

Uloga TLR-a u upali i imunosti na tumor

Adžić, Stipe

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:734639>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Stipe Adžić

Uloga TLR-a u upali i imunosti na tumor

Završni rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Stipe Adžić

**The Role of TLRs in Inflammation and
Tumor Immunity**

Bachelor thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj završni rad izrađen je u sklopu studijskog programa Molekularne biologije na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Uloga TLR-a u upali i imunosti na tumor

Stipe Adžić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Receptori slični Tollu predstavljaju evolucijski konzerviranu skupinu receptora koji čine prvu liniju zaštite organizma od stranih patogena. Oni prepoznaju komponente patogenih mikroorganizama, inicirajući tako upalnu reakciju i aktivaciju protuvirusne obrane. Prepoznavanje takvih obrazaca potiče oslobađanje upalnih medijatora i kemokina koji privlače imunosne stanice na mjesto infekcije. Nadalje, receptori TLR imaju ključnu ulogu u regulaciji programirane stanične smrti te održavanju homeostaze organizma. Istraživanja sugeriraju da se umjetnom aktivacijom receptora TLR može potaknuti imunosni odgovor temeljen na prirodno-bilačkim stanicama i T-limfocitima. Navedena strategija pokazuje obećavajuće naznake u kontekstu protutumorske terapije. U ovom radu predstavljena je osnovna uloga receptora TLR u održavanju upalnih procesa i imunosti protiv tumora. Podrobno je opisana primjena ovih receptora u poticanju željenog protutumorskog učinka te njihova potencijalna korist u kliničkoj praksi. Ova terapija, bilo samostalno ili u kombinaciji s drugim imunoterapijskim pristupima, predstavlja obećavajuće područje istraživanja u borbi protiv raka.

Ključne riječi: programirana stanična smrt, tumorski mikrookoliš, agonist, antagonist, imunoterapija

(24 stranice, 4 slike, 1 tablica, 85 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

The Role of TLRs in Inflammation and Tumor Immunity

Stipe Adžić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Toll-like receptors (TLRs) represent an evolutionarily conserved group of receptors that constitute the first line of defense against foreign pathogens in the body. These receptors recognize pathogen-associated patterns, thereby initiating an inflammatory reaction and triggering the activation of antiviral defenses. Recognition of such patterns leads to the release of inflammatory mediators and chemokines that attract immune cells to the site of infection. Furthermore, Toll-like receptors play a crucial role in regulating cell death and maintaining organismal homeostasis. Research suggests that artificial activation of TLR signaling can stimulate an immune response based on T cells and natural killer cells. The mentioned strategy shows promising indications in the context of antitumor therapy. This paper presents the fundamental role of TLRs in maintaining inflammatory processes and immunity against tumors. The application of these receptors in promoting the desired antitumor effect is described in detail, along with their potential benefits in clinical practice. This therapy, whether used independently or in combination with other immunotherapeutic approaches, represents a promising area of research in the fight against cancer.

Keywords: programmed cell death, tumor microenvironment, agonist, antagonist, immunotherapy

(24 pages, 4 figures, 1 table, 85 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Nada Oršolić, PhD

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Uloga TLR-a u upali.....	2
2.1. Signalizacija posredovana TLR-ima	2
2.2. Uloga TLR-a u razvoju upale.....	3
3. Programirana stanična smrt i TLR-i.....	4
3.1. Apoptoza	5
3.2. Autofagija.....	6
3.3. Programirana nekroza.....	8
4. TLR-i u imunosti na tumor i kombiniranoj terapiji	10
4.1. Organizacija tumorskog mikrookoliša	10
4.2. Uloga TLR-a u metaboličkom reprogramiranju stanica tumorskoga mikrookoliša	10
4.3. TLR-i u imunosti na tumor.....	12
4.3.1. Protumorska uloga TLR-a	12
4.3.2. Protutumorska uloga TLR-a	13
4.4. Agonisti receptora TLR u kombinaciji s imunoterapijskim pristupima	16
5. Zaključak	17
6. Literatura.....	18
7. Životopis.....	24

1. Uvod

Receptori slični Tollu (engl. *Toll-like receptor*, TLR) predstavljaju evolucijski konzerviranu skupinu transmembranskih receptora koji tvore prvu liniju obrane organizma od raznih patogena. Radi se o receptorima koji prepoznaju molekularne obrasce svojstvene patogenima (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) te ovisno vrsti obrasca dovode do aktivacije različitih transkripcijskih čimbenika uključenih u upalu i uspostavu protuvirusnoga odgovora. Prepoznavanje stranih te vlastitih molekula omogućeno je specifičnom strukturom izvanstanične domene, koja spregnuta s citosolnim ostatkom omogućuje prijenos signala nizvodnom proteinskom kaskadom. Citosolna domena TIR (engl. *Toll/interleukin-1 receptor/resistance protein*) visoko je konzervirana, opisana među različitim skupinama organizama te prisutna u sklopu nekolicine receptora imunostoga sustava. Njezina konzerviranost upućuje na sličnu organizaciju nizvodne signalne kaskade te na preklapanja do kojih dolazi aktivacijom receptora s istom citosolnom domenom, kao što su receptori za interleukine IL-1 te IL-18.

Mogućnost prepoznavanja stranih obrazaca, ali i molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjem tkiva (engl. *damage-associated molecular patterns*, DAMP), ostvarena je složenom strukturom izvanstanične domene bogate leucinom. Donekle plastična organizacija izvanstanične domene omogućuje prepoznavanje ograničene ali dostatne palete obrazaca PAMP koji su esencijalan dio metabolizma patogenih mikroorganizama. Recipročnim evolucijskim odgovorom razvijena je čvrsta veza između urođene imunosti i patogena, dok je istovremeno mikroorganizmima onemogućeno odbacivanje glavne mete imunostoga sustava. Prepoznavanje je ograničeno na nekoliko obrazaca kao što su lipopolisaharidi (LPS), lipoproteini, flagelin, nemetilirani citozin-gvanozin dinukleotid (CpG) te jednolančana RNA (engl. *single-stranded RNA*, ssRNA) (Lim i Staudt 2013).

Osim stranih obrazaca te obrazaca povezanih s oštećenjem tkiva, receptori slični Tollu prepoznaju i tumorske antigene. Takvo prepoznavanje dovodi do indukcije željenog protutumorskog učinka povećanjem ekspresije upalnih citokina i odgovorom citotoksičnih T-limfocita (CTL). Suvremena dostignuća pokazuju da se umjetnom aktivacijom receptora TLR na imunostimuliranim stanicama, uključujući monocite, makrofage i dendritičke stanice (engl. *dendritic cells*, DC), može stimulirati imunitet zasnovan na CD8⁺ T-stanicama i prirodno ubilačkim stanicama (engl. *natural killer*, NK), pri čemu se nazire uloga TLR-a u protutumorskoj terapiji (Mogensen 2009; Cheadle i sur. 2017).

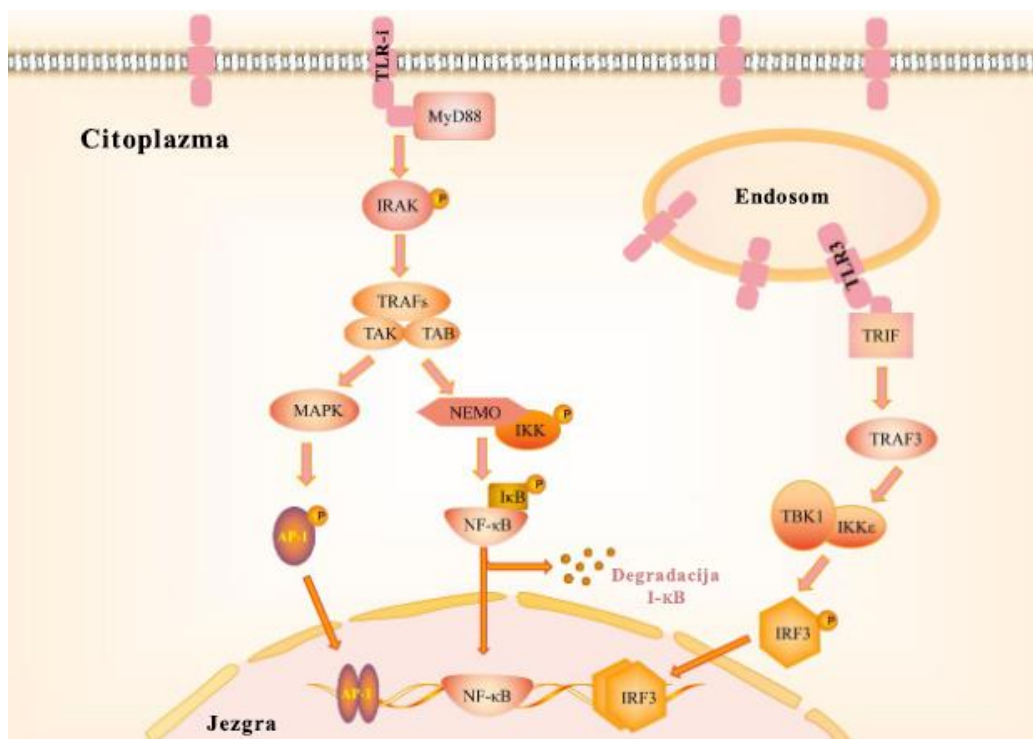
2. Uloga TLR-a u upali

Uloga receptora nalik Tollu predstavlja dugogodišnje područje od interesa u imunologiji. Podrobnije razumijevanje kaskadnih mehanizama aktiviranih receptorima TLR dovelo je do značajnog napretka u istraživanjima urođene imunosti. Manipulacija signalizacijom posredovanom TLR-ima omogućuje inaktivaciju receptora ključnih za razvoj upalnih bolesti te pojačava njihovo protutumorsko djelovanje (Zheng i Ma 2022). Njihova važnost u inicijaciji te održavanju upale dobro je opisana, kako na sistemskoj, tako i na molekularnoj razini. Danas TLR-i predstavljaju ključne receptore prepoznavanja obrazaca DAMP i PAMP te važne aktivatore proupalnoga odgovora od strane urođene imunosti. Iako je urođena imunost često karakterizirana kao nespecifična, zahvaljujući TLR-ima, ali i ostalim receptorima PRR (engl. *pattern recognition receptor*), ona ipak prepoznaje određenu raznolikost obrazaca i odgovara u skladu s njome. Aktivacija transkripcijskih čimbenika poput NF- κ B (engl. *nuclear factor kappa B*), AP1 (engl. *activation protein 1*) te IRF (engl. *interferon regulatory factor*) naglašava raznolikost i važnost tog odgovora u inicijaciji upale te njezinom održavanju.

