

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623271>

Иммуногенный ферроптоз защищает от развития опухолевого роста

М.О. Савюк^{1, 2*}, В.Д. Турубанова^{1, 2}, Ю.В. Ефимова¹, Т.А. Мищенко², М.В. Ведунова², Д.В. Крысько¹

¹ Гентский университет, Гент, Бельгия;

² Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Иммунотерапия стала независимой и эффективной противоопухолевой стратегией наряду с хирургией, лучевой терапией и химиотерапией [1]. Иммуногенная гибель клеток (ICD) была признана решающим фактором, определяющим эффективность терапии рака [2]. Концепция ICD сочетает способность эффективно уничтожать раковые клетки с активацией иммунного ответа, специфичного для раковых клеток и приводящего к сильному и длительному противораковому иммунитету. Агенты, индуцирующие ICD, вызывают активацию опасного пути, включающего выброс медиаторов ICD, известных как молекулярные паттерны, связанные с повреждением (DAMPs). DAMPs составляют семейство эндогенных молекул, которые приобретают иммуностимулирующие свойства при воздействии на внешнюю клеточную мембрану или при высвобождении во внеклеточный матрикс определённым пространственно-временным образом. Они включают АТФ, ядерный белок HMGB1, кальретикулин (CRT) и провоспалительные цитокины, такие как интерфероны типа I (IFN) [3].

Первоначально концепция ICD была описана для раковых клеток, подвергающихся апоптозу, но она была расширена и дополнена другими типами клеточной смерти, такими как некроптоз, пирроптоз, ферроптоз, нетоз и др. [4]. Ферроптоз — это регулируемая железозависимая форма клеточной смерти, характеризующаяся накоплением активных форм кислорода в клетке.

В этом исследовании мы оценили иммуногенность ферроптотических раковых клеток *in vitro* и проверили их потенциал в качестве альтернативного подхода к иммунотерапии рака.

Смерть клеток глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205 была вызвана с использованием одного из хорошо изученных индукторов ферроптоза RSL3 (RAS-Selective Lethal 3). Через 24 часа после стимуляции RSL3 80% клеток GL261 и 90% клеток MCA205 были дважды положительными при окрашивании аннексином V/Sytox Blue и находились на поздней стадии ферроптоза. Через 3 часа после стимуляции RSL3 50% клеток GL261 и 45% клеток MCA205 были дважды положительными при окрашивании аннексином V/Sytox Blue. Мы оценили иммуногенные характеристики ранних и поздних ферроптотических клеток *in vitro* (то есть через 3 или 24 часа после стимуляции RSL3). Для этого мы сравнили фенотип дендритных клеток (BMDC), подвергшихся воздействию поздних ферроптотических клеток, с BMDC, подвергшихся воздействию жизнеспособных раковых клеток. В качестве положительного контроля мы индуцировали иммуногенный апоптоз, обрабатывая клетки MTX, в качестве второго положительного контроля использовался LPS. Поздние ферроптотические клетки MCA 205 не индуцировали фенотипического созревания BMDC, на что указывает отсутствие поверхностной активации костимулирующих молекул CD86, CD80 и MHCII. Ранние ферроптотические клетки глиомы GL261 индуцировали менее выраженный фенотипический ответ по сравнению с клетками MCA205. Тем не менее наблюдалось уменьшение способности к активации дендритных клеток для поздних ферроптотических клеток, для глиомы тоже.

Чтобы проверить способность ранних ферроптотических раковых клеток активировать адаптивную иммунную систему, мы воспользовались общепринятой моделью профилактической вакцинации опухоли у иммунокомпетентных мышей C57BL/6 J. Мы иммунизировали мышей C57BL/6 J клетками MCA205 с ранним или поздним ферроптозом. В качестве отрицательного контроля мы использовали PBS или клетки, подвергнутые спонтанному некрозу. Затем иммунизированных мышей заражали жизнеспособными опухолевыми клетками MCA205. Защита от роста опухоли в месте заражения интерпретировалась как признак успешного запуска адаптивной иммунной системы. Мыши, иммунизированные клетками MCA205 с поздним ферроптозом (индукция RSL3 в течение 24 часов), оставались значительно менее свободными от опухолей в месте заражения, что указывает на то, что клетки с поздним ферроптозом не являются иммуногенными *in vivo*, подтверждая наши первоначальные наблюдения *in vitro*.

Ключевые слова: глиома; фибросаркома; ферроптоз; иммуногенная клеточная гибель.

Рукопись получена: 17.05.2023

Рукопись одобрена: 26.11.2023

Опубликована online: 20.01.2024

Как цитировать:

Савюк М.О., Турбанова В.Д., Ефимова Ю.В., Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Крысько Д.В. Иммуногенный ферроптоз защищает от развития опухолевого роста // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 4. С. 550–553. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623271>

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Работа была выполнена при поддержке проекта РНФ № 22-15-00376.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldberg M.S. Improving cancer immunotherapy through nanotechnology // *Nature Reviews Cancer*. 2019. Vol. 19, N 10. P. 587–602. doi: 10.1038/s41568-019-0186-9
2. Kepp O., Senovilla L., Vitale I., et. al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death // *Oncoimmunology*. 2014. Vol. 3, N 9. P. e955691. doi: 10.4161/21624011.2014.955691
3. Ghiringhelli F., Apetoh L., Tesniere A., et. al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors // *Nature Medicine*. 2009. Vol. 15, N 10. P. 1170–1178. doi: 10.1038/nm.2028
4. Obeid M., Panaretakis T., Joza N., et. al. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis // *Cell Death & Differentiation*. 2007. Vol. 14, N 10. P. 1848–1850. doi: 10.1038/sj.cdd.4402201

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

* М.О. Савюк; адрес: 10 Corneel Heymanslaan, 9000, Гент, Бельгия; e-mail: mariia.saviuk@ugent.be

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623271>

Immunogenic ferroptosis protects against the development of tumour growth

M.O. Saviuk^{1, 2*}, V.D. Turubanova^{1, 2}, Yu.V. Efimova¹, T.A. Mishchenko², M.V. Vedunova², D.V. Krysko¹¹ Ghent University, Ghent, Belgium;² National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

ABSTRACT

Immunotherapy is a proven and effective anti-tumor strategy, which can be used alongside surgery, radiation therapy, and chemotherapy [1]. Immunogenic cell death (ICD) was identified as a critical factor determining the effectiveness of cancer treatment [2]. The concept of ICD combines the capacity to destroy cancer cells effectively, with the activation of a cancer cell-specific immune response, leading to potent and long-lasting anti-cancer immunity. ICD-inducing agents activate a perilous pathway that triggers the release of ICD mediators called damage-associated molecular patterns (DAMPs). DAMPs encompass a group of naturally occurring molecules that gain immunostimulatory qualities upon exposure to the outer cell membrane or when liberated into the extracellular matrix in a specific spatiotemporal fashion. ATP, the nuclear protein HMGB1, calreticulin (CRT), and type I interferons (IFNs) are among the identified factors [8].

The concept of ICD was initially described for cancer cells undergoing apoptosis, but it was expanded to encompass additional forms of cell death, such as necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, nontosis, etc. [11]. Ferroptosis is a regulated iron-dependent type of cell death that is characterized by the buildup of reactive oxygen species in the cell.

In this study, the immunogenicity of ferroptotic cancer cells *in vitro* was assessed and their potential as an alternative approach to cancer immunotherapy was tested.

Glioma GL261 and fibrosarcoma MCA205 cells were induced with one of the well-known inducers of ferroptosis, RSL3 (RAS-Selective Lethal 3). After 24 hours of RSL3 stimulation, 80% of GL261 cells and 90% of MCA205 cells showed positivity to Annexin V/Sytox Blue, indicating they were in the late stage of ferroptosis. Similarly, after 3 hours of RSL3 stimulation, 50% of GL261 cells and 45% of MCA205 cells were double positive with Annexin V/Sytox Blue indicating their late-stage ferroptotic state. We evaluated the immunogenic features of early and late ferroptotic cells *in vitro*, specifically at 3 or 24 hours after RSL3 stimulation. To achieve this, we compared the phenotype of dendritic cells (BMDCs) exposed to late ferroptotic cells with BMDCs exposed to viable cancer cells. Furthermore, immunogenic apoptosis was induced with MTX as a positive control and LPS as a secondary positive control. Late ferroptotic MCA 205 cells surprisingly did not induce phenotypic BMDC maturation, as indicated by the lack of surface activation of costimulatory molecules CD86, CD80, and MHCII. In contrast, a less pronounced phenotypic response compared to MCA205 cells was induced by early ferroptotic glioma GL261 cells. Nonetheless, a decrease in the ability to activate dendritic cells was observed for late ferroptotic glioma cells as well.

The study used the standard tumor prophylactic vaccination model on immunocompetent C57BL/6 J mice to assess the adaptive immune system activation by early ferroptotic cancer cells. Mice were immunized with early or late ferroptosis MCA205 cells. As a negative control, we used PBS or cells that underwent spontaneous necrosis. The mice that were immunized were later confronted with viable MCA205 tumor cells. Protection against tumor growth at the site of infection was deemed indicative of successful activation of the adaptive immune system. Remarkably, mice that received immunization with late ferroptotic MCA205 cells, induced with RSL3 for 24 hours, exhibited conspicuous tumor growth at the infection site, signifying that late ferroptotic cells are not immunogenic *in vivo*, as per our preliminary observations *in vitro*.

Keywords: glioma; fibrosarcoma; ferroptosis; immunogenic cell death.

To cite this article:

Saviuk MO, Turubanova VD, Efimova YuV, Mishchenko TA, Vedunova MV, Krysko DV. Immunogenic ferroptosis protects against the development of tumour growth. *Genes & Cells*. 2023;18(4):550–553. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623271>

Received: 17.05.2023

Accepted: 26.11.2023

Published online: 20.01.2024

ADDITIONAL INFORMATION

Funding sources. The study was supported by the RSF project No. 22-15-00376.

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, and final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

1. Goldberg M.S. Improving cancer immunotherapy through nanotechnology. *Nature Reviews Cancer*. 2019;19(10):587–602. doi: 10.1038/s41568-019-0186-9
2. Kepp O, Senovilla L, Vitale I, et. al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology*. 2014;3(9):e955691. doi: 10.4161/21624011.2014.955691
3. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, et. al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nature Medicine*. 2009;15(10):1170–1178. doi: 10.1038/nm.2028
4. Obeid M, Panaretakis T, Joza N, et. al. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. 2007;14(10):1848–1850. doi: 10.1038/sj.cdd.4402201

AUTHORS' CONTACT INFO

* M.O. Saviuk; address: 10 Corneel Heymanslaan, 9000 Ghent, Belgium; e-mail: mariia.saviuk@ugent.be