

## УЧАСТИЕ ПЕРФОРИН/ГРАНЗИМ Б-ЗАВИСИМОГО МЕХАНИЗМА В РЕАЛИЗАЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРОТИВ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Тыринова Т.В.<sup>1</sup>, Леплина О.Ю.<sup>1</sup>, Мишинов С.В.<sup>2</sup>, Тихонова М.А.<sup>1</sup>,  
Калиновский А.В.<sup>3</sup>, Чернов С.В.<sup>3</sup>, Ступак В.В.<sup>2</sup>, Останин А.А.<sup>1</sup>,  
Черных Е.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,  
г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна»  
Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** Грануло-опосредованная цитотоксичность для клеток-эффекторов является универсальным механизмом подавления опухолевого роста и индукции гибели клеток-мишеней. Целью работы явилось изучение экспрессии цитолитических молекул дендритными клетками (ДК), генерированными в присутствии IFN $\alpha$  (IFN-ДК), а также исследование роли грануло-опосредованного механизма в реализации цитотоксической активности IFN-ДК против опухолевых клеточных линий. IFN-ДК генерировали путем культивирования прилипающей фракции МНК в присутствии GM-CSF и IFN $\alpha$  в течение 4 суток с последующим дозреванием с ЛПС в течение 24 ч. Опухолевые линии были получены из фрагментов опухоли пациентов с внутримозговой глиобластомой. Индукция созревания IFN-ДК под действием ЛПС ассоциировалась с накоплением внутриклеточного пула молекул перфорины и гранзима Б. Экспрессия перфорины в ЛПС-стимулированных IFN-ДК прямо коррелировала с внутриклеточной экспрессией лизосомально-ассоциированного мембранного белка-1 (LAMP-1/CD107a), при этом уровень последнего не менялся в ответ на стимуляцию ЛПС. В то же время ЛПС стимулировал дегрануляцию в IFN-ДК, о чем свидетельствовало увеличение доли клеток, экспрессирующих CD107a на поверхностной мембране ДК. Активация ЛПС генерированных из моноцитов крови тех же доноров ДК по стандартному протоколу (в присутствии GM-CSF и IL-4 [IL-4-ДК]) не влияла на уровень экспрессии перфорины и гранзима Б в IL-4-ДК, которая была значимо ниже по сравнению с аналогичными культурами IFN-ДК. В ответ на стимуляцию ЛПС отмечалось увеличение внутриклеточного пула CD107a в IL-4-ДК при отсутствии изменений в поверхностной экспрессии CD107a. Исследование цитотоксической активности ЛПС-стимулированных IFN-ДК против глиобластомных клеточных линий показало вовлеченность перфорин/гранзим Б-сигнального пути в реализацию цитотоксической активности ДК, поскольку блокирование этого механизма с помощью ингибитора вакуолярной H<sup>+</sup>-АТФ-азы конканамин А (СМА) ослабляло цитотоксическую

### Адрес для переписки:

Тыринова Тамара Викторовна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»  
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (383) 228-21-01.  
Факс: 8 (383) 222-70-28.  
E-mail: ct\_lab@mail.ru, tyrinova@bk.ru

### Address for correspondence:

Tyrinova Tamara V.  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
630099, Russian Federation, Novosibirsk,  
Yadrintsevskaya str., 14.  
Phone: 7 (383) 228-21-01.  
Fax: 7 (383) 222-70-28.  
E-mail: ct\_lab@mail.ru, tyrinova@bk.ru

### Образец цитирования:

Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина, С.В. Мишинов,  
М.А. Тихонова, А.В. Калиновский, С.В. Чернов,  
В.В. Ступак, А.А. Останин, Е.Р. Черных «Участие  
перфорин/гранзим Б-зависимого механизма  
в реализации цитотоксического эффекта дендритных  
клеток против клеток глиобластомы человека»  
// Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4.  
С. 421–430. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-421-430

© Тыринова Т.В. и соавт., 2017

### For citation:

T.V. Tyrinova, O.Yu. Leplina, S.V. Mishinov, M.A. Tikhonova,  
A.V. Kalinovskiy, S.V. Chernov, V.V. Stupak, A.A. Ostanin,  
E.R. Chernykh "Involvement of perforin/granzyme B-dependent  
signaling pathway in cytotoxic activity of dendritic cells towards  
human glioblastoma cells", Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 421–430.  
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-421-430

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-421-430

активность IFN-ДК. При этом различная выраженность подавления цитотоксичности ДК с помощью СМА свидетельствовала о существовании перфорин/гранзим Б-независимых механизмах цитотоксического действия IFN-ДК против глиобластомных клеток.

**Ключевые слова:** дендритные клетки, интерферон-альфа, перфорин, гранзим Б, CD107a, глиобластома

## INVOLVEMENT OF PERFORIN/GRANZYME B-DEPENDENT SIGNALING PATHWAY IN CYTOTOXIC ACTIVITY OF DENDRITIC CELLS TOWARDS HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS

Tyrinova T.V.<sup>a</sup>, Leplina O.Yu.<sup>a</sup>, Mishinov S.V.<sup>b</sup>, Tikhonova M.A.<sup>a</sup>,  
Kalinovskiy A.V.<sup>c</sup>, Chernov S.V.<sup>c</sup>, Stupak V.V.<sup>b</sup>, Ostanin A.A.<sup>a</sup>,  
Chernykh E.R.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Ya.L. Tsivyan Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>c</sup> Federal Neurosurgical Center, Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** Granule-mediated cytotoxicity of effector cells is a universal mechanism of tumor growth inhibition and induction of tumor cell death. The aim of present study was to evaluate expression of lytic molecules in DCs generated in presence of IFN $\alpha$  (IFN-DCs), and to analyze the role of granule-mediated mechanism for IFN-DC cytotoxic activity against tumor cell lines. IFN-DCs were generated by culturing of plastic-adherent peripheral blood mononuclear cells in presence of GM-CSF and IFN $\alpha$  for 4 d followed by LPS addition for 24 h. The tumor cell lines were obtained from malignant tissues from patients with glioblastoma multiforme. Maturation of IFN-DCs in presence of LPS was accompanied by accumulation of intracellular perforin and granzyme B molecules. Perforin expression showed a direct correlation with intracellular lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1/CD107a) expression in LPS-stimulated IFN-DCs. However, CD107a expression did not increase under LPS stimulation. At the same time, LPS caused upregulated degranulation in IFN-DCs, as shown by an increase of surface CD107a expression on IFN-DCs. LPS activation of DCs generated from the same donors in the presence of GM-CSF and IL-4 (IL-4-DCs) did not influence perforin and granzyme B expression in IL-4-DCs which was significantly lower than in IFN-DCs. Intracellular pool of CD107a molecules was increased in response to LPS stimulation of IL-4-DCs, but surface CD107a expression did not change on IL-4-DCs. Studies of cytotoxic activity of LPS-stimulated IFN-DCs revealed that concanamycin A (CMA), an inhibitor of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and of perforin/granzyme B-mediated signaling pathway, caused reduced cytotoxicity of donor DCs towards glioblastoma cell lines. Involvement of perforin/granzyme B-signaling pathway into the DCs cytotoxicity was confirmed with glioblastoma cell lines, since blockage of this mechanism with vacuolar H<sup>+</sup> ATPase blocker (CMA) caused inhibition of the IFN-DC cytotoxicity. Differently reduced DC cytotoxic activity by CMA may suggest that the glioblastoma cell lysis can be mediated via perforin/granzyme B-independent mechanisms.