2.1. Signalizacija posredovana TLR-ima

Vežanje obrazaca PAMP i DAMP dovodi do dimerizacije TLR-a i novačenja adapterskih bjelančevina na unutarstaničnu, citosolnu domenu TIR (Slika 1.). Opisane su razne adapterske bjelančevine spregnute s domenom TIR, a među njima vrijedi istaknuti MyD88 (engl. *myeloid differentiation primary response 88*), TRIF (engl. *TIR domain-containing adaptor-inducing interferon- β*), TIRAP (engl. *TIR domain-containing adaptor protein*) i TRAM (engl. *TRIF related adaptor molecule*) (McGettrick i O'Neill 2004). Većina receptora TLR novači adaptor MyD88, čime se ističe njegova složena uloga u unutarstaničnoj signalnoj kaskadi, pokretanju upalnoga odgovora, ali i inicijaciji apoptoze. Pacijenti s autosomno recesivnom MyD88 deficijencijom skloni su ozbiljnim, često ponavljajućim infekcijama izazvanim piogenim bakterijama, čiji je ishod ponekad letalan (Von Bernuth i sur. 2008). Adaptor MyD88 novači proteinske kinaze IRAK (engl. *IL-1R associated kinase*), koje posljedično vežu i aktiviraju nizvodni čimbenik TRAF6 (engl. *TNF receptor associated factor 6*). Aktivirani TRAF6 zatim sudjeluje u poliubikvitilaciji bjelančevina TAB (engl. *TAK1-binding protein*), čime omogućuje njihovu asocijaciju s kinazom TAK1 (engl. *TGF- β -activated kinase 1*). Komplex TAK1/TAB fosforilira katalitičku beta podjedinicu IKK (engl. *I κ B kinase*), koja aktivirana promovira razgradnju I κ B-a (engl. *inhibitor of NF- κ B*) te oslobađa čimbenik NF- κ B. Konačno, aktivirani NF- κ B translocira u jezgru stanice i potiče transkripciju gena povezanih s upalnim odgovorom. Osim puta NF- κ B, adaptor MyD88 posreduje aktivaciju MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*) signalnog puta te inicira AP-1 ovisan odgovor. TLR3, smješten na unutarstaničnoj endosomalnoj membrani,

omogućuje prepoznavanje virusu svojstvenih, dvolančanih oblika RNA (engl. *double-stranded RNA*, dsRNA). Vežanje odgovarajućeg liganda dovodi do dimerizacije TLR3 te prijenosa signala putem adaptora TRIF. TRIF regrutira citosolne kinaze TBK1 (engl. *TANK-binding kinase 1*) te IKKε, koje fosforiliraju čimbenik IRF, čime posreduju u njegovoj dimerizaciji i translokaciji u jezgru. IRF3 zatim djeluje kao transkripcijski aktivator te potiče stvaranje proupalnih citokina i interferona tipa I.



Slika 1. Shematski prikaz biokemijskih signalnih puteva posredovanih receptorima TLR. Svi TLR-i, osim TLR3, regrutiraju adaptor MyD88, aktivirajući NF-κB i MAPK signalne puteve. TLR3, smješten na unutarstaničnoj endosomalnoj membrani, omogućuje prepoznavanje virusu svojstvenih, dvolančanih oblika RNA (dsRNA) te pokreće put ovisan o adaptoru TRIF. Preuzeto i prilagođeno iz Zheng i Ma 2022.

2.2. Uloga TLR-a u razvoju upale

Upala predstavlja složeni odgovor organizma na biološko, kemijsko ili mehaničko oštećenje tkiva, pri čemu se na oštećeno mjesto novače stanice imunostoga sustava koje aktivno doprinose održavanju te regulaciji započete reakcije. Protuvirusna obrana i upala dobro su okarakterizirani procesi, inicirani brzom reakcijom urođene imunosti. Stanice prisutne u oštećenome tkivu, a posebice antigen-predočne stanice (engl. *antigen-presenting cells*, APC), prepoznaju uzročnike upale, internaliziraju ih te predočavaju stanicama specifične imunosti. Time je definirana uloga urođene imunosti koja, osim što brzo odstranjuje patogene, služi kao važan aktivator mehanizama stečene imunosti.

Makrofagi, dendritičke stanice te neutrofili predstavljaju prvu liniju obrane organizma od samih patogena. Njihovo djelovanje utemeljeno je na učinkovitom prepoznavanju molekularnih obrazaca svojstvenih patogenima te vrlo važnoj sposobnosti internalizacije stranih antigena.

Površinski te unutarstanični receptori TLR sudjeluju u prepoznavanju navedenih obrazaca te aktivaciji signalne kaskade koja postupno dovodi do razvoja upale. Aktivirane stanice luče proupalne citokine, čija je ekspresija ovisna o putu NF- κ B, odnosno putu AP-1. S druge strane, aktivacija čimbenika IRF rezultira oslobađanjem interferona tipa I (IFN-I), uključujući IFN- α i IFN- β . Interferoni tipa I imaju ključnu ulogu u obrani organizma od virusnih infekcija, što dodatno osvjetljava ulogu TLR-a u aktivaciji čimbenika IRF. Naime, unutarstanično lokaliziran TLR3 prepoznaje dvolančane RNA molekule (dsRNA) svojstvene određenim fazama virusnoga ciklusa. Time je omogućeno prepoznavanje ne samo površnih obrazaca, već i onih obrazaca koji su oslobođeni internalizacijom ili prodorom samoga virusa.

Sepsa je ozbiljno medicinsko stanje karakterizirano brzim širenjem upale te pristunošću infekcije koja može dovesti do naglog oštećenja tkiva. Najčešći izvori sepse jesu infekcije dišnih puteva te urogenitalnoga sustava koje zatim propagiraju na sistemsku razinu. TLR4 prepoznaje lipolisaharide (LPS) tijekom akutne infekcije gram-negativnim bakterijama te ima ključnu ulogu u patogenezi sepse. Istraživanje Weighardt i sur. (2002) pokazuje da miševi s deficijencijom MyD88 ne mogu razviti sepsu u modelu polimikrobnog septičkog peritonitisa. U modelima s nedostatnom kinazom IRAK4 otkriveno je da miševi izražavaju oslabljen odgovor na virusne i bakterijske infekcije (Suzuki i sur. 2002). Nadalje, Naiki i sur. (2005) sugeriraju da adaptor MyD88 posreduje ključnu ulogu u zaraznim bolestima, što ukazuje na važnost TLR-a u patogenezi i kontroli sepse.

3. Programirana stanična smrt i TLR-i

Programirana stanična smrt (engl. *programmed cell death*, PCD) jedan je od osnovnih mehanizama održavanja homeostaze, uklanjanja oštećenih te nepotrebnih stanica višestaničnoga organizma. U ovisnosti o morfološkim zbivanjima, kao i unutarstaničnim signalnima koji uvjetuju same procese, PCD se može podijeliti u tri oblika: apoptozu, autofagiju te programiranu nekrozu. Takva podjela ipak nije rigidna jer procesi dijele iste signalne puteve ili nizvodno izvedene adaptore za induciranje programirane stanične smrti. Poznato je da apoptoza i programirana nekroza imaju važnu ulogu u obrani organizma od nastanka tumora, dok autofagija djeluje dvojako, simultano sprječavajući i promovirajući rast tumora (Ou i sur. 2017). Slično obrascima DAMP, receptori nalik Tollu prepoznaju tumorske antigene, pri čemu aktiviraju signalnu kaskadu koja inicira programiranu staničnu smrt (Ouyang i sur. 2012).

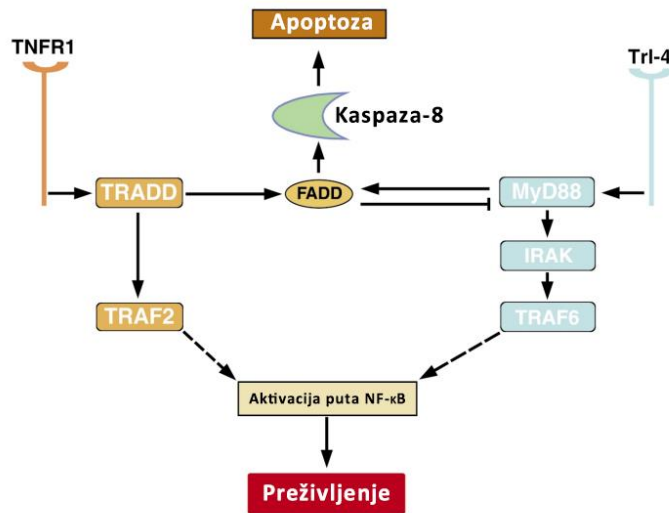
3.1. Apoptoza

Apoptoza je oblik programirane stanične smrti koja se događa u svim višestaničnim organizmima te koja ima ključnu ulogu u razvoju, regulaciji i funkcioniranju imunskog sustava. Anomalije u ovom obliku stanične smrti, vrlo često povezane s autoimunosti, predočuju važnost mehanizama apoptoze u održavanju homeostaze. Mehanizmi apoptoze definirani su dvjema putevima, intrinzičnim i ekstrinzičnim. Ovi putevi razlikuju se u svojim inicijatorima te proteinskim kaskadama koje posreduju u regulaciji stanične smrti.

Ekstrinzični put apoptoze uspostavlja se vezanjem odgovarajućeg liganda na površinski receptor, čime je omogućeno vezanje adapterske molekule na citosolni završetak receptorske bjelančevine. Adaptor zatim novači neaktivne inicijatorske kaspaze, pri čemu nastaje signalni kompleks koji inducira staničnu smrt (engl. *death inducing signaling complex*, DISC). Novonastali kompleks dovodi do konformacijske promjene te rezultira aktivacijom inicijatorskih kaspaza koje aktiviraju nizvodne, izvršne kaspaze.

Intrinzični put ovisan je o unutarstaničnim signalima koji dovode do povećanja permeabilnosti membrane mitohondrija te oslobodjenja međumembranskoga sadržaja u citosol. Izlivanje citokroma c najvažniji je korak u aktivaciji čimbenika Apaf1 (engl. *apoptotic protease activating factor 1*) te formiranju kompleksa poznatog kao apoptosom. Njegova ključna uloga je novačenje i aktivacija inicijatorske kaspaze-9, a time i nizvodna aktivacija izvršnih kaspaza te pokretanje programirane stanične smrti.

Receptori slični Tollu predstavljaju bitan okidač nizvodne signalne kaskade, čiji rezultat ovisi o dostupnosti pojedinih čimbenika koji usmjeruju i određuju staničnu sudbinu. Kao što je već spomenuto, većina receptora TLR novači adaptor MyD88, ističući njegovu važnu ulogu u unutarstaničnom signalnom lancu. Adaptor MyD88, koji osim TIR vezne domene posjeduje i domenu smrti (engl. *death domain*, DD), novači proteinske kinaze IRAK, čime dovodi do aktivacije puta NF- κ B. Jedna od nedovoljno istraženih interakcija adaptora MyD88 odnosi se na specifično povezivanje s čimbenikom FADD (engl. *FAS associated death domain*) (Aliprantis i sur. 2000). Vezanje čimbenika FADD na domenu smrti adaptora MyD88 onemogućuje novačenje kinaze IRAK, pri čemu FADD djeluje kao negativni regulator puta NF- κ B (Slika 2.) (Tourneur i Chiochia 2010). Adaptor FADD novači inicijatorsku prokaspazu-8, čija je aktivacija posredovana mehanizmima proteolitičke autodigestije (Martin i sur. 1998; Muzio i sur. 1996). Aktivirana kaspaza-8 zatim djeluje kao inicijator te pokreće lančanu reakciju efektorskih kaspaza koje dovode do ciljane razgradnje ključnih staničnih komponenti.



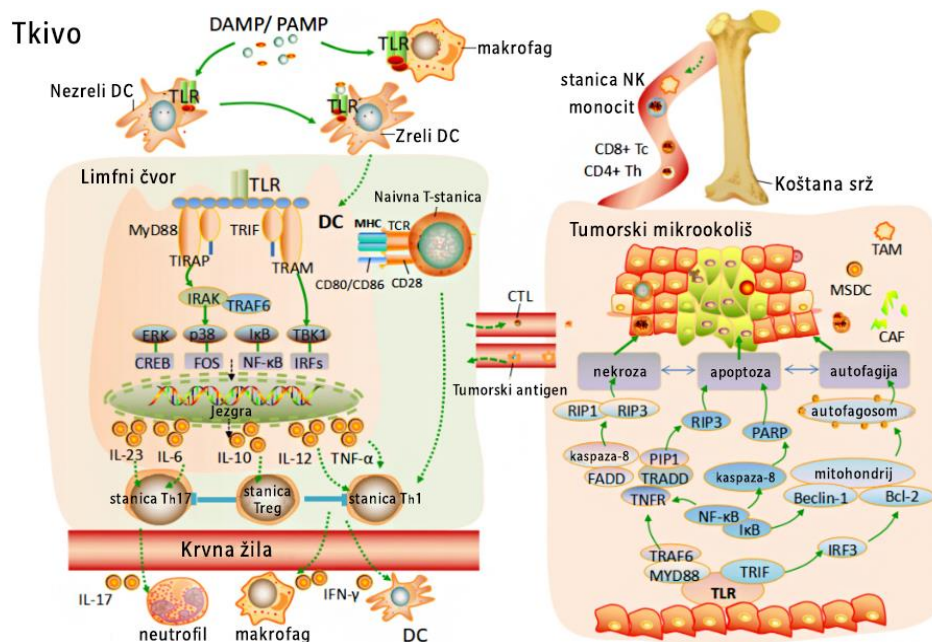
Slika 2. Vežanje čimbenika FADD na domenu smrti adaptora MyD88 onemogućuje aktivaciju puta NF-κB. Adaptori MyD88 i TRADD novače FADD te iniciraju apoptozu posredovanu kaspazom-8. Preuzeto i prilagođeno iz Duckett 2002.

Važnost TLR-a opisana je i u razvoju hepatocelularnog karcinoma (engl. *hepatocellular carcinoma*, HCC) induciranog s poly(I:C), pri čemu aktivacija unutarstaničnog, vezikularnog TLR3 rezultira apoptozom tumorskih stanica (Yoneda i sur. 2008). Ta saznanja otvorila su mogućnost šire primjene agonista TLR-a u medicinske svrhe, a danas je opisana nekolicina lijekova koji imaju terapijski učinak. Jedan od njih jest imikvimod (engl. *imiquimod*, IMQ), sintetski ligand receptora TLR7, koji se koristi za liječenje površinskog karcinoma bazalnih stanica, genitalnih bradavica i aktiničke keratoze. U staničnoj liniji karcinoma bazalnih stanica kože IMQ potiče proizvodnju reaktivnih oblika kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS), čime aktivira put ATM/ATR (engl. *ataxia-telangiectasia, mutated/ATM and Rad3-related*) te stimulira apoptozu ovisnu o p53 (Huang i sur. 2016).

3.2. Autofagija

Proces autofagije predstavlja oblik stanične smrti karakteriziran formiranjem dvostruke membrane koja obavlja nefunkcionalne oštećene stanične organele (mitohondrije, peroksisome, ER), oštećene stanične makromolekule (proteine, glikogen, lipide, nukleotide), kao i neželjeni citoplazmatski sadržaj te ih izravno fuzionira sa sadržajem lizosoma (Lin i sur. 2013). Autofagija pokazuje dvostruki učinak na kontrolu tumora, pri čemu može stimulirati apoptozu iscrpljivanjem tumorskih supresora, ali je i oslabiti selektivno crpeći proapoptotičke proteine (Colell i sur. 2007). Uloga receptorskih proteina TLR u regulaciji procesa autofagije prvotno je opisana na primjeru TLR4. Aktivirani TLR4 promovira autofagiju fagocitiranih mikobakterija u

makrofagima putem VPS34 (engl. *vacuolar protein sorting 34*) posredovanog formiranja citoplazmatskih LC3 (engl. *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) nakupina. Ubrzo je utvrđena uloga i ostalih receptora poput TLR7, koji eliminira *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) pojačanom regulacijom čimbenika ATG5 (engl. *autophagy related 5*) i Beclin-1 (Delgado i sur. 2008). Receptor TLR2 dovodi do eliminacije bakterije *Listeria monocytogenes* aktivacijom autofagije ovisne o ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*) signalnome putu. S vremenom su otkriveni brojni drugi mehanizmi koji povezuju aktivaciju TLR-a s autofagijom te su identificirani dodatni molekularni putevi koji objašnjavaju preciznu ulogu ove kaskade u pokretanju autofagije (Slika 3.). Receptori TLR novače Beclin-1, koji zatim stupa u interakciju s TRAF6, inducirajući poliubikvitinaciju tipa lizin-63 domene BH3 i stvaranje autofagosoma (Shi i Kehrl 2010). Imikvimod (IMQ) ne dovodi samo do apoptoze, već pridonosi autofagalnoj staničnoj smrti u staničnoj liniji melanoma (Huang i sur. 2016; Chang i sur. 2017). Unatoč tome, proces autofagije induciran receptorima TLR3 i TLR4 može potaknuti proliferaciju stanica raka pluća otpuštanjem citokina IL6, CCL2 (engl. *chemokine (C-C motif) ligand 2*) i MMP2 (engl. *matrix metalloproteinase 2*) (Zhan i sur. 2014). U pacijenata s povećanim izražajem TLR4, u fibroblastima povezanim s rakom (engl. *cancer-associated fibroblast*, CAF), zabilježena je veća koncentracija LC3II, čimbenika važnog pri formiranju autofagosoma. Povećana koncentracija LC3II povezana je s višom stopom relapsa i lošijom prognozom (Zhao i sur. 2017).



Slika 3. Vežanje PAMP-ova ili DAMP-ova inicira upalni odgovor te dovodi do programirane stanične smrti. Pri tome dolazi do sazrijevanja stanica APC, koje migriraju u limfne čvorove. Adaptori MYD88 i TRIF potiču proizvodnju citokina koji utječu na diferencijaciju T-stanica. Aktivirane citotoksične T-stanice prelaze u tumorski mikrookoliš gdje posreduju u protutumorskom djelovanju. Receptori TLR pokreću puteve programirane stanične smrti, uključujući apoptozu, autofagiju i nekrozu. Preuzeto i prilagođeno iz Cen i sur. 2018.

3.3. Programirana nekroza

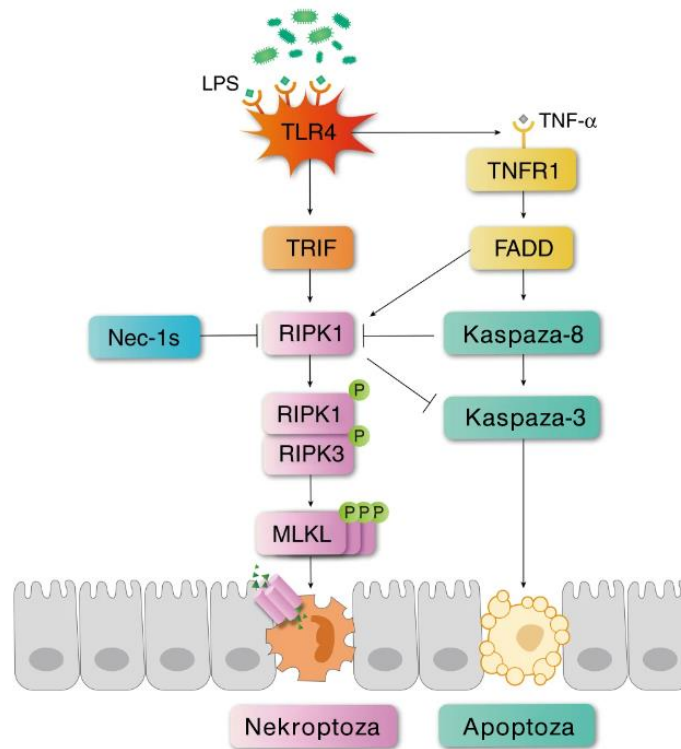
Programirana nekroza dugo je smatrana nereguliranim oblikom stanične smrti čiji je rezultat izlivanje staničnog sadržaja u okolno tkivo te inicijacija upale. Međutim, novija istraživanja ukazuju na kompleksnost mehanizama nekroze te njezinu spregnutost s ostalim oblicima programirane stanične smrti, kao što su apoptoza i autofagija. Ovisno o inicijatorima te unutarstaničnim mehanizmima, programirana nekroza može se kategorizirati u četiri osnovna procesa: nekroza, piroptoza, ferroptoza i NEToza (Berghe i sur. 2014).

Nekroptoza predstavlja važnu inačicu programirane nekroze koja je posredovana formiranjem kompleksa RIPK1/RIPK3, poznatog kao nekrosom (Cho i sur. 2009; Li i sur. 2012). RIPK1 (engl. *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*) i TRADD (engl. *TNFR1-associated death domain protein*) vežu se na domenu smrti receptora TNFR (engl. *tumor necrosis factor receptor*) te sudjeluju u formiranju signalnog kompleksa (TNF-RSC/kompleks I) i aktivaciji puta NF- κ B (Micheau i Rg Tschopp 2003). Kompleks I nastaje disocijacijom kompleksa I s receptora TNFR te sadrži nemođificiranu kinazu RIPK1, kao i bjelančevine TRAF2 (engl. *TNF receptor associated factor 2*), TRADD i FADD. Adaptor FADD novači i aktivira kaspazu-8 te pokreće lančanu reakciju efektorskih kaspaza koje dovode do apoptoze. Inhibicija kaspaze-8, ili njezina nedostupnost, rezultira stvaranjem kompleksa Iib koji usmjeruje stanicu prema programiranoj smrti. Fosforilacijska modifikacija kinaza RIPK1 i RIPK3 (engl. *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3*) omogućuje novačenje i aktivaciju pseudokinaze MLKL (engl. *mixed lineage kinase-like*), koja se veže na plazmatsku membranu i narušava njezinu cjelovitost (Dondelinger i sur. 2014). Kompleks RIPK1/RIPK3 uključen je u oslobađanje reaktivnih oblika kisika (ROS), čime doprinosi daljnjem razvoju nekroze (Fulda 2016). Ovime je omogućeno izlivanje staničnog sadržaja u okolno tkivo, kao i dodatna pobuda sustava urođene imunosti koji prepoznaje oslobođene obrasce DAMP te inicira upalu.

Istraživanje Linkermann i Green (2014) potvrđuje doprinos receptora TLR4 u inicijaciji nekroptoze stimulirajući aktivaciju dvaju odvojenih signalnih puteva (Slika 4.). TLR4 je plazmatski receptor koji novači adapterske bjelančevine MyD88 te TRIF. Adaptor Myd88 sudjeluje u uspostavi signalne kaskade te aktivaciji puta NF- κ B, čime dolazi do povećanja ekspresije čimbenika TNF α (engl. *tumor necrosis factor alpha*). Oslobođeni TNF α zatim se veže na receptor TNFR te dovodi do nastanka nekrosoma (Linkermann i Green 2014). S druge strane, adaptor TRIF sadrži domenu RHIM (engl. *RIP homotypic interaction motif*), koja omogućuje izravno novačenje kinaze RIPK1 (Linkermann i Green 2014).

Istraživanje koje su proveli Ariana i sur. (2020) sugerira da adaptor TRIF u inicijaciji nekroptoze ima veći značaj u odnosu na adaptor MyD88. Međutim, Liu i sur. (2022) zaključuju da oba čimbenika, TRIF i TNFR1, značajno doprinose nekroptozu izazvanoj lipopolisaharidima. Osim aktivacije posredovane receptorom TLR4, zabilježena je mogućnost indukcije nekroptoze putem vezikularnog receptora TLR3.

TLR3 može potaknuti nekrozu koja djelomično ovisi o TNF signalnom putu, što dovodi do formiranja kompleksa RIPK1/RIPK3 (Bianchi i sur. 2017). Ovaj dodatni put aktivacije naglašava važnost razumijevanja složenih signalnih puteva koji određuju staničnu sudbinu i ukazuje na mogućnost daljnjeg napretka u istraživanjima na području programirane stanične smrti.



Slika 4. TLR4 novači adapterske bjelančevine MyD88 te TRIF. Adaptor Myd88 sudjeluje u uspostavi signalne kaskade te aktivaciji puta NF-κB. S druge strane, adaptor TRIF sadrži domenu RHIM, koja omogućuje izravno novačenje kinaze RIPK1. Preuzeto i prilagođeno iz Liu i sur. 2022.

4. TLR-i u imunosti na tumor i kombiniranoj terapiji

4.1. Organizacija tumorskog mikrookoliša

Tumorski mikrookoliš (engl. *tumor microenvironment*, TME) predstavlja složenu i dinamičnu mrežu raznovrsnih staničnih populacija te molekularnih medijatora kao što su citokini, kemokini, čimbenici rasta i adhezijske molekule. Njegova složena organizacija osnova je razumijevanja fiziologije tumora te ključna komponenta pri odabiru optimalne protutumorske terapije. Regulatornu ulogu u razvoju tumorskog mikrookoliša imaju stromalne stanice među kojima su najzastupljenije stanice imunosnoga sustava, tumoru pridruženi fibroblasti te stanice endotela (Zheng i Ma 2022).

Tumorski imunosni mikrookoliš (engl. *tumor immune microenvironment*, TIME) odnosi se na kompleks stanica imunosnoga sustava te njihove interakcije unutar tumorskog mikrookoliša koje imaju jedinstven utjecaj na razvoj tumora (Binnewies i sur. 2018; Rayes i sur. 2019). Ovisno o položaju i mogućnosti infiltracije citotoksičnih T-limfocita, TIME se može kategorizirati u dvije onkološki značajne skupine. Prva skupina, (I-E) TIME, karakterizirana je marginalnom raspodjelom citotoksičnih T-limfocita, pri čemu je onemogućen njihov prodor u samu srž tumora. Nemogućnost infiltracije T-limfocita rezultira slabom, gotovo neznačajnom aktivacijom specifične imunosti, zbog čega se takve tumore kolokvijalno naziva „imunosno hladnima“. S druge strane, „imunosno topli tumori“, odnosno (I-I) TIME, obuhvaćaju izrazito imunogeničan mikrookoliš u kojem se T-limfociti nalaze duboko u srži tumora te izražavaju inhibitorne receptore poput PD-1 (engl. *programmed cell death protein 1*) i CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*). Prva generacija kliničke imunoterapije posredovane antitijelima usmjerena je blokiranju izraženih receptora, smanjujući pritom njihov utjecaj na funkciju T-stanica (Topalian i sur. 2015). Naravno, uspješnost liječenja te osjetljivost tumora na imunoterapiju značajno ovisi o prirodi TIME-a (Gasser i sur. 2017).

4.2. Uloga TLR-a u metaboličkom reprogramiranju stanica tumorskoga mikrookoliša

Rast tumora energetski je iscrpan proces koji zahtijeva pravovremenu prilagodbu okolnih stanica na restriktivne uvjete. Uspostavljena paleta biokemijskih promjena, poznata kao Warburgov učinak, osigurava dovoljno energije za rast i preživljavanje tumora te razvoj metastaza. Proces staničnoga reprogramiranja ne odvija se isključivo u stanicama tumora, već i u pridruženim stanicama tumorskoga mikrookoliša. Dendritičke stanice i makrofagi prolaze kroz razne metaboličke promjene koje definiraju njihovu izvršnu funkciju te pobliže određuju njihovu ulogu u razvoju tumora. Kataboličke promjene odnose se na povećanje stope glikolize te smanjenu energetsku opskrbu putem oksidativne fosforilacije.

Receptori nalik Tollu imaju važnu ulogu u regulaciji staničnoga metabolizma (Huang i sur. 2018). Stimulacija TLR3, posredovana ligandom poli(A:U), dovodi do preuređenja metabolizma u stanicama karcinoma glave i vrata, što rezultira povećanim rastom tumora (Veyrat i sur. 2016). Reprogramirane tumorske stanice glavnu energiju oslobađaju procesom glikolize, čime je omogućena brza regeneracija ATP-a te održavanje visoke anaboličke aktivnosti esencijalne za staničnu proliferaciju. Povećana potreba za glukozom nadomještena je prekomjernom ekspresijom prijenosnika glukoze, GLUT1 i GLUT3, pod kontrolom čimbenika HIF-1 (engl. *hypoxia-inducible factor 1*) (Balamurugan 2016).

Rast tumora zahtijeva obilne količine kisika, što dovodi do njegova akutnoga nedostatka (hipoksije) u tumorom zahvaćenom tkivu. Hipoksija potiče stvaranje novih krvnih žila (angiogenezu), čime se optimiziraju dotok i potrošnja kisika. Čimbenik HIF ima ključnu ulogu u poticanju angiogeneze te uzrokuje niz metaboličkih promjena koje dovode do nakupljanja glikolitičkih produkata u tumorskim stanicama. Glavni proizvod glikolitičkog puta, laktat, predstavlja temeljni metabolit svojstven stanicama malignih tumora (Warburgeov efekt) (Keshari i sur. 2013; Rodrigues i sur. 2014). Povećana proizvodnja laktata rezultira regeneracijom koenzima NAD⁺ te zakiseljavanjem (acidozom) tumorskoga mikrookoliša, čime je olakšana invazija tumorskih stanica u okolno tkivo (Romero-Garcia i sur. 2016). Osim toga, unutarstanični laktat potiče inhibiciju T-stanica te prirodno-bilačkih stanica, kompromitirajući njihovu ulogu u imunosti na tumor (Brand i sur. 2016; Fischer i sur. 2007). Istraživanje Xia i sur. (2017) predlaže važnost laktata u inicijaciji apoptoze naivnih T-stanica supresijom proteina FI200 (engl. *FAK family-interacting of 200 kDa*) (Xia i sur. 2017).

Stimulacija TLR-a rezultira metaboličkim preinakama u stanicama specifične imunosti, makrofagima te dendritičkim stanicama. Navedene preinake odvijaju se na metaboličkome planu, a uključuju favoriziranje glikolitičkoga puta naspram puta oksidativne fosforilacije. Iako je to neizbježan kompenzatorni mehanizam, njegov utjecaj na samu stanicu je imunološki značajan te pobliže definira izvršnu funkciju aktivirane stanice. Reprogramirane stanice makrofaga usmjerene su prema M1 fenotipu, koji karakterizira snažna proupalna aktivnost te stvaranje i oslobađanje proupalnih citokina. Reprogramiranje omogućuje maturaciju i preživljavanje dendritičkih stanica, kao i poprimanje odgovarajuće imunostne uloge.

Nekoliko je molekula ključno pri aktivaciji makrofaga i dendritičkih stanica (Huang i sur. 2018). Stimulacija TLR4, posredovana lipopolisharidnim ligandom, dovodi do povećane produkcije inducibilne sintaze dušikova oksida (iNOS) te dušikovih spojeva, koji su važni inhibitori puta oksidativne fosforilacije (Everts i sur. 2012; Kelly i O'Neill 2015). Rezultati istraživanja sugeriraju da se rano glikolitičko reprogramiranje, posredovano receptorima TLR, događa brzom fosforilacijom i aktivacijom kinaza AKT, TBK1 i IKK ϵ , koje potiču aktivnost glikolitičkih enzima te *de novo* sintezu masnih kiselina (Everts i sur. 2014; Krawczyk i sur. 2010). Wu i sur. (2016) predlažu da signalizacija putem TLR7 i TLR9 potiče glikolizu i metabolizam

lipida u plazmacitoidnim dendritičkim stanicama (engl. *plasmacytoid dendritic cells*, pDC). U ljudskim stanicama pDC aktivacija TLR7 doprinosi povećanoj ekspresiji i aktivnost prijenosnika glukoze te pridruženih glikolitičkih enzima, čime potiče ranu fazu glikolize te povećava ECAR (engl. *extracellular acidification rate*) (Wu i sur. 2016).

Receptori slični Tollu imaju ključnu ulogu u regulaciji razvoja, diferencijacije i funkcije različitih podskupova T-stanica (Reynolds i sur. 2010; Shi i sur. 2013). Oni posreduju snažno kostimulacijsko djelovanje CD4⁺ i CD8⁺ T-stanica te sudjeluju u oslobađanju IL-2 i IFN- γ (Karim i sur. 2017). Signalizacija putem TLR2 potiče proliferaciju Th17 stanica i proizvodnju IL-17 te snažno doprinosi razvoju eksperimentalnog autoimunoga encefalomijelitisa (Reynolds i sur. 2010). Njegova aktivacija omogućuje formiranje učinkovitih memorijskih T-stanica koje proizvode povećane razine IFN- γ i granzima B te pospešuju citotoksičnu aktivnost antigenom aktiviranih CD8⁺ T-stanica (Cottalorda i sur. 2006).

4.3. TLR-i u imunosti na tumor

Receptori slični Tollu imaju dvostruku ulogu u procesu tumorigeneze, a njihovo djelovanje ovisno je o razini aktivacije samoga receptora. Poznato je da TLR-i dovode do aktivacije puta NF- κ B te inicijacije upalnog odgovora. Unatoč tome, pretjerana ili neznatna aktivacija receptora omogućuje preživljavanje tumorskih stanica te posreduje u stvaranju metastaza. Manipulacija receptorima TLR u svrhu razvoja djelotvorne te sigurne imunoterapije često rezultira nedovoljno definiranim ishodima. Složeni signalni putevi te brojne međustanične interakcije značajno otežavaju razumijevanje djelovanja ovih receptora. Unatoč tome, utjecaj TLR-a na organizaciju tumorskoga mikrookoliša te razvoj tumora ostaje od neosporive važnosti. U skladu s time, razvijen je znatan broj agonista i antagonista TLR-a koji su pronašli svoju primjenu u medicinske i istraživačke svrhe. Nekolicina agonista TLR-a dobila je odobrenje FDA-e (engl. *Food and Drug Administration*) za tretman različitih tipova karcinoma, dok se pojedini agonisti ispituju u prekliničkoj fazi istraživanja ne bi li se utvrdila njihova učinkovitost i sigurnost u terapijskoj primjeni. Ti spojevi omogućuju preciznu modifikaciju imunosnoga odgovora, čime otvaraju vrata medicini 21. stoljeća te razvoju terapijskih pristupa nove generacije.

4.3.1. Protumorska uloga TLR-a

Tumorskom mikrookolišu (TME) karakteristična je visoka koncentracija oslobođenih obrazaca DAMP te abnormalno visoka ekspresija receptora TLR. Opetovana stimulacija receptora dovodi do kronične upale te nakupljanja imunosupresivnih stanica poput makofaga M2, T_{REG} limfocita te MDSC-a (engl. *myeloid-derived suppressor cells*) (Zheng i Ma 2022). Kronična infekcija i upala odgovorne su za razvoj 20%

karcinoma, pri čemu postoji jasna povezanost raka jetre i hepatitisa B, raka želuca i kronične infekcije *Helicobacter pylori* te raka debelog crijeva i upalne bolesti crijeva (Ribatti i Tamma 2018).

Put NF- κ B posreduje u upalnom odgovoru koji doprinosi održavanju karakteristika matičnih stanica (*stemness*), dok matične stanice raka iskazuju povećanu aktivnost puta NF- κ B. Rezultat je pozitivna povratna sprega koja dovodi do povećanja populacije matičnih stanica u tumorima (Yeh i sur. 2016). Stimulacija TLR-a ne potiče samo proliferaciju, već omogućuje invaziju tumorskih stanica i širenje metastaza kroz regulaciju metaloproteinaza (MMP) i integrina (Zheng i Ma 2022). Istraživanje Zandi i sur. (2019) sugerira da tretman antagonistom TLR4, TAK-242, inhibira invaziju stanica raka smanjenjem aktivnosti MMP-a. Osim toga, aktivacija tumorskih stanica posredovana receptorima TLR inducira sintezu proupalnih čimbenika i imunosupresivnih molekula koje značajno modificiraju tumorski mikrookoliš te povećavaju otpornost tumorskih stanica na imunski odgovor (Huang i sur. 2008).

U nepromijenjenim stanicama kolona ispoljavanje receptora TLR2 na površini stanice ovisno je o ekspresiji čimbenika TOLLIP (engl. *Toll interacting protein*). Njegova smanjena ekspresija u tumorskim stanicama dovodi do zadržavanja receptora TLR2 na apikalnoj i bazolaternoj membrani stanice te pogoduje daljnjoj proliferaciji tumora (Pimentel-Nunes i sur. 2012). Aktivacija TLR2 u anaerobnim uvjetima potiče produkciju reaktivnih oblika kisika (ROS) u staničnim linijama HT-29, Caco-2 i NCM460. Osim toga, TLR2 uključen je u biosintezu kolesterola te proliferaciju zloćudno promijenjenih stanica (Tsoi i sur. 2017).

TLR4 izražen je na nekolicini stanica imunosnoga sustava te dovodi do aktivacije puteva ovisnih o adaptorima MyD88 i TRIF. Njegovo dvojako djelovanje smatra se važnom karikom u razvoju karcinoma, a shodno tome i djelotvorne protutumorske terapije. Lu (2014) sugerira da TLR4 dovodi do povećanoga izražaja PD-1L (engl. *PD-1 ligand*) na površini tumorskih stanica, pri čemu značajno utječe na sudbinu T-stanica. Također, aktivacija TLR4 dovodi do lučenja imunosupresivnih čimbenika, poput IL-10, TGF- β (engl. *transforming growth factor beta*) i VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*), te omogućuje nastanak mikrookoliša pogodna za razvoj tumora (Zandi i sur. 2019). TAK-242 inhibira antiapoptotske bjelančevine Bcl-X_L (engl. *B-cell lymphoma-extra large*) te Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma-2*) u stanicama karcinoma jajnika i dojke, doprinoseći frekventnijoj apoptozi tumorskih stanica (Mishra i Pathak 2019). Zbog svoga raznolika djelovanja, liječenje antagonistima TLR4 predstavlja potencijalnu strategiju inhibicije nekoliko vrsta poznatih karcinoma.

4.3.2. Protutumorska uloga TLR-a

Optimalna aktivacija receptora nalik Tollu pokazuje korisne, terapijski primjenjive značajke u borbi protiv tumora (Tablica 1.). Nekoliko TLR-a te njima pridruženih agonista proučavano je zbog snažnog

adjuvantnoga učinka u protutumorskim cjepivima (Chiang i Kandalajt 2018). Oni induciraju lučenje proupalnih citokina poput IL-1, IL-6 i IL-12 te sudjeluju u diferencijaciji T-stanica (Chen i sur. 2022).

Smješten na plazmatskoj membrani mikroglia stanica, TLR2 posreduje snažno protutumorsko djelovanje. Njegova aktivacija dovodi do povećanoga izražaja kompleksa MHC-I (engl. *major histocompatibility complex class I*), koji sudjeluje u izravnoj aktivaciji citotoksičnih T-limfocita (Chang i sur. 2019; Qian i sur. 2018). Osim toga, manipulacija TLR2 inhibira MDSC, pri čemu posreduje u reaktivaciji protutumorske imunosti. Agonist receptora TLR1/2, sintetski bakterijski lipoprotein (BLP), selektivno smanjuje postotak stanica MDSC u mišjem tumoru, uglavnom promicanjem diferencijacije stanica M-MDSC (engl. *monocytic myeloid-derived suppressor cell*) u M1 makrofage (Deng i sur. 2019).

Aktivacija TLR3 izraženog u karcinomu prostate sprječava umnažanja stanica MAPK signalnim putem te dovodi do apoptoze posredovane kaspazama (Paone i sur. 2008, 2010). Poli(I:C) sintetski je agonist TLR3 koji promovira antigen-specifičan odgovor CD8⁺ T-stanica u tumorima miša i primata te dovodi do povećanja ekspresije IFN- γ , IL-2 i TNF- α (Najafabadi i sur. 2021). Nadalje, sve češće korišten agonist, Riboxsim, karakterizira dobro definirana kemijska struktura, topljivost te potencijalno adjuvantni učinak (Naumann i sur. 2013). Radi se o sintetskom analogu dvolančane RNA (dsRNA) koji potiče aktivaciju dendritičkih stanica te povećava izražaj kostimulacijskih bjelančevina, čime pospješuje predočavanje antigena citotoksičnim T-limfocitima (Chen i sur. 2022). Riboxsim je stabilan u tjelesnim tekućinama do 7 dana te pokazuje znatno manju toksičnost u usporedbi s poli(I:C), odnosno mnogo veću vrijednost LD50 (Naumann i sur. 2013).

MPLA (engl. *monophosphoryl-lipid A*) je funkcionalni agoinst TLR4 koji ne dovodi do pretjerane aktivacije upalnoga odgovora, a pritom zadržava dovoljnu imunogeničnost te pokazuje adjuvantni učinak (Traini i sur. 2019). Istraživanje Mata-Haro i sur. (2007) sugerira da MPLA favorizira signalizaciju novačenjem adaptora TRIF, dok istovremeno ne dovodi do aktivacije puta ovisnog o MyD88. Novačenje samo jednog od dva navedena adaptora rezultira balansiranim imunskim odgovorom koji promovira protutumorsko djelovanje. Adaptor TRIF sudjeluje u oslobađanju interferona tipa I važnoga u ekspanziji T-stanica (Mata-Haro i sur. 2007).

Prijenos signala putem TLR5 započinje prepoznavanjem i vezanjem flagelina ili njegovih derivata. Jedan od posebno proučavanih agonista TLR5, FlaB-Vax, često se koristi u kombinaciji s fotodinamičkom terapijom (engl. *photodynamic therapy*, PDT), pri čemu potiče nakupljanje dendritičkih stanica, poboljšava učinkovitost križnog predočavanja tumorskih antigena u TME-u te potiče infiltraciju citotoksičnih T-limfocita (Hwang i sur. 2020). Istraživanje Hwang i sur. (2020) pokazuje da kombinirana terapija FlaB-Vax i PDT poboljšava liječenje malignog melanoma blokadom bjelančevine PD-1.

Aktivacija TLR7 na površini dendritičkih stanica dovodi do oslobađanja IFN- α , dok TLR8 izražen na monocitima i mijeloidnim dendritičkim stanicama inducira lučenje IFN- γ , TNF- α i IL-12 (Beesu i sur. 2017). Nadalje, TLR8 dovodi do izravne inhibicije T_{REG} limfocita te smanjuje njihovo novačenje u područja zahvaćena tumorom. Agoniste receptora TLR7/8, imikvimod i motolimod, odobrila je FDA za uporabu u prvoj fazi kliničkih ispitivanja u liječenju solidnih tumora (Pahlavanneshan i sur. 2021).

Funkcionalno aktivan TLR9 izražen je u nekoliko humanih tumora, uključujući karcinom dojke, karcinom pluća, cervikalnu neoplaziju, Burkittov limfom i karcinom prostate. Unatoč relativno nejasnoj ulozi u razvoju navedenih karcinoma, istraživanja potvrđuju njegovu ulogu u regulaciji tumorigeneze. Agonisti TLR9, poput CpG ODN (engl. *CpG oligodeoxynucleotides*), dovode do aktivacije plazmocitoidnih dendritičkih stanica te sekrecije interferona tipa I, kao i pojačane ekspresije kostimulacijskih molekula CD80 i CD86. Time je omogućena aktivacija stanica s izraženim protutumorskim djelovanjem; prirodnoubilačkih stanica te citotoksičnih T-limfocita (Mohan i Zhu 2010).

Razvijeno je nekoliko generacija agonista TLR9 koje pokazuju zanimljiva svojstva u kombinaciji s drugim imunoterapijskim metodama. Prva generacija agonista uključuje oligonukleotide s prirodnim modifikacijama, dok agonisti druge generacije posjeduju jedinstvene modifikacije u slijedu nukleotida, pri čemu izražavaju imunomodulacijska svojstva (IMO) (Zheng i Ma 2022). Treću generaciju agonista TLR9 odlikuje smanjena toksičnost i rjeđe nuspojave u kliničkoj praksi. Pojava četvrte generacije povezana je s razvojem novih tehnologija, posebice tehnologije nanomaterijala, čime je značajno poboljšana učinkovitost unutarstanične isporuke te biološka stabilnost lijeka (Jin i sur. 2021).

Tablica 1. Mehanizmi protutumorskoga djelovanja receptora TLR u odabranim tumorima*.

Tumori	TLR-i	Mehanizmi
Melanom	TLR5	Aktivacija TLR5 posredovana vezanjem flagelina
TNBC	TLR4	Infiltracija i aktivacija različitih imunskih stanica
PC	TLR3	Inhibicija proliferacije MAPK signalnim putem te indukcija apoptoze posredovane kaspazama
SCCHN	TLR8	Sinergijska aktivacija prirodnoubilačkih stanica motolimodom i NLRP3 receptorom
Tumor mozga	TLR2	Povećana ekspresija kompleksa MHC-I na glija-stanicama dovodi do aktivacije i proliferacije CD8 ⁺ T-stanica

* Tablica je preuzeta i prilagođena iz Zheng i Ma 2022.

Kratice: TNBC— trostruko negativni karcinom dojke; PC— rak prostate; SCCHN— karcinom pločastih stanica glave i vrata

4.4. Agonisti receptora TLR u kombinaciji s imunoterapijskim pristupima

Terapijska implikacija receptora nalik Tollu smatrana je obećavajućim korakom u liječenju karcinoma, autoimunih te upalnih bolesti, a odnosi se na primjenu agonista odnosno antagonista TLR-a koji specifično prepoznaju izvanstaničnu domenu bogatu leucinom. Njihova uloga u modulaciji tumorskoga mikrookoliša temelj je razvoja suvremenih metoda liječenja u onkologiji. Ipak, ambivalentna priroda receptora TLR predstavlja teško premostivu barijeru koja zahtijeva dodatna istraživanja na području signalizacije posredovane receptorima. Ova bi otkrića mogla upotpuniti naše znanje o biologiji tumora te započeti novo poglavlje u razvoju samostalnih ili kombiniranih terapijskih pristupa.

Postupni razvoj imunologije rezultirao je spektrom imunoterapijskih metoda koje se danas, ovisno o mehanizmu djelovanja, mogu podijeliti u pet kategorija: imunoterapija cjepivom, imunoterapija citokinima, imunoterapija blokadom imunosnih kontrolnih točaka, imunoterapija prijenosom stanica adaptivne imunosti te imunoterapija malim molekulama (Zheng i Ma 2022). Sve je češća i primjena posebnih oblika modificiranih stanica nazvanih stanice CAR-T (engl. *chimeric antigen receptor T cells*). Manipulacija takvim stanicama obećavajući je korak u liječenju „toplih“ tumora. Stanice CAR-T su genetski modificirani T-limfociti koji uspješno prepoznaju antigene povezane s tumorima (engl. *tumor-associated antigens*, TAA) te potiču restrukturiranje mikrookoliša radi pojačavanja imunosnog odgovora na tumor (Grosser i sur. 2019; Zheng i Ma 2022).

Kombinacija različitih imunoterapijskih pristupa te agonista i/ili antagonista receptora TLR može imati sinergijski učinak u zaustavljanju proliferacije tumorskih stanica. Imunoterapija blokadom inhibicijskih receptora sve je korištenija opcija u liječenju raznih vrsta tumora. Riječ je o terapijskom pristupu koji ometa interakciju stanica tumora te citotoksičnih T-limfocita, pri čemu promovira preživljavanje stanica imunosnoga sustava. Sinergijski učinak ovih dvaju terapijskih opcija pokazao se korisnim tretmanom u istraživanjima na mišjim modelima. Koh i sur. (2021) proizveli su nanoemulziju koja sadrži agonist TLR7/8, R848, i antitijelo anti-PD-1 te su demonstrirali njezin učinak u inhibiciji karcinoma pluća miševa. Nadalje, FDA je odobrila korištenje imikvimoda (IMQ) u kombinaciji s pembrolizumabom za liječenje melanoma u stadiju IIIB-IV (Zhang i sur. 2021).

Aktivacija receptora TLR primjenom njihovih agonista rezultira povećanjem ekspresije enzimaIDO (indolamin 2,3-dioksigenaza). Njegov povećan izražaj povezan je s nastankom imunosupresivnog tumorskog okružja koje pogoduje daljnjem razvoju tumora. Kako bi se izbjeglo nakupljanje regulatornih T-stanica i MDSC-a u tumorskome mikrookolišu, korištena je dvojna terapija,IDO inhibitorima te agonistima TLR-a. Kombinacija IMQ iIDO inhibitora, 1-meti1-D-triptofana (1-MT), potiče odgovor Th1 stanica i inhibira rast tumora (Ito i sur. 2015).

5. Zaključak

Receptori nalik Tollu predstavljaju homogenu skupinu receptora koji prepoznaju strane, potencijalno patogene obrasce te dovode do aktivacije imunskog odgovora. Njihova uloga u razvoju i nastanku upale dobro je definirana, a sve više istraživanja upućuje na njihov značaj u patologiji autoimunih bolesti, sepse te malignih oboljenja. Signalizacija posredovana TLR-ima neizostavan je aspekt istraživanja koja povezuju stanično preživljenje, inicijaciju upale te razvoj tumora. Prepoznavanje obrazaca DAMP i PAMP potiče signalnu kaskadu koja, ovisno o unovačenim adapterima i čimbenicima, omogućuje otpuštanje različitih citokina te inicira snažan imunski odgovor organizma.

Uloga TLR-a u razvoju tumora može se opisati dvojako, pri čemu receptori TLR mogu potaknuti odnosno inhibirati daljnju proliferaciju i preživljavanje stanica tumora. Pojedini receptori posreduju supresiju imunskog odgovora te promoviraju protumorsku organizaciju tumorskoga mikrookoliša. Osim toga, TLR-i mogu djelovati protutumorski, pri čemu induciraju lučenje proupalnih citokina, novače stanice urođene imunosti te sudjeluju u diferencijaciji T-stanica. Oni potiču aktivaciju prirodno-bilačkih stanica te citotoksičnih T-limfocita, suprimirajući pritom daljnji rast tumora.

Nadalje, receptori TLR sudjeluju u reprogramiranju metabolizma stanica unutar tumorskog mikrookoliša. Njihovo djelovanje nije ograničeno samo na stanice karcinoma, već obuhvaća njemu pridružene stanice koje oblikuju dinamičnu mrežu imunskih stanica te topljivih čimbenika (TIME). Ovo kompleksno međudjelovanje utječe na progresiju tumora, njegovu sposobnost invazije te stvaranje metastaza.

Sintetizirani su mnogobrojni ligandi koji vezanjem na receptore TLR inhibiraju odnosno aktiviraju staničnu signalizaciju. Mogućnost aktivacije ili inhibicije receptora otvara vrata za ciljanu manipulaciju imunskim odgovorom prema potrebama pacijenta. Klinička primjena ovih spojeva, samostalno ili u kombinaciji s drugim imunoterapijskim metodama, predstavlja izazovno ali obećavajuće područje istraživanja u borbi protiv raka.

6. Literatura

- Aliprantis A.O., Yang R.B., Weiss D.S., Godowski P., Zychlinsky A. (2000): The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J* **19**: 3325–3336.
- Ariana A., Alturki N.A., Hajjar S., Stumpo D.J., Tiedje C., Alnemri E.S., Gaestel M., Blackshear P.J., Sad S. (2020): Tristetraprolin regulates necroptosis during tonic Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in murine macrophages. *J Biol Chem* **295**: 4661–4672.
- Balamurugan K. (2016): HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *Int J Cancer* **138**: 1058–1066.
- Beesu M., Salyer A.C.D., Brush M.J.H., Trautman K.L., Hill J.K., David S.A. (2017): Identification of High-Potency Human TLR8 and Dual TLR7/TLR8 Agonists in Pyrimidine-2,4-diamines. *J Med Chem* **60**: 2084–2098.
- Berghe T. Vanden, Linkermann A., Jouan-Lanhouet S., Walczak H., Vandenabeele P. (2014): Regulated necrosis: The expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 135–147.
- Bernuth H. Von, Picard C., Jin Z., Pankla R., Xiao H., Ku C.L., Chrabieh M., Mustapha I. Ben, Ghandil P., Camcioglu Y., Vasconcelos J., Sirvent N., Guedes M., Vitor A.B., Herrero-Mata M.J., Aróstegui J.I., Rodrigo C., Alsina L., Ruiz-Ortiz E., Juan M., Fortuny C., Yagüe J., Antón J., Pascal M., Chang H.H., Janniere L., Rose Y., Garty B.Z., Chapel H., Issekutz A., Maródi L., Rodriguez-Gallego C., Banchereau J., Abel L., Li X., Chaussabel D., Puel A., Casanova J.L. (2008): Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* (1979) **321**: 691–696.
- Bianchi F., Pretto S., Tagliabue E., Balsari A., Sfondrini L. (2017): Exploiting poly(I:C) to induce cancer cell apoptosis. *Cancer Biol Ther* **18**: 747–756.
- Binnewies M., Roberts E.W., Kersten K., Chan V., Fearon D.F., Merad M., Coussens L.M., Gaborilovich D.I., Ostrand-Rosenberg S., Hedrick C.C., Vonderheide R.H., Pittet M.J., Jain R.K., Zou W., Howcroft T.K., Woodhouse E.C., Weinberg R.A., Krummel M.F. (2018): Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* **24**: 541–550.
- Brand A., Singer K., Koehl G.E., Kolitzus M., Schoenhammer G., Thiel A., Matos C., Bruss C., Klobuch S., Peter K., Kastenberger M., Bogdan C., Schleicher U., Mackensen A., Ullrich E., Fichtner-Feigl S., Kesselring R., Mack M., Ritter U., Schmid M., Blank C., Dettmer K., Oefner P.J., Hoffmann P., Walenta S., Geissler E.K., Pouyssegur J., Villunger A., Steven A., Seliger B., Schreml S., Haferkamp S., Kohl E., Karrer S., Berneburg M., Herr W., Mueller-Klieser W., Renner K., Kreutz M. (2016): LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab* **24**: 657–671.
- Cen X., Liu S., Cheng K. (2018): The role of toll-like receptor in inflammation and tumor immunity. *Front Pharmacol* **9**: 878. DOI 10.3389/fphar.2018.00878.
- Chang C.Y., Jeon S.B., Yoon H.J., Choi B.K., Kim S.S., Oshima M., Park E.J. (2019): Glial TLR2-driven innate immune responses and CD8 + T cell activation against brain tumor. *Glia* **67**: 1179–1195.
- Chang S.H., Huang S.W., Wang S.T., Chung K.C., Hsieh C.W., Kao J.K., Chen Y.J., Wu C.Y., Shieh J.J. (2017): Imiquimod-induced autophagy is regulated by ER stress-mediated PKR activation in cancer cells. *J Dermatol Sci* **87**: 138–148.

- Cheadle E.J., Lipowska-Bhalla G., Dovedi S.J., Fagnano E., Klein C., Honeychurch J., Illidge T.M. (2017): A TLR7 agonist enhances the antitumor efficacy of obinutuzumab in murine lymphoma models via NK cells and CD4 T cells. *Leukemia* **31**: 1611–1621.
- Chen X., Zhang Y., Fu Y. (2022): The critical role of Toll-like receptor-mediated signaling in cancer immunotherapy. *Med Drug Discov* **14**: 100122. DOI 10.1016/j.medidd.2022.100122.
- Chiang C.L.L., Kandalafi L.E. (2018): In vivo cancer vaccination: Which dendritic cells to target and how? *Cancer Treat Rev* **71**: 88–101.
- Cho Y.S., Challa S., Moquin D., Genga R., Ray T.D., Guildford M., Chan F.K.M. (2009): Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell* **137**: 1112–1123.
- Colell A., Ricci J.E., Tait S., Milasta S., Maurer U., Bouchier-Hayes L., Fitzgerald P., Guio-Carrion A., Waterhouse N.J., Li C.W., Mari B., Barbry P., Newmeyer D.D., Beere H.M., Green D.R. (2007): GAPDH and Autophagy Preserve Survival after Apoptotic Cytochrome c Release in the Absence of Caspase Activation. *Cell* **129**: 983–997.
- Cottalorda A., Vershelde C., Marçais A., Tomkowiak M., Musette P., Uematsu S., Akira S., Marvel J., Bonnefoy-Berard N. (2006): TLR2 engagement on CD8 T cells lowers the threshold for optimal antigen-induced T cell activation. *Eur J Immunol* **36**: 1684–1693.
- Delgado M.A., Elmaoued R.A., Davis A.S., Kyei G., Deretic V. (2008): Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J* **27**: 1110–1121.
- Deng Y., Yang J., Qian J., Liu R., Huang E., Wang Y., Luo F., Chu Y. (2019): TLR1/TLR2 signaling blocks the suppression of monocytic myeloid-derived suppressor cell by promoting its differentiation into M1-type macrophage. *Mol Immunol* **112**: 266–273.
- Dondelinger Y., Declercq W., Montessuit S., Roelandt R., Goncalves A., Bruggeman I., Hulpiau P., Weber K., Schon C.A., Marquis R.W., Bertin J., Gough P.J., Savvides S., Martinou J.C., Bertrand M.J.M., Vandenaabeele P. (2014): MLKL Compromises Plasma Membrane Integrity by Binding to Phosphatidylinositol Phosphates. *Cell Rep* **7**: 971–981.
- Duckett C.S. (2002): Apoptosis and NF- κ B: the FADD connection. *J Clin Invest* **109**: 579–580.
- Everts B., Amiel E., Huang S.C.C., Smith A.M., Chang C.H., Lam W.Y., Redmann V., Freitas T.C., Blagih J., Windt G.J.W. Van Der, Artyomov M.N., Jones R.G., Pearce E.L., Pearce E.J. (2014): TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKK ϵ supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat Immunol* **15**: 323–332.
- Everts B., Amiel E., Windt G.J.W. Van Der, Freitas T.C., Chott R., Yarasheski K.E., Pearce E.L., Pearce E.J. (2012): Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells. *Blood* **120**: 1422–1431.
- Fischer K., Hoffmann P., Voelkl S., Meidenbauer N., Ammer J., Edinger M., Gottfried E., Schwarz S., Rothe G., Hoves S., Renner K., Timischl B., Mackensen A., Kunz-Schughart L., Andreesen R., Krause S.W., Kreutz M. (2007): Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* **109**: 3812–3819.
- Fulda S. (2016): Regulation of necroptosis signaling and cell death by reactive oxygen species. *Biol Chem* **397**: 657–660.

- Gasser S., Lim L.H.K., Cheung F.S.G. (2017): The role of the tumour microenvironment in immunotherapy. *Endocr Relat Cancer* **24**: T283–T295.
- Grosser R., Cherkassky L., Chintala N., Adusumilli P.S. (2019): Combination Immunotherapy with CAR T Cells and Checkpoint Blockade for the Treatment of Solid Tumors. *Cancer Cell* **36**: 471–482.
- Huang B., Zhao J., Unkeless J.C., Feng Z.H., Xiong H. (2008): TLR signaling by tumor and immune cells: A double-edged sword. *Oncogene* **27**: 218–224.
- Huang L., Xu H., Peng G. (2018): TLR-mediated metabolic reprogramming in the tumor microenvironment: potential novel strategies for cancer immunotherapy. *Cell Mol Immunol* **15**: 428–437.
- Huang S.W., Chang S.H., Mu S.W., Jiang H.Y., Wang S.T., Kao J.K., Huang J.L., Wu C.Y., Chen Y.J., Shieh J.J. (2016): Imiquimod activates p53-dependent apoptosis in a human basal cell carcinoma cell line. *J Dermatol Sci* **81**: 182–191.
- Hwang H.S., Cherukula K., Bang Y.J., Vijayan V., Moon M.J., Thirupathi J., Puth S., Jeong Y.Y., Park I.K., Lee S.E., Rhee J.H. (2020): Combination of Photodynamic Therapy and a Flagellin-Adjuvanted Cancer Vaccine Potentiated the Anti-PD-1-Mediated Melanoma Suppression. *Cells* **9**: 2432. DOI 10.3390/cells9112432.
- Ito H., Ando T., Arioka Y., Saito K., Seishima M. (2015): Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity enhances the anti-tumour effects of a Toll-like receptor 7 agonist in an established cancer model. *Immunology* **144**: 621–630.
- Jin Y., Zhuang Y., Dong X., Liu M. (2021): Development of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists in anti-cancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* **21**: 841–851.
- Karim A.F., Reba S.M., Li Q., Boom W.H., Rojas R.E. (2017): Toll like Receptor 2 engagement on CD4+ T cells promotes TH9 differentiation and function. *Eur J Immunol* **47**: 1513–1524.
- Kelly B., O'Neill L.A.J. (2015): Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res* **25**: 771–784.
- Keshari K.R., Sriram R., Crieckinge M. Van, Wilson D.M., Wang Z.J., Vigneron D.B., Peehl D.M., Kurhanewicz J. (2013): Metabolic reprogramming and validation of hyperpolarized ¹³C lactate as a prostate cancer biomarker using a human prostate tissue slice culture bioreactor. *Prostate* **73**: 1171–1181.
- Koh J., Kim S., Lee S.N., Kim S.Y., Kim J.E., Lee K.Y., Kim M.S., Heo J.Y., Park Y.M., Ku B.M., Sun J.M., Lee S.H., Ahn J.S., Park K., Yang S., Ha S.J., Lim Y.T., Ahn M.J. (2021): Therapeutic efficacy of cancer vaccine adjuvanted with nanoemulsion loaded with TLR7/8 agonist in lung cancer model. *Nanomedicine* **37**: 102415. DOI 10.1016/j.nano.2021.102415.
- Krawczyk C.M., Holowka T., Sun J., Blagih J., Amiel E., DeBerardinis R.J., Cross J.R., Jung E., Thompson C.B., Jones R.G., Pearce E.J. (2010): Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* **115**: 4742–4749.
- Li J., McQuade T., Siemer A.B., Napetschnig J., Moriwaki K., Hsiao Y.S., Damko E., Moquin D., Walz T., McDermott A., Chan F.K.M., Wu H. (2012): The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell* **150**: 339–350.
- Lim K.H., Staudt L.M. (2013): Toll-Like receptor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: a011247.

- Lin C., Tsai S.C., Tseng M.T., Peng S.F., Kuo S.C., Lin M.W., Hsu Y.M., Lee M.R., Amagaya S., Huang W.W., Wu T.S., Yang J.S. (2013): AKT serine/threonine protein kinase modulates baicalin-triggered autophagy in human bladder cancer T24 cells. *Int J Oncol* **42**: 993–1000.
- Linkermann A., Green D.R. (2014): Necroptosis. *N Engl J Med* **370**: 455–465.
- Liu T., Zong H., Chen X., Li S., Liu Z., Cui X., Jia G., Shi Y. (2022): Toll-like receptor 4-mediated necroptosis in the development of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* **91**: 73–82.
- Lu H. (2014): TLR agonists for cancer immunotherapy: Tipping the balance between the immune stimulatory and inhibitory effects. *Front Immunol* **5**: 83. DOI 10.3389/fimmu.2014.00083.
- Martin D.A., Siegel R.M., Zheng L., Lenardo M.J. (1998): Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACH α 1) death signal. *J Biol Chem* **273**: 4345–4349.
- Mata-Haro V., Cekic C., Martin M., Chilton P.M., Casella C.R., Mitchell T.C. (2007): The Vaccine Adjuvant Monophosphoryl Lipid A as a TRIF-Biased Agonist of TLR4. *Science* (1979) **316**: 1628–1632.
- McGettrick A.F., O'Neill L.A.J. (2004): The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. *Mol Immunol* **41**: 577–582.
- Micheau O., Rg Tschopp J. (2003). Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes of these receptors delivers a powerful and rapid proapoptotic signal through a DD-mediated recruitment of the adaptor protein FADD and the formation of the so-called complex I fails to induce the expression of antiapoptotic. *Cell* **114**: 181-190.
- Mishra V., Pathak C. (2019): Human Toll-Like Receptor 4 (hTLR4): Structural and functional dynamics in cancer. *Int J Biol Macromol* **122**: 425–451.
- Mogensen T.H. (2009): Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* **22**: 240–273.
- Mohan C., Zhu J. (2010): Toll-like receptor signaling pathways - Therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm* **2010**: 781235. DOI 10.1155/2010/781235.
- Muzio M., Chinnaiyan A.M., Kischkel F.C., O'Rourke K. (1996). FLICE, A Novel FADD-Homologous ICE/CED-3-like Protease, Is Recruited to the CD95 (Fas/APO-1) Death-Inducing Signaling Complex. *Cell* **85**: 817-827.
- Naiki Y., Michelsen K.S., Schröder N.W.J., Alsabeh R., Slepkin A., Zhang W., Chen S., Wei B., Bulut Y., Wong M.H., Peterson E.M., Arditi M. (2005): MyD88 is pivotal for the early inflammatory response and subsequent bacterial clearance and survival in a mouse model of Chlamydia pneumoniae pneumonia. *J Biol Chem* **280**: 29242–29249.
- Najafabadi A.H., Izadi Z., Abadi N., Aikins M.E., Foulds K.E., Donaldson M.M., Yuan W., Okeke E.B., Nam J., Xu Y., Weerappuli P., Hetrick T., Adams D., Lester P.A., Salazar A.M., Barouch D.H., Schwendeman A., Seder R.A., Moon J.J. (2021). Vaccine nanodiscs plus polyICLC elicit robust CD8+ T cell responses in mice and non-human primates. *J Control Release* **337**: 168–178.
- Naumann K., Wehner R., Schwarze A., Petzold C., Schmitz M., Rohayem J. (2013): Activation of dendritic cells by the novel toll-like receptor 3 agonist RGC100. *Clin Dev Immunol* **2013**: 283649. DOI 10.1155/2013/283649.

- Ouyang L., Shi Z., Zhao S., Wang F.T., Zhou T.T., Liu B., Bao J.K. (2012): Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* **45**: 487–498.
- Pahlavanneshan S., Sayadmanesh A., Ebrahimiyan H., Basiri M. (2021): Toll-Like Receptor-Based Strategies for Cancer Immunotherapy. *J Immunol Res* **2021**: 9912188. DOI 10.1155/2021/9912188.
- Paone A., Galli R., Gabellini C., Lukashev D., Starace D., Gorlach A., Cesaris P. de, Ziparo E., Bufalo D. del, Sitkovsky M. V., Filippini A., Riccioli A. (2010): Toll-like receptor 3 regulates angiogenesis and apoptosis in prostate cancer cell lines through hypoxia-inducible factor 1 α . *Neoplasia* **12**: 539–549.
- Paone A., Starace D., Galli R., Padula F., Cesaris P. De, Filippini A., Ziparo E., Riccioli A. (2008): Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC- α -dependent mechanism. *Carcinogenesis* **29**: 1334–1342.
- Pimentel-Nunes P., Gonçalves N., Boal-Carvalho I., Afonso L., Lopes P., Roncon-Albuquerque R., Soares J.B., Cardoso E., Henrique R., Moreira-Dias L., Dinis-Ribeiro M., Leite-Moreira A.F. (2012): Decreased toll-interacting protein and peroxisome proliferator-activated receptor γ are associated with increased expression of toll-like receptors in colon carcinogenesis. *J Clin Pathol* **65**: 302–308.
- Qian J., Luo F., Yang J., Liu J., Liu R., Wang L., Wang C., Deng Y., Lu Z., Wang Y., Lu M., Wang J.Y., Chu Y. (2018): TLR2 promotes glioma immune evasion by downregulating MHC class II molecules in microglia. *Cancer Immunol Res* **6**: 1220–1233.
- Rayes R.F., Mouhanna J.G., Nicolau I., Bourdeau F., Giannias B., Rousseau S., Quail D., Walsh L., Sangwan V., Bertos N., Cools-Lartigue J., Ferri L.E., Spicer J.D. (2019): Primary tumors induce neutrophil extracellular traps with targetable metastasis-promoting effects. *JCI Insight* **5**: 128008. DOI 10.1172/jci.insight.128008.
- Reynolds J.M., Pappu B.P., Peng J., Martinez G.J., Zhang Y., Chung Y., Ma L., Yang X.O., Nurieva R.I., Tian Q., Dong C. (2010): Toll-like receptor 2 signaling in CD4⁺ T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease. *Immunity* **32**: 692–702.
- Ribatti D., Tamma R. (2018): A revisited concept. Tumors: Wounds that do not heal. *Crit Rev Oncol Hematol* **128**: 65–69.
- Rodrigues T.B., Serrao E.M., Kennedy B.W.C., Hu D.E., Kettunen M.I., Brindle K.M. (2014): Magnetic resonance imaging of tumor glycolysis using hyperpolarized 13 C-labeled glucose. *Nat Med* **20**: 93–97.
- Romero-Garcia S., Moreno-Altamirano M.M.B., Prado-Garcia H., Sánchez-García F.J. (2016): Lactate contribution to the tumor microenvironment: Mechanisms, effects on immune cells and therapeutic relevance. *Front Immunol* **7**: 52. DOI 10.3389/fimmu.2016.00052.
- Shi C.S., Kehrl J.H. (2010): TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced Autophagy. *Sci Signal* **3**: ra42. DOI 10.1126/scisignal.2000751.
- Shi G., Vistica B.P., Nugent L.F., Tan C., Wawrousek E.F., Klinman D.M., Gery I. (2013): Differential Involvement of Th1 and Th17 in Pathogenic Autoimmune Processes Triggered by Different TLR Ligands. *J Immunol* **191**: 415–423.

- Suzuki N., Suzuki S., Duncan G.S., Millar D.G., Wada T., Mirtsos C., Takada H., Wakeham A., Itie A., Li S., Penninger J.M., Wesche H., Ohashi P.S., Mak T.W., Yeh W.-C. (2002). Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* **416**: 750-754.
- Topalian S.L., Drake C.G., Pardoll D.M. (2015): Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* **27**: 450–461.
- Tourneur L., Chiocchia G. (2010): FADD: A regulator of life and death. *Trends Immunol* **31**: 260–269.
- Traini G., Ruiz-de-Angulo A., Blanco-Canosa J.B., Zamacola Bascarán K., Molinaro A., Silipo A., Escors D., Mareque-Rivas J.C. (2019): Cancer Immunotherapy of TLR4 Agonist–Antigen Constructs Enhanced with Pathogen-Mimicking Magnetite Nanoparticles and Checkpoint Blockade of PD-L1. *Small* **15**: e1803993. DOI 10.1002/sml.201803993.
- Tsoi H., Chu E.S.H., Zhang X., Sheng J., Nakatsu G., Ng S.C., Chan A.W.H., Chan F.K.L., Sung J.J.Y., Yu J. (2017): *Peptostreptococcus anaerobius* Induces Intracellular Cholesterol Biosynthesis in Colon Cells to Induce Proliferation and Causes Dysplasia in Mice. *Gastroenterology* **152**: 1419-1433.e5.
- Veyrat M., Durand S., Classe M., Glavan T.M., Oker N., Kapetanakis N.-I., Jiang X., Gelin A., Herman P., Casiraghi O., Zagzag D., Enot D., Busson P., Vérillaud B. (2016). Stimulation of the toll-like receptor 3 promotes metabolic reprogramming in head and neck carcinoma cells. *Oncotarget* **7**: 82580-82593.
- Weighardt H., Kaiser-Moore S., Vabulas R.M., Kirschning C.J., Wagner H., Holzmann B. (2002): Cutting Edge: Myeloid Differentiation Factor 88 Deficiency Improves Resistance Against Sepsis Caused by Polymicrobial Infection. *J Immunol* **169**: 2823–2827.
- Wu D., Sanin D.E., Everts B., Chen Q., Qiu J., Buck M.D., Patterson A., Smith A.M., Chang C.H., Liu Z., Artyomov M.N., Pearce E.L., Cella M., Pearce E.J. (2016): Type 1 Interferons Induce Changes in Core Metabolism that Are Critical for Immune Function. *Immunity* **44**: 1325–1336.
- Xia H., Wang W., Crespo J., Kryczek I., Li W., Wei S., Bian Z., Maj T., He M., Liu R.J., He Y., Rattan R., Munkarah A., Guan J.-L., Zou W. (2017). Suppression of FIP200 and autophagy by tumor-derived lactate promotes naïve T cell apoptosis and affects tumor immunity. *Sci. Immunol* **2**: eaan4631. DOI 10.1126/sciimmunol.aan4631.
- Yeh D.W., Huang L.R., Chen Y.W., Huang C.Y.F., Chuang T.H. (2016): Interplay between Inflammation and Stemness in Cancer Cells: The Role of Toll-Like Receptor Signaling. *J Immunol Res* **2016**: 4368101. DOI 10.1155/2016/4368101.
- Yoneda K., Sugimoto K., Shiraki K., Tanaka J., Beppu T., Fuke H., Yamamoto N., Masuya M., Horie R., Uchida K., Takei Y. (2008): Dual topology of functional Toll-like receptor 3 expression in human hepatocellular carcinoma: Differential signaling mechanisms of TLR3-induced NF-κB activation and apoptosis. *Int J Oncol* **33**: 929–936.
- Zandi Z., Kashani B., Poursani E.M., Bashash D., Kabuli M., Momeny M., Mousavi-pak S.H., Sheikhsaran F., Alimoghaddam K., Mousavi S.A., Ghaffari S.H. (2019): TLR4 blockade using TAK-242 suppresses ovarian and breast cancer cells invasion through the inhibition of extracellular matrix degradation and epithelial-mesenchymal transition. *Eur J Pharmacol* **853**: 256–263.
- Zhan Z., Xie X., Cao H., Zhou X., Zhang X.D., Fan H., Liu Z. (2014): Autophagy facilitates TLR4- and TLR3-triggered migration and invasion of lung cancer cells through the promotion of TRAF6 ubiquitination. *Autophagy* **10**: 257–268.

- Zhang J., Zhang Y., Qu B., Yang H., Hu S., Dong X. (2021): If small molecules immunotherapy comes, can the prime be far behind? *Eur J Med Chem* **218**: 113356. DOI 10.1016/j.ejmech.2021.113356.
- Zhao X.L., Lin Y., Jiang J., Tang Z., Yang S., Lu L., Liang Y., Liu X., Tan J., Hu X.G., Niu Q., Fu W.J., Yan Z.X., Guo D.Y., Ping Y.F., Wang J.M., Zhang X., Kung H.F., Bian X.W., Yao X.H. (2017): High-mobility group box 1 released by autophagic cancer-associated fibroblasts maintains the stemness of luminal breast cancer cells. *J Pathol* **243**: 376–389.
- Zheng R., Ma J. (2022): Immunotherapeutic Implications of Toll-like Receptors Activation in Tumor Microenvironment. *Pharmaceutics* **14**: 2285. DOI 10.3390/pharmaceutics14112285.

7. Životopis

Rođen sam 2001. godine u Zadru gdje sam završio osnovnoškolsko obrazovanje u OŠ Bartula Kašića. Tijekom osnovne škole pokazao sam snažan interes za područje prirodoslovlja te sam sudjelovao na nekoliko manifestacija s ciljem promocije znanosti među mladima. Srednjoškolsko obrazovanje završio sam u Gimnaziji Jurja Barakovića uz stipendijsku potporu grada Zadra zbog izvrsnih postignuća. Tijekom tog razdoblja istaknuo sam se na školskim i županijskim natjecanjima iz prirodoslovnih predmeta te sam sudjelovao na dvama državnim natjecanjima iz biologije u kategoriji znanja (2018. i 2019. godine), pri čemu sam 2018. godine osvojio treće mjesto na nacionalnoj razini natjecanja.

2020. godine upisao sam prijediplomski studij Molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija primao sam stipendiju Ministarstva znanosti i obrazovanja za izvrsnost u STEM područjima. Od 2021. godine aktivno sudjelujem u djelovanju Odbora za promicanje psihološkog zdravlja u sklopu Studentskog zbora Sveučilišta u Zagrebu. Cilj Odbora jest promicati svijest o važnosti održavanja mentalne higijene pružanjem aktualnih informacija o mentalnom zdravlju te organizacijom multidisciplinarnih događanja i promocija koje se bave tom tematikom.

Tijekom treće godine studija odradio sam laboratorijsku stručnu praksu u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu. Na praksi sam stekao vještine rada u staničnoj kulturi te sam se upoznao s korištenjem fluorescencijskog mikroskopa i analizom podataka pomoću softverskih alata. Ovo iskustvo obogatilo je moje razumijevanje laboratorijskog rada i analize bioloških procesa.

Kroz studij sam razvio poseban interes za imunologiju i biokemiju te vjerujem da ću se nastaviti kontinuirano usavršavati i produbljivati svoje znanje u tim znanstvenim disciplinama.