

**Т.В. Тыринова<sup>1,2</sup>, О.Ю. Леплина<sup>1</sup>, М.А. Тихонова<sup>1</sup>,  
С.А. Шифон<sup>2</sup>, Е.Р. Черных<sup>1</sup>**

## **ГАЛЕКТИН-9 СТИМУЛИРУЕТ СОЗРЕВАНИЕ И Th1-ПОЛЯРИЗУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ IFN $\alpha$ -ИНДУЦИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК**

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

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Российская Федерация

**Резюме.** Галектин-9 через взаимодействие с ингибиторным чекпойнт рецептором TIM-3 оказывает ингибирующее влияние на Т-клеточный иммунный ответ. Недавние исследования продемонстрировали, что TIM-3 экспрессируется на клетках миелоидного ряда, в том числе и на дендритных клетках. Соответственно, дендритные клетки также могут быть мишенями для регулирующего влияния галектина-9. **Цель исследования:** изучить влияния галектина-9 на дендритные клетки, генерированные в культуре *in vitro* из моноцитов в присутствии IFN $\alpha$  (ИФН-ДК). **Материалы и методы.** Дендритные клетки генерировали путем культивирования прилипающей фракции мононуклеарных клеток здоровых доноров в присутствии GM-CSF и IFN $\alpha$  в течение 4 суток, после чего добавляли рекомбинантный галектин-9 (10 мкг/мл) и продолжали культивировать в течение 24 часов. Фенотипический анализ проводили методом проточной цитометрии с использованием флуорохром-конъюгированных моноклональных антител. Аллостимуляторную и Th1/Th2-поляризирующую активность ИФН-ДК оценивали в смешанной культуре лейкоцитов с аллогенными мононуклеарными клетками здоровых доноров. **Результаты исследования** показали, что ИФН-ДК, как и моноцитарные предшественники, на высоком уровне экспрессируют ингибиторный чекпойнт рецептор TIM-3. Добавление галектина-9 в культуры ИФН-ДК снижает долю незрелых CD14<sup>+</sup>CD83<sup>-</sup> клеток ( $p_w=0,017$ ), увеличивает содержание зрелых CD83<sup>+</sup> дендритных клеток ( $p_w=0,028$ ), а также уровень экспрессии ко-стимуляторной молекулы CD86 ( $p_w=0,01$ ). В присутствии галектина-9 ИФН-ДК обладают аллостимуляторной активностью в отношении CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов и характеризуются значимо более высокой способностью индуцировать генерацию IFN $\gamma$ -продуцирующих CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов. **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о стимулирующем влиянии галектина-9 на созревание ИФН-ДК и их функциональную активность.

**Ключевые слова:** дендритные клетки, интерферон  $\alpha$ , TIM-3, галектин-9, аллостимуляторная активность

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Тыринова Тамара Викторовна

tyrinova@bk.ru

Дата поступления: 01.09.2024

Образец цитирования: Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Шифон С.А., Черных Е.Р. Галектин-9 стимулирует созревание и Th1-поляризирующую активность IFN $\alpha$ -индуцированных дендритных клеток. [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2024, Том 21, № 4, с. 467–478, DOI: 10.22138/2500-0918-2024-21-4-467-478

### **Введение**

Галектин-9 (Gal-9), будучи участником семейства  $\beta$ -галактозид-связывающих лектинов, обладает иммуномодулирующей активностью и участвует в поддержании гомеостаза, регулируя процессы

роста и дифференцировки клеток, механизмы межклеточного взаимодействия и апоптоза [1]. Основная роль Gal-9 в иммунном ответе связана с его ингибирующим влиянием на Th1-/Th17-клетки и стимуляцией регуляторных Т-клеток, что способствует подавлению иммунного ответа [2,3]. Повышенная экспрессия Gal-9 в опухолевых клетках ассоциируется с ростом и прогрессией опухоли при лимфопролиферативных заболеваниях, глиомах и так далее [4-6]. В то же время есть данные о том, что Gal-9 обладает противоопухолевым действием [7], что может быть обусловлено вовлеченностью различных механизмов реализации эффектов Gal-9. Одним из наиболее важных рецепторов Gal-9 является ингибиторный чекпойнт рецептор TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3). На сегодняшний день Gal-9/TIM-3-взаимодействие рассматривается как одна из важных мишеней в терапии опухолевых заболеваний наряду с PD-L1/PD-1-координацией. Разработка и клиническое применение ингибиторов этого сигнального пути изучается в качестве перспективной стратегии иммунотерапии опухолевых заболеваний [8].

Впервые TIM-3 был описан как рецептор, который экспрессируется на CD4<sup>+</sup>Th1 и CD8<sup>+</sup> Т-клетках и ассоциируется с ингибированием их эффекторных функций [9, 10]. Тем не менее все больше данных накапливается о конститутивной экспрессии TIM-3 на клетках врожденного иммунитета, в том числе на дендритных клетках (ДК) [11]. Однако, какова функциональная значимость экспрессии TIM-3 на ДК до сих пор остается во многом неизвестным. В свою очередь, Gal-9 продуцируется различными типами клеток, в том числе эндотелиальными клетками, фибробластами, тканевыми макрофагами, тучными клетками, Т-клетками и так далее [12, 13], значит, Gal-9 может выступать в качестве естественного лиганда для ДК и регулировать их фенотипические или функциональные свойства через Gal-9/TIM-3-опосредованное взаимодействие.

**Целью** исследования стало изучение влияния Gal-9 на дендритные клетки, генерированные в культуре *in vitro* из моноцитов в присутствии IFN $\alpha$ .

## Материалы и методы

### Генерирование дендритных клеток

В исследование было включено 25 здоровых доноров обоего пола. Все исследования проводили после получения письменного информированного согласия.

ДК генерировали путем культивирования адгезивной к пластику фракции моноклеарных клеток (МНК), выделенных из периферической крови в градиенте плотности фикола-урографина ( $\rho=1,077$ ) в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 2,5 % эмбриональной телячьей сыворотки (FCS, БиолоТ, Санкт-Петербург), в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN $\alpha$  (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария) при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub> в течение 4 суток).

Для изучения роли Gal-9 на четвертые сутки в культуры ДК добавляли рекомбинантный Gal-9 (10 мкг/мл; rGal-9, BiloLegend, США) и продолжали культивировать в течение 24 часов. Контрольными культурами являлись интактные ДК без добавления rGal-9 (пятисуточные культуры). Жизнеспособность ДК в оценке окрашивания трипановым синим составляла 93-95%.

### Фенотипический анализ дендритных клеток

Оценку фенотипа ДК проводили методом проточной цитофлуориметрии (BD FACSCanto™, США) с использованием флуорохром-конъюгированных моноклональных анти-CD14 (FITC), -CD83 (APC), -HLA-DR (PerCP), -CD86 (Pe), -TIM-3 (Pe) антител (BD PharMingen, США; Biolegend, США). В качестве негативного контроля использовали изотипические антитела, конъюгированные с аналогичными флуорохромами. Процент позитивных клеток, экспрессирующих соответствующие CD-маркеры, рассчитывали на 10000 клеток в регионе больших гранулярных лимфоцитов. Уровень экспрессии маркеров выражали в интенсивности флуоресценции моноклональных антител, связавшихся с соответствующим антигеном (MFI).

### Оценка аллостимуляторной и Th1/Th2-поляризирующей активности дендритных клеток

Аллостимуляторную активность ДК оценивали в смешанной культуре лейкоцитов с предварительно окрашенными витальным красителем Violet Proliferation Dye 450 (VPD450; BD Horizon™, США) аллогенными МНК доноров в соотношении ДК:МНК=1:10 в среде RPMI-1640 в присутствии 10% аутологичной (для МНК доноров) плазмы крови при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 5 суток. Через

5 суток клетки окрашивали APC-меченными анти-CD3-, PerCP-меченными анти-CD4- и анти-CD8-антителами (BD PharMingen, США).

Анализ пролиферативного ответа МНК проводили методом проточной цитометрии в гейтах CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитов по уменьшению интенсивности флуоресценции красителя VPD450. Результат выражали в виде процентного содержания делящихся клеток к общему количеству клеток в исследуемой области. Для оценки Th1/Th2-поляризующей активности ДК в популяции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> оценивали количество IFN $\gamma$ - и IL4-позитивных клеток, предварительно окрашенных анти-IFN $\gamma$ -FITC/IL4-Рe моноклональными антителами (BD FastImmune™, США) согласно стандартной методике с помощью коммерческого набора растворов для фиксации/пермеабиллизации TrueNuclear™ Transcription Factor Buffer Set (BioLegend, США).

### **Статистический анализ**

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica v.6.0 и GraphPad Prism v.8.0 Software, США. Данные представлены в виде медианы (Me) и значений интерквартильного диапазона (IQR; LQ – UQ). Для выявления значимых различий использовали непараметрический критерий знаков для парных выборок. Различия считали статистически значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

### **Результаты**

Согласно полученным нами данным, интактные ИФН-ДК доноров, как и их моноцитарные предшественники, имели высокую экспрессию мембранной формы TIM-3 (Рис.1). Более 70% клеток были позитивны в популяциях CD14<sup>+</sup> моноцитов и ИФН-ДК.

Как известно, незрелый статус ДК ассоциируется с высокой экспрессией моноцитарного маркера CD14 и низкой экспрессией маркера зрелости CD83. Добавление Gal-9 в культуры ИФН-ДК приводило к частичному снижению доли незрелых ДК с фенотипом CD14<sup>+</sup>CD83<sup>-</sup> ( $p_w = 0,017$ ; Рис. 2А). Количество CD83-позитивных ДК в присутствии Gal-9 возрастало почти 2 раза в сравнении с интактными ИФН-ДК ( $p_w = 0,028$ ; Рис. 2Б). Выявленные изменения фенотипа ДК свидетельствуют о стимулирующем влиянии Gal-9 на созревание ИФН-ДК. Аналогичные изменения наблюдались и для показателей уровня экспрессии маркеров CD14 и CD83 (MFI) (данные не представлены).

Относительное количество ИФН-ДК, экспрессирующих молекулы МНС II класса HLA-DR, было стабильно высоким (почти 100% клеток) в интактных и Gal-9-стимулированных культурах (Рис. 2В). При этом добавление Gal-9 усиливало уровень экспрессии HLA-DR (MFI) на ИФН-ДК ( $p_w = 0,08$ ). Для индукции Т-клеточного ответа важной составляющей являются ко-стимуляторные молекулы, в том числе маркер CD86, экспрессия которого возрастает при созревании ДК. Согласно полученным нами данным, уровень экспрессии CD86 (MFI) значимо повышался на ИФН-ДК в присутствии Gal-9 по сравнению с интактными ДК ( $p_w = 0,01$ ; Рис. 2Г).

На следующем этапе мы исследовали функциональную активность ИФН-ДК в условиях воздействия Gal-9. Одна из ключевых функций ДК в иммунном ответе заключается в их способности презентировать антигены и активировать Т-клетки. Интактные и Gal-9-обработанные ИФН-ДК характеризовались схожей способностью индуцировать пролиферативный ответ CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на аллоантигены (Рис. 3А-Б). В то же время Gal-9-обработанные ИФН-ДК оказывали более выраженный стимулирующий эффект на генерацию IFN $\gamma$ -позитивных CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов по сравнению с аналогичным показателем интактных ИФН-ДК ( $p_w = 0,046$ ; Рис. 3В), несмотря на схожую аллостимуляторную активность. Оба типа ИФН-ДК демонстрировали способность индуцировать IL-4-продуцирующие CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты (Рис. 3Г), однако значимых различий в Th2-поляризующей активности интактных и Gal-9-обработанных ДК выявлено не было.

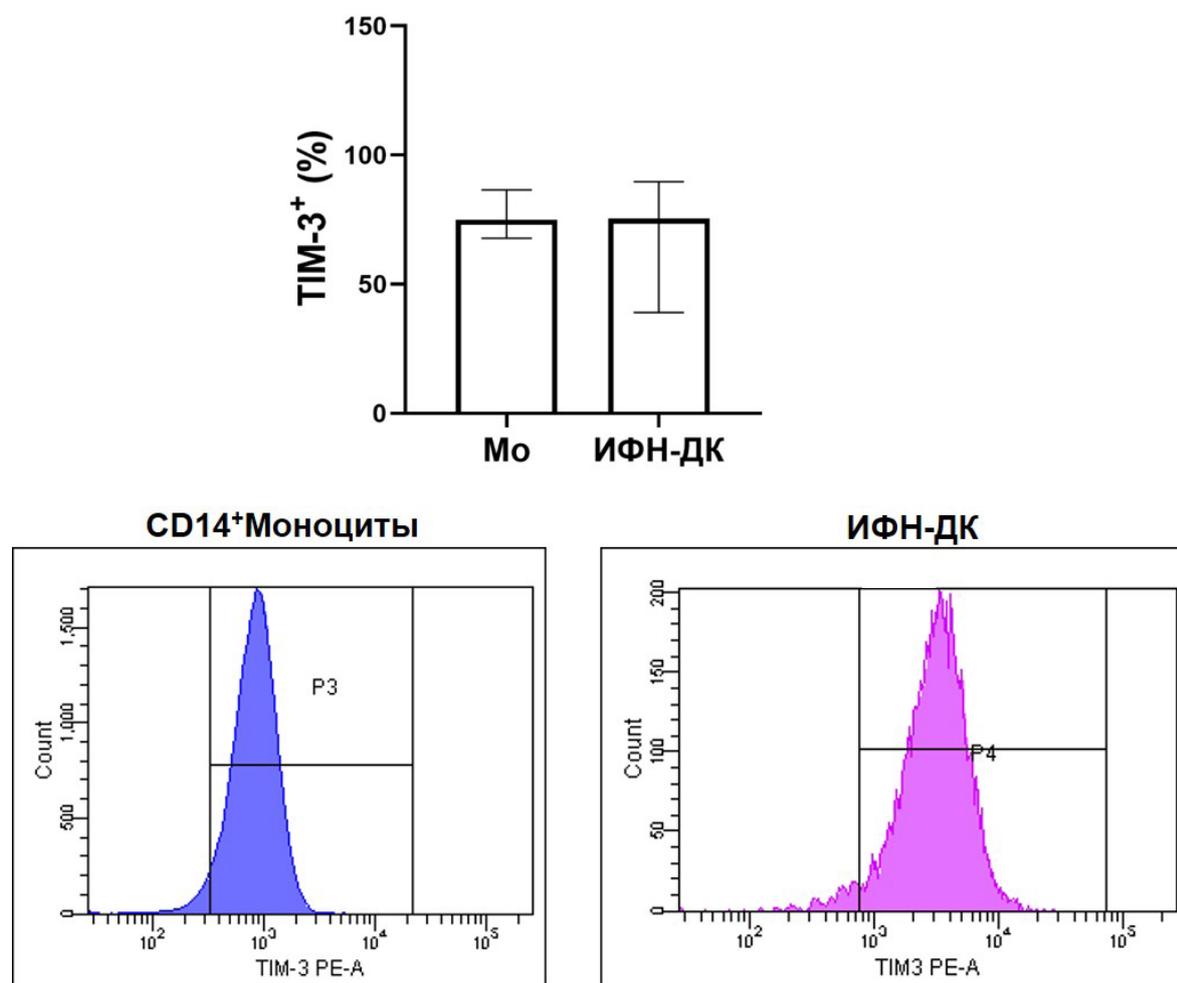


Рисунок 1. Экспрессия TIM-3 на моноцитах и дендритных клетках, генерированных из моноцитов в присутствии IFN $\alpha$

Примечание: на верхнем графике в виде медианных и диапазона 25-75% значений (Me; IQR) представлены данные об относительном количестве TIM-3-экспрессирующих CD14<sup>+</sup> моноцитов (Mo, n=7) и ДК, генерированные в культуре *in vitro* из моноцитов в присутствии IFN $\alpha$  (ИФН-ДК, n=12), нижние графики демонстрируют репрезентативные гистограммы экспрессии TIM-3 на моноцитах (левая гистограмма) и ИФН-ДК (правая гистограмма)

Figure 1. TIM-3 expression on monocytes and IFN $\alpha$ -induced monocyte-derived DCs

Note: the upper graph shows the frequency of TIM-3-expressing CD14<sup>+</sup> monocytes (Mo; n=7) and DCs generated *in vitro* from monocytes in the presence of IFN $\alpha$  (IFN-DCs; n=12) as median and 25-75% range (Me; IQR); the lower graphs show representative histograms of TIM-3 expression on monocytes (left histogram) and IFN-DCs (right histogram)

## Обсуждение

Проведенное нами исследование показало, что ДК, генерированные из моноцитов в культуре *in vitro* в присутствии IFN $\alpha$ , так же, как и сами CD14<sup>+</sup> моноциты, на высоком уровне экспрессируют ингибиторный чекпойнт рецептор TIM-3. При этом Gal-9, лиганд TIM-3, оказывает стимулирующее действие на созревание ИФН-ДК, снижая экспрессию CD14 и повышая экспрессию CD83 и CD86 молекул. Обнаруженные фенотипические изменения ассоциируются с высокой аллостимуляторной активностью ИФН-ДК, а также более выраженной способностью Gal-9-обработанных ДК индуцировать генерацию IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов по сравнению с интактными ИФН-ДК.

На сегодняшний день экспрессия рецептора TIM-3 описана на различных типах клеток иммунной системы, однако наиболее изучена функция этого рецептора для Т-клеток. Многочисленные исследования, проведенные *in vitro* и *in vivo*, позволяют отнести TIM-3 к ингибиторному рецептору, который опосредует дисрегуляцию Th1 иммунного ответа [14].

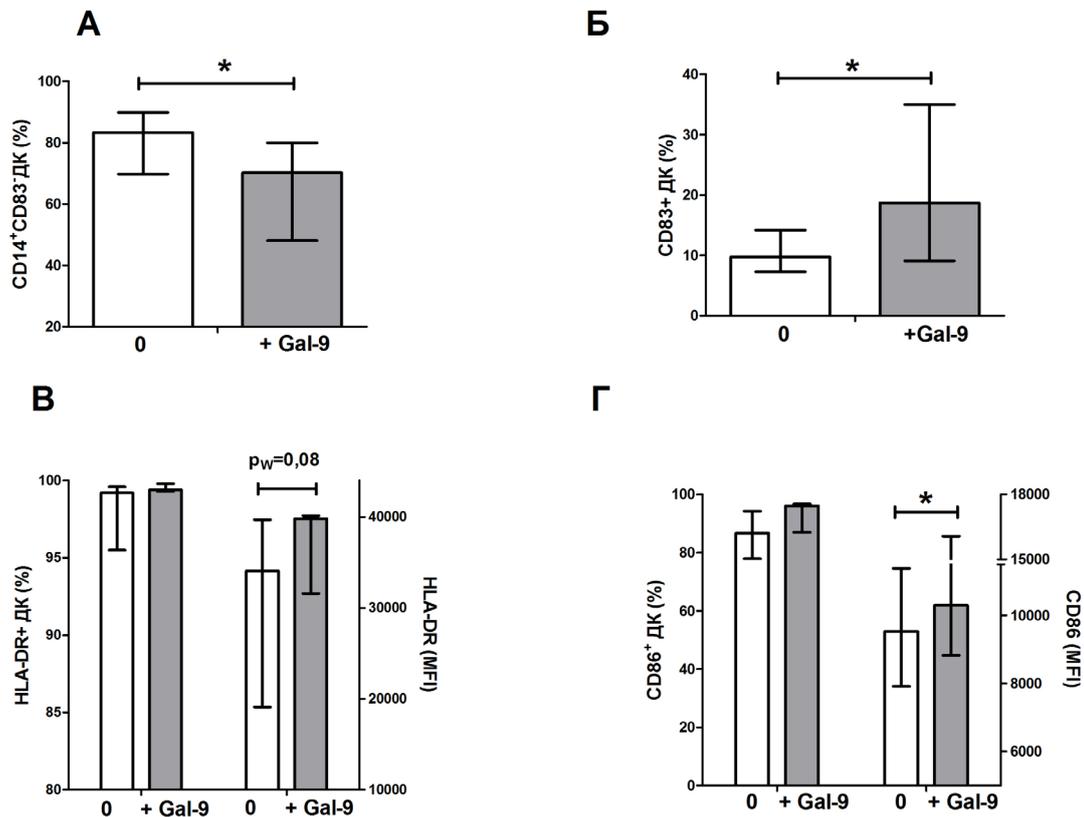


Рисунок 2. Влияние галектина-9 на экспрессию маркеров зрелости в культурах ИФН-ДК

Примечание. В виде медианных и диапазона 25-75% значений (Me; IQR) представлены данные об относительном количестве CD14<sup>+</sup>CD83<sup>-</sup> ИФН-ДК (А), CD83<sup>+</sup> ИФН-ДК (Б), об относительном количестве (левая ось, %) и уровне экспрессии (правая ось, MFI) HLA-DR (В) и CD86 (Г) на интактных ИФН-ДК (0) и в ответ на добавление галектина-9 (+Gal-9; 10 мкг/мл). n=12; \* – значимость различий p<sub>w</sub><0,05

Figure 2. Effect of Galectin-9 on the expression of maturity markers in IFN-DCs

Note. The data are presented as median and 25-75% range (Me; IQR) of the relative number of CD14<sup>+</sup>CD83<sup>-</sup> IFN-DCs (A), CD83<sup>+</sup> IFN-DCs (B), the relative number (left axis, %) and the expression level (right axis, MFI) of HLA-DR (C) and CD86 (D) on intact IFN-DCs (0) and after treatment of galectin-9 (+Gal-9; 10 µg/ml). n=12; \* – significance of differences p<sub>w</sub><0.05

Роль TIM-3 с точки зрения его функциональной значимости для ДК остается до конца неясной. С одной стороны, в опухолевом микроокружении присутствуют TIM-3-экспрессирующие ДК [15], а блокирование TIM-3 в ДК в экспериментальных моделях приводит к усилению противоопухолевого иммунного ответа и восстановлению эффекторных CD8<sup>+</sup> Т-клеток и Т-клеток со свойствами стволовых клеток [16]. В этом аспекте можно предположить, что TIM-3 опосредует иммунорегуляторные свойства ДК. Кроме того, исследование M. Nakayama et al. (2009) демонстрирует, что TIM-3 может выступать в качестве рецептора для апоптотических клеток и участвовать тем самым в поддержании периферической толерантности [11]. С другой стороны, есть данные о том, что деплеция TIM-3 в ДК мышей сопровождается снижением LPS-индуцированной продукции TNF [17], что свидетельствует о возможном синергизме между TLR-опосредованным сигналом и TIM-3 с точки зрения продукции провоспалительных цитокинов.

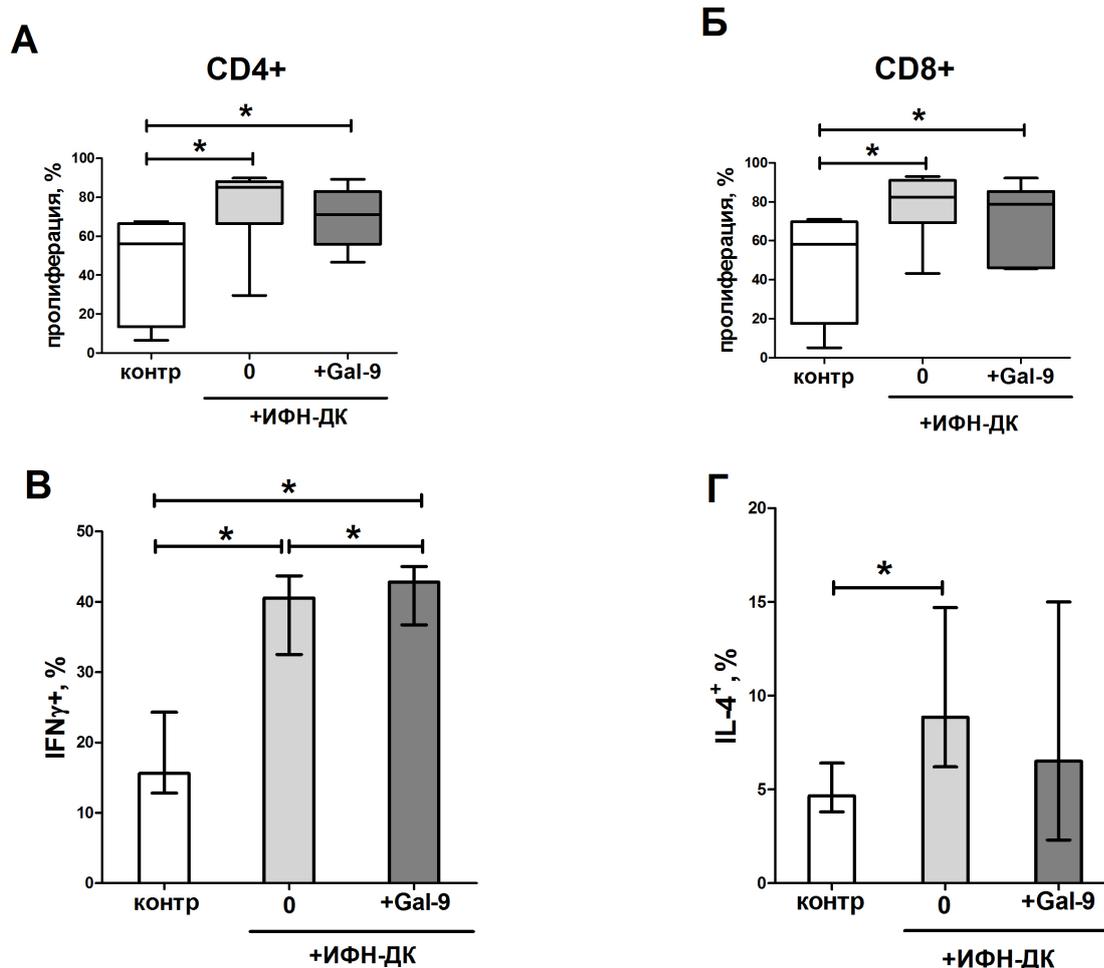


Рисунок 3. Влияние галектина-9 на функциональную активность ИФН-ДК

Примечание. В виде медианных и диапазона 25-75% значений (Me; IQR) представлены данные: А-Б) пролиферативного ответа аллогенных CD4<sup>+</sup> (А) и CD8<sup>+</sup> (Б) Т-лимфоцитов, культивируемых в отсутствие ДК (контр) и в присутствии интактных (0) и Gal-9-обработанных ИФН-ДК (+Gal-9; 10 мкг/мл); В-Г) уровне IFN $\gamma$ - (В) и IL-4-продуцирующих (Г) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, культивируемых в отсутствие ДК (контр) и в присутствии интактных (0) и Gal-9-обработанных ИФН-ДК (+Gal-9; 10 мкг/мл). n=8; \* – значимость различий pW<0,05

Figure 3. Effect of Galectin-9 on the functional activity of IFN-DCs

Note. The data are presented as median and 25-75% range (Me; IQR) of: A-B) the proliferative response of allogeneic CD4<sup>+</sup> (A) and CD8<sup>+</sup> (B) T lymphocytes cultured in the absence of DCs (contr) and in the presence of intact (0) and Gal-9-treated IFN-DCs (+Gal-9; 10  $\mu$ g/ml); C-D) the level of IFN $\gamma$ - (C) and IL-4-producing (D) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T lymphocytes cultured in the absence of DCs (contr) and in the presence of intact (0) and Gal-9-treated IFN-DCs (+Gal-9; 10  $\mu$ g/ml). n=8; \* – significance of differences pW<0,05

Одним из важных лигандов к TIM-3 является Gal-9, который продуцируется стромальными клетками и клетками иммунной системы, а при различных патологических состояниях (злокачественные опухоли, вирусная инфекция, аутоиммунные заболевания) его содержание в сыворотке пациентов повышается [1, 18, 19]. Поскольку ИФН-ДК на высоком уровне экспрессируют TIM-3, то они могут быть мишенями для Gal-9. Согласно полученным нами данным, Gal-9 способствовал частичному созреванию ИФН-ДК, что проявлялось в снижении количества клеток, экспрессирующих моноцитарный маркер CD14, и повышении количества более зрелых CD83<sup>+</sup> ИФН-ДК. Кроме того, Gal-9 стимулировал экспрессию CD86 и на уровне тренда – HLA-DR, что имеет важное значение с точки зрения индукции Т-клеточного ответа. Похожие результаты были получены S.-Y. Dai et al. (2005), которые продемонстрировали стимулирующее влияние Gal-9 на ДК, генерированные из моноцитов в присутствии IL-4 (ИЛ-4-ДК) [20]. При этом данный эффект Gal-9 был TLR4-независимым, но ре-

ализовывался через механизм фосфорилирования p38 MAPK и связанного с ним сигнального пути. В то же время, несмотря на высокую экспрессию TIM-3 на самих моноцитарных предшественниках, Gal-9 не влияет на процесс дифференцировки моноцитов в ДК [20].

Согласно полученным нами данным, ИФН-ДК в присутствии Gal-9 стимулировали пролиферативный ответ аллогенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток. При этом Gal-9-обработанные ИФН-ДК характеризовались более выраженной способностью индуцировать IFN $\gamma$ -продуцирующие CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-клетки по сравнению с интактными культурами ИФН-ДК. Аналогичные результаты были получены и для ИЛ-4-ДК [20].

С точки зрения Т-клеточной функции известно, что Gal-9/TIM-3-опосредованное взаимодействие ингибирует экспансию Th1- и Th17-клеток, индуцирует апоптоз Т-клеток, а также стимулирует иммуносупрессорные свойства регуляторных Т-клеток [2, 3]. Сравнивая эффект Gal-9 на Т-клетки и ДК, можно предположить, что TIM-3 может выполнять различные функции в клетках врожденного и приобретенного иммунитета, а стимуляция TIM-3 запускает разные сигнальные пути в этих клетках. С другой стороны, оппозитный эффект Gal-9 на свойства ДК продемонстрирован в работе L. Li et al. (2023). Согласно данным авторов, Gal-9 усиливает IL-10-секретирующую активность мДК, а также стимулирует способность мДК индуцировать генерацию IL-10-продуцирующих регуляторных Т-клеток 1 типа (Tr1) [21], однако этот эффект Gal-9 является CD22-зависимым, а не опосредуется через TIM-3.

### Заключение

Таким образом, фенотипически ИФН-ДК в присутствии Gal-9 переключаются в сторону более зрелых ДК, способных активировать пролиферативных ответ CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и индуцировать генерацию IFN $\gamma$ -продуцирующих CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Поскольку Gal-9 выполняет роль негативного медиатора с точки зрения Т-клеток, можно предположить, что Gal-9/TIM-3-сигнальный путь играет сложную роль в регуляции как врожденного, так и адаптивного иммунитета. В этом аспекте дальнейшие исследования Gal-9/TIM-3-взаимоотношений в дендритных клетках моноцитарного происхождения позволят не только более детально изучить биологическую значимость ингибиторных рецепторов на ДК с точки зрения иммунного ответа, но также определить перспективы использования агонистов или антагонистов указанных молекул с целью направленной регуляции дендритных клеток при иммунотерапии различных патологических состояний.

### Благодарности

Исследование выполнено в рамках гранта РФФИ № 23-25-00354 (<https://rscf.ru/project/23-25-00354/>).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Lv Y., Ma X., Ma Y., Du Y., Feng J. A new emerging target in cancer immunotherapy: Galectin-9 (LGALS9). *Genes Dis.* 2023; 10(6): 2366–2382. doi:10.1016/J.GENDIS.2022.05.020.
2. Zhu C., Anderson A.C., Schubart A., Xiong H., Imitola J., Khoury S.J., Zheng X.X., Strom T.B., Kuchroo V.K. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* 2005; 6(12):1245–1252. doi:10.1038/ni1271.
3. Seki M., Oomizu S., Sakata K. mei, Sakata A., Arikawa T., Watanabe K., Ito K., Takeshita K., Niki T., Saita N., Nishi N., Yamauchi A., Katoh S., Matsukawa A., Kuchroo V., Hirashima M. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin. Immunol.* 2008; 127(1):78–88. doi:10.1016/J.CLIM.2008.01.006.
4. Gonçalves Silva I., Yasinska I.M., Sakhnevych S.S., Fiedler W., Wellbrock J., Bardelli M., Varani L., Hussain R., Siligardi G., Ceccone G., Berger S.M., Ushkaryov Y.A., Gibbs B.F., Fasler-Kan E., Sumbayev V.V. The Tim-3-galectin-9 Secretory Pathway is Involved in the Immune Escape of Human Acute Myeloid Leukemia Cells. *EBioMedicine.* 2017; 22:44–57. doi:10.1016/J.EBIOM.2017.07.018.
5. Nakajima R., Miyagaki T., Kamijo H., Oka T., Shishido-Takahashi N., Suga H., Sugaya M., Sato S. Possible therapeutic applicability of galectin-9 in cutaneous T-cell lymphoma. *J. Dermatol. Sci.* 2019; 96(3):134–142. doi:10.1016/J.JDERMSCI.2019.09.004.
6. Liu Z., Han H., He X., Li S., Wu C., Yu C., Wang S. Expression of the galectin-9-Tim-3 pathway in glioma tissues is associated with the clinical manifestations of glioma. *Oncol. Lett.* 2016; 11(3):1829.

doi:10.3892/OL.2016.4142.

7. Fujita K., Iwama H., Sakamoto T., Okura R., Kobayashi K., Takano J., Katsura A., Tatsuta M., Maeda E., Mimura S., Nomura T., Tani J., Miyoshi H., Morishita A., Yoneyama H., Yamana Y., Himoto T., Okano K., Suzuki Y., Niki T., Hirashima M., Masaki T. Galectin-9 suppresses the growth of hepatocellular carcinoma via apoptosis in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.* 2015; 46(6):2419–2430. doi:10.3892/IJO.2015.2941.

8. Cai L., Li Y., Tan J., Xu L., Li Y. Targeting LAG-3, TIM-3, and TIGIT for cancer immunotherapy. *J. Hematol. Oncol.* 2023; 16(1):1–34. doi:10.1186/S13045-023-01499-1.

9. Golden-Mason L., Palmer B.E., Kassam N., Townshend-Bulson L., Livingston S., McMahon B.J., Castelblanco N., Kuchroo V., Gretch D.R., Rosen H.R. Negative Immune Regulator Tim-3 Is Overexpressed on T Cells in Hepatitis C Virus Infection and Its Blockade Rescues Dysfunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells. *J. Virol.* 2009; 83(18):9122. doi:10.1128/JVI.00639-09.

10. Monney L., Sabatos C.A., Gaglia J.L., Ryu A., Waldner H., Chernova T., Manning S., Greenfield E.A., Coyle A.J., Sobel R.A., Freeman G.J., Kuchroo V.K. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature.* 2002; 415(6871):536–541. doi:10.1038/415536A.

11. Nakayama M., Akiba H., Takeda K., Kojima Y., Hashiguchi M., Azuma M., Yagita H., Okumura K. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood.* 2009; 113(16):3821–3830. doi:10.1182/BLOOD-2008-10-185884.

12. Hirashima M., Kashio Y., Nishi N., Yamauchi A., Imaizumi T.A., Kageshita T., Saita N., Nakamura T. Galectin-9 in physiological and pathological conditions. *Glycoconj J.* 2002; 19(7–9):593–600. doi:10.1023/B:GLYC.0000014090.63206.2F.

13. Imaizumi T., Yoshida H., Nishi N., Sashinami H., Nakamura T., Hirashima M., Ohyama C., Itoh K., Satoh K. Double-stranded RNA induces galectin-9 in vascular endothelial cells: involvement of TLR3, PI3K, and IRF3 pathway. *Glycobiology.* 2007; 17(7):12C-15C. doi:10.1093/GLYCOB/CWM045.

14. Rodriguez-Manzanet R., Dekruyff R., Kuchroo V.K., Umetsu D.T. The costimulatory role of TIM molecules. *Immunol. Rev.* 2009; 229(1):259. doi:10.1111/J.1600-065X.2009.00772.X.

15. Sakuma M., Katagata M., Okayama H., Nakajima S., Saito K., Sato T., Fukai S., Tsumuraya H., Onozawa H., Sakamoto W., Saito M., Saze Z., Momma T., Mimura K., Kono K. TIM-3 Expression on Dendritic Cells in Colorectal Cancer. *Cancers.* 2024; 16(10):1888. doi:10.3390/CANCERS16101888/S1.

16. Dixon K.O., Tabaka M., Schramm M.A., Xiao S., Tang R., Dionne D., Anderson A.C., Rozenblatt-Rosen O., Regev A., Kuchroo V.K. TIM-3 restrains anti-tumour immunity by regulating inflammasome activation. *Nat.* 2021; 595(7865):101–106. doi:10.1038/s41586-021-03626-9.

17. Anderson A.C., Anderson D.E., Bregoli L., Hastings W.D., Kassam N., Lei C., Chandwaskar R., Karman J., Su E.W., Hirashima M., Bruce J.N., Kane L.P., Kuchroo V.K., Hafler D.A. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science.* 2007; 318(5853):1141–1143. doi:10.1126/SCIENCE.1148536/SUPPL\_FILE/ANDERSON.SOM.PDF.

18. Matsuoka N., Fujita Y., Temmoku J., Furuya M.Y., Asano T., Sato S., Matsumoto H., Kobayashi H., Watanabe H., Suzuki E., Kozuru H., Yastuhashi H., Migita K. Galectin-9 as a biomarker for disease activity in systemic lupus erythematosus. *PLoS One.* 2020; 15(1). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0227069.

19. Merani S., Chen W., Elahi S. The bitter side of sweet: the role of Galectin-9 in immunopathogenesis of viral infections. *Rev. Med. Virol.* 2015; 25(3):175–186. doi:10.1002/RMV.1832.

20. Dai S.-Y., Nakagawa R., Itoh A., Murakami H., Kashio Y., Abe H., Katoh S., Kontani K., Kihara M., Zhang S.L., Hata T., Nakamura T., Yamauchi A., Hirashima M. Galectin-9 Induces Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J. Immunol.* 2005; 175(5):2974–2981. doi:10.4049/JIMMUNOL.175.5.2974.

21. Li L., Xu X., Wang X., Zhang S., Yao W., Liu J., Liu Z., Yang P. Galectin-9 in synergy with NF- $\kappa$ B inhibition restores immune regulatory capability in dendritic cells of subjects with food allergy. *Clin. Exp. Immunol.* 2023; 213(2):155. doi:10.1093/CEI/UXAD062.

**Авторы**

Тыринова Тамара Викторовна

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

Д. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии

Новосибирск, Российская Федерация

tyriova@bk.ru

Леплина Ольга Юрьевна

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

Д. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии

Новосибирск, Российская Федерация

oleplina@mail.ru

Тихонова Марина Александровна

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

К. б. н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии

Новосибирск, Российская Федерация

matrix-59@mail.ru

Шифон Софья Андреевна

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (Новосибирский государственный университет, НГУ)

Студент Института медицины и психологии В.Зельмана

Новосибирск, Российская Федерация

s.shsherbakova@g.nsu.ru

Черных Елена Рэмовна

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

Д. м. н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клеточной иммунотерапии

Новосибирск, Российская Федерация

ct\_lab@mail.ru

*T.V. Tyrinova<sup>1,2</sup>, O.Yu. Leplina<sup>1</sup>, M.A. Tikhonova<sup>1</sup>,  
S.A. Schifon<sup>2</sup>, E.R. Chernykh<sup>1</sup>*

## **GALECTIN-9 STIMULATES MATURATION AND TH1-POLARIZING ACTIVITY OF IFN $\alpha$ -INDUCED DENDRITIC CELLS**

<sup>1</sup>FSBSI «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology»,  
Novosibirsk, Russian Federation

<sup>2</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** Galectin-9 (Gal-9) inhibits the T-cell immune response via ligation with the inhibitory checkpoint receptor TIM-3. Recent studies have demonstrated the expression of TIM-3 on myeloid cells, including dendritic cells (DCs). Therefore, DCs may also be targets for Gal-9's regulatory effect. The current study aimed to investigate the effect of Gal-9 on monocyte-derived DCs generated in the presence of IFN $\alpha$  (IFN-DCs). *Material and*

**methods.** DCs were generated by culturing the adherent fraction of healthy donor mononuclear cells in the presence of GM-CSF and IFN $\alpha$  for 4 days, followed by recombinant Gal-9 (10  $\mu$ g/ml) for 24 h. Phenotypic analysis was performed by flow cytometry using fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies. The allostimulatory and Th1/Th2-polarizing activity of IFN-DCs was assessed in a mixed culture of leukocytes with allogeneic mononuclear cells. **Results.** IFN-DCs, as well as monocytic precursors expressed the inhibitory checkpoint receptor TIM-3 at a high level. When Gal-9 was added to IFN-DC cultures, the number of immature CD14<sup>+</sup>CD83<sup>-</sup> cells decreased ( $p_w=0.017$ ), the number of mature CD83<sup>+</sup> DCs increased ( $p_w=0.028$ ), and the level of the costimulatory molecule CD86 increased ( $p_w=0.01$ ). In the presence of Gal-9, IFN-DCs had allostimulatory activity towards CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and were characterized by a significantly higher ability to induce IFN $\gamma$ -producing CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. **Conclusions.** The obtained data indicate that Gal-9 stimulates the maturation of IFN-DCs and their functional activity.

**Keywords:** dendritic cells, interferon  $\alpha$ , TIM-3, galectin-9, allostimulatory activity

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Tamara V. Tyrinova

tyrinova@bk.ru

Received: 01.09.2024

For citation: Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Schifon S.A., Chernykh E.R. Galectin-9 stimulates maturation and Th1-polarizing activity of IFN $\alpha$ -induced dendritic cells. [Online] Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2024, Vol. 21, no. 4, pp. 467–478. DOI: 10.22138/2500-0918-2024-21-4-467-478 (In Russ)

#### REFERENCES

1. Lv Y., Ma X., Ma Y., Du Y., Feng J. A new emerging target in cancer immunotherapy: Galectin-9 (LGALS9). *Genes Dis.* 2023; 10(6): 2366–2382. doi:10.1016/J.GENDIS.2022.05.020.
2. Zhu C., Anderson A.C., Schubart A., Xiong H., Imitola J., Khoury S.J., Zheng X.X., Strom T.B., Kuchroo V.K. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* 2005; 6(12):1245–1252. doi:10.1038/ni1271.
3. Seki M., Oomizu S., Sakata K. mei, Sakata A., Arikawa T., Watanabe K., Ito K., Takeshita K., Niki T., Saita N., Nishi N., Yamauchi A., Katoh S., Matsukawa A., Kuchroo V., Hirashima M. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin. Immunol.* 2008; 127(1):78–88. doi:10.1016/J.CLIM.2008.01.006.
4. Gonçalves Silva I., Yasinska I.M., Sakhnevych S.S., Fiedler W., Wellbrock J., Bardelli M., Varani L., Hussain R., Siligardi G., Ceccone G., Berger S.M., Ushkaryov Y.A., Gibbs B.F., Fasler-Kan E., Sumbayev V.V. The Tim-3-galectin-9 Secretory Pathway is Involved in the Immune Escape of Human Acute Myeloid Leukemia Cells. *EBioMedicine.* 2017; 22:44–57. doi:10.1016/J.EBIOM.2017.07.018.
5. Nakajima R., Miyagaki T., Kamijo H., Oka T., Shishido-Takahashi N., Suga H., Sugaya M., Sato S. Possible therapeutic applicability of galectin-9 in cutaneous T-cell lymphoma. *J. Dermatol. Sci.* 2019; 96(3):134–142. doi:10.1016/J.JDERMSCI.2019.09.004.
6. Liu Z., Han H., He X., Li S., Wu C., Yu C., Wang S. Expression of the galectin-9-Tim-3 pathway in glioma tissues is associated with the clinical manifestations of glioma. *Oncol. Lett.* 2016; 11(3):1829. doi:10.3892/OL.2016.4142.
7. Fujita K., Iwama H., Sakamoto T., Okura R., Kobayashi K., Takano J., Katsura A., Tatsuta M., Maeda E., Mimura S., Nomura T., Tani J., Miyoshi H., Morishita A., Yoneyama H., Yamana Y., Himoto T., Okano K., Suzuki Y., Niki T., Hirashima M., Masaki T. Galectin-9 suppresses the growth of hepatocellular carcinoma via apoptosis in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.* 2015; 46(6):2419–2430. doi:10.3892/IJO.2015.2941.
8. Cai L., Li Y., Tan J., Xu L., Li Y. Targeting LAG-3, TIM-3, and TIGIT for cancer immunotherapy. *J. Hematol. Oncol.* 2023; 16(1):1–34. doi:10.1186/S13045-023-01499-1.
9. Golden-Mason L., Palmer B.E., Kassam N., Townshend-Bulson L., Livingston S., McMahon B.J., Castelblanco N., Kuchroo V., Gretch D.R., Rosen H.R. Negative Immune Regulator Tim-3 Is Overexpressed on T Cells in Hepatitis C Virus Infection and Its Blockade Rescues Dysfunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells.

J. Virol. 2009; 83(18):9122. doi:10.1128/JVI.00639-09.

10. Monney L., Sabatos C.A., Gaglia J.L., Ryu A., Waldner H., Chernova T., Manning S., Greenfield E.A., Coyle A.J., Sobel R.A., Freeman G.J., Kuchroo V.K. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*. 2002; 415(6871):536–541. doi:10.1038/415536A.

11. Nakayama M., Akiba H., Takeda K., Kojima Y., Hashiguchi M., Azuma M., Yagita H., Okumura K. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood*. 2009; 113(16):3821–3830. doi:10.1182/BLOOD-2008-10-185884.

12. Hirashima M., Kashio Y., Nishi N., Yamauchi A., Imaizumi T.A., Kageshita T., Saita N., Nakamura T. Galectin-9 in physiological and pathological conditions. *Glycoconj J*. 2002; 19(7–9):593–600. doi:10.1023/B:GLYC.0000014090.63206.2F.

13. Imaizumi T., Yoshida H., Nishi N., Sashinami H., Nakamura T., Hirashima M., Ohyama C., Itoh K., Satoh K. Double-stranded RNA induces galectin-9 in vascular endothelial cells: involvement of TLR3, PI3K, and IRF3 pathway. *Glycobiology*. 2007; 17(7):12C-15C. doi:10.1093/GLYCOB/CWM045.

14. Rodriguez-Manzanet R., Dekruyff R., Kuchroo V.K., Umetsu D.T. The costimulatory role of TIM molecules. *Immunol. Rev.* 2009; 229(1):259. doi:10.1111/J.1600-065X.2009.00772.X.

15. Sakuma M., Katagata M., Okayama H., Nakajima S., Saito K., Sato T., Fukai S., Tsumuraya H., Onozawa H., Sakamoto W., Saito M., Saze Z., Momma T., Mimura K., Kono K. TIM-3 Expression on Dendritic Cells in Colorectal Cancer. *Cancers*. 2024; 16(10):1888. doi:10.3390/CANCERS16101888/S1.

16. Dixon K.O., Tabaka M., Schramm M.A., Xiao S., Tang R., Dionne D., Anderson A.C., Rozenblatt-Rosen O., Regev A., Kuchroo V.K. TIM-3 restrains anti-tumour immunity by regulating inflammasome activation. *Nat*. 2021; 595(7865):101–106. doi:10.1038/s41586-021-03626-9.

17. Anderson A.C., Anderson D.E., Bregoli L., Hastings W.D., Kassam N., Lei C., Chandwaskar R., Karman J., Su E.W., Hirashima M., Bruce J.N., Kane L.P., Kuchroo V.K., Hafler D.A. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science*. 2007; 318(5853):1141–1143. doi:10.1126/SCIENCE.1148536/SUPPL\_FILE/ANDERSON.SOM.PDF.

18. Matsuoka N., Fujita Y., Temmoku J., Furuya M.Y., Asano T., Sato S., Matsumoto H., Kobayashi H., Watanabe H., Suzuki E., Kozuru H., Yastuhashi H., Migita K. Galectin-9 as a biomarker for disease activity in systemic lupus erythematosus. *PLoS One*. 2020; 15(1). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0227069.

19. Merani S., Chen W., Elahi S. The bitter side of sweet: the role of Galectin-9 in immunopathogenesis of viral infections. *Rev. Med. Virol.* 2015; 25(3):175–186. doi:10.1002/RMV.1832.

20. Dai S.-Y., Nakagawa R., Itoh A., Murakami H., Kashio Y., Abe H., Katoh S., Kontani K., Kihara M., Zhang S.L., Hata T., Nakamura T., Yamauchi A., Hirashima M. Galectin-9 Induces Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J. Immunol.* 2005; 175(5):2974–2981. doi:10.4049/JIMMUNOL.175.5.2974.

21. Li L., Xu X., Wang X., Zhang S., Yao W., Liu J., Liu Z., Yang P. Galectin-9 in synergy with NF- $\kappa$ B inhibition restores immune regulatory capability in dendritic cells of subjects with food allergy. *Clin. Exp. Immunol.* 2023; 213(2):155. doi:10.1093/CEI/UXAD062.

## **Auhtors**

Tamara V. Tyrinova  
Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology» (RIFCI)  
DB, leader researcher of the Laboratory of cellular immunotherapy  
Novosibirsk, Russian Federation  
tyriova@bk.ru

Olga Yu. Leplina  
Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology» (RIFCI)  
DM, leader researcher of the Laboratory of cellular immunotherapy  
Novosibirsk, Russian Federation  
oleplina@mail.ru

Marina A. Tikhonova  
Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology» (RIFCI)  
PhD, senior researcher of the Laboratory of cellular immunotherapy  
Novosibirsk, Russian Federation  
matrix-59@mail.ru

Sofia A. Schifon  
Novosibirsk State University  
Student of Institute of Medicine and Psychology V.Zelman  
Novosibirsk, Russian Federation  
s.shsherbakova@g.nsu.ru

Elena R. Chernykh  
Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology» (RIFCI)  
DM, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, head of laboratory of cellular immunotherapy  
Novosibirsk, Russian Federation  
ct\_lab@mail.ru