

УДК 577.15

## ГРАНЗИМЫ И МИТОХОНДРИИ

### Обзор

© 2020 Д.Б. Киселевский

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: dkiselevs@mail.ru

Поступила в редакцию 01.10.2019

После доработки 01.11.2019

Принята к публикации 04.11.2019

Цитотоксические Т-лимфоциты и естественные киллеры избавляют организм от зараженных клеток путем включения в них программы гибели (апоптоза). Это может происходить в результате высвобождения содержимого литических гранул клеток-киллеров, в которых локализованы порообразующие белки перфорины и протеолитические ферменты гранзимы, и их последующего проникновения в клетки-мишени. Гранзим В способен инициировать зависимый от митохондрий путь апоптоза несколькими способами: через 1) проапоптотный белок Bid, 2) белки Mcl-1 и Bim или 3) белок p53. В результате из митохондрий в цитоплазму выходит цитохром c, и образуются апоптосомы, обеспечивающие протеолитический каскад активации каспаз. Гранзимы M, H и F вызывают гибель клеток, которая сопровождается выходом цитохрома c из митохондрий. Гранзим А индуцирует образование активных форм кислорода (АФК), которые способствуют транслокации ассоциированного с эндоплазматическим ретикулулом комплекса SET в ядро клетки. В клеточном ядре гранзим А расщепляет SET; это активирует нуклеазы, которые осуществляют одноцепочечные разрывы ДНК. Гранзимы А и В проникают в митохондрии и разрезают субъединицы комплекса I дыхательной цепи. Одна из субъединиц комплекса I является мишенью также и для каспазы-3. Гранзим-зависимое повреждение комплекса I приводит к образованию АФК и гибели клеток.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** активные формы кислорода, апоптоз, гранзимы, митохондрии, программируемая клеточная смерть.

DOI: 10.31857/S0320972520020013

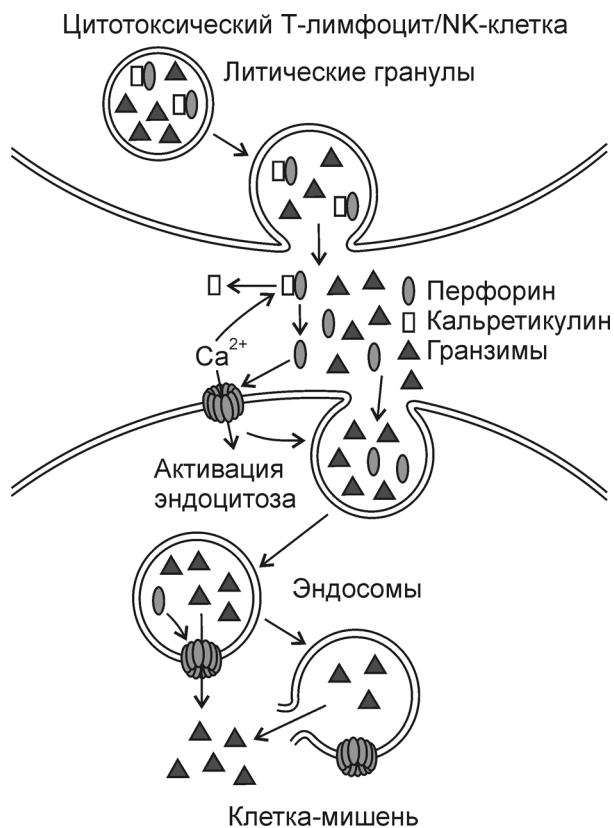
Если организм инфицирован, то основной способ его защиты – избавление от собственных зараженных клеток. Специализированные клетки иммунной системы – цитотоксические Т-лимфоциты и естественные киллеры (NK, natural killer) – осуществляют поиск и уничтожение клеток, содержащих чужеродные компоненты: инфицированных, мутировавших или раковых клеток. Ликвидация таких клеток осуществляется посредством включения в них программы гибели клеток (апоптоза) и может происходить двумя путями [1, 2].

Первый путь реализуется через взаимодействие лигандов и рецепторов суперсемейства фактора некроза опухоли (TNF, tumor necrosis factor), например, CD95L (FasL, Fas-лиганд), расположенного трансмембранно на клетках-

киллерах, и рецептора CD95 (Fas) на клетках-мишенях [3, 4]. В результате происходит активация каспаз, начиная с каспазы-8, и апоптоз [5]. При определенных условиях связывание лигандов с рецепторами может приводить не к апоптозу, а к некроптозу – одной из форм программируемого (регулируемого) некроза. Образуется рипоптосома – белковый комплекс (2 МДа), содержащий киназу RIPK1 (receptor-interacting protein kinase 1), адаптерный белок FADD (Fas-associated death domain), каспазу-8 и cFLIP (cellular FLICE-like inhibitory protein). Некроптоз реализуется в условиях подавления активности cIAPs (cellular inhibitors of apoptosis proteins), которые способствуют убиквитинированию и разрушению киназы RIPK1. Образование рипоптосомы регулируется разными изоформами белка cFLIP и обеспечивает последовательное фосфорилирование RIPK1, RIPK3 и белка MLKL (mixed lineage kinase-like protein), который олигомеризуется и образует каналы в плазматической мембране клеток [6–8].

Второй путь – это высвобождение содержимого литических гранул клеток-убийц (рис. 1).

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода;  $O_2^-$  – супероксидный анион-радикал; GAAD – ДНКазы, активируемая гранзимом А; FeS-кластеры – железо-серные кластеры; FMN – флавиномононуклеотид; NK – естественные киллеры;  $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$  – разность электрохимических потенциалов ионов водорода;  $\Delta\psi$  – трансмембранная разность электрических потенциалов.



**Рис. 1.** Путь доставки гранзимов из литических гранул цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток в цитоплазму клетки-мишени

Чтобы сконцентрировать содержимое литических гранул и обезопасить от него соседние клетки, между клеткой-киллером и клеткой-мишенью формируется иммунный синапс — микроскопическая межклеточная щель, ограниченная плазматическими мембранами взаимодействующих клеток, в которую высвобождаются компоненты литических гранул. Размеры иммунного синапса достигают нескольких микрон, а ширина щели между клетками — порядка десятков нанометров [9–11]. В гранулах содержится перфорин с мембраноатакующим комплексом, подобным С9-компоненту системы комплемента [12], создающий каналы в мембране диаметром в среднем ~16 нм [13, 14].

Другой компонент литических гранул — кальретикулин. В отсутствие Ca<sup>2+</sup> он связывает перфорин (рис. 1), а при увеличении концентрации Ca<sup>2+</sup> до 0,1 мМ и выше комплекс кальретикулин–перфорин диссоциирует. Предполагается, что кальретикулин препятствует образованию перфориновых пор в мембране литических гранул, предохраняя цитотоксические Т-лимфоциты и естественные киллеры от опасного содержимого гранул [15]. В жидкостях и тканях

животных общая концентрация кальция варьирует от 2,1 до 2,6 мМ, доля свободного ионизированного Ca<sup>2+</sup> снаружи клеток обычно составляет половину от этих значений, а внутри клеток его концентрация на ~5 порядков ниже [16].

С помощью перфориновых пор внутрь клеточ-мишени проникает еще один компонент гранул — гранзимы — сериновые протеазы, разрезающие внутриклеточные белки-субстраты. Проникновение гранзимов в клетку происходит не напрямую через перфориновые каналы в плазматической мембране. Длительное нарушение барьерной функции наружной мембраны клеток, вызванное перфорином, может приводить к гибели клеток по типу некроза, который сопровождается воспалением, тогда как гранзим-зависимая гибель клеток — это апоптоз, происходящий, как правило, без воспаления [17]. Перфориновые поры в плазматической мембране вызывают временный приток Ca<sup>2+</sup> в клетку-мишень (рис. 1), который длится несколько минут. Увеличение внутриклеточной концентрации Ca<sup>2+</sup> активирует механизм восстановления повреждений плазматической мембраны, включающий эндоцитоз для удаления поврежденных участков мембраны. Перфорин и гранзимы попадают в эндосомы. Гранзимы могут медленно выходить из эндосом через перфориновые поры в их мембране. Затем, примерно через 15 мин после воздействия на клетки перфорином и гранзимом, мембрана эндосом разрывается, и гранзимы высвобождаются в цитоплазму клетки-мишени (рис. 1) [18].

Название гранзимы (от словосочетания «гранулярные энзимы») было впервые предложено для двух обнаруженных протеаз — гранзимов А (35 кДа) и В (29 кДа) — в 1986 г. в работе Masson et al. [19]. В настоящее время идентифицированы 12 гранзимов (А, В, С, D, E, F, G, H, J, K, M и N), из них пять (А, В, H, K и M) найдены у человека [20–22]. В литических гранулах цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток ~90% массы приходится на долю гранзимов [23].

### ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ЦИТОХРОМА С ИЗ МИТОХОНДРИЙ

Гранзим В инициирует зависимый от митохондрий путь апоптоза с участием проапоптозного белка Bid (BH3 interacting domain death agonist). При входе в цитоплазму из эндосомального компартмента гранзим В расщепляет Bid с образованием gtBid (granzyme-truncated Bid), приводя к апоптозу (рис. 2). Участок разрезания белка Bid гранзимом В отличается от места расщепления каспазой-8. Сверхэкспрессия в

митохондриях антиапоптозного белка Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) может блокировать проявления клеточной гибели, вызванной гранзимом В [24–26]. Белок gtBid (14 кДа) транслоцируется в митохондрии и рекрутирует белки Вах (Bcl-2-associated X-protein) или Вак (Bcl-2-antagonist/killer), которые интегрируются в мембрану и индуцируют высвобождение цитохрома с (рис. 2) [27, 28]. Согласно одной из моделей взаимодействия белков семейства Bcl-2, ингибирующее действие белка Bcl-2 может быть обусловлено его прямым связыванием с Вах, Вак или gtBid. Другая модель предполагает, что в норме белок Вах, имеющий сродство к липидной мембране, постоянно транслоцируется с наружной мембраны митохондрии в цитоплазму белком Bcl-2. При апоптозе gtBid (а также другие белки из группы проапоптозных белков семейства Bcl-2, содержащих только домен BH3) препятствует действию антиапоптозного Bcl-2, в результате чего Вах связывается с мембраной, димеризуется, а затем олигомеризуется, формируя поры, через которые цитохром с выходит из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму [29, 30].

Связывание цитохрома с в цитоплазме с мономерным Araf-1 (apoptotic protease activating factor-1) вызывает конформационные изменения последнего, приводящие к нуклеотидному обмену: ADP в нуклеотид-связывающем домене Araf-1 заменяется на dATP или ATP. В этой реакции dATP более эффективен в сравнении с ATP, но внутриклеточная концентрация ATP выше, поэтому оба нуклеотида могут быть вовлечены в митохондриальный путь апоптоза [31]. Далее Araf-1, связанный с цитохромом с, олигомери-

зуется. Образовавшийся гептамер – апоптосома, являющаяся платформой для активации каспазы-9. Апоптосома напрямую связывает молекулы прокаспазы-9 через гомотипическое взаимодействие доменов CARD (caspase activation and recruitment domain), расположенных в центральной части апоптосомы и на прокаспазе-9 [32, 33]. Удаление домена CARD существенно увеличивает каталитическую активность прокаспазы-9, поэтому роль апоптосомы в активации каспазы-9 может заключаться не только в олигомеризации прокаспаз-9 и их автопротеолизе [34, 35], но и в устранении ингибирующего эффекта домена CARD [36]. Каспаза-9 инициирует протеолитический каскад, активирующий эффекторные каспазы-3 и -7 [34]. Каспаза-3 может активироваться напрямую гранзимом В (рис. 2), но не гранзимом А [37, 38]. Субстратами эффекторных каспаз, в т.ч. каспазы-3, являются сотни белков клетки. Среди них белки ядра и цитоскелета, протеолиз которых приводит к фрагментации клеточного ядра и образованию везикул на плазматической мембране – характерным проявлениям апоптоза [39, 40].

У гранзима В, кроме белка Bid и прокаспаз-2, -3, -7, -8, -9 и -10, есть множество других белков-мишеней в клетке, включая белки теплового шока, белки цитоскелета (среди которых актин и тубулин), ингибитор каспаза-активируемой ДНКазы ICAD/DFF45 (inhibitor of caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor, 45 кДа), ядерные белки (в т.ч. ламин, поли(ADP-рибоза)полимераза и другие белки, связанные с репарацией ДНК) [10]. Митохондриальные субстраты гранзима В включают белок Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1), расположенный на

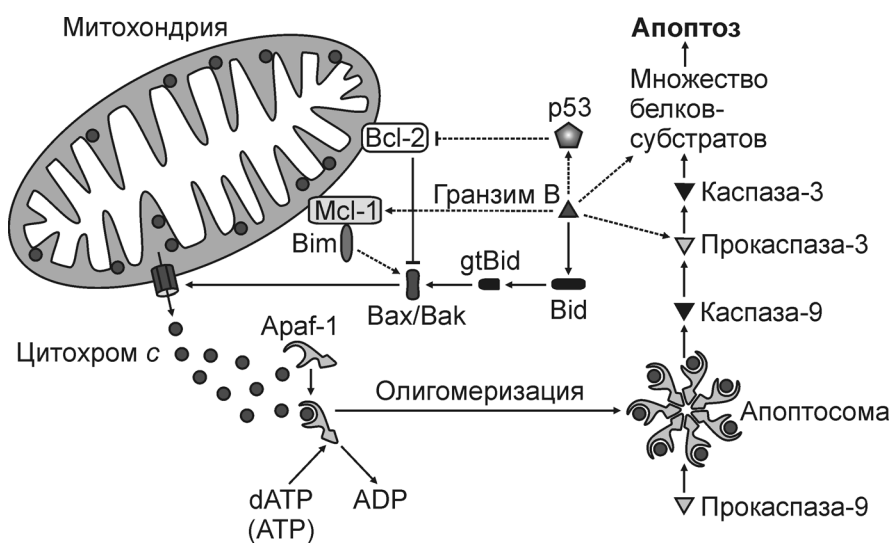


Рис. 2. Гранзим В активирует митохондриальный путь апоптоза

внешней мембране митохондрий [41, 42], и дигидролипоилтрансацилазу E2 пируватдегидрогеназного комплекса [43], осуществляющего окислительное декарбоксилирование пирувата с образованием ацетил-кофермента А и  $\text{CO}_2$ , а также восстановлением  $\text{NAD}^+$  в матриксе митохондрий.

При протеолизе Mcl-1 гранзимом В может осуществляться альтернативный, независимый от белка Bid митохондриальный путь апоптоза (рис. 2). Антиапоптотный белок Mcl-1 связывает проапоптотный белок Bim (или Bcl-2-like 11, apoptosis facilitator). Оба этих белка, как и белки Bid, Bax и Bak, принадлежат к семейству белков Bcl-2 [44]. Гранзим В высвобождает Bim из комплекса Mcl-1–Bim, активируя его [10, 41]. Как и в случае с Bid, обработанным гранзимом В, белок Bim напрямую инициирует олигомеризацию белков Bax и Bak, образование пор в мембранах митохондрий и выход цитохрома *c*. Bid преимущественно активирует Bak, тогда как Bim предпочитает Bax [45].

В еще одном пути регуляции апоптоза гранзимом В, связанном с митохондриями, участвует опухолевый супрессор p53. Активированный гранзимом В белок p53 транслоцируется к митохондриям и взаимодействует с Bcl-2 на внешней митохондриальной мембране (рис. 2). Это устраняет ингибирующее воздействие Bcl-2 на Bax и способствует образованию пор в митохондриальной мембране [46].

Изученные в меньшей степени гранзимы М, Н и F индуцировали гибель клеток с участием митохондрий, которая сопровождалась выходом цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму. Гранзим М напрямую не расщеплял прокаспазу-3 и Bid, его действие опосредовано каспазой-8. Ассоциированный с рецептором смерти CD95 (Fas) адаптерный белок FADD (Fas-associated protein with death domain) специфически расщеплялся гранзимом М после остатка Met196, образуя усеченный белок (tFADD). Это облегчало рекрутирование прокаспазы-8. Индуцированной гранзимом М гибели клеток сопутствовало высвобождение цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму [47]. Гранзим Н вызывал гибель клеток при участии Bcl-2, однако также не осуществлял прямого расщепления Bid. Вызванная гранзимом Н гибель клеток сопровождалась выходом цитохрома *c* из митохондрий. Активация каспаз и защитный эффект ингибиторов каспаз наблюдались, однако были небольшими при сравнении гранзима Н с другими индукторами апоптоза. Гранзим Н, подобно гранзиму В, непосредственно взаимодействовал с ICAD/DFP45, что, вероятно, приводило к повреждению ДНК и гибели клеток [48, 49]. Смерть

клеток, вызванная гранзимом F, не включала расщепление Bid и активацию каспаз. Гранзим F нарушал транспорт электронов в дыхательной цепи митохондрий, снижая скорость поглощения  $\text{O}_2$  и образование АТФ в клетках [50].

Гранзим А, подобно гранзиму В, способен расщеплять множество клеточных белков, в т.ч. белки цитоскелета и ядра [51]. Губительное действие гранзима А на клетки связывают с активацией нуклеаз, производящих одноцепочечные разрывы ДНК и способствующих гибели клеток с признаками апоптоза. С эндоплазматическим ретикуломом связан белковый комплекс (270–420 кДа), содержащий ДНКазу NM23-N1 (или GAAD, granzyme A-activated DNase) и ее ингибитор SET, который разрезается гранзимом А. В результате ДНКазы высвобождается и активируется. Клетки с подавленной экспрессией NM23-N1 устойчивы к повреждению ДНК, вызванному гранзимом А, и цитолизу, а клетки со сверхэкспрессией NM23-N1, напротив, более чувствительны [52, 53]. Было обнаружено, что гранзим А вызывает образование активных форм кислорода (АФК) и снижение разности электрических потенциалов ( $\Delta\psi$ ) в митохондриях. Повреждение митохондрий является важным этапом в апоптозе, вызванном гранзимом А [54].

## ОБРАЗОВАНИЕ АФК В МИТОХОНДРИЯХ

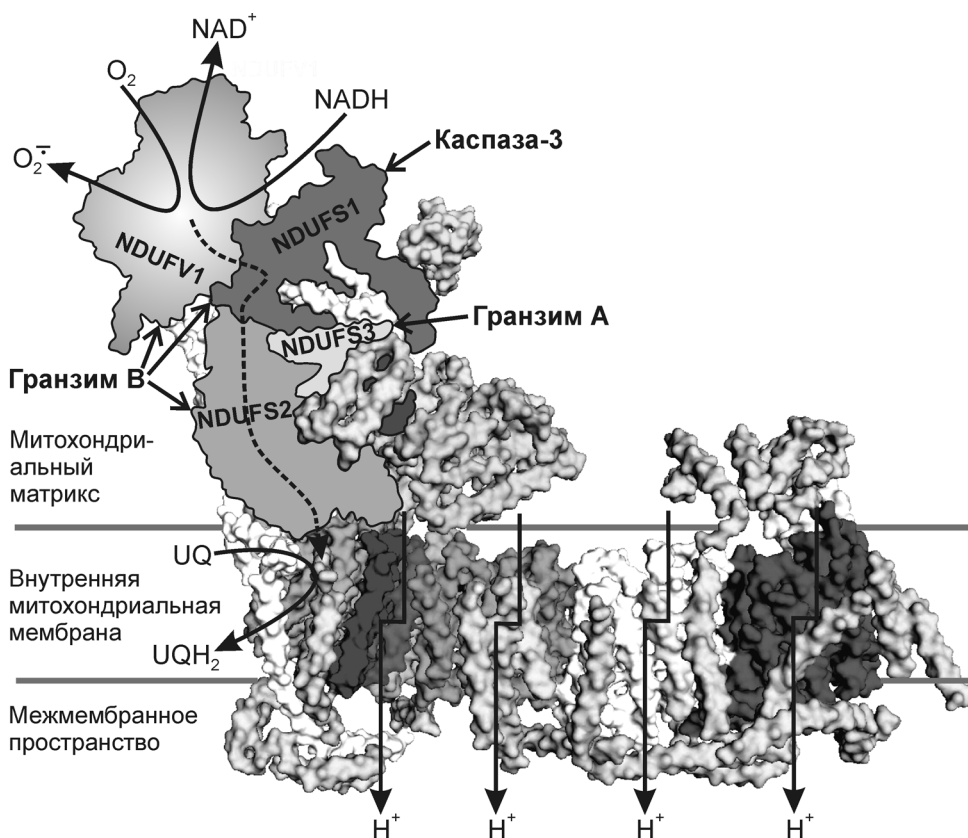
NADH:убихинон-оксидоредуктаза (комплекс I дыхательной цепи митохондрий) катализирует окисление NADH убихиноном. Двухэлектронное окисление одной молекулы NADH сопровождается трансмембранным переносом четырех протонов и генерацией на внутренней мембране митохондрий разности электрохимических потенциалов ионов водорода ( $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ ) [55]. Комплекс I – один из крупнейших (970 кДа) комплексов белков в клетке, связанных с мембраной. Комплекс I млекопитающих содержит 45 субъединиц: 14 основных субъединиц консервативны и имеются у живых организмов от бактерий до человека; 31 субъединица специфична для млекопитающих [56, 57].

Гранзим А действует непосредственно на митохондрии, вызывая образование АФК и снижение  $\Delta\psi$  на внутренней мембране митохондрий. После 2 мин обработки гранзимом А в комбинации с перфорином митохондрии клеток HeLa начинали генерировать супероксидный анион-радикал ( $\text{O}_2^-$ ), который детектировали с помощью MitoSOX Red, митохондриального флуоресцентного индикатора  $\text{O}_2^-$ . Показано, что гранзим А разрезает субъединицу комплекса I NDUFS3 после остатка Lys56 [58]. Гранзим В,

который подобно гранзиму А в сочетании с перфорином вызывал образование митохондриальных АФК, расщепляет субъединицы NDUFV1, NDUFS1 и NDUFS2 [59]. Примечательно, что NDUFS1 разрезается также каспазой-3 – центральным протеолитическим ферментом при апоптозе. В NDUFS1 есть участок из четырех остатков аминокислот (DVMD у млекопитающих), являющийся субстратом каспазы [60]. На рис. 3 отмечены субъединицы комплекса I, подвергающиеся протеолизу каспазой-3 (NDUFS1), гранзимами А (NDUFS3) или В (NDUFV1, NDUFS1 и NDUFS2). Все эти субъединицы из числа основных субъединиц расположены в гидрофильном (немембранном) домене комплекса I, в котором происходит перенос электронов с NADH на убихинон по цепочке FeS-кластеров. NDUFV1 содержит флавиномононуклеотид (FMN) и FeS-кластер N3; NDUFS1 – FeS-кластеры N1b, N4 и N5; NDUFS2 и NDUFS3 содержат FeS-кластеры, не принадлежащие к основному пути переноса электронов от NADH к убихинону [57].

Проникновение в митохондрии гранзима В происходит независимо от транслоказы внешней митохондриальной мембраны Tom (translocase of the outer mitochondrial membrane), вместо этого используется Sam50 (sorting and assembly machinery). Через внутреннюю мембрану гранзим В проходит с помощью Tim22 (translocase of the inner mitochondrial membrane) при участии митохондриального белка теплового шока 70 (mtHsp70). Гранзим А и каспаза-3 доставляются в митохондрии по похожему пути. Для проникновения гранзимов и каспазы-3 митохондрии должны обладать  $\Delta\psi$  на внутренней мембране [63, 64].

Генерация  $O_2^-$  в комплексе I дыхательной цепи митохондрий зависит от  $\Delta\psi$ , концентрации и соотношения NADH/NAD<sup>+</sup>, соотношения восстановленного и окисленного убихинона и концентрации  $O_2$  [65–68]. Считается, что основным кофактором, ответственным за генерацию  $O_2^-$ , является FMN, но не исключено и образование АФК на участке связывания убихинона. Предположительно, существуют два пути



**Рис. 3.** Структура комплекса I дыхательной цепи митохондрий (по статьям Hirst и Roessler [61], Rodenburg [62]). Обозначены субъединицы, расщепляемые каспазой-3 (NDUFS1), гранзимом А (NDUFS3) или гранзимом В (NDUFV1, NDUFS1 и NDUFS2). Пунктирной линией показан перенос электронов от FMN к участку связывания убихинона по цепочке FeS-кластеров

образования  $O_2^-$ . Первый путь:  $NADH \rightarrow FMN$  в комплексе I  $\rightarrow O_2^-$ . Высокий уровень  $NADH/NAD^+$  приводит к восстановлению FMN. FMN (полностью восстановленный или в форме семихинона) реагирует с  $O_2$ , образуя  $O_2^-$ . Второй путь (обратный перенос электронов): восстановленный убихинон  $\rightarrow$  цепь FeS-кластеров в комплексе I  $\rightarrow FMN$  в комплексе I  $\rightarrow O_2^-$ . Сукцинат, субстрат комплекса II дыхательной цепи, восстанавливающего убихинон, вызывал генерацию  $O_2^-$  в субмитохондриальных частицах. Она подавлялась ротеноном, ингибирующим взаимодействие убихинона с комплексом I, и протонифицирующим разобщителем, снимающим  $\Delta\psi$ . NADH-Зависимое образование АФК, напротив, могло усиливаться ротеноном и быть нечувствительным к действию разобщителя. NADH в миллимолярной концентрации (близкой к физиологической) и  $NAD^+$  подавляли образование  $O_2^-$ , по-видимому, конкурируя с  $O_2$  за связывание с восстановленным FMN. Есть предположение, что FMN комплекса I взаимодействует по меньшей мере с двумя разными участками связывания нуклеотидов: в одном осуществляется окисление NADH, а в другом может происходить восстановление  $NAD^+$  или  $O_2$  [65, 66].

Неясно, каким образом опосредованный гранзимами протеолиз субъединиц комплекса I приводит к образованию АФК. Поскольку действие гранзимов сопровождается снижением  $\Delta\psi$ , можно предположить, что разрезание субъединиц, в т.ч. и тех, в которых находятся компоненты электронтранспортной цепи (NDUFV1 и NDUPS1), нарушает перенос электронов на убихинон, и генерация  $O_2^-$  происходит по первому пути:  $NADH \rightarrow FMN \rightarrow O_2^-$ . Однако это противоречит наблюдению, что ротенон подавлял образование АФК и гибель клеток, вызванную гранзимом А в комбинации с перфорином [58]. Ингибирование процесса ротеноном – признак обратного переноса электронов, от убихинона на FMN. По-видимому, при обработке клеток гранзимами основной путь переноса электронов сохраняется. Возможно, протеолиз субъединиц комплекса I способствует доступу  $O_2$  к скрытым внутри белка FMN и FeS-центрам и их окислению с образованием  $O_2^-$ . Наряду с глутамат- и малат-зависимым поглощением  $O_2$ , гранзим В подавлял дыхание с сукцинатом, а также активность комплекса III дыхательной цепи, поэтому не исключено взаимодействие гранзимов с другими комплексами дыхательной цепи [59].

АФК играют важную роль при внедрении в клетку гранзимов. Образование АФК в митохондриях может провоцировать окисление кардиолипина и высвобождение электростатически

связанного с ним цитохрома *c* в цитоплазму [69, 70]. Антиоксиданты подавляли гибель клеток, вызванную гранзимом А и перфорином [54]. АФК способствуют транслокации ассоциированного с эндоплазматическим ретикулулом комплекса SET в ядро, где этот комплекс расщепляется гранзимом А с высвобождением двух ДНКаз (NM23-H1 или GAAD и TREX1), которые разрезают ядерную ДНК при гибели клеток, опосредованной гранзимом А [54, 71]. Антиоксиданты также уменьшали проявление признаков апоптоза, индуцированного гранзимом В [59].

Литические гранулы клеток-киллеров у человека (но не у грызунов), в дополнение к перфоринолу, кальретикулину и гранзимам, содержат антимикробный пептид гранулизин, который избирательно разрушает микробные мембраны с низким содержанием холестерина. Этот пептид способствует защите организма от внутриклеточных паразитических простейших (трипаносомы, токсоплазмы, лейшмании). Перфорин обеспечивает проникновение гранзимов и гранулизина в инфицированные клетки, а затем гранулизин доставляет гранзимы к внутриклеточным паразитам. Показано, что гранзимы запускали образование АФК и инактивировали ферменты антиоксидантной защиты для уничтожения паразита. Гибель паразитических простейших была нечувствительна к ингибиторам каспаз, но по ряду признаков напоминала апоптоз млекопитающих [72].

Таким образом, цитотоксические клетки-киллеры, использующие гранзимы, могут инициировать множество путей активации клеточной гибели. По-видимому, это необходимо для противодействия патогенам, которые могут использовать разные способы уклонения от иммунитета [49].

В последние годы растет интерес к Т- или НК-клеткам-киллерам. Это связано как с их участием в противовирусной защите организма, так и с возможным применением в иммунотерапии опухолей. Цитотоксические Т- и НК-клетки вырабатывают интерферон- $\gamma$ , который обеспечивает включение ряда различных механизмов противовирусной защиты [73]. Цитотоксические Т-лимфоциты распознают и уничтожают клетки, зараженные вирусом и презентующие вирусные пептиды на молекулах главного комплекса гистосовместимости класса I (MHC I, major histocompatibility complex class I) [74]. Это свойство может иметь практическое применение в медицине. Так, например, трансплантация сопