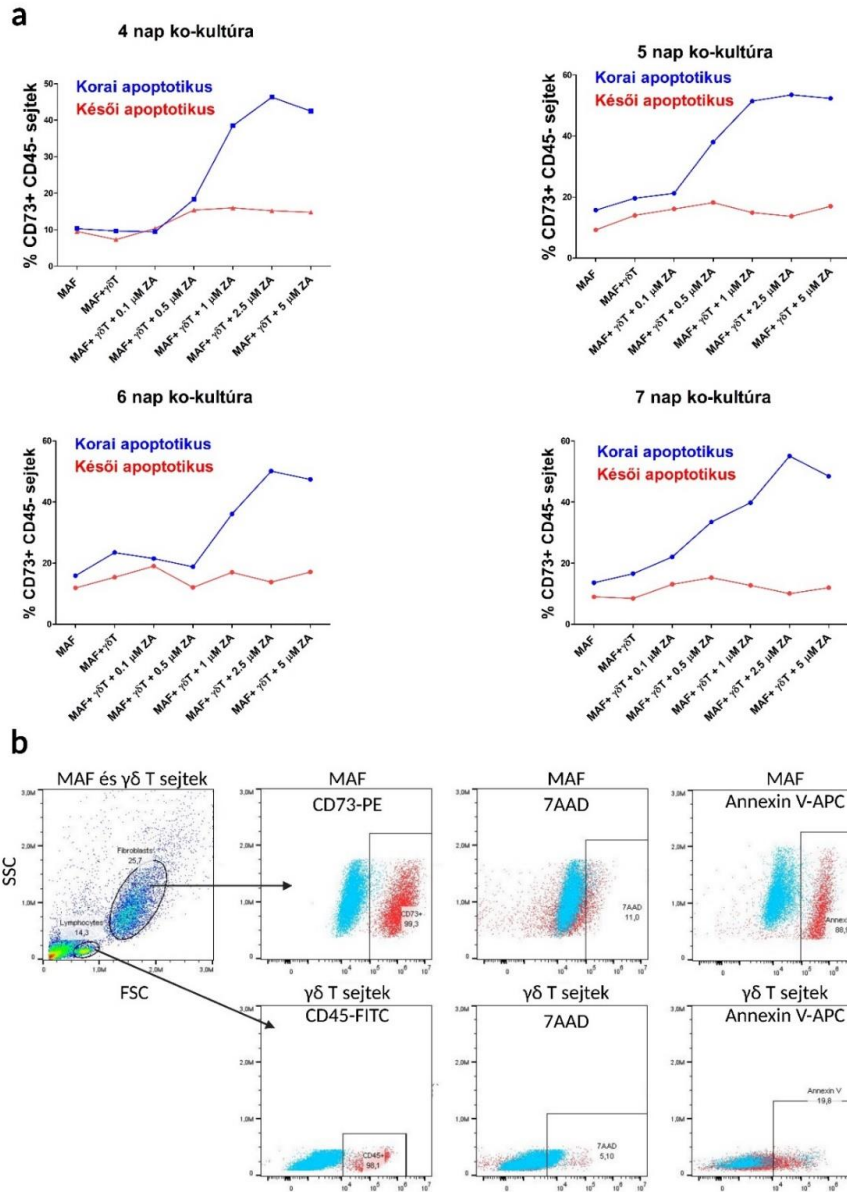
5.5. Áramlási citometriai apoptózis esszék $\gamma\delta$ T-sejt és MAF kokultúrákban

Jelenleg a CAF-okat célzó terápiás kutatások és fejlesztések specifikusan ezeken a sejteken kifejeződő molekulákra irányulnak, mint a FAP, vagy azon specifikus jelátviteli útvonalak gátlására, melyek a CAF aktivációhoz járulnak hozzá [155]. Ezek közé tartozik a TGF- β , PDGF, vagy a Hedgehog jelpálya molekuláris mechanizmusainak targetálása [84], [89], [156].

Továbbá jelenleg aktívan kutatott terület a különböző ICI-k kombinálása CAF-okat megcélzó terápiás szerekekkel, vagy sejterápiás alkalmazásban esetleg CAR-T-sejtek alkalmazása CAF specifikus antitestekkel felruházva.

A sejterápiás eszköztárból kiemelkedő szereppel bírnak a $\gamma\delta$ T-sejtek. Ezek a T-sejtek az egyedi MHC-független módon történő antigén felismerő képességükkel lehetővé teszik az allogén sejterápiát. Ezenfelül a citotoxikus hatásuk specifikusan malignus, vagy fertőzött sejtekre terjed ki. Körülbelül ötezer tumor molekuláris profilozásából kiderült, hogy a $\gamma\delta$ T-sejtek jelenléte hozzájárul a jobb prognózishoz és a hosszabb túléléshez [157].

Magukon a $\gamma\delta$ T sejttes terápiás készítményeken kívül *in vivo* is lehetséges ezeket a sejteket aktiválni és proliferációra bírni. Számos kutatás irányul az aktivációjukban szerepet játszó butirofilin molekulákat stimuláló hatású antitest fejlesztésére [158]–[160]. Korábban megfigyelték, hogy bizonyos pácienseknél intravénás zoledronsav adminisztrációt követően a saját $\gamma\delta$ T-sejtjeik aktiválódtak [155]. Azonban a jelenlegi klinikai kutatásokban a $\gamma\delta$ T-sejtek szolid tumorokkal szembeni hatása vegyes eredménnyel szolgált. Az általam kidolgozott apoptózis esszé egy másfajta megközelítésben tumorsejtek helyett MAF-okat tartalmazott.



11. ábra: Az áramlási citometriai apoptózis esszé optimalizálása $\gamma\delta$ T cell–MAF kokultúrákban. A $\gamma\delta$ T cell–MAF kokultúrák ZA általi stimulációját követően a korai (Annexin V⁺, 7AAD⁺) és késői (Annexin V⁺, 7AAD⁺) apoptotikus populációkat mértük. (a) Koncentráció függő hatása a zoledronsavnak a MAF-ok apoptózisára különböző napokon mérve (4-7 nap) $\gamma\delta$ T-sejtekkel való kokultúrában. (b) Az áramlási citometriai analízis kapuzási stratégiája: a fő sejtpopulációk meghatározása a sejtek oldal irányú szórása (SSC-side scatter) alapján, majd a két populáció elkülönítése CD73⁺ és CD45⁺ sejtfelszíni markerek alapján. Végül az Annexin V⁺ és 7AAD pozitív sejtek arányának meghatározása a CD73⁺ és a CD45⁺ populációkon belül (kék szín: jelöletlen kontroll, piros szín: jelölt minta)

Megvizsgáltam azt, hogy a $\gamma\delta$ T-sejtek proliferációjához szükséges zoledronsav pre-stimulus önmagában képtessé teszi-e a $\gamma\delta$ T-sejteket, hogy citotoxikus hatást fejtsenek ki a MAF-okra.

Eredményeim azt mutatták, hogy a stimulus nélküli $\gamma\delta$ T sejt-MAF kokultúrában megegyezők voltak az apoptotikus populációk az egyedüli MAF monokultúrákkal (**11. ábra** a rész), és további zoledronsav stimulusra van szükség a citotoxikus hatásuk növeléséhez.

Ez részben azzal is magyarázható, hogy a $\gamma\delta$ T-sejtek hosszabb *in vitro* kultúrájában tartásához hasonlóan, mint más T-limfocita populációk esetében szükségesek a specifikus exogén stimulusok. Ezek közé tartoznak többek között T-sejt receptor összekapcsolódásra ható anyagok, mint a zoledronsav az akkumulált IPP molekulákon keresztül.

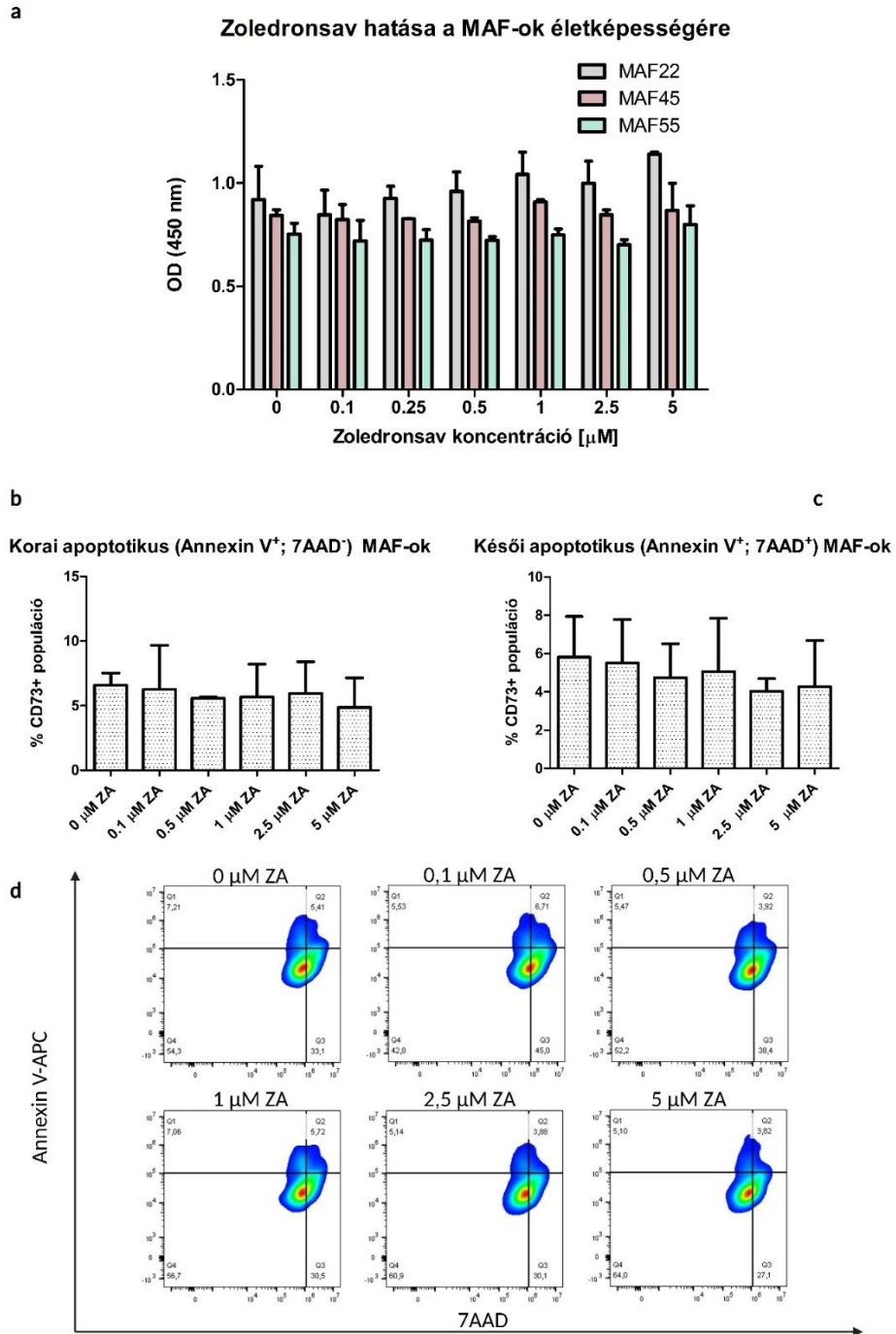
Ezután összehasonlítottam a korai és késői apoptotikus populációkat (százalékos értéküket). A MAF monokultúra, a stimulus nélküli $\gamma\delta$ T sejt-MAF kokultúra és a 0,1 μM zoledronsavval stimulált $\gamma\delta$ T sejt-MAF kokultúra alacsony és szignifikáns különbség nélküli eltérést mutatott korai és késői apoptotikus populációkban (**11. ábra** a rész). A zoledronsav stimulus koncentrációjának emelése arányosan növelte a korai apoptotikus populációkat, míg a késői apoptotikus populációk 20% alatt maradtak (**11. ábra** a rész). A korai és késői apoptotikus populációk az ötödik napon telítődést mutattak, így a további áramlási citometriai apoptózis esszét öt napos kokultúrákban végeztem.

Egy kontroll kísérletben vizsgáltam a zoledronsav hatását a MAF sejtekre annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk, hogy a megnövekedett apoptózis kizárólag a $\gamma\delta$ T-sejteknek köszönhető és ehhez nem járul hozzá önmagában a zoledronsav.

Öt napos monokultúrában áramlási citometriai méréssel 0,1-5 μM zoledronsav koncentráció nem okozott szignifikáns különbséget a zoledronsav nélküli kontrollhoz képest (**12. ábra** b rész).

A kontroll kísérletet emellett elvégeztem a sejtek életképességét mérő kolorimetrián alapuló sejtszámláló CCK-8 (Cell Counting Kit-8) kittel is. Ez esetben sem mutattak szignifikáns eltérést a zoledronsavval kezelt kondíciók a nem-kezelt kontroll MAF-okhoz képest, az OD értékek minden minta esetén hasonló nagyságúak voltak (**12. ábra** b rész). Az OD értékekben történő változás a kontrollhoz képesti negatív, vagy pozitív irányban

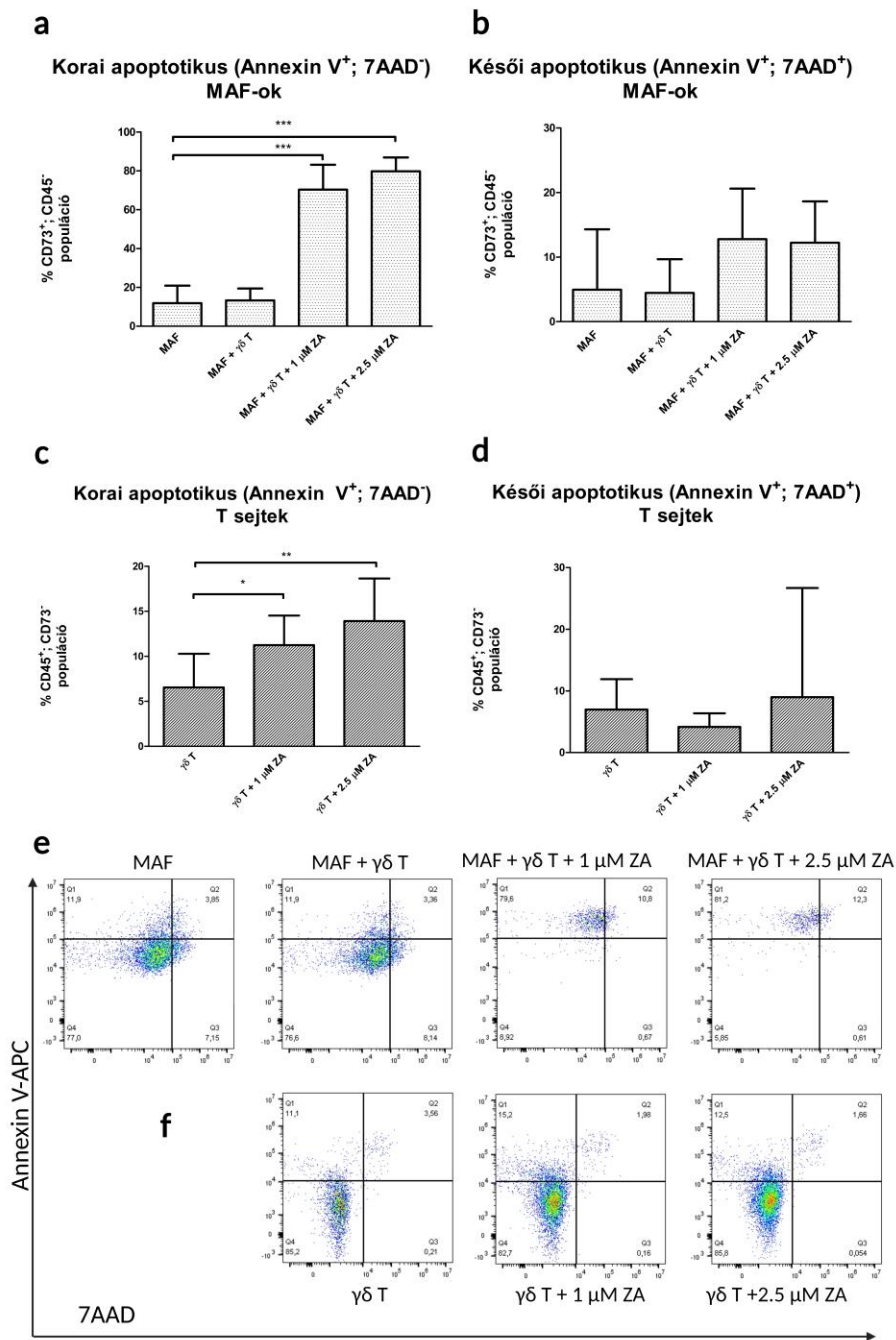
arányosan a sejtszám csökkenésével, vagy növekedésével korrelált volna. Így megállapítottam, hogy öt nap alatt a kiültetett sejtek a zoledronsavval kezelt és kezeletlen lyukakban is hasonló mértékben proliferáltak.



12. ábra: A zoledronsav határa a MAF-ok életképességére (a) CCK-8 méréssel meghatározott Optikai Densitás (OD) értékek a zoledronsavval kezelt (0-5 μM) MAF-okon (n=3). Kontroll: (zoledronsavval nem kezelt MAF-ok b) Korai apoptotikus (Annexin V⁺, 7AAD⁻) és (c) késői apoptotikus (Annexin V⁺, 7AAD⁺) MAF populációk [CD73⁺, CD45⁻] (n=3) (d) Reprerentatív denzitás plotjai a zoledronsav kezelt MAF-oknak. Kontroll: zoledronsavval nem kezelt MAF-ok. A hibaszávok az átlagokat ± standard hibát (SD) jelölik.

Az optimalizált öt napos $\gamma\delta$ T sejt-MAF kokultúra apoptózis esszét ezt követően elvégeztem különböző donorokból származó MAF sejtekkel (**13. ábra**). A $\gamma\delta$ T-sejtek ez esetben egyetlen egészséges donortól származtak, annak érdekében, hogy a MAF-ok apoptózisa közötti különbséget ne befolyásolja a $\gamma\delta$ T-sejtek donorok közötti eltérése. Egy-egy időpontban elvégzett esszében mindig csak egy donor $\gamma\delta$ T sejtjeit használtam fel, hogy csak a kokultúra MAF tagjai adhassanak donor különbségeket.

A zoledronsav stimulusból a kísérleti kondíciókban az 1 μM és 2,5 μM koncentrációkat hagytuk meg. A korai apoptotikus populációk átlagosan 65 % felett voltak 1 μM , és közel 80%-ot értek el 2,5 μM zoledronsav mellett (**13. ábra** a rész) A késői apoptotikus populációk 10% körül voltak (**13. ábra** b rész) A MAF-ok mellett vizsgáltam a $\gamma\delta$ T-sejtek apoptózisát is korai és késői apoptotikus populációk elemzésével, melyek közül mindegyik 10% alatt volt (**13. ábra** c és d rész). A zoledronsavval stimulált kultúrákban szignifikánsan több korai apoptotikus $\gamma\delta$ T-sejtet detektáltam a nem-stimulált kontrollhoz képest.



13. ábra: Áramlási citometriai apoptózis esszé γδ T-sejt-MAF kokultúrákban optimalizált kondíciókkal (5 nap kokultúra 1 μM és 2.5 μM zoledronsav stimulus mellett) (a) A korai apoptotikus (Annexin V⁺, 7AAD⁻) és (b) késői apoptotikus (Annexin V⁺, 7AAD⁺) MAF [CD73⁺; CD45⁻] százalékos értékei n=10. Kontrol: MAF monokultúra γδ T-sejtek nélkül. (c) A korai apoptotikus (Annexin V⁺, 7AAD⁻) és késői apoptotikus (Annexin V⁺, 7AAD⁺) γδ T-sejt populációk [CD45⁺; CD73⁻] százalékos értékei 5 nap MAF-okkal való kokultúrát követően. Kontrol: kokultúra stimulus nélküli γδ T-sejtekkel. (e) Reprezentatív apoptotikus fibroblasztokat ábrázoló áramlási citometriai dot plotok (f) Reprezentatív apoptotikus γδ T-sejteket ábrázoló áramlási citometriai dot plotok. A hibásávok az átlagokat ± SD értékeket jelölik. . * p < 0.05 ** p < 0.01 and *** p < 0.001.

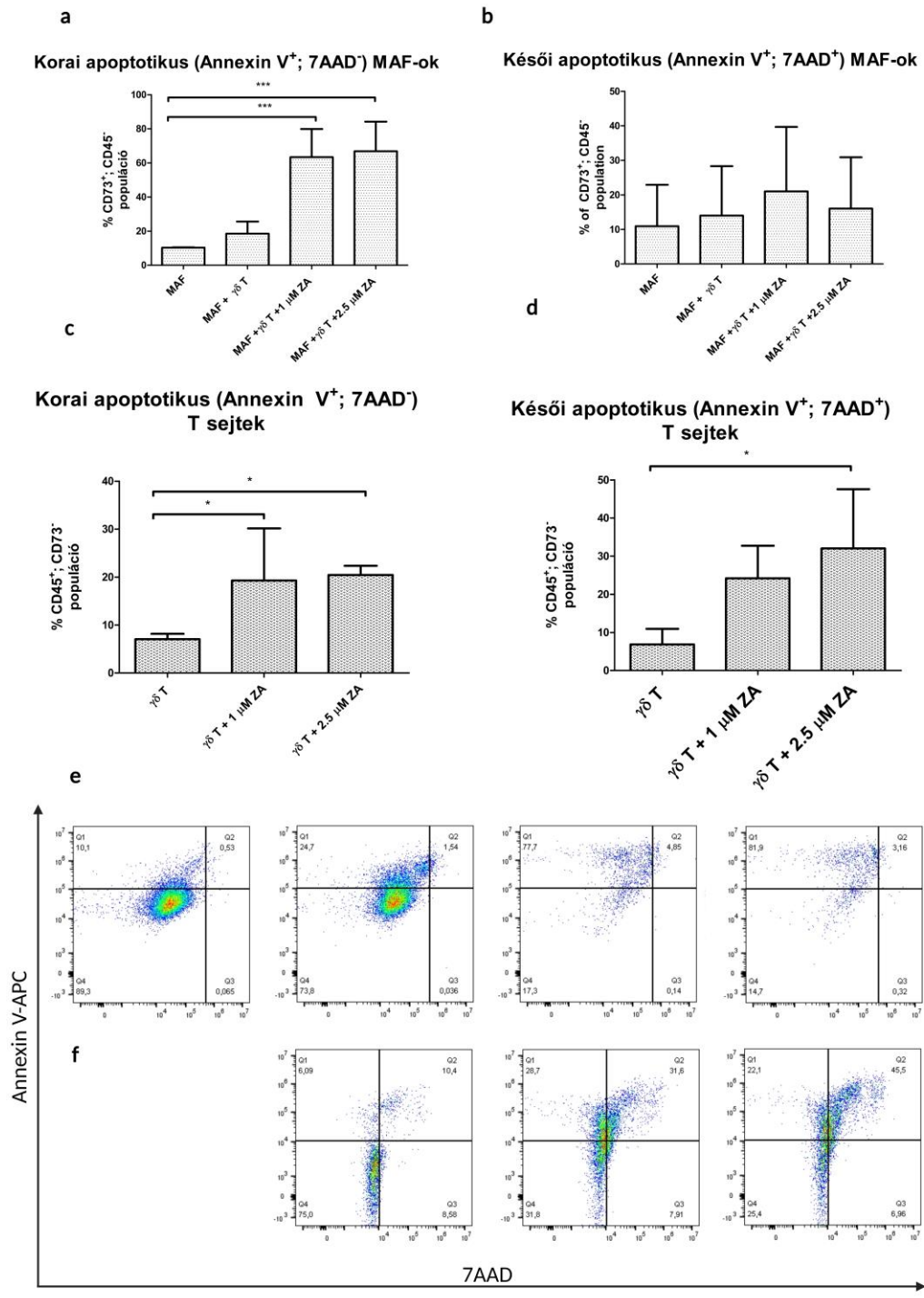
5.5.1. A $\gamma\delta$ T-sejtek által indukált apoptózis MAF-okban MHC-független módon valósul meg

A $\gamma\delta$ T-sejtek MHC-független ligand felismerési tulajdonsága miatt potenciális eszközei lehetnek az autológ és allogén sejterápiáknak. Az allogén $\gamma\delta$ T-sejt terápia lehetővé tenné, hogy egészséges donorokból származó, funkcionális sejteket lehessen különböző betegségekben szenvedő pácienseknek *ex vivo* felszaporítani. Egy másik előnyös tulajdonságuk, hogy a páciensek felszabadulnának attól a teherrel, hogy a daganatterápiát követő esetleges sejterápia kezdeteként az adott vizsgálati helyen nagyobb mennyiségű vért adjanak. Hanem úgynevezett „off-the-shelf” (mindig rendelkezésre álló) módon a terápia kezdetekor már az elkészült terápiás készítményt kapnák meg a helyszínen.

Ezért kísérleteim nagy részében egészségesekből származó $\gamma\delta$ T-sejteket használtam. Azonban az autológ $\gamma\delta$ T-sejtes terápia, illetve a zoledronsav terápia lehetőségét is szem előtt tartva, fontosnak tartottam megvizsgálni a melanóma páciensekből származó $\gamma\delta$ T-sejtek citotoxikus hatását. Korábban izolált és biobankunkban szereplő két donortól származó MAF sejteket használtam az a $\gamma\delta$ T-MAF kokultúra apoptózis esszé megismétlésére. A donorok esetében vénás vérből izoláltam PBMC-eket és a korábban (Anyagok és Módszerek 4.1.5. fejezet) leírt módon zoledronsav segítségével expandáltam, majd szeparáltuk a $\gamma\delta$ T-sejteket.

A stimulus nélkül a $\gamma\delta$ T-sejtek nem indukáltak apoptózist MAF-okban, azonban 1 és 2,5 μM zoledronsav és IL-2 stimulust követően szignifikánsan magasabb korai apoptotikus populációk voltak detektálhatóak (**14. ábra** a rész). Ezzel a kísérleti beállítással demonstráltam, hogy a $\gamma\delta$ T-sejtek citotoxikus hatása érvényesül MHC azonos target sejt esetén, tehát MHC független módon is.

A melanóma páciensektől származó $\gamma\delta$ T-sejt-MAF kokultúrában a $\gamma\delta$ T-sejtek nagyobb mértékben apoptotizáltak az egészséges önkéntesek $\gamma\delta$ T-sejtjei képest a MAF kokultúrákban. A proliferáltatott PBMC-ből való $\gamma\delta$ T-sejt izolálás során tapasztaltam, hogy kevesebb számú $\gamma\delta$ T-sejt volt kinyerhető. Mivel a $\gamma\delta$ T-sejtek expansziós kapacitása nagymértékben függ a donorok egyéni tulajdonságaitól, a kisszámú melanómás $\gamma\delta$ T-sejt donor miatt ezt a megfigyelést egyelőre nem tudtam további vizsgálatokkal megerősíteni [154], [161].



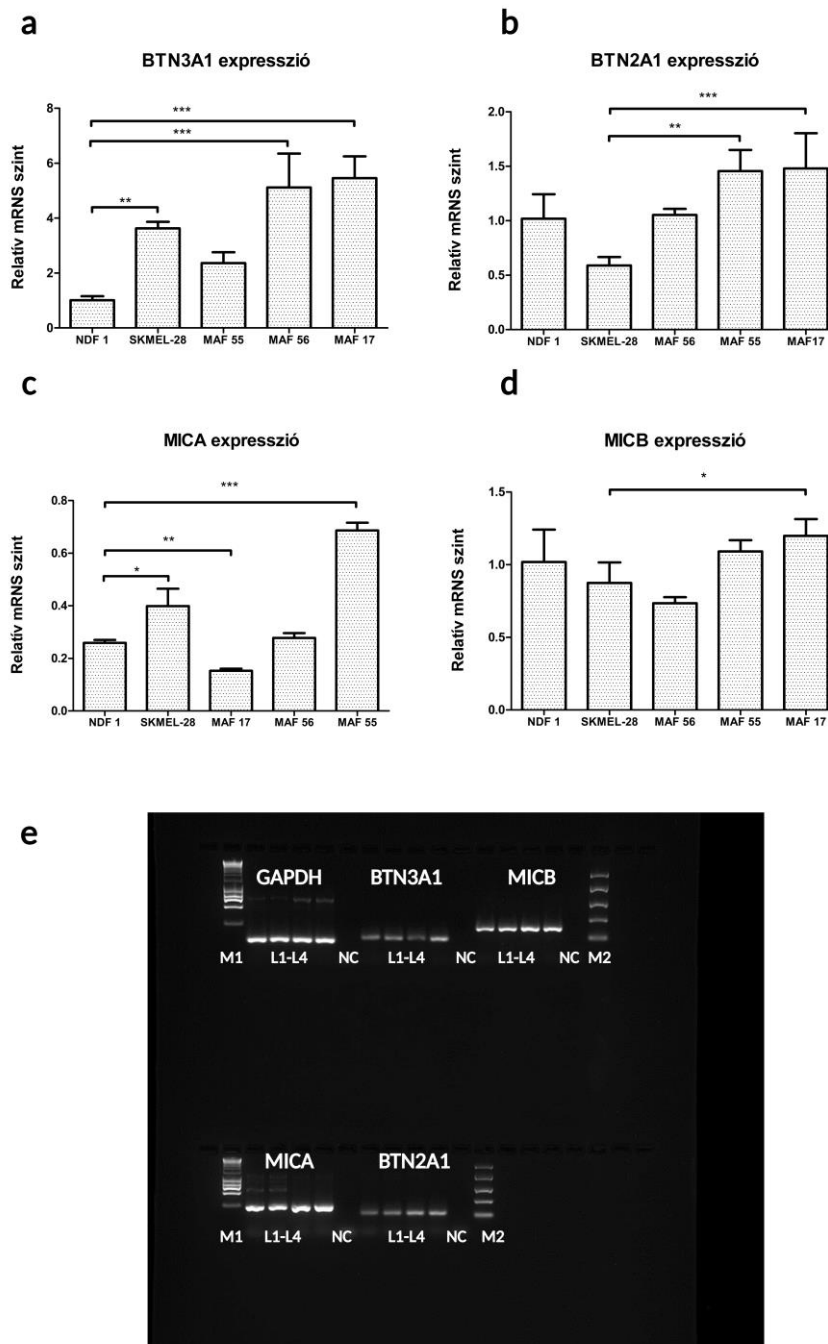
14. ábra: $\gamma\delta$ T-sejt és MAF interakció melanómás páciensekből származó sejtekkel. Az ábra kísérleti beállításában a biobankolt MAF sejteket páciensekből származó frissen izolált $\gamma\delta$ T-sejtekkel párosítottuk az apoptózis esszében. (a) Korai (Annexin V⁺; 7AAD⁻) és (b) késői apoptotikus MAF (Annexin V⁺ 7AAD⁺) [CD73⁺, CD45⁻] populációk. (c) Korai (Annexin V⁺; 7AAD⁻) és (d) késői (Annexin V⁺ 7AAD⁺) apoptotikus $\gamma\delta$ T-sejt [CD45⁺, CD73⁻] populációk. (e) Reprezentatív apoptotikus fibroblasztokat ábrázoló áramlási citometriai dot plotok (f) Reprezentatív apoptotikus $\gamma\delta$ T-sejteket ábrázoló áramlási citometriai dot plotok

5.6 A MAF-ok és NDF-ek expresszálják az MHC I. osztályú polipeptidhez köthető szekvencia A és B, BTN2A1 és BTN3A1 molekulákat

A $\gamma\delta$ T-sejtek MAF-okra kifejtett citotoxikus hatás molekuláris hátterének vizsgálatához a $\gamma\delta$ T-sejt fő receptorainak ($\gamma\delta$ TCR, NKG2D) cél molekuláit mRNS szinten MAF-okban reverz transzkripció és kvantitatív PCR segítségével elemeztem (**15. ábra**).

Negatív kontrollként NDF sejteket, míg pozitív kontrollként az SK-MEL-28 sejtvonalat választottam ki. A $\gamma\delta$ TCR BTN2A1 és BTN3A1 célpontjait, valamint az NKG2D receptor kapcsolódási MICA és MICB molekuláit a MAF-ok és NDF-ek is expresszálták (**15. ábra**).

A relatív BTN3A1 mRNS növekedés szintén megfigyelhető volt két donor esetében (**15. ábra a** rész). A BTN2A1 molekula esetében szintén két donor esetében szignifikánsan magasabb volt a relatív mRNS szint az SK-MEL-28 sejtvonalhoz képest (**15. ábra b** rész). A MICA és MICB expressziós mintázatban nem láttam kiemelkedő MAF-okat. A MICA esetében csupán egy kiemelkedő donor volt, míg a MICB expresszió hasonló mértékű volt az összes sejttípusban, egy kiemelkedő MAF donort kivéve (**15. ábra c** és **d** rész).



15. ábra: $\gamma\delta$ TCR target molekulák mRNS expressziója MAF-okban. Relatív mRNS expressziója a (a) BTN3A1, (b) BTN2A1, (c) MICA és (d) MICB molekuláknak a háztartási gliceraldehid-3 foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) expresszióhoz és viszonyítva, és az NDF sejtekkel kalibrálva. Pozitív kontrollként SK-MEL-28 sejtvonalat alkalmaztunk. (e) A target molekulák RT-PCR termékeinek gél elektroforézis fotója (sorrendben: GAPDH, BTN3A1, MICB, MICA és BTN2A1) Sávok: M1: méret marker: 1 kB HyperLadder™; L1-L2: MAF, L3: NDF, L4: SK-MEL-28 pozitív kontrol, NC-non-templát kontrol, M2: méret marker: 100-2000 bp Easy Ladder. A hibásávok az átlag értékeket jelölik \pm SD. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

5.6.1. Áramlási citometriai apoptózis esszé normál dermális fibroblasztokban (NDF) és SK-MEL-28 sejtvonalban

A génextpresszió mRNS szintjén vizsgált molekulák közül a BTN3A1 $\gamma\delta$ TCR targetet fehérje szinten is szerettem volna vizsgálni, illetve felderíteni, hogy milyen mértékben befolyásolja az apoptotikus populációkat olyan sejtes kokultúrákban, ahol a BTN3A1 fehérje szintje alacsony, és ahol magas.

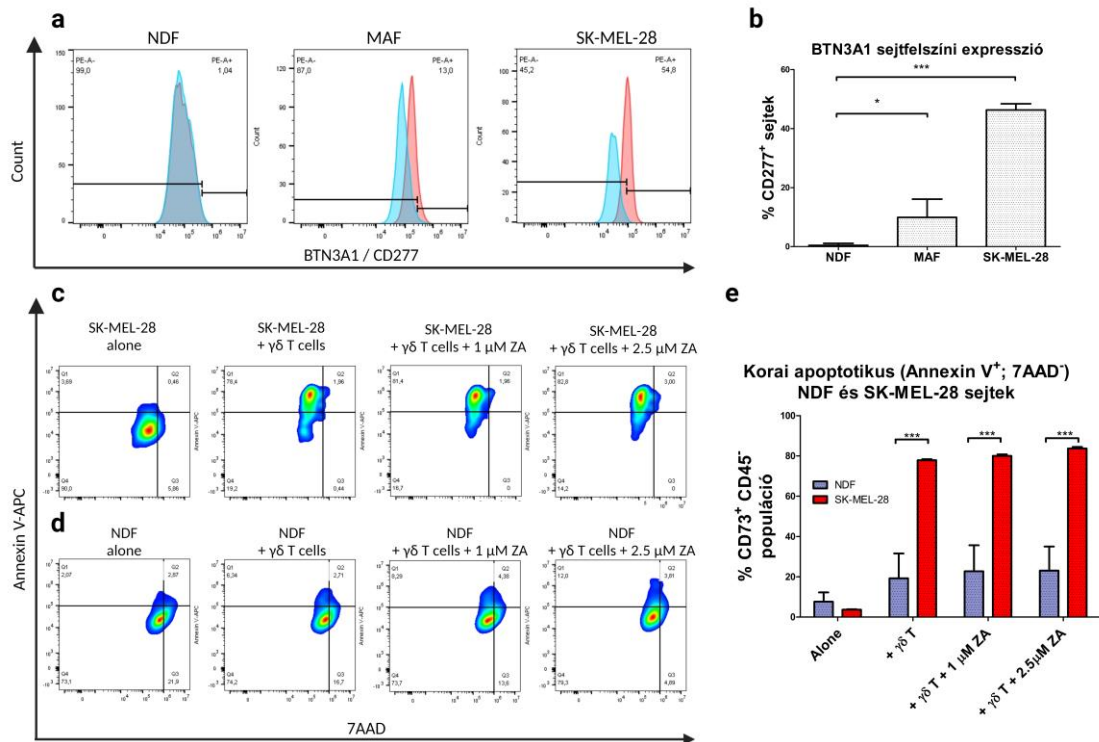
Fehérje szinten az SK-MEL-28 melanóma sejtek expresszálták a BTN3A1 molekulát a legnagyobb mértékben, az analizált populáció több, mint 50%-os pozitivitást mutatott a jelöletlen SK-MEL-28 kontrollhoz képest (**16. ábra** a rész). Ezt követően a MAF-okban átlagosan 10% feletti pozitivitást mutattak a jelöletlen MAF kontroll mintához képest (**16. ábra** a rész). Így mindkét sejttypusban szignifikánsan magasabb BTN3A1 expresszió volt detektálható az NDF sejtekhez képest, ahol alig volt detektálható a BTN3A1 sejt felszíni jelenléte.

Az áramlási citometriai BTN3A1 sejt felszíni mérések alapján az NDF sejteket nagyon alacsony, míg az SK-MEL-28 melanóma sejtvonalat magas BTN3A1 expressziójú kategóriába soroltam. Megismételtem az öt napos áramlási citometriai apoptózis esszét (Anyagok és módszerek 4.2.2.) $\gamma\delta$ T-sejtekkel és SK-MEL-28, vagy NDF sejtekkel, ahol a kokultúra kondíciói megegyeztek a korábbi kondíciókkal.

NDF sejtek esetében a stimulus nélküli $\gamma\delta$ T-sejtek nem okoztak szignifikáns növekedést a korai apoptotikus (Annexin V⁺, 7AAD⁻) populációkban (**16. ábra** e rész). Továbbá az 1 és 2,5 μ M zoledronsav és 100 IU/mL IL-2 nem indukált nagyobb mértékű apoptózist az NDF sejtek esetében, mint a $\gamma\delta$ T sejtek zoledronsav kezelés nélkül.

A MAF-okkal végzett apoptózis esszékkal szemben az SK-MEL-28- $\gamma\delta$ T kokultúrában a stimulus-nélküli $\gamma\delta$ T-sejt-SK-MEL-28 kísérleti beállításnál szignifikánsan magasabb volt a korai apoptotikus populáció az egyedüli SK-MEL-28 kontrollhoz képest (**16. ábra** e rész). Emellett az 1 és 2,5 μ M zoledronsav nem növelte a korai apoptotikus populációkat SK-MEL-28 sejtek esetében, hanem hasonló módon 80% apoptotikus sejtet eredményezett. A MAF- $\gamma\delta$ T-sejt kokultúrában (**13. ábra** és **14. ábra**) nem tapasztaltam azt, hogy a zoledronsav hozzáadása elhanyagolható lenne, így azt a következtetést vontam le, hogy

a magas BTN3A1 expressziójú sejtek esetében a $\gamma\delta$ T-sejtek potens citotoxikus hatással rendelkeznek.



16. ábra: BTN3A1 expresszió és $\gamma\delta$ T-sejt indukált apoptózis fibroblasztokban és SK-MEL-28 sejtekben. (a) Reprezentatív hisztogramjai a BTN3A1 expresszióknak NDF (n=3), MAF (n=3) és SK-MEL-28 sejteken. (b) BTN3A1 expresszió fibroblasztokon és SK-MEL-28 sejtvonalon. (c) Korai (Annexin V⁺; 7AAD⁻) és késői (Annexin V⁺; 7AAD⁺) apoptotikus SK-MEL-28 populációk reprezentatív denzitás plotjai. (d) Korai (Annexin V⁺; 7AAD⁻) és késői (Annexin V⁺; 7AAD⁺) apoptotikus NDF populációk (n=3) reprezentatív denzitás plotjai. (e) Korai (Annexin V⁺; 7AAD⁻) és késői (Annexin V⁺; 7AAD⁺) apoptotikus NDF és SK-MEL-28 populációk [CD73⁺, CD45⁻] százalékos értékei 5 nap kokultúra után zoledronsav stimulált $\gamma\delta$ T-sejtekkel. A hibásávok az átlag értékeket jelölik \pm SD. * p < 0.05 ** p < 0.01 and *** p < 0.001.

Mivel ezekre a sejtekre nem volt szignifikáns hatással a $\gamma\delta$ T-sejtek citotoxikus aktivitása, ezzel szemben a magasabb expressziójú melanóma sejtvonalra (SK-MEL-28) viszont igen megerősítette azt, hogy a $\gamma\delta$ TCR–BTN2A1–BTN3A1 tengely a fő faktor az apoptotikus folyamatokban.

Az, hogy az apoptózis gátlása anti-TCR $\gamma\delta$ és anti-BTN2A1 antitestekkel csak részleges csökkenést eredményezett azt mutatja, hogy más molekuláknak is (pl: NKG2D-MICA/MICB/ULBP kapcsolat) szerepe lehet ebben az interakcióban.

5.6.2. A $\gamma\delta$ T-sejtek által indukált MAF apoptózisban szerepe van a $\gamma\delta$ TCR-butirofilin tengelynek

A $\gamma\delta$ T-sejt és MAF interakció részletesebb, molekuláris szintű megismeréséhez módosítva megismételtem az eredeti apoptózis esszéket.

Feltételezéseim alapján a MAF-ok apoptózisához hozzájárulnak azok a molekulák, melyeket korábban a $\gamma\delta$ T-sejtek és tumorsejtek interakciójában azonosítottak [162], [163]. A zoledronsav hozzájárul az IPP felhalmozódáshoz MAF-okban, majd az IPP kötődik a BTN3A1 molekula intracelluláris részéhez. Ez konformációváltozást előidézve lehetővé teszi, hogy kapcsolódjon az intracelluláris B30.2 doménejeiken keresztül a BTN2A1 molekulához. Az aktív konformáció így közreműködik abban, hogy a $\gamma\delta$ T-sejt V γ 9 lánc (a CDR2 és CDR3 régiók között) kötődni tudjon a BTN2A1-hez, aktiválva így a $\gamma\delta$ T-sejt citotoxikus funkcióját, képessé téve a $\gamma\delta$ T-sejteket a MAF-ok apoptózisának indukálására. Fontos megjegyezni, hogy a BTN3A1 kötő partnerét a $\gamma\delta$ T-sejten nem ismerjük, de egy feltételezett ligand a CDR3, amely összekapcsolja a BTN3A1-et és a $\gamma\delta$ TCR-t.

Ehhez a stimulus nélküli és az 1-2,5 μ M zoledronsavval stimulált $\gamma\delta$ T-sejt-MAF kondíciók mellett bevezettem olyan kísérleti beállításokat is, ahol a kokultúra butirofileket és/vagy $\gamma\delta$ TCR-t célzó antitesteket is tartalmazott. Egy stimuláló hatású ($\gamma\delta$ T-sejt citotoxikus hatást növelő) anti-BTN3A1 (20.1 klón) antitestet [164]–[166], alkalmaztam 1 μ g/mL koncentrációban zoledronsav nélkül és zoledronsav mellett, arra a kérdésre keresve a választ, hogy képes-e növelni a korai apoptotikus populációt MAF-okban.

A nem-stimulált $\gamma\delta$ T-sejt-MAF kontrollhoz képest az anti-BTN3A1 és az anti-BTN3A1 + zoledronsav is szignifikánsan növelte a korai apoptotikus MAF populációt (**17. ábra**). Hozzá kell tenni, hogy az anti-BTN3A1 és zoledronsav együttes kombinációja nem eredményezett szignifikáns különbséget az egyedüli zoledronsav stimulus kondícióhoz képest. A MAF-ok és $\gamma\delta$ T-sejtek közötti direkt interakció bemutatására 5-5 μ g/mL anti-

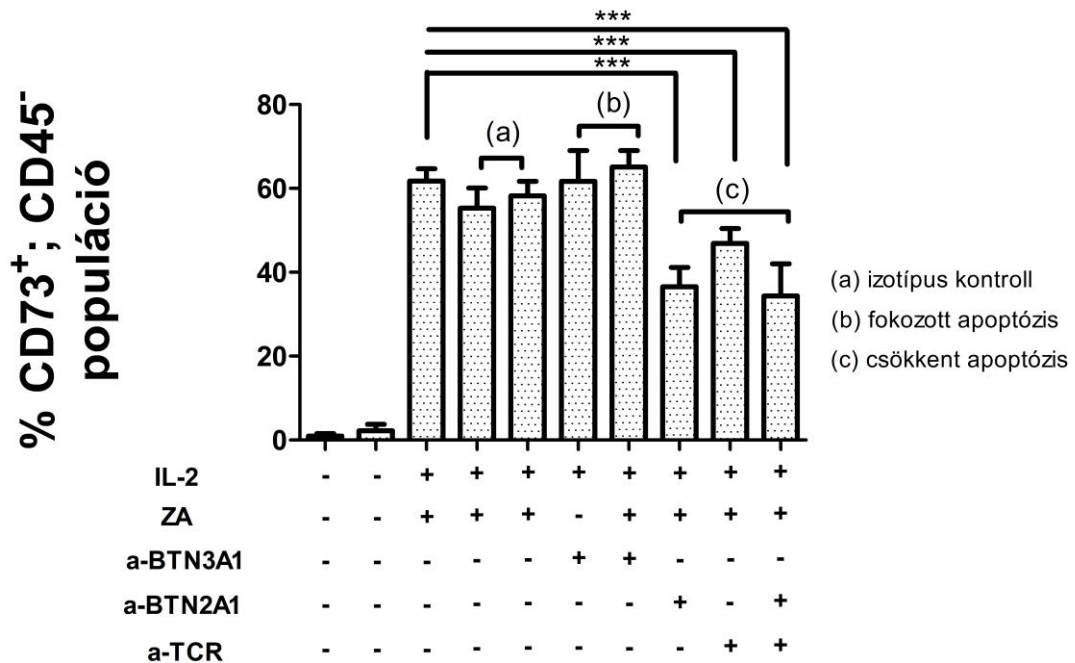
BTN2A1 és anti-TCR $\gamma\delta$ (B1 klón) antitestet alkalmaztam [167] és az 1 μM zoledronsavval stimulált kondícióhoz hasonlítottam, hogy milyen mértékben befolyásolja a MAF-ok apoptózisát.

Kísérletes munkámban korlátozó tényező volt, hogy gátló anti-BTN3A1 antitest nem volt számomra elérhető, vagy ezen fehérje géncsendesítését MAF-okban nem valósítottam meg. Ehelyett a molekuláris mechanizmus igazolására olyan alacsony BTN3A1 expressziójú fibroblasztokkal végeztem kísérleteket, melyek nem daganatos páciensekből lettek izolálva, hanem egészséges bőrszövetből (Eredmények 5.6.1 fejezet)

A kísérletes eredményeim azt mutatták, hogy az anti-BTN2A1 antitesttel pre-inkubált, az anti-TCR $\gamma\delta$ antitesttel és az anti-BTN2A1 + anti-TCR $\gamma\delta$ antitestekkel pre-inkubált kokultúrákban szignifikánsan csökkent a MAF-ok korai apoptózisa (**17. ábra**).

Az apoptózis esszé továbbá az alkalmazott antitesteknek megfelelő izotípus kontroll antitesteket is tartalmazott. Ezek alapján elmondható, hogy a $\gamma\delta$ TCR -butirofilin interakció szerepet játszik a $\gamma\delta$ T-sejtek MAF-okra kifejtett citotoxikus hatásában.

Korai apoptotikus (Annexin V⁺; 7AAD⁻) MAF-ok



17. ábra: $\gamma\delta$ T-sejt és MAF interakció vizsgálata különböző $\gamma\delta$ TCR target molekulák célzó antitestek jelenléte mellett: BTN2A1 gátlás anti-BTN2A1 antitesttel, $\gamma\delta$ T-sejt receptor blokkolás anti- $\gamma\delta$ TCR (B1 klón) antitesttel, BTN3A1 stimuláció CD277/BTN3A1 monoklonális antitesttel (20.1 klón) egér IgG κ 1 izotípus kontroll és nyúl IgG izotípus kontroll mellett. A hibasávok az átlag értékeket mutatják \pm SD. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$

A megváltozott apoptotikus populációk alapján így igazolható a feltevés, hogy zoledronsav hozzájárul az IPP felhalmozódáshoz MAF-okban, majd az IPP kötődik a BTN3A1 molekula intracelluláris részéhez. Ez konformációváltozást előidézve lehetővé teszi, hogy kapcsolódjon az intracelluláris B30.2 doménejeiken keresztül a BTN2A1 molekulához. Az aktív konformáció így közreműködik abban, hogy a $\gamma\delta$ T-sejt V γ 9 lánc (a CDR2 és CDR3 régiók között) kötődni tudjon a BTN2A1-hez, aktiválva így a $\gamma\delta$ T-sejt citotoxikus funkcióját, képessé téve a $\gamma\delta$ T-sejteket a MAF-ok apoptózisának indukálására. Fontos megjegyezni, hogy a BTN3A1 kötő partnerét a $\gamma\delta$ T-sejten nem ismerjük, de egy feltételezett ligand a CDR3, amely összekapcsolja a BTN3A1-et és a $\gamma\delta$ TCR-t.

6. Összefoglaló és kitekintés

A melanóma tumor mikrokörnyezetében a MAF-oknak kitüntetett szerepe van a tumor növekedésének és az intratumorális immun mechanizmusok befolyásolásában, valamint a helyi áttétképződésben [168]. Mivel ismert, hogy a MAF-ok képesek gátolni a tumorba bejutó CD8 T-sejteket és NK-sejteket, a kutatásaim során egy másik immunsejt populációval a makrofágokkal való kölcsönhatásukat vizsgáltam. A klasszikus M1-M2 makrofág polarizáció régóta ismert jelenség [169]. A tumor mikrokörnyezetében azonban a két fenotípus homogén populációja ritkán figyelhető meg. Ehelyett a makrofágok heterogén populációinak keveréke található meg, folyamatos átmenetben az M1 és M2 állapotok között. A két makrofág típus citokin termelésének és együttes immunszuppresszív hatásának vizsgálata kihívást jelent, azonban egyes citokinek szintje utalhat a tumor azon tulajdonságára, hogy milyen mértékben befolyásolja az anti-tumor immunválaszt. Az IL-10 kiemelkedő jelentőséggel bír az immunszuppresszív citokinek közül [170]. Különböző daganatokban a TAM-ok IL-10 citokin termelése korrelál a betegség kedvezőtlen prognózisával és az alacsony túlélési aránnyal [171], [172]. Mindemellett a tumoron belüli IL-10 szekréció kapcsolatban áll a primer melanóma áttét képző képességével [118], [171]. Tekintettel a MAF-ok és MSC-k immunszuppresszív hasonlóságaira, vizsgálataim során arra a kérdésre kerestem a választ, hogy, hogyan befolyásolják a MAF-ok a makrofágok IL-10 szekrécióját.

Kutatási céloom továbbá annak a kérdésnek a megválaszolására irányult, hogy a már több, mint tizenöt éve gyógyszerként elfogadott, és egyébként a $\gamma\delta$ T-sejtek *ex vivo* proliferáltatására is használt zoledronsav alkalmazható-e *in vitro* modellben $\gamma\delta$ T-sejtek aktiválására, és a MAF-ok eliminálására. Kísérleteim során a MAF-ok apoptózisa $\gamma\delta$ T-sejteken keresztül kimutatható volt, továbbá MAF-ok esetében is azonosítottuk azokat a butirofilin molekulákat, melyek korábban a $\gamma\delta$ T-sejtek és tumorsejtek interakciójában mutattak be.

Úgy vélem, hogy a kutatásaim adatai hozzájárulnak a melanóma TME részletesebb megismeréséhez, illetve további kutatások kezdeményezéséhez mind a MAF immunszuppresszív hatásának vizsgálata terén, mind a $\gamma\delta$ T-sejtek terápiás felhasználásának területén. Emellett ezeknek a stratégiáknak a továbbfejlesztése ígéretes eredményekkel szolgálhat az agresszív szolid tumorok gyógyításában.

7. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni a segítséget témavezetőimnek Dr. Mayer Baláznak és Dr. Gyöngy Miklósnak, hogy figyelemmel és türelemmel kísérték kutatási éveimet és megfelelő iránymutatást szolgáltak. Köszönettel tartozom Dr. Németh Krisztiánnak, a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika Őssejtlabor vezetőjének, hogy teret biztosított kutatásaimnak és szakmai tanácsaira támaszkodhattam. Továbbá kiemelt köszönetet érdemelnek az Őssejtlabor munkatársai: Dr. Çakır Uğur, Dr. Silló Pálma és Széky Balázs, akiknek a kutatásaimat megelőző munkájuk biztosította a vizsgálataim alapjait. Köszönettel tartozom Dr. Érsek Barbarának a MAF sejtek karakterizációjában végzett munkájáért és az immunológiai területén nyújtott segítségével. Továbbá Mazán Mercédesznek és Suba Flóriánné Adriennek a molekuláris biológiai technikák elsajátításában való segítségért. Ezen kívül köszönöm a szakmai segítségnyújtást bőronkológia, immunológia és sejtbológia területén Prof. Dr. Kárpáti Saroltának és Prof. Dr. Mezey Évának.

Köszönetet érdemel kutatásaim anyagi hátterének biztosításában a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (Prof. Dr. Kárpáti Sarolta és Dr. Németh Krisztián által elnyert OTKA NN 114460 pályázat, valamint a biobankot támogató TKP2021-NVA-15 pályázat), a Semmelweis Egyetem (Dékáni Keret 2015 Dr. Németh Krisztián és Dr. Mayer Balázs számára), továbbá a Pázmány Péter Egyetem Információs Technológiai és Bionika Kar, hogy biztosította a szükséges feltételek a doktori tanulmányaim során.

Köszönöm a jelenlegi munkatársaimnak és a munkahelyemnek, hogy további kutatásokban és fejlesztésekben vehetek részt. Nem utolsó sorban hálával tartozom családomnak, hogy figyelemmel és odaadással kísérték végig doktori éveimet, a barátaimnak és a páromnak, akik megértéssel és szeretettel fordultak felém ez időszak alatt.

8. Publikációk

Tézis alapjául szolgáló publikációk:

Çakır Uğur, Hajdara Anna, Széky Balázs, Mayer Balázs, Kárpáti Sarolta, Mezey Éva, Silló Pálma, Szakács Gergely, Füredi András, Pós Zoltán, Érsek Barbara, Sárdy Miklós, Németh Krisztián (2021) Mesenchymal-Stromal Cell-like Melanoma-Associated Fibroblasts Increase IL-10 Production by Macrophages in a Cyclooxygenase/Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Dependent Manner, *Cancers*, 13 : 24 Paper: 6173 , 22 p (IF: 5,2)

Hajdara Anna, Çakır Uğur, Érsek Barbara, Silló Pálma, Széky Balázs, Barna Gábor, Shaaban Faqi, Gyöngy Miklós, Kárpáti Sarolta, Mayer Balázs (2023) Targeting Melanoma-Associated Fibroblasts (MAFs) with Activated $\gamma\delta$ ($V\delta 2$) T Cells: An In Vitro Cytotoxicity Model, *International Journal of Molecular Sciences*, 24 : 16 p. 12893 (IF: 5,6)

Tézishez köthető konferencia közlemények:

Hajdara Anna, Çakır Uğur, Érsek Barbara, Silló Pálma, Széky Balázs, Barna Gábor, Faqi Shaaban, Kárpáti Sarolta, Németh Krisztián és Mayer Balázs (2023) Zoledronic acid activated Gamma Delta T cells Induce Apoptosis in Melanoma-Associated Fibroblasts; A Magyar Immunológiai Társaság 52. Vándorgyűlése, Kecskemét

Egyéb publikációk:

Ren Jiaqiang, Szombath Gergely, Vitale-Cross Lynn, Stroncek F. David, Robey G. Pamela, Hajdara Anna, Szalayova Ildikó, Mayer Balázs, Martin Daniel, Mezey Éva, Németh Krisztián (2023) The Potential Use of THP-1, a Monocytic Leukemia Cell Line, to Predict Immune-Suppressive Potency of Human Bone-Marrow Stromal Cells (BMSCs) In Vitro: A Pilot Study, *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (17) : 13258 (IF: 5,6)

Széky Balázs, Mayer Balázs, Gyöngy Miklós, Hajdara Anna, Barsi Szilvia, Kárpáti Sarolta, Németh Krisztián (2021) Tri-Lineage Differentiation of NTERA2 Clone D1 Cells towards Neural, Hepatic and Osteogenic Lineages In Vitro, *Folia Biologica* 67 : 5-6 pp. 174-182. , 9 p (IF: 0,6)

Egyéb konferencia közlemények:

Hajdara Anna, Megyeri Márton, Brunyánszki Attila, Szöör Árpád, Hornyák Péter, Murányi József, Péterfi Zsolt, Tóvári József, Farkas Sándor (2023) Chlorotoxin Analogue Targeted CAR-T Therapy Against Glioblastoma Multiforme; Immuno-Oncology Summit Europe, London

Brunyánszki Attila, Hajdara Anna, Szöőr Árpád, Hornyák Péter, Murányi József, Tóvári József, Péterfi Zalán, Farkas Sándor, Megyeri Márton (2023) Chlorotoxin Analogue Targeted CAR-T Therapy Against Glioblastoma Multiforme; Magyar Immunológiai Társaság 52. Vándorgyűlése, Kecskemét

Szekér Patrik, Hajdara Anna, Rácz Gábor, Murányi József, Csóti Ágota, Ngo Hanh Nikoletta, Megyeri Márton, Kitka Tamás, Kovács Péter, Brunyánszki Attila, Kemény Ágnes, Pintér Erika, Helyes Zsuzsanna, Gyöngyösi Norbert, Panyi György, Farkas Sándor, Péterfi Zalán, Hornyák Péter (2023) Developing Selective Kv1.3 Inhibitors for the Treatment of Autoimmune Diseases; Magyar Immunológiai Társaság 52. Vándorgyűlése, Kecskemét

9. Irodalomjegyzék

- [1] B. Ahmed, M. I. Qadir, and S. Ghafoor, "Malignant Melanoma: Skin Cancer-Diagnosis, Prevention, and Treatment," *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, vol. 30, no. 4, pp. 291–297, 2020, doi: 10.1615/CRITREVEUKARYOTGENEEXPR.2020028454.
- [2] B. A. Gilchrest, M. S. Eller, A. C. Geller, and M. Yaar, "The Pathogenesis of Melanoma Induced by Ultraviolet Radiation," <https://doi.org/10.1056/NEJM199904293401707>, vol. 340, no. 17, pp. 1341–1348, Apr. 1999, doi: 10.1056/NEJM199904293401707.
- [3] A. E. Chang, L. H. Karnell, and H. R. Menck, "The national cancer data base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: A summary of 84,836 cases from the past decade," *Cancer*, vol. 83, no. 8, pp. 1664–1678, 1998, doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19981015)83:8<1664::AID-CNCR23>3.0.CO;2-G.
- [4] R. I. Hartman and J. Y. Lin, "Cutaneous Melanoma-A Review in Detection, Staging, and Management," *Hematol Oncol Clin North Am*, vol. 33, no. 1, pp. 25–38, Feb. 2019, doi: 10.1016/J.HOC.2018.09.005.
- [5] M. Maio, "Melanoma as a model tumour for immuno-oncology," *Ann Oncol*, vol. 23 Suppl 8, no. SUPPL.8, Sep. 2012, doi: 10.1093/ANNONC/MDS257.
- [6] D. Gonzalez *et al.*, "BRAF mutation testing algorithm for vemurafenib treatment in melanoma: recommendations from an expert panel," *Br J Dermatol*, vol. 168, no. 4, pp. 700–707, Apr. 2013, doi: 10.1111/BJD.12248.
- [7] C. Abildgaard and P. Guldberg, "Molecular drivers of cellular metabolic reprogramming in melanoma," *Trends Mol Med*, vol. 21, no. 3, pp. 164–171, Mar. 2015, doi: 10.1016/J.MOLMED.2014.12.007.
- [8] P. K. Dhanyamraju and T. N. Patel, "Melanoma therapeutics: a literature review," *J Biomed Res*, vol. 36, no. 2, pp. 1–21, 2022, doi: 10.7555/JBR.36.20210163.
- [9] A. Avagliano *et al.*, "Metabolic Plasticity of Melanoma Cells and Their Crosstalk With Tumor Microenvironment," *Front Oncol*, vol. 10, May 2020, doi: 10.3389/FONC.2020.00722.
- [10] M. R. Ruocco *et al.*, "Metabolic flexibility in melanoma: A potential therapeutic target," *Semin Cancer Biol*, vol. 59, pp. 187–207, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2019.07.016.
- [11] A. Alqathama, "BRAF in malignant melanoma progression and metastasis: potentials and challenges.," *Am J Cancer Res*, vol. 10, no. 4, pp. 1103–1114, 2020.
- [12] G. A. Hobbs, C. J. Der, and K. L. Rossman, "RAS isoforms and mutations in cancer at a glance," *J Cell Sci*, vol. 129, no. 7, pp. 1287–1292, Apr. 2016, doi: 10.1242/JCS.182873.

- [13] A. E. Cust *et al.*, “Melanoma risk for CDKN2A mutation carriers who are relatives of population-based case carriers in Australia and the UK,” *J Med Genet*, vol. 48, no. 4, pp. 266–272, Apr. 2011, doi: 10.1136/JMG.2010.086538.
- [14] M. Rossi, C. Pellegrini, L. Cardelli, V. Ciciarelli, L. Di Nardo, and M. C. Fagnoli, “Familial Melanoma: Diagnostic and Management Implications,” *Dermatol Pract Concept*, vol. 9, no. 1, pp. 10–16, Jan. 2019, doi: 10.5826/DPC.0901A03.
- [15] J. Mazurkiewicz, A. Simiczyjew, E. Dratkiewicz, M. Ziętek, R. Matkowski, and D. Nowak, “Stromal Cells Present in the Melanoma Niche Affect Tumor Invasiveness and Its Resistance to Therapy,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 2, pp. 1–21, Jan. 2021, doi: 10.3390/IJMS22020529.
- [16] J. Villanueva and M. Herlyn, “Melanoma and the Tumor Microenvironment,” *Curr Oncol Rep*, vol. 10, no. 5, p. 439, 2008, doi: 10.1007/S11912-008-0067-Y.
- [17] A. L. Labrousse, C. Ntayi, W. Hornebeck, and P. Bernard, “Stromal reaction in cutaneous melanoma,” *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 49, no. 3, pp. 269–275, 2004, doi: 10.1016/j.critrevonc.2003.10.007.
- [18] K. Shiga, M. Hara, T. Nagasaki, T. Sato, H. Takahashi, and H. Takeyama, “Cancer-associated fibroblasts: Their characteristics and their roles in tumor growth,” *Cancers*, vol. 7, no. 4. MDPI AG, pp. 2443–2458, Dec. 11, 2015. doi: 10.3390/cancers7040902.
- [19] G. Botti, M. Cerrone, G. Scognamiglio, A. Anniciello, P. A. Ascierto, and M. Cantile, “Microenvironment and tumor progression of melanoma: new therapeutic perspectives,” *J Immunotoxicol*, vol. 10, no. 3, pp. 235–252, Jul. 2013, doi: 10.3109/1547691X.2012.723767.
- [20] M. Marzagalli, N. D. Ebelt, and E. R. Manuel, “Unraveling the crosstalk between melanoma and immune cells in the tumor microenvironment,” *Semin Cancer Biol*, vol. 59, pp. 236–250, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2019.08.002.
- [21] M. F. Sanmamed and L. Chen, “A Paradigm Shift in Cancer Immunotherapy: From Enhancement to Normalization,” *Cell*, vol. 175, no. 2, pp. 313–326, Oct. 2018, doi: 10.1016/J.CELL.2018.09.035.
- [22] Y. Pan, Y. Yu, X. Wang, and T. Zhang, “Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity,” *Front Immunol*, vol. 11, Dec. 2020, doi: 10.3389/FIMMU.2020.583084.
- [23] A. Mantovani, F. Marchesi, A. Malesci, L. Laghi, and P. Allavena, “Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology,” *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 14, no. 7, pp. 399–416, Jul. 2017, doi: 10.1038/NRCLINONC.2016.217.
- [24] C. Atri, F. Z. Guerfali, and D. Laouini, “Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases,” *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 6, Jun. 2018, doi: 10.3390/IJMS19061801.

- [25] C. O'Reilly, M. Doroudian, L. Mawhinney, and S. C. Donnelly, "Targeting MIF in Cancer: Therapeutic Strategies, Current Developments, and Future Opportunities," *Med Res Rev*, vol. 36, no. 3, pp. 440–460, May 2016, doi: 10.1002/MED.21385.
- [26] R. Noy and J. W. Pollard, "Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy," *Immunity*, vol. 41, no. 1, pp. 49–61, Jul. 2014, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2014.06.010.
- [27] J. Xie, Z. Huang, X. Yu, L. Zhou, and F. Pei, "Clinical implications of macrophage dysfunction in the development of osteoarthritis of the knee," *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 46, pp. 36–44, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.CYTOGFR.2019.03.004.
- [28] Y. Liang, N. Yang, G. Pan, B. Jin, S. Wang, and W. Ji, "Elevated IL-33 promotes expression of MMP2 and MMP9 via activating STAT3 in alveolar macrophages during LPS-induced acute lung injury," *Cell Mol Biol Lett*, vol. 23, p. 52, 2018, doi: 10.1186/S11658-018-0117-X.
- [29] H. Asaga and A. Ishigami, "Microglial expression of peptidylarginine deiminase 2 in the prenatal rat brain," *Cell Mol Biol Lett*, vol. 12, no. 4, pp. 536–544, 2007, doi: 10.2478/S11658-007-0025-Y.
- [30] T. A. Wynn, A. Chawla, and J. W. Pollard, "Macrophage biology in development, homeostasis and disease," *Nature*, vol. 496, no. 7446, pp. 445–455, Apr. 2013, doi: 10.1038/NATURE12034.
- [31] X. Yang, Y. Chang, and W. Wei, "Emerging role of targeting macrophages in rheumatoid arthritis: Focus on polarization, metabolism and apoptosis," *Cell Prolif*, vol. 53, no. 7, p. e12854, Jul. 2020, doi: 10.1111/CPR.12854.
- [32] P. J. Murray *et al.*, "Perspective Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines," 2014, doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.
- [33] T. D. Ricketts, N. Prieto-Dominguez, P. S. Gowda, and E. Ubil, "Mechanisms of Macrophage Plasticity in the Tumor Environment: Manipulating Activation State to Improve Outcomes," *Front Immunol*, vol. 12, p. 642285, May 2021, doi: 10.3389/FIMMU.2021.642285/BIBTEX.
- [34] A. Mantovani, F. Marchesi, A. Malesci, L. Laghi, and P. Allavena, "Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology," *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 14, no. 7, pp. 399–416, Jul. 2017, doi: 10.1038/NRCLINONC.2016.217.
- [35] B. Z. Qian *et al.*, "CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast tumor metastasis," *Nature*, vol. 475, no. 7355, p. 222, Jul. 2011, doi: 10.1038/NATURE10138.
- [36] A. Mantovani and P. Allavena, "The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages," *J Exp Med*, vol. 212, no. 4, pp. 435–445, Apr. 2015, doi: 10.1084/JEM.20150295.
- [37] F. O. Martinez and S. Gordon, "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment.," *F1000Prime Rep*, vol. 6, p. 13, 2014, doi: 10.12703/P6-13.

- [38] L. Cassetta and J. W. Pollard, "Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 17, no. 12, pp. 887–904, Nov. 2018, doi: 10.1038/NRD.2018.169.
- [39] W. H. Fridman, L. Zitvogel, C. Sautès-Fridman, and G. Kroemer, "The immune contexture in cancer prognosis and treatment," *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 14, no. 12, pp. 717–734, Dec. 2017, doi: 10.1038/NRCLINONC.2017.101.
- [40] S. Lee and K. Margolin, "Tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma," *Curr Oncol Rep*, vol. 14, no. 5, pp. 468–474, Oct. 2012, doi: 10.1007/S11912-012-0257-5.
- [41] T. A. Barnes and E. Amir, "HYPER or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer," *Br J Cancer*, vol. 117, no. 4, pp. 451–460, Aug. 2017, doi: 10.1038/BJC.2017.220.
- [42] R. L. Camp, V. Neumeister, and D. L. Rimm, "A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers," *J Clin Oncol*, vol. 26, no. 34, pp. 5630–5637, Dec. 2008, doi: 10.1200/JCO.2008.17.3567.
- [43] W. H. Clark, L. From, E. A. Bernardino, and M. C. Mihm, "The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin," *Cancer Res*, vol. 29, no. 3, pp. 705–727, 1969.
- [44] K. J. Busam *et al.*, "Histologic classification of tumor-infiltrating lymphocytes in primary cutaneous malignant melanoma. A study of interobserver agreement," *Am J Clin Pathol*, vol. 115, no. 6, pp. 856–860, 2001, doi: 10.1309/G6EK-Y6EH-OLGY-6D6P.
- [45] A. Spatz, G. Batist, and A. M. Eggermont, "The biology behind prognostic factors of cutaneous melanoma," *Curr Opin Oncol*, vol. 22, no. 3, pp. 163–168, May 2010, doi: 10.1097/CCO.0B013E328337FE8F.
- [46] D. Ruiters, T. Bogenrieder, D. Elder, and M. Herlyn, "Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects," *Lancet Oncol*, vol. 3, no. 1, pp. 35–43, 2002, doi: 10.1016/S1470-2045(01)00620-9.
- [47] A. Ladányi, "Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma," *Pigment Cell Melanoma Res*, vol. 28, no. 5, pp. 490–500, Sep. 2015, doi: 10.1111/PCMR.12371.
- [48] A. Durgeau, Y. Virk, S. Corgnac, and F. Mami-Chouaib, "Recent Advances in Targeting CD8 T-Cell Immunity for More Effective Cancer Immunotherapy," *Front Immunol*, vol. 9, no. JAN, Jan. 2018, doi: 10.3389/FIMMU.2018.00014.
- [49] L. Martínez-Lostao, A. Anel, and J. Pardo, "How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells?," *Clin Cancer Res*, vol. 21, no. 22, pp. 5047–5056, Nov. 2015, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0685.
- [50] J. P. Böttcher and C. Reis e Sousa, "The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity," *Trends Cancer*, vol. 4, no. 11, pp. 784–792, Nov. 2018, doi: 10.1016/J.TRECAN.2018.09.001.

- [51] N. Jacquelot *et al.*, “Immunophenotyping of Stage III Melanoma Reveals Parameters Associated with Patient Prognosis,” *J Invest Dermatol*, vol. 136, no. 5, pp. 994–1001, 2016, doi: 10.1016/J.JID.2015.12.042.
- [52] Y. Simoni *et al.*, “Bystander CD8+ T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates,” *Nature*, vol. 557, no. 7706, pp. 575–579, May 2018, doi: 10.1038/S41586-018-0130-2.
- [53] J. M. Chauvin *et al.*, “TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8+ T cells in melanoma patients,” *J Clin Invest*, vol. 125, no. 5, pp. 2046–2058, May 2015, doi: 10.1172/JCI80445.
- [54] H. J. Kim and H. Cantor, “CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful,” *Cancer Immunol Res*, vol. 2, no. 2, pp. 91–98, Feb. 2014, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0216.
- [55] J. Borst, T. Ahrends, N. Bąbała, C. J. M. Melief, and W. Kastenmüller, “CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy,” *Nat Rev Immunol*, vol. 18, no. 10, pp. 635–647, Oct. 2018, doi: 10.1038/S41577-018-0044-0.
- [56] K. A. Ward-Hartstonge and R. A. Kemp, “Regulatory T-cell heterogeneity and the cancer immune response,” *Clin Transl Immunology*, vol. 6, no. 9, Sep. 2017, doi: 10.1038/CTI.2017.43.
- [57] Y. Togashi, K. Shitara, and H. Nishikawa, “Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy,” *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 16, no. 6, pp. 356–371, Jun. 2019, doi: 10.1038/S41571-019-0175-7.
- [58] D. V. Sawant *et al.*, “Adaptive plasticity of IL-10+ and IL-35+ Treg cells cooperatively promotes tumor T cell exhaustion,” *Nat Immunol*, vol. 20, no. 6, pp. 724–735, Jun. 2019, doi: 10.1038/S41590-019-0346-9.
- [59] G. Christoffersson and M. von Herrath, “Regulatory Immune Mechanisms beyond Regulatory T Cells,” *Trends Immunol*, vol. 40, no. 6, pp. 482–491, Jun. 2019, doi: 10.1016/J.IT.2019.04.005.
- [60] C. M. Laumont, A. C. Banville, M. Gilardi, D. P. Hollern, and B. H. Nelson, “Tumour-infiltrating B cells: immunological mechanisms, clinical impact and therapeutic opportunities HHS Public Access,” *Nat Rev Cancer*, vol. 22, no. 7, pp. 414–430, 2022, doi: 10.1038/s41568-022-00466-1.
- [61] D. S. Thommen *et al.*, “A transcriptionally and functionally distinct PD-1+ CD8+ T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade,” *Nat Med*, vol. 24, no. 7, pp. 994–1004, Jun. 2018, doi: 10.1038/S41591-018-0057-Z.
- [62] H. H. Workel *et al.*, “A Transcriptionally Distinct CXCL13+CD103+CD8+ T-cell Population Is Associated with B-cell Recruitment and Neoantigen Load in Human Cancer,” *Cancer Immunol Res*, vol. 7, no. 5, pp. 784–796, May 2019, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0517.

- [63] L. Saul *et al.*, "IgG subclass switching and clonal expansion in cutaneous melanoma and normal skin," *Sci Rep*, vol. 6, Jul. 2016, doi: 10.1038/SREP29736.
- [64] Z. N. Willsmore *et al.*, "B Cells in Patients With Melanoma: Implications for Treatment With Checkpoint Inhibitor Antibodies," *Front Immunol*, vol. 11, p. 622442, Jan. 2020, doi: 10.3389/FIMMU.2020.622442.
- [65] F. E. Lund, "Cytokine-producing B lymphocytes – key regulators of immunity," *Curr Opin Immunol*, vol. 20, no. 3, p. 332, Jun. 2008, doi: 10.1016/J.COI.2008.03.003.
- [66] J. Griss *et al.*, "B cells sustain inflammation and predict response to immune checkpoint blockade in human melanoma," *Nature Communications 2019 10:1*, vol. 10, no. 1, pp. 1–14, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-12160-2.
- [67] A. Avagliano *et al.*, "Metabolic Reprogramming of Cancer Associated Fibroblasts: The Slavery of Stromal Fibroblasts," *Biomed Res Int*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/6075403.
- [68] A. Arcucci, M. R. Ruocco, G. Granato, A. M. Sacco, and S. Montagnani, "Cancer: An Oxidative Crosstalk between Solid Tumor Cells and Cancer Associated Fibroblasts," *Biomed Res Int*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/4502846.
- [69] J. M. Sorrell and A. I. Caplan, "Fibroblast heterogeneity: more than skin deep," *J Cell Sci*, vol. 117, no. 5, pp. 667–675, Feb. 2004, doi: 10.1242/JCS.01005.
- [70] V. S. LeBleu and R. Kalluri, "A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact," *Dis Model Mech*, vol. 11, no. 4, Apr. 2018, doi: 10.1242/DMM.029447.
- [71] V. Thulabandu, D. Chen, and R. P. Atit, "Dermal fibroblast in cutaneous development and healing," *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, vol. 7, no. 2, p. e307, Mar. 2018, doi: 10.1002/wdev.307.
- [72] E. Rognoni *et al.*, "Fibroblast state switching orchestrates dermal maturation and wound healing," *Mol Syst Biol*, vol. 14, no. 8, p. 8174, Aug. 2018, doi: 10.15252/MSB.20178174.
- [73] A. Avagliano *et al.*, "Metabolic Reprogramming of Cancer Associated Fibroblasts: The Slavery of Stromal Fibroblasts," *Biomed Res Int*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/6075403.
- [74] B. Hinz, G. Celetta, J. J. Tomasek, G. Gabbiani, and C. Chaponnier, "Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity," *Mol Biol Cell*, vol. 12, no. 9, pp. 2730–2741, 2001, doi: 10.1091/MBC.12.9.2730.
- [75] G. Serini *et al.*, "The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1," *J Cell Biol*, vol. 142, no. 3, pp. 873–881, Aug. 1998, doi: 10.1083/JCB.142.3.873.
- [76] V. Romano *et al.*, "Influence of Tumor Microenvironment and Fibroblast Population Plasticity on Melanoma Growth, Therapy Resistance and Immunoescape," *International*

Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 5283, vol. 22, no. 10, p. 5283, May 2021, doi: 10.3390/IJMS22105283.

- [77] M. R. Ruocco *et al.*, "Involvement of Breast Cancer-Associated Fibroblasts in Tumor Development, Therapy Resistance and Evaluation of Potential Therapeutic Strategies," *Curr Med Chem*, vol. 25, no. 29, pp. 3414–3434, Mar. 2018, doi: 10.2174/0929867325666180309120746.
- [78] P. F. Wong *et al.*, "Multiplex quantitative analysis of cancer-associated fibroblasts and immunotherapy outcome in metastatic melanoma," *J Immunother Cancer*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, Jul. 2019, doi: 10.1186/S40425-019-0675-0/TABLES/3.
- [79] T. Liu, L. Zhou, Y. Xiao, T. Andl, and Y. Zhang, "BRAF Inhibitors Reprogram Cancer-Associated Fibroblasts to Drive Matrix Remodeling and Therapeutic Escape in Melanoma," *Cancer Res*, vol. 82, no. 3, pp. 419–432, Feb. 2022, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-0614/675724/P/BRAF-INHIBITORS-REPROGRAM-CANCER-ASSOCIATED.
- [80] N. Erez, M. Truitt, P. Olson, and D. Hanahan, "Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- κ B-Dependent Manner," *Cancer Cell*, vol. 17, no. 2, pp. 135–147, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.041.
- [81] V. Sanz-Moreno *et al.*, "ROCK and JAK1 Signaling Cooperate to Control Actomyosin Contractility in Tumor Cells and Stroma," *Cancer Cell*, vol. 20, no. 2, pp. 229–245, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.ccr.2011.06.018.
- [82] E. Sahai *et al.*, "A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts," *Nat Rev Cancer*, vol. 20, no. 3, pp. 174–186, 2020, doi: 10.1038/s41568-019-0238-1.
- [83] J. H. Yeon *et al.*, "Cancer-derived exosomes trigger endothelial to mesenchymal transition followed by the induction of cancer-associated fibroblasts," *Acta Biomater*, vol. 76, pp. 146–153, Aug. 2018, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2018.07.001.
- [84] B. Chandra Jena, S. Sarkar, L. Rout, and M. Mandal, "The transformation of cancer-associated fibroblasts: Current perspectives on the role of TGF- β in CAF mediated tumor progression and therapeutic resistance," *Cancer Lett*, vol. 520, pp. 222–232, Nov. 2021, doi: 10.1016/J.CANLET.2021.08.002.
- [85] S. Dror *et al.*, "Melanoma miRNA trafficking controls tumour primary niche formation," *Nat Cell Biol*, vol. 18, no. 9, pp. 1006–1017, Sep. 2016, doi: 10.1038/NCB3399.
- [86] Z. Li *et al.*, "Nodal Facilitates Differentiation of Fibroblasts to Cancer-Associated Fibroblasts that Support Tumor Growth in Melanoma and Colorectal Cancer," *Cells* 2019, Vol. 8, Page 538, vol. 8, no. 6, p. 538, Jun. 2019, doi: 10.3390/CELLS8060538.
- [87] P. P. Naik, "Cutaneous Malignant Melanoma: A Review of Early Diagnosis and Management," *World J Oncol*, vol. 12, no. 1, p. 7, Feb. 2021, doi: 10.14740/WJON1349.

- [88] L. Monteran and N. Erez, "The dark side of fibroblasts: Cancer-associated fibroblasts as mediators of immunosuppression in the tumor microenvironment," *Frontiers in Immunology*, vol. 10, no. AUG. Frontiers Media S.A., 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.01835.
- [89] P. Micke and A. Östman, "Exploring the tumour environment: cancer-associated fibroblasts as targets in cancer therapy," *Expert Opin Ther Targets*, vol. 9, no. 6, pp. 1217–1233, Dec. 2005, doi: 10.1517/14728222.9.6.1217.
- [90] J. Bhat, K. Placek, and S. Faissner, "Contemplating Dichotomous Nature of Gamma Delta T Cells for Immunotherapy," *Front Immunol*, vol. 13, May 2022, doi: 10.3389/FIMMU.2022.894580.
- [91] C. Bottino *et al.*, "Two subsets of human T lymphocytes expressing gamma/delta antigen receptor are identifiable by monoclonal antibodies directed to two distinct molecular forms of the receptor," *J Exp Med*, vol. 168, no. 2, pp. 491–505, Aug. 1988, doi: 10.1084/JEM.168.2.491.
- [92] T. Hinz *et al.*, "Identification of the complete expressed human TCR V gamma repertoire by flow cytometry," *Int Immunol*, vol. 9, no. 8, pp. 1065–1072, 1997, doi: 10.1093/INTIMM/9.8.1065.
- [93] D. Wesch, T. Hinz, and D. Kabelitz, "Analysis of the TCR Vgamma repertoire in healthy donors and HIV-1-infected individuals," *Int Immunol*, vol. 10, no. 8, pp. 1067–1075, 1998, doi: 10.1093/INTIMM/10.8.1067.
- [94] M. Bonneville, R. L. O'Brien, and W. K. Born, "Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity," *Nat Rev Immunol*, vol. 10, no. 7, pp. 467–478, Jul. 2010, doi: 10.1038/NRI2781.
- [95] D. Kabelitz, R. Serrano, L. Kouakanou, C. Peters, and S. Kalyan, "Cancer immunotherapy with $\gamma\delta$ T cells: many paths ahead of us," *Cellular and Molecular Immunology*, vol. 17, no. 9. Springer Nature, pp. 925–939, Sep. 01, 2020. doi: 10.1038/s41423-020-0504-x.
- [96] V. Groh, R. Rhinehart, H. Secrist, S. Bauer, K. H. Grabstein, and T. Spies, "Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived T cells of MICA and MICB," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 96, no. 12, pp. 6879–6884, Jun. 1999, doi: 10.1073/pnas.96.12.6879.
- [97] A. E. Simões, B. Di Lorenzo, and B. Silva-Santos, "Molecular Determinants of Target Cell Recognition by Human $\gamma\delta$ T Cells," *Front Immunol*, vol. 9, no. APR, Apr. 2018, doi: 10.3389/FIMMU.2018.00929.
- [98] D. Wesch, C. Peters, H. H. Oberg, K. Pietschmann, and D. Kabelitz, "Modulation of $\gamma\delta$ T cell responses by TLR ligands," *Cell Mol Life Sci*, vol. 68, no. 14, pp. 2357–2370, Jul. 2011, doi: 10.1007/S00018-011-0699-1.

- [99] K. Pietschmann *et al.*, "Toll-like receptor expression and function in subsets of human gammadelta T lymphocytes," *Scand J Immunol*, vol. 70, no. 3, pp. 245–255, Sep. 2009, doi: 10.1111/J.1365-3083.2009.02290.X.
- [100] P. Constant *et al.*, "Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands," *Science*, vol. 264, no. 5156, pp. 267–270, 1994, doi: 10.1126/SCIENCE.8146660.
- [101] M. Hintz *et al.*, "Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in *Escherichia coli*," *FEBS Lett*, vol. 509, no. 2, pp. 317–322, Dec. 2001, doi: 10.1016/S0014-5793(01)03191-X.
- [102] Y. Tanaka, Y. Tanaka, B. R. Bloom, C. T. Morita, M. B. Brenner, and E. Nieves, "Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells," *Nature*, vol. 375, no. 6527, pp. 155–158, May 1995, doi: 10.1038/375155A0.
- [103] J. L. Goldstein and M. S. Brown, "Regulation of the mevalonate pathway," *Nature*, vol. 343, no. 6257, pp. 425–430, 1990, doi: 10.1038/343425A0.
- [104] H. J. Gober, M. Kistowska, L. Angman, P. Jenö, L. Mori, and G. De Libero, "Human T cell receptor $\gamma\delta$ cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 197, no. 2, pp. 163–168, Jan. 2003, doi: 10.1084/jem.20021500.
- [105] V. Kunzmann, E. Bauer, and M. Wilhelm, "Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate," *N Engl J Med*, vol. 340, no. 9, pp. 737–738, Mar. 1999, doi: 10.1056/NEJM199903043400914.
- [106] K. Thompson, J. Rojas-Navea, and M. J. Rogers, "Alkylamines cause Vgamma9Vdelta2 T-cell activation and proliferation by inhibiting the mevalonate pathway," *Blood*, vol. 107, no. 2, pp. 651–654, Jan. 2006, doi: 10.1182/BLOOD-2005-03-1025.
- [107] E. Espinosa *et al.*, "Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells," *J Biol Chem*, vol. 276, no. 21, pp. 18337–18344, Jan. 2001, doi: 10.1074/JBC.M100495200.
- [108] J. H. Park and H. K. Lee, "Function of $\gamma\delta$ T cells in tumor immunology and their application to cancer therapy," *Exp Mol Med*, vol. 53, pp. 318–327, 2021, doi: 10.1038/s12276-021-00576-0.
- [109] B. Érsek *et al.*, "Melanoma-associated fibroblasts impair CD8+ T cell function and modify expression of immune checkpoint regulators via increased arginase activity," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 78, no. 2, pp. 661–673, 2020, doi: 10.1007/s00018-020-03517-8.
- [110] M. Balsamo *et al.*, "Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no. 49, pp. 20847–20852, Dec. 2009, doi: 10.1073/pnas.0906481106.

- [111] H. Cheng *et al.*, "Paracrine effect of NRG1 and HGF drives resistance to MEK inhibitors in metastatic uveal melanoma," *Cancer Res*, vol. 75, no. 13, pp. 2737–2748, Jul. 2015, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0370.
- [112] H. Raskov, A. Orhan, S. Gaggari, and I. Gögenur, "Cancer-Associated Fibroblasts and Tumor-Associated Macrophages in Cancer and Cancer Immunotherapy," *Front Oncol*, vol. 11, p. 668731, May 2021, doi: 10.3389/FONC.2021.668731/BIBTEX.
- [113] B. Gok Yavuz *et al.*, "Cancer associated fibroblasts sculpt tumour microenvironment by recruiting monocytes and inducing immunosuppressive PD-1+ TAMs," *Scientific Reports* 2019 9:1, vol. 9, no. 1, pp. 1–15, Feb. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-39553-z.
- [114] L. Chiossone *et al.*, "Mesenchymal Stromal Cells Induce Peculiar Alternatively Activated Macrophages Capable of Dampening Both Innate and Adaptive Immune Responses," *Stem Cells*, vol. 34, no. 7, pp. 1909–1921, Jul. 2016, doi: 10.1002/STEM.2369.
- [115] J. Stagg and J. Galipeau, "Mechanisms of immune modulation by mesenchymal stromal cells and clinical translation," *Curr Mol Med*, vol. 13, no. 5, pp. 856–867, May 2013, doi: 10.2174/1566524011313050016.
- [116] K. Németh *et al.*, "Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production," *Nat Med*, vol. 15, no. 1, pp. 42–49, Jan. 2009, doi: 10.1038/NM.1905.
- [117] U. Çakır *et al.*, "Mesenchymal-Stromal Cell-like Melanoma-Associated Fibroblasts Increase IL-10 Production by Macrophages in a Cyclooxygenase/Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Dependent Manner," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 24, p. 6173, Dec. 2021, doi: 10.3390/CANCERS13246173.
- [118] W. Dummer, J. C. Becker, A. Schwaaf, M. Leverkus, T. Moll, and E. B. Bröcker, "Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma," *Melanoma Res*, vol. 5, no. 1, pp. 67–68, 1995, doi: 10.1097/00008390-199502000-00008.
- [119] F. Rubel *et al.*, "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*, vol. 138, no. 3, pp. 679–687, Mar. 2018, doi: 10.1016/J.JID.2017.09.036.
- [120] M. Hennequart *et al.*, "Constitutive IDO1 Expression in Human Tumors Is Driven by Cyclooxygenase-2 and Mediates Intrinsic Immune Resistance," *Cancer Immunol Res*, vol. 5, no. 8, pp. 695–709, Aug. 2017, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0400.
- [121] Z. Ding *et al.*, "iNOS Associates With Poor Survival in Melanoma: A Role for Nitric Oxide in the PI3K-AKT Pathway Stimulation and PTEN S-Nitrosylation," *Front Oncol*, vol. 11, Feb. 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.631766.
- [122] H. Fleisch, "Bisphosphonates. Pharmacology and use in the treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease," *Drugs*, vol. 42, no. 6, pp. 919–944, 1991, doi: 10.2165/00003495-199142060-00003.

- [123] I. R. Reid *et al.*, “Zoledronate,” *Bone*, vol. 137, Aug. 2020, doi: 10.1016/J.BONE.2020.115390.
- [124] P. M. Camacho *et al.*, “AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS/AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY CLINICAL PRACTICE GUIDELINES FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF POSTMENOPAUSAL OSTEOPOROSIS-2020 UPDATE,” *Endocr Pract*, vol. 26, no. Suppl 1, pp. 1–46, May 2020, doi: 10.4158/GL-2020-0524SUPPL.
- [125] P. Chotiyarnwong and E. V. McCloskey, “Pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis and options for treatment,” *Nat Rev Endocrinol*, vol. 16, no. 8, pp. 437–447, Aug. 2020, doi: 10.1038/S41574-020-0341-0.
- [126] I. Kravets, “Paget’s Disease of Bone: Diagnosis and Treatment,” *Am J Med*, vol. 131, no. 11, pp. 1298–1303, Nov. 2018, doi: 10.1016/J.AMJMED.2018.04.028.
- [127] M. Chakhtoura and G. El-Hajj Fuleihan, “Treatment of Hypercalcemia of Malignancy,” *Endocrinol Metab Clin North Am*, vol. 50, no. 4, pp. 781–792, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.ECL.2021.08.002.
- [128] K. Anderson *et al.*, “Role of Bone-Modifying Agents in Multiple Myeloma: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update,” *J Clin Oncol*, vol. 36, no. 8, pp. 812–818, Mar. 2018, doi: 10.1200/JCO.2017.76.6402.
- [129] E. L. Greear and A. Bankole, “Zoledronate,” *StatPearls*, Jun. 2023.
- [130] S. Sun and C. E. McKenna, “Farnesyl pyrophosphate synthase modulators: a patent review (2006 - 2010),” *Expert Opin Ther Pat*, vol. 21, no. 9, pp. 1433–1451, Sep. 2011, doi: 10.1517/13543776.2011.593511.
- [131] M. Miyashita, T. Shimizu, E. Ashihara, and O. Ukimura, “Strategies to Improve the Antitumor Effect of $\gamma\delta$ T Cell Immunotherapy for Clinical Application,” *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 8910*, vol. 22, no. 16, p. 8910, Aug. 2021, doi: 10.3390/IJMS22168910.
- [132] A. J. Roelofs, M. Jauhainen, H. Mönkkönen, M. J. Rogers, J. Mönkkönen, and K. Thompson, “Peripheral blood monocytes are responsible for gammadelta T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP,” *Br J Haematol*, vol. 144, no. 2, pp. 245–250, Jan. 2009, doi: 10.1111/J.1365-2141.2008.07435.X.
- [133] J. Bennouna *et al.*, “Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma,” *Cancer Immunol Immunother*, vol. 57, no. 11, pp. 1599–1609, Nov. 2008, doi: 10.1007/S00262-008-0491-8.
- [134] Y. Tanaka *et al.*, “Synthesis of pyrophosphate-containing compounds that stimulate Vgamma2Vdelta2 T cells: application to cancer immunotherapy,” *Med Chem*, vol. 3, no. 1, pp. 85–99, Dec. 2007, doi: 10.2174/157340607779317544.

- [135] M. I. G. Raaijmakers *et al.*, "A new live-cell biobank workflow efficiently recovers heterogeneous melanoma cells from native biopsies," *Exp Dermatol*, vol. 24, no. 5, pp. 377–380, May 2015, doi: 10.1111/EXD.12683.
- [136] M. Genin, F. Clement, A. Fattaccioli, M. Raes, and C. Michiels, "M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide," *BMC Cancer*, vol. 15, no. 1, Aug. 2015, doi: 10.1186/s12885-015-1546-9.
- [137] S. A. Amici *et al.*, "CD38 Is Robustly Induced in Human Macrophages and Monocytes in Inflammatory Conditions," *Front Immunol*, vol. 9, no. JUL, Jul. 2018, doi: 10.3389/FIMMU.2018.01593.
- [138] E. Surdziel *et al.*, "Multidimensional pooled shRNA screens in human THP-1 cells identify candidate modulators of macrophage polarization," *PLoS One*, vol. 12, no. 8, p. e0183679, Aug. 2017, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0183679.
- [139] P. Li *et al.*, "Comparative Proteomic Analysis of Polarized Human THP-1 and Mouse RAW264.7 Macrophages," *Front Immunol*, vol. 12, Jun. 2021, doi: 10.3389/FIMMU.2021.700009.
- [140] V. Serbulea *et al.*, "Macrophage phenotype and bioenergetics are controlled by oxidized phospholipids identified in lean and obese adipose tissue," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 115, no. 27, pp. E6254–E6263, Jul. 2018, doi: 10.1073/PNAS.1800544115/-/DCSUPPLEMENTAL.
- [141] F. Raggi *et al.*, "Regulation of Human Macrophage M1-M2 Polarization Balance by Hypoxia and the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1," *Front Immunol*, vol. 8, no. SEP, Sep. 2017, doi: 10.3389/FIMMU.2017.01097.
- [142] S. Tiainen *et al.*, "High numbers of macrophages, especially M2-like (CD163-positive), correlate with hyaluronan accumulation and poor outcome in breast cancer," *Histopathology*, vol. 66, no. 6, pp. 873–883, May 2015, doi: 10.1111/HIS.12607.
- [143] Z. J. Xu *et al.*, "The M2 macrophage marker CD206: a novel prognostic indicator for acute myeloid leukemia," *Oncoimmunology*, vol. 9, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1080/2162402X.2019.1683347.
- [144] S. Edin *et al.*, "The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, Oct. 2012, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0047045.
- [145] W. Ma *et al.*, "Butyrophilin-like 9 expression is associated with outcome in lung adenocarcinoma," *BMC Cancer*, vol. 21, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12885-021-08790-9.
- [146] Y. Du *et al.*, "Cancer cell-expressed BTNL2 facilitates tumour immune escape via engagement with IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells," *Nat Commun*, vol. 13, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/S41467-021-27936-8.

- [147] Z. Jiang and F. Liu, "Butyrophilin-Like 9 (BTNL9) Suppresses Invasion and Correlates with Favorable Prognosis of Uveal Melanoma," *Med Sci Monit*, vol. 25, pp. 3190–3198, 2019, doi: 10.12659/MSM.914074.
- [148] S. Vavassori *et al.*, "Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human $\gamma\delta$ T cells," *Nat Immunol*, vol. 14, no. 9, pp. 908–916, Sep. 2013, doi: 10.1038/ni.2665.
- [149] S. Hosomi *et al.*, "Intestinal epithelial cell endoplasmic reticulum stress promotes MULT1 up-regulation and NKG2D-mediated inflammation," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 214, no. 10, pp. 2985–2997, Oct. 2017, doi: 10.1084/JEM.20162041.
- [150] S. Hosomi *et al.*, "Intestinal epithelial cell endoplasmic reticulum stress promotes MULT1 up-regulation and NKG2D-mediated inflammation," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 214, no. 10, pp. 2985–2997, Oct. 2017, doi: 10.1084/JEM.20162041.
- [151] L. Starick *et al.*, "Butyrophilin 3A (BTN3A, CD277)-specific antibody 20.1 differentially activates V γ 9V δ 2 TCR clonotypes and interferes with phosphoantigen activation," *Eur J Immunol*, vol. 47, no. 6, pp. 982–992, Jun. 2017, doi: 10.1002/EJI.201646818.
- [152] J. Ren *et al.*, "The Potential Use of THP-1, a Monocytic Leukemia Cell Line, to Predict Immune-Suppressive Potency of Human Bone-Marrow Stromal Cells (BMSCs) In Vitro: A Pilot Study," *International Journal of Molecular Sciences 2023*, Vol. 24, Page 13258, vol. 24, no. 17, p. 13258, Aug. 2023, doi: 10.3390/IJMS241713258.
- [153] M. M. Nielsen, D. A. Witherden, and W. L. Havran, " $\gamma\delta$ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues," *Nat Rev Immunol*, vol. 17, no. 12, pp. 733–745, Dec. 2017, doi: 10.1038/NRI.2017.101.
- [154] R. E. Burnham *et al.*, "Characterization of Donor Variability for $\gamma\delta$ T Cell ex vivo Expansion and Development of an Allogeneic $\gamma\delta$ T Cell Immunotherapy," *Front Med (Lausanne)*, vol. 7, Nov. 2020, doi: 10.3389/FMED.2020.588453.
- [155] U. Laggner *et al.*, "Regression of melanoma metastases following treatment with the n-bisphosphonate zoledronate and localised radiotherapy," *Clinical Immunology*, vol. 131, no. 3, pp. 367–373, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.clim.2009.01.008.
- [156] L. Eibenschutz *et al.*, "Evaluation of hedgehog pathway inhibition on nevoid basal cell carcinoma syndrome fibroblasts and basal cell carcinoma-associated fibroblasts: Are vismodegib and sonidegib useful to target cancer-prone fibroblasts?," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 22, p. 5858, Nov. 2021, doi: 10.3390/CANCERS13225858/S1.
- [157] A. J. Gentles *et al.*, "The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers," *Nat Med*, vol. 21, no. 8, pp. 938–945, Aug. 2015, doi: 10.1038/NM.3909.
- [158] A. Marabelle *et al.*, "316 EVICTION Study: Preliminary results in solid tumor patients with ICT01, a first-in-class, gamma9 delta2 T cell activating antibody targeting butyrophilin-3A," *J Immunother Cancer*, vol. 8, no. Suppl 3, pp. A194–A195, Nov. 2020, doi: 10.1136/JITC-2020-SITC2020.0316.

- [159] M. Rigau, A. P. Uldrich, and A. Behren, "Targeting butyrophilins for cancer immunotherapy," *Trends Immunol*, vol. 42, no. 8, pp. 670–680, Aug. 2021, doi: 10.1016/J.IT.2021.06.002.
- [160] C. E. Cano *et al.*, "BTN2A1, an immune checkpoint targeting V γ 9V δ 2 T cell cytotoxicity against malignant cells," *Cell Rep*, vol. 36, no. 2, p. 109359, Jul. 2021, doi: 10.1016/J.CELREP.2021.109359.
- [161] H. C. Jonus *et al.*, "Dissecting the cellular components of ex vivo $\gamma\delta$ T cell expansions to optimize selection of potent cell therapy donors for neuroblastoma immunotherapy trials," *Oncoimmunology*, vol. 11, no. 1, 2022, doi: 10.1080/2162402X.2022.2057012.
- [162] D. Okuno *et al.*, "Comparison of a Novel Bisphosphonate Prodrug and Zoledronic Acid in the Induction of Cytotoxicity in Human V γ 2V δ 2 T Cells," *Front Immunol*, vol. 11, Jul. 2020, doi: 10.3389/FIMMU.2020.01405.
- [163] H. Mönkkönen, P. D. Ottewell, J. Kuokkanen, J. Mönkkönen, S. Auriola, and I. Holen, "Zoledronic acid-induced IPP/Apppl production in vivo," *Life Sci*, vol. 81, no. 13, pp. 1066–1070, Sep. 2007, doi: 10.1016/J.LFS.2007.08.007.
- [164] H. Wang *et al.*, "Butyrophilin 3A1 plays an essential role in prenyl pyrophosphate stimulation of human V γ 2V δ 2 T cells," *J Immunol*, vol. 191, no. 3, pp. 1029–1042, Aug. 2013, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1300658.
- [165] C. Harly *et al.*, "Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset," *Blood*, vol. 120, no. 11, pp. 2269–2279, Sep. 2012, doi: 10.1182/BLOOD-2012-05-430470.
- [166] L. Starick *et al.*, "Butyrophilin 3A (BTN3A, CD277)-specific antibody 20.1 differentially activates V γ 9V δ 2 TCR clonotypes and interferes with phosphoantigen activation," *Eur J Immunol*, vol. 47, no. 6, pp. 982–992, Jun. 2017, doi: 10.1002/EJI.201646818.
- [167] D. V. Correia, M. Fogli, K. Hudspeth, M. Gomes Da Silva, D. Mavilio, and B. Silva-Santos, "Differentiation of human peripheral blood V δ 1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor Nkp30 for recognition of lymphoid leukemia cells," *Blood*, vol. 118, no. 4, pp. 992–1001, Jul. 2011, doi: 10.1182/BLOOD-2011-02-339135.
- [168] V. Romano *et al.*, "Influence of Tumor Microenvironment and Fibroblast Population Plasticity on Melanoma Growth, Therapy Resistance and Immunoescape," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 10, May 2021, doi: 10.3390/IJMS22105283.
- [169] M. A, S. A, and L. M, "Macrophage polarization comes of age," *Immunity*, vol. 23, no. 4, pp. 344–346, Oct. 2005, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2005.10.001.
- [170] E. Itakura, R. R. Huang, D. R. Wen, E. Paul, P. H. Wünsch, and A. J. Cochran, "IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence," *Modern Pathology*, vol. 24, no. 6, pp. 801–809, Jun. 2011, doi: 10.1038/modpathol.2011.5.

- [171] J. Nemunaitis, T. Fong, P. Shabe, D. Martineau, and D. Ando, "Comparison of serum interleukin-10 (il-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma," *Cancer Invest*, vol. 19, no. 3, pp. 239–247, 2001, doi: 10.1081/CNV-100102550.
- [172] S. S *et al.*, "Regulation of TNFalpha and interleukin-10 production by prostaglandins I(2) and E(2): studies with prostaglandin receptor-deficient mice and prostaglandin E-receptor subtype-selective synthetic agonists," *Biochem Pharmacol*, vol. 61, no. 9, pp. 1153–1160, May 2001, doi: 10.1016/S0006-2952(01)00586-X.