**Keywords:** dendritic cells, interferon-alpha, perforin, granzyme B, CD107a, glioblastoma multiforme

## Введение

Дендритные клетки (ДК) являются высоко-специализированными антигенпрезентирующими клетками, обеспечивающими запуск иммунного ответа против различных, в том числе опухолевых, антигенов [4]. Наряду с запуском адаптивного иммунного ответа ДК обладают эффекторной функцией и способны подавлять рост и пролиферацию опухолевых клеток за счет прямого цитотоксического действия [14, 26].

Известно, что противоопухолевый эффект цитотоксических клеток (НК-клеток, цитотоксических CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов) реализуется с вовлечением рецептор- и грануло-зависимого механизмов. Первый опосредуется за счет вза-

имодействия мембранно-связанных и растворимых проапоптогенных молекул (TNF $\alpha$ , FasL, TRAIL и др.), экспрессируемых цитотоксическими клетками, с соответствующими рецепторами на опухолевых клетках. Второй (перфорин/гранзим-зависимый путь) связан с дегрануляцией и высвобождением в иммунологический синапс содержащихся в литических гранулах цитолитических медиаторов, включая перфорин, обеспечивающий формирование пор в клетках-мишенях, и гранзим Б, проникающий через поры и индуцирующий процессы апоптоза [11].

Согласно данным литературы, индукторами цитотоксической активности ДК являются интерфероны I типа (IFN-I) [12, 19]. Проведенные нами ранее исследования показали, что ДК, ге-

нерируемые из моноцитов крови в присутствии GM-CSF и IFN $\alpha$  (IFN-ДК), способны лизировать различные типы опухолевых клеток за счет TNF $\alpha$ -, FasL-, а также TRAIL-опосредованных сигнальных путей. При этом цитотоксичность IFN-ДК против FasL- и TRAIL-чувствительных опухолевых клеток даже превышает цитотоксическую активность ДК, генерируемых стандартно в присутствии GM-CSF и IL-4 (IL-4-ДК) [25]. Также нами было показано, что IFN-ДК обладают способностью лизировать клетки первичных опухолевых линий, полученных от пациентов с глиобластомой [25]. Однако, вопрос об экспрессии IFN-ДК перфорина и гранзима Б и участии этих медиаторов в реализации цитотоксической активности IFN-ДК, в том числе против глиобластомных клеток, остается практически неисследованным.

В связи с этим **целью настоящей работы** явилось изучение экспрессии основных компонентов литических гранул IFN-ДК с учетом степени зрелости ДК, а также исследование роли гранулопосредованного сигнального пути в реализации цитотоксической активности IFN-ДК против клеточных линий, полученных из фрагментов опухоли пациентов с внутримозговой глиобластомой.

## Материалы и методы

В исследование были включены 25 здоровых доноров крови. Забор крови и все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина. IFN-ДК получали путем культивирования прилипающей фракции МНК в 6-луночных планшетах (Nunc, Дания) в течение 4 суток в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 2,5% FBS (BioWest, США) в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN $\alpha$  (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария) с последующим дозреванием в течение 24 ч с липополисахаридом (ЛПС, 10 мкг/мл, LPS *E.coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich). Для генерации IL-4-ДК прилипающую фракцию МНК инкубировали в полной культуральной среде в присутствии GM-CSF (40 нг/мл) и IL-4 (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) в течение 5 суток. Конечное созревание IL-4-ДК индуцировали путем дополнительного культивирования клеток в течение 48 ч в присутствии ЛПС (10 мкг/мл). В серии экспериментов в качестве контроля IFN-ДК и IL-4-ДК культивировали 5 суток и 7 суток соответственно, без добавления ЛПС (интактные ДК).

Фенотипический анализ ДК проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson, США) в гейте HLA-DR<sup>+</sup> кле-

ток с использованием FITC-, PE- или APC-меченных моноклональных анти-HLA-DR, -CD107a, -гранзим Б, -перфорин антител (BD PharMingen, США). Для оценки внутриклеточной экспрессии CD107a, гранзима Б и перфорина ДК инкубировали с FITC-конъюгированными анти-HLA-DR-антителами согласно стандартной методике для определения поверхностных антигенов. Далее ДК инкубировали с PE- или APC-конъюгированными анти-CD107a-, анти-гранзим Б- или анти-перфорин-антителами, используя коммерческий набор для определения внутриклеточных молекул фирмы BD Biosciences (BD<sup>TM</sup> Pharmingen Transcription Factor Buffer Set).

Оценку экспрессии CD107a на поверхности ДК проводили путем добавления моноклональных анти-CD107a антител (BD PharMingen, США) в культуры IFN-ДК на 4 сутки (без ЛПС или совместно с ЛПС) и в культуры IL-4-ДК на 6 сутки культивирования. По окончании культивирования ДК инкубировали с FITC-конъюгированными анти-HLA-DR-антителами согласно стандартной методике для определения поверхностных антигенов. Уровень экспрессии CD107a оценивали в гейте HLA-DR<sup>+</sup> клеток.

Первичные культуры глиобластомных клеток были получены путем механической и последующей ферментативной (0,3% коллагеназы-I, Sigma-Aldrich) дезагрегации фрагмента ткани опухоли, полученной хирургическим путем от 4 пациентов с гистологически верифицированной глиобластомой (Grade IV), проходивших обследование и лечение в отделении нейрохирургии Новосибирского НИИТО и Федеральном нейрохирургическом центре. Исследования проводили после получения письменного информированного согласия больных.

Полученную суспензию глиобластомных клеток культивировали при 37 °C и 5%CO<sub>2</sub> в среде DMEM (Gibco, UK), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 10<sup>-4</sup>М меркаптэтанол, 100 мкг/мл гентамицина и 10% FBS, обновляя питательную среду два раза в неделю. Пассирование клеток осуществляли при достижении субконфлюэнтного роста адгезивных клеток посредством 0,25% трипсина (Sigma-Aldrich) и 0,02% ЭДТА (ICN, USA).

Цитотоксическую активность ДК оценивали против полученных глиобластомных клеточных линий с помощью МТТ-теста в течение 24 ч в соотношении эффектор:мишень 1:1. В отдельной серии экспериментов ДК доноров предварительно инкубировали в течение 2 ч с конканамицином А (100 нМ, Santa Cruz Biotechnology, США).

Уровень цитотоксической активности определяли по формуле:

$$(\%) = [1 - (\text{ОПЭ} + \text{м} - \text{ОПЭ}) / \text{ОПМ}] \times 100\%,$$

где ОПЭ+м – оптическая плотность в опытных образцах; ОПЭ – оптическая плотность в лунках

с эффекторами; ОПм — оптическая плотность в лунках с мишенями. Оптическую плотность измеряли при длине волны 492 нм на многоканальном спектрофотометре (Thermo Scientific Multiskan FC, Finland).

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR). Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона—Манна. Для анализа взаимосвязей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты

Фенотипический анализ показал, что среди незрелых IFN-ДК в среднем 12 и 14,8% клеток внутриклеточно экспрессируют перфорин и гранзим Б соответственно (рис. 1). Сходный уровень внутриклеточной экспрессии перфорина и гранзима Б регистрировался и в популяции незрелых IL-4-ДК (Me 11,5 и 18,2% соответственно). Конечное дозревание IFN-ДК в присутствии ЛПС сопровождалось двукратным увеличением количества перфорин<sup>+</sup> и гранзим-Б<sup>+</sup> клеток ( $p_U = 0,028$ ). В то же время среди зрелых, ЛПС-стимулированных IL-4-ДК содержание клеток, экспрессирующих перфорин и гранзим

Б, значимо не менялось (рис. 1 и 2). В результате в условиях активации ЛПС IFN-ДК отличались от IL-4-ДК достоверно более высокой внутриклеточной экспрессией перфорина (Me 24,5 vs 17%,  $p = 0,028$ ) и гранзима Б (Me 27,8 vs 20,2%,  $p = 0,046$ ). Таким образом, индукция созревания ДК под действием ЛПС ассоциировалась с накоплением перфорина и гранзима Б в популяции IFN-ДК, но не влияла на уровень внутриклеточной экспрессии анализируемых молекул в IL-4-ДК.

Важно отметить, что неперенным условием для реализации киллерной активности эффекторных клеток через перфорин/гранзим Б-зависимый механизм является дегрануляция, т.е. процесс слияния мембраны литических гранул с поверхностной мембраной клетки. Одним из белков мембраны гранул является лизосомально-ассоциированный мембранный белок — 1 (LAMP-1, CD107a), который в процессе дегрануляции обнаруживается на поверхности клеток-эффекторов и, соответственно, может выступать в качестве маркера цитотоксической функции этих клеток [1]. Поэтому, наряду с анализом перфорина и гранзима Б в ДК, была также исследована экспрессия CD107a. Учитывая, что процессы дегрануляции могут индуцироваться активационными стимулами, экспрессия CD107a на ДК оценивалась до и после активации ЛПС.

Как видно из рисунка 3, относительное количество интактных IFN-ДК, внутриклеточно

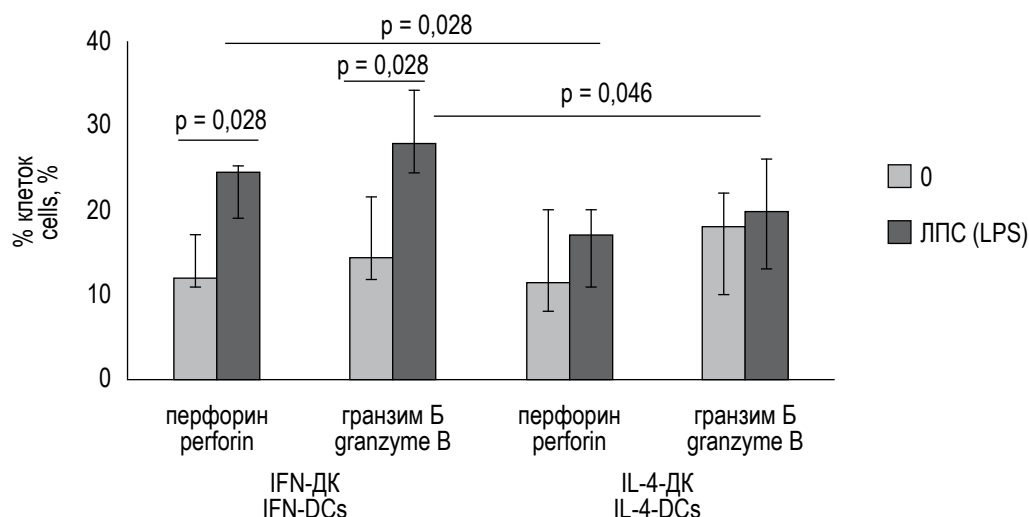


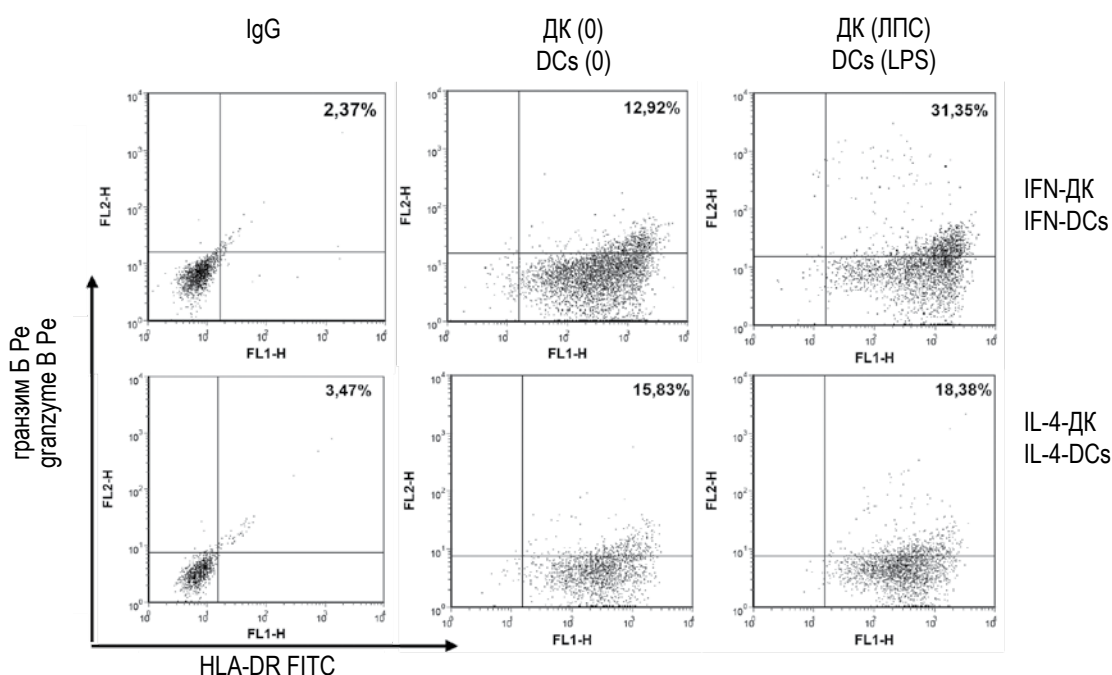
Рисунок 1. Внутриклеточная экспрессия перфорина и гранзима Б дендритными клетками здоровых доноров

Примечание. Представлены медианные значения (Me) и интерквартильный диапазон (IQR) внутриклеточной экспрессии перфорина и гранзима Б в гейте HLA-DR<sup>+</sup> клеток среди интактных (0) и ЛПС-стимулированных (ЛПС) IFN-ДК (n = 6) и IL-4-ДК (n = 6) здоровых доноров. P — U-критерий Манна-Уитни.

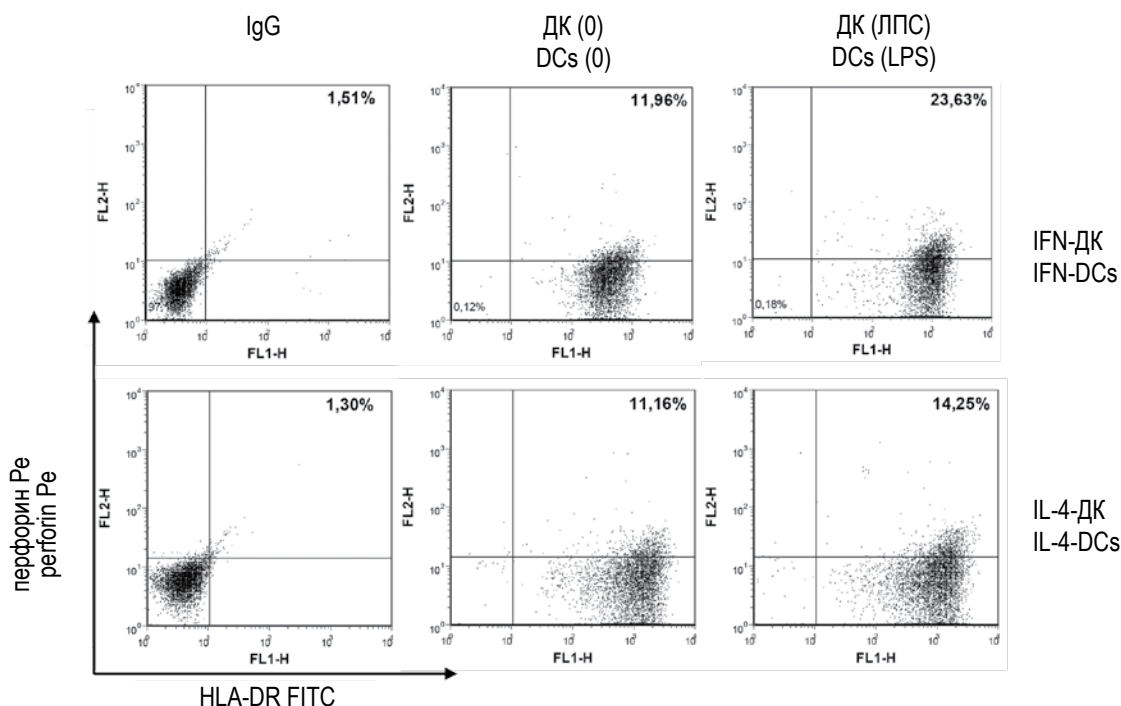
Figure 1. Intracellular perforin and granzyme B expression in healthy donor's DCs

Note. Data of intracellular perforin and granzyme B expression detected in HLA-DR<sup>+</sup> gate for IFN-DCs and IL-4-DCs from healthy donors, either intact (0), or LPS-stimulated cells (LPS) (n = 6). The data are presented as median (Me) and interquartile range (IQR). P, confidence level by Mann-Whitney U-test.

A (A)



Б (B)



**Рисунок 2. Экспрессии молекул перфорина и гранзима Б интактными и ЛПС-стимулированными дендритными клетками**

**Примечание.** Представлены индивидуальные гистограммы распределения IFN-ДК и IL-4-ДК по флуоресценции FITC-меченых анти-HLA-DR и Ре-меченных анти-гранзим Б или анти-перфорин антител в популяции интактных (ДК 0) и ЛПС-стимулированных (ДК ЛПС) клеток. Контроль (IgG) – ДК, меченные соответствующими изотип-специфическими антителами. Относительное содержание HLA-DR<sup>+</sup>гранзим Б<sup>+</sup> ДК и HLA-DR<sup>+</sup> перфорин<sup>+</sup> ДК – правый верхний квадрант.

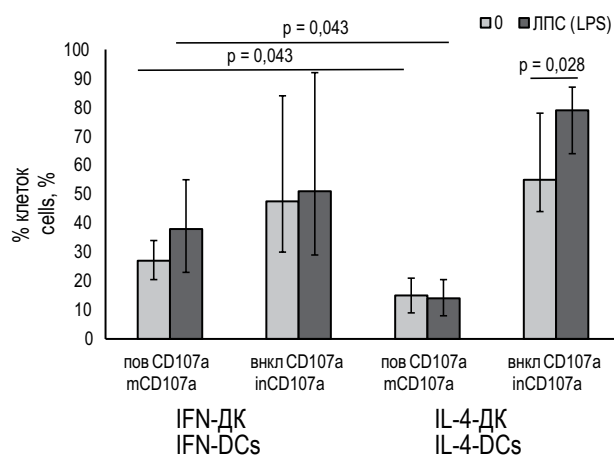
Figure 2. Perforin and granzyme B expression in intact (DC 0) and LPS-stimulated (DC LPS) DCs

Note. Representative flow cytometric dot plots are showing expression of HLA-DR (FITC-conjugated monoclonal antibody) and granzyme B or perforin (Pe-conjugated monoclonal antibodies) in intact (DC 0) and LPS-stimulated (DC LPS) IFN-DCs or IL-4-DCs. Control (IgG) represents DCs labeled with appropriate isotype-specific monoclonal antibodies. HLA-DR/granzyme B, or HLA-DR/perforin-double staining cells are seen in upper right quadrant.

экспрессирующих CD107a, составляло в среднем 47,5%. В ответ на стимуляцию ЛПС этот показатель значимо не менялся (Me 51%). Тем не менее, в популяции ЛПС-стимулированных IFN-ДК обнаруживалась сильная корреляционная взаимосвязь между внутриклеточной экспрессией перфорины и CD107a ( $R = 0,899$ ;  $p = 0,015$ ).

Незрелые интактные IL-4-ДК экспрессировали схожий уровень внутриклеточной формы CD107a (Me 55%), при этом в ответ на стимуляцию ЛПС количество CD107a-позитивных IL-4-ДК возрастало до 79% ( $p = 0,028$ ). Однако в отличие от IFN-ДК в популяции ЛПС-стимулированных IL-4-ДК значимой взаимосвязи между внутриклеточной экспрессией исследуемых молекул (CD107a, перфорин, гранзим Б) выявлено не было.

Анализ поверхностной экспрессии CD107a показал, что в среднем 27% интактных IFN-ДК несут на мембране молекулу CD107a. При активации ЛПС наблюдалось недостоверное увеличение количества повCD107a<sup>+</sup> клеток (до 38%,  $p = 0,17$ ). В популяции незрелых интактных IL-4-ДК относительное содержание повCD107a<sup>+</sup> клеток было достоверно меньше (15%,  $p = 0,043$ ). В ответ на дозревающий сигнал (ЛПС) их количество оставалось на таком же уровне, что было практически в 3 раза ниже, чем в популяции ЛПС-стимулированных IFN-ДК (13 vs 38%,  $p = 0,043$ ).



**Рисунок 3. Экспрессия CD107a дендритными клетками здоровых доноров**

**Примечание.** Представлены медианные значения (Me) и интерквартильный диапазон (IQR) поверхностной (повCD107a) и внутриклеточной (внклCD107a) экспрессии CD107a в гейте HLA-DR<sup>+</sup> клеток среди интактных (0) и ЛПС-стимулированных (ЛПС) IFN-ДК ( $n = 6$ ) и IL-4-ДК ( $n = 5$ ) здоровых доноров. P – U-критерий Манна-Уитни.

Figure 3. CD107a expression in DCs from healthy donors  
Note. Data on surface (mCD107a) and intracellular (inCD107a) CD107a expression detected in HLA-DR<sup>+</sup> gate. Intact healthy donor cells (0) and LPS-stimulated (LPS) IFN-DCs ( $n = 6$ ), or IL-4-DCs ( $n = 5$ ) are presented as median (Me) and interquartile range (IQR). P, confidence levels by Mann-Whitney U-test.

Таким образом активация ЛПС индуцирует в популяции IFN-ДК как усиление экспрессии перфорины и гранзима Б, так и дегрануляцию литических гранул. В то же время в популяции IL-4-ДК активация ЛПС приводит к увеличению внутриклеточного пула CD107a, которое не сопровождается значимым возрастанием внутриклеточного уровня перфорины/гранзима Б и усилением экспрессии мембранной формы CD107a.

Следующий этап исследования был посвящен изучению участия перфорин/гранзим Б-зависимого механизма в реализации цитотоксической активности ЛПС-стимулированных IFN-ДК против глиобластных клеток. Цитотоксичность ДК оценивали против четырех клеточных линий, которые были получены из фрагментов опухоли больных глиобластомой (Grade IV). Как видно из рисунка 4, IFN-ДК доноров эффективно лизировали клетки всех 4-х опухолевых линий. Медиана цитотоксичности IFN-ДК варьировала от 36% до 70% в зависимости от клеточной линии. Для блокирования перфорин/гранзим Б-зависимого цитолиза ДК предварительно обрабатывали конканамицином А (СМА). СМА является специфическим ингибитором вакуолярной H<sup>+</sup>-АТФ-азы, что способствует нейтрализации pH в литических гранулах и приводит в конечном итоге к инактивации молекул перфорины [16].

В целом по группе ( $n = 19$ ) противоопухолевая цитотоксическая активность IFN-ДК доноров ( $n = 5$ ) против клеток глиобластных линий ( $n = 4$ ) после обработки СМА снижалась в среднем с 47 до 34%,  $p_U = 0,07$  (рис. 5). Выраженность ингибирующего эффекта СМА прямо коррелировала с исходным уровнем цитотоксичности IFN-ДК ( $R = 0,50$ ;  $p = 0,027$ ;  $n = 19$ ). Так, при исходно высокой цитотоксической активности ДК ( $\geq 47\%$ ,  $n = 10$ ) конканамицин А оказывал наиболее выраженный эффект, что проявлялось 2-кратным снижением киллерной функции IFN-ДК с 60 до 27%,  $p = 0,006$ . В то же время СМА не оказывал ингибирующего действия на ДК с относительно низким ( $< 47\%$ ,  $n = 9$ ) уровнем цитотоксичности. Таким образом, способность IFN-ДК доноров эффективно лизировать клетки глиобластомы опосредуется с вовлечением перфорин/гранзим Б-зависимого пути. С другой стороны, подавление высокой цитотоксической активности ДК только на 50%, а также отсутствие эффекта СМА в культурах ДК с исходно низкой цитотоксичностью свидетельствует о существовании перфорин/гранзим Б-независимых механизмов цитотоксического действия IFN-ДК против глиобластных клеток.

## Обсуждение

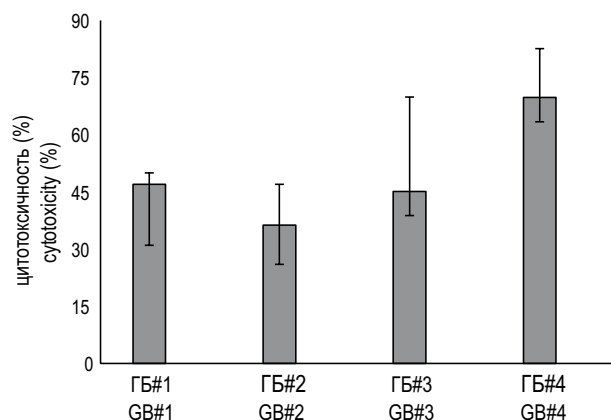
Эффекторная функция ДК, как и других клеток врожденного иммунитета, связана с цитотоксическим действием на клетки-мишени. Не-



смотря на различия в путях активации, способах распознавания клеток-мишеней, клетки-эффекторы медируют схожие апоптоз-индуцирующие сигнальные пути. Грануло-опосредованная цитотоксичность для клеток-эффекторов является универсальным механизмом подавления опухолевого роста и индукции гибели клеток-мишеней. При этом показано, что, наряду с NK-клетками и CD8<sup>+</sup> T-лимфоцитами, различные типы ДК могут также вызывать перфорин/гранзим Б-зависимый цитолитический эффект опухолевых клеток. Экспрессия перфорина и гранзима Б продемонстрирована как для плазматических [13, 15], так и миелоидных ДК [24]. Также экспрессия перфорина и гранзима Б характерна для ДК, генерируемых из моноцитов в присутствии IFN $\alpha$ , IL-4 или IL-15 [3, 17].

Как известно, IFN $\alpha$  является одним из мощных стимуляторов киллерной активности эффекторных клеток, в том числе и ДК [12, 22, 25]. В настоящей работе показано, что часть IFN-ДК здоровых доноров также экспрессируют перфорин и гранзим Б. Причем при схожем уровне экспрессии этих молекул в интактных IFN-ДК и IL-4-ДК после активации ЛПС IFN-ДК характеризовались достоверно более высокой внутриклеточной экспрессией перфорина и гранзима Б по сравнению с IL-4-ДК. По-видимому, обнаруженные различия между двумя этими популяциями ДК связаны с разным уровнем синергичной активации экспрессии генов перфорина и гранзима Б в ответ на стимуляцию ЛПС и IFN $\alpha$  или IL-4 соответственно. В пользу этого предположения свидетельствуют данные ряда авторов об оппозитном эффекте IL-4 и IFN $\alpha$  на экспрессию перфорина и гранзима Б. Так, IL-4 является негативным регулятором экспрессии генов гранзима Б и перфорина в IL2-активированных NK-клетках [10]. Кроме того, IL-4 дозозависимо подавляет экспрессию и продукцию гранзима Б в регуляторных Т-клетках (Treg), а также гранзим Б-опосредованную противоопухолевую цитотоксичность Treg [9]. В отношении IFN $\alpha$ , наоборот, показано стимулирующее влияние на экспрессию гранзима Б на уровне гена и самого белка в NK-клетках и их цитотоксическую активность [27], а также на экспрессию мРНК перфорина [20].

Еще одним маркером грануло-опосредованной цитотоксичности клеток является молекула CD107a, относящаяся к группе лизосомально-ассоциированных мембранных белков (LAMP) [1]. Согласно полученным нами данным, стимуляция ЛПС не влияла на внутриклеточную экспрессию CD107a в IFN-ДК. Поскольку CD107a находится на мембране цитолитических гранул, можно предположить, что накопление пула перфорина и гранзима Б в ответ на стимуляцию ЛПС происходило в ранее сформированные CD107a-позитивные гранулы. Интересно отметить, что



**Рисунок 4. Цитотоксическая активность IFN-ДК доноров против глиобластомных клеточных линий**

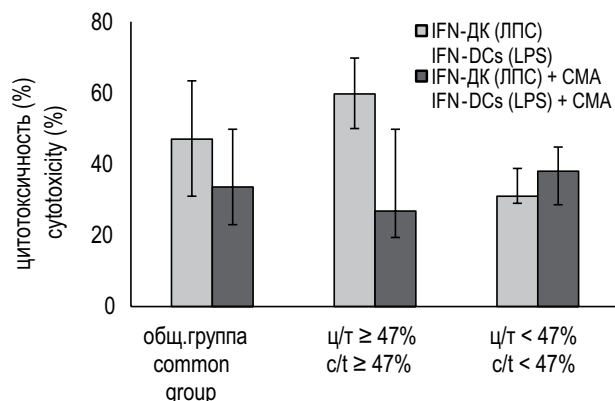
**Примечание.** Представлены медианные значения (Me) и интерквартильный диапазон (IQR) цитотоксической активности (%) ЛПС-стимулированных IFN-ДК здоровых доноров (n = 5) против опухолевых клеточных линий, полученных из фрагментов опухоли четырех пациентов с глиобластомой (Grade IV). Цитотоксическую активность оценивали с помощью МТТ-теста при соотношении эффекторы : мишени – 1:1.

Figure 4. Cytotoxic activity of donor IFN-DCs against glioblastoma cell lines

Note. Data of cytotoxic activity of LPS-stimulated (n = 5) IFN-DCs from healthy donors against tumor cell lines obtained from malignant tissues of four patients with glioblastoma multiforme (Grade IV). The results are presented as median (Me) and interquartile range (IQR). Cytotoxic activity was determined using MTT-assay, at a ratio of effector cells (DCs)-to-targets (tumor cells) as 1:1.

в культурах IL-4-ДК стимуляция интактных ДК сопровождалась приростом CD107a в цитоплазме клеток на фоне практически неменяющейся экспрессии перфорина и гранзима Б. Эти данные могут косвенно указывать на менее эффективную способность IL-4-ДК лизировать клетки-мишени через грануло-опосредованный механизм цитотоксичности.

Полученные нами данные показали, что уровень внутриклеточной экспрессии CD107a в ЛПС-стимулированных IFN-ДК прямо коррелировал с перфорином, но не гранзимом Б. Выявленный факт согласуется с результатами исследования роли CD107a в перфорин/гранзим Б-опосредованной цитотоксичности NK-клеток [18]. Так, показано, что для CD107a-дефицитных мышей характерны нарушения трафика перфорина (но не гранзима Б) в литические гранулы и низкий уровень экспрессии зрелых форм перфорина. Результатом таких нарушений является дефект цитотоксической функции NK-клеток, поскольку низкое количество перфорина, высвобождающегося в процессе деградации в иммунологический синапс, не обеспечивает эффективного проникновения гранзима Б в клетки-мишени.



**Рисунок 5. Влияние конканамицина А на цитотоксическую активность IFN-ДК доноров против клеток глиобластомы**

**Примечание.** Представлены медианные значения (Me) и интерквартильный диапазон (IQR) цитотоксической активности (%) ЛПС-стимулированных интактных и СМА-обработанных (IFN-ДК(ЛПС) и IFN-ДК(ЛПС) + СМА) ДК здоровых доноров против опухолевых клеточных линий пациентов с глиобластомой (Grade IV, n = 4). Данные представлены в общей группе (n = 19), а также в подгруппах с высокой (ц/т ≥ 47%, n = 10) и низкой (ц/т < 47%, n = 9) цитотоксической активностью IFN-ДК.

Figure 5. The effect of concanamycin A on cytotoxic activity of donor IFN-DCs against glioblastoma cell lines

Note. The data are presented as median (Me) and interquartile range (IQR) of cytotoxic activity produced by LPS-stimulated, CMA-free, or CMA-treated [IFN-DC(LPS) and IFN-DC(LPS) + CMA] DCs from healthy donors against tumor cell lines of glioblastoma patients (Grade IV, n = 4). Data are presented for the total group (n = 19), and in subgroups with high (c/t ≥ 47%, n = 10) and low (c/t < 47%, n = 9) cytotoxicity.

Процесс дегрануляции сопровождается экстернализацией CD107a на поверхности различных цитотоксических клеток (CTL, NK, нейтрофилы, макрофаги) и является маркером цитотоксической функции NK-клеток и CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов [1, 2]. Согласно полученным нами данным, молекула CD107a определялась на поверхности IFN-ДК. При этом активация ЛПС усиливала дегрануляцию IFN-ДК, о чем свидетельствовало увеличение количества IFN-ДК, экспрессирующих на поверхности CD107a. В то же время в культурах IL-4-ДК активация ЛПС, ведущая к увеличению внутриклеточного пула CD107a, не сопровождалась экстернализацией данной молекулы. Полученные данные позволяют предполагать, что, по аналогии с NK-клетками и CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитами, анализ поверхностной экспрессии CD107a может быть использован в качестве маркера противоопухолевой цитотоксической функции и дегрануляции IFN-ДК в ответ на стимуляцию опухолевыми антигенами. Однако это предположение требует дальнейшего изучения.

Способность ДК проявлять киллерную активность против перфорин/гранзим

Б-чувствительной опухолевой линии K562 является известным фактом [3, 17, 24]. Нами впервые изучено участие перфорин/гранзим Б-зависимого механизма в реализации цитотоксической активности IFN-ДК против клеточных линий, полученных непосредственно из ткани опухоли больных с глиобластомой. Ранее нами было показано, что IFN-ДК здоровых доноров эффективно лизируют первичные глиобластомные культуры [25]. Однако вопрос о вовлечении перфорин/гранзим Б-зависимого пути в этом случае оставался открытым. Между тем, гранулоопосредованная цитотоксичность может иметь большое значение в противоопухолевом иммунитете при глиальных опухолях головного мозга, поскольку многие глиомные опухолевые линии резистентны к рецептор-опосредованному апоптозу [6, 8]. В литературе имеются отдельные сообщения о чувствительности клеток глиобластомы к перфорин/гранзим Б-опосредованному лизису [11, 21]. Исследования *in situ* показали, что в области иммунологического синапса между глиобластомными клетками человека и опухоль-инфильтрирующими CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитами обнаруживается гранзим Б [5]. При этом в самих опухолевых клетках этой зоны наблюдаются нарушения полимеризации микротубулярной системы цитоскелета и высокий уровень экспрессии активной формы каспазы-3, что может свидетельствовать о чувствительности глиобластомных клеток к гранзим Б-опосредованному цитолизу. Исследования Renner и соавт. показали, что в экспериментальных моделях перфорин опосредует не только прямое цитотоксическое действие CD8<sup>+</sup>T-клеток, но также способствует нарушению сосудистой проницаемости в зоне опухоли [23].

Проведенное нами исследование прямо демонстрирует, что перфорин/гранзим Б-сигнальный путь вовлечен в реализацию цитотоксической активности IFN-ДК против глиобластомных клеток, и блокирование этого механизма с помощью СМА значительно ослабляет цитотоксическую активность IFN-ДК. При этом гранулоопосредованный механизм вносит значительный вклад в эффективный киллинг опухолевых клеток. Об этом свидетельствует отсутствие блокирующего эффекта СМА при исходно низком уровне цитотоксичности IFN-ДК против клеток глиобластомы и выраженный ингибирующий эффект СМА при высокой цитотоксической активности IFN-ДК.

## Благодарности

Исследование поддержано грантом Президента Российской Федерации государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук (МК-7611.2016.7) и грантом РФФИ № 16-34-00711.



## Список литературы / References

1. Aktas E., Kucuksezer U.C., Bilgic S., Erten G., Deniz G., Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol.*, 2009, Vol. 254, pp. 149-154.
2. Alter G., Malenfant J.M., Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods*, 2004, Vol. 294, no. 1-2, pp. 15-22.
3. Anguille S., Lion E., Tel J., de Vries I.J.M., Couderé K., Fromm P.D., Van Tendeloo V.F., Smits E.L., Berneman Z.N. Interleukin-15-induced CD56<sup>+</sup> myeloid dendritic cells combine potent tumor antigen presentation with direct tumoricidal potential. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, e51851. doi:10.1371/journal.pone.0051851.
4. Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, Vol. 392, pp. 245-252.
5. Barcia C. Jr., Gómez A., Gallego-Sanchez J.M., Perez-Vallés A., Castro M.G., Lowenstein P.R., Barcia C., Herrero M.-T. Infiltrating CTLs in human glioblastoma establish immunological synapses with tumorigenic cells. *Am. J. Pathol.*, 2009, Vol. 175, pp. 786-798.
6. Bellail A.C., Tse M.C., Song J.H., Phuphanich S., Olson J.J., Sun S.Y., Hao C. DR5-mediated DISC controls caspase-8 cleavage and initiation of apoptosis in human glioblastomas. *J. Cell Mol. Med.*, 2010, Vol. 14, no. 6A, pp. 1303-1317.
7. Bratke K., Nielsen J., Manig F., Klein C., Kuepper M., Geyer S., Julius P., Lommatzsch M., Virchow J.C. Functional expression of granzyme B in human plasmacytoid dendritic cells: a role in allergic inflammation. *Clin. Exp. Allergy*, 2010, Vol. 40, pp. 1015-1024.
8. Capper D., Gaiser T., Hartmann C., Habel A., Mueller W., Herold-Mende C., von Deimling A., Siegelin M.D. Stem-cell-like glioma cells are resistant to TRAIL/Apo2L and exhibit down-regulation of caspase-8 by promoter methylation. *Acta Neuropathol.*, 2009, Vol. 117, no. 4, pp. 445-456.
9. Choi B.D., Gedeon P.C., Herndon J.E., Archer G.E., Reap E.A., Sanchez-Perez L., Mitchell D.A., Bigner D.D., Sampson J.H. Human regulatory T cells kill tumor cells through granzyme-dependent cytotoxicity upon retargeting with a bispecific antibody. *Cancer Immunol. Res.*, 2013, Vol. 1, no. 3, pp. 163-167.
10. Clément M.V., Haddad P., Soulié A., Legros-Maida S., Guillet J., Cesar E., Sasportes M. Involvement of granzyme B and perforin gene expression in the lytic potential of human natural killer cells. *Res Immunol.*, 1990, Vol. 141, no. 6, pp. 477-489.
11. Cullen S.P., Brunet M., Martin S.J. Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death Differ.*, 2008, Vol. 17, no. 4, pp. 616-623.
12. Fanger N.A., Maliszewski C.R., Schooley K., Griffith T.S. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J. Exp. Med.*, 1999, Vol. 190, pp. 1155-1164.
13. Jahrsdörfer B., Vollmer A., Blackwell S.E., Maier J., Sontheimer K., Beyer T., Mandel B., Lunov O., Tron K., Nienhaus G.U., Simmet T., Debatin K.M., Weiner G.J., Fabricius D. Granzyme B produced by human plasmacytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion. *Blood*, 2010, Vol. 115, no. 6, pp. 1156-1165.
14. Janjic B.M., Lu G., Pimenov A., Whiteside T.L., Storkus W.J., Vujanovic N.L. Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. I. involvement of an apoptosis-inducing pathway. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, pp. 1823-1830.
15. Karrich J.J., Jachimowski L.C.M., Nagasawa M., Kamp A., Balzarolo M., Wolkers M.C., Uittenbogaart C.H., Marieke van Ham S., Blom B. IL-21-stimulated human plasmacytoid dendritic cells secrete granzyme B, which impairs their capacity to induce T-cell proliferation. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 16, pp. 3103-3111.
16. Kataoka T., Takaku K., Magae J., Shinohara N., Takayama H., Kondo S., Nagai K. Acidification is essential for maintaining the structure and function of lytic granules of CTL. Effect of concanamycin A, an inhibitor of vacuolar type H<sup>(+)</sup>-ATPase, on CTL-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 9, pp. 3938-3947.
17. Korthals M., Safaian N., Kronenwett R., Maihöfer D., Schott M., Papewalis C., Diaz Blanco E., Winter M., Czibere A., Haas R., Kobbe G., Fenk R. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN- $\alpha$  acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. *J. Transl. Med.*, 2007, Vol. 5, p. 46.
18. Krzewski K., Gil-Krzewska A., Nguyen V., Peruzzi G., Coligan J.E. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 23, pp. 4672-4683.
19. Liu Sh., Yu Y., Zhang M., Wang W., Cao X. The involvement of TNF- $\alpha$ -related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN- $\beta$ -stimulated human dendritic cells to tumor cells. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 166, no. 9, pp. 5407-5415.
20. Mori S., Jewett A., Murakami-Mori K., Cavalcanti M., Bonavida B. The participation of the Fas-mediated cytotoxic pathway by natural killer cells is tumor-cell-dependent. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1997, Vol. 44, pp. 282-290.
21. Ogbomo H., Zemp F.J., Lun X., Zhang J., Stack D., Rahman M.M., Mcfadden G., Mody C.H., Forsyth P.A. Myxoma virus infection promotes NK lysis of malignant gliomas *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, e66825. doi:10.1371/journal.pone.0066825.
22. Papewalis C., Jacobs B., Wuttke M., Ullrich E., Baehring T., Fenk R., Willenberg H.S., Schinner S., Cohnen M., Seissler J., Zacharowski K., Scherbaum W.A., Schott M. IFN- $\alpha$  skews monocytes into CD56<sup>+</sup>-expressing dendritic cells with potent functional activities *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, pp. 1462-1470.

23. Renner D., Jin F., Parney I., Pirko I., Pavelko K., Johnson A. A duality of roles for perforin in CD8<sup>+</sup> T cell-glioma interactions: contributions to cytotoxicity and altered vascular permeability. *Neuro Oncol.*, 2014, Vol. 16 (suppl. 5), v109. doi:10.1093/neuonc/nou257.10.
24. Stary G., Bangert C., Tauber M., Strohal R., Kopp T., Stingl G. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, pp. 1441-1451.
25. Tyrinova T.V., Leplina O.Y., Mishinov S.V., Tikhonova M.A., Shevela E.Y., Stupak V.V., Pendyurin I.V., Shilov A.G., Alyamkina E.A., Rubtsova N.V., Bogachev S.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Cytotoxic activity of ex-vivo generated IFN $\alpha$ -induced monocyte-derived dendritic cells in brain glioma patients. *Cell Immunol.*, 2013, Vol. 284, pp. 146-153.
26. Vanderheyde N., Vandenabeele P., Goldman M., Willems F. Distinct mechanisms are involved in tumoricidal and tumoricidal activities of monocyte-derived dendritic cells. *Immunol. Lett.*, 2004, Vol. 91, no. 2-3, pp. 99-101.
27. Zhang B., Zhang J., Tian Z. Comparison in the effects of IL-2, IL-12, IL-15 and IFN $\alpha$  on gene regulation of granzymes of human NK cell line NK-92. *Int. Immunopharmacol.*, 2008, Vol. 8, pp. 989-996.

**Авторы:**

**Тыринова Т.В.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Леплина О.Ю.** — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Мишинов С.В.** — к.м.н., врач-нейрохирург отделения нейрохирургии ФГБУ «Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Тихонова М.А.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Калиновский А.В.** — к.м.н., заведующий операционным блоком ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Чернов С.В.** — к.м.н., заведующий отделением нейроонкологии ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Ступак В.В.** — д.м.н., профессор, зав. отделением нейрохирургии ФГБУ «Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Останин А.А.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Черных Е.Р.** — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Authors:**

**Tyrinova T.V.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Leplina O.Yu.**, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Mishinov S.V.**, PhD (Medicine), Neurosurgeon, Neurosurgery Department, Ya. L. Tsivyan Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russian Federation

**Tikhonova M.A.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Kalinovskiy A.V.**, PhD (Medicine), Head, Surgical Unit, Federal Neurosurgical Center, Novosibirsk, Russian Federation

**Chernov S.V.**, PhD (Medicine), Head, Neurooncology Department, Federal Neurosurgical Center, Novosibirsk, Russian Federation

**Stupak V.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Neurosurgery Department, Ya. L. Tsivyan Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russian Federation

**Ostanin A.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Chernykh E.R.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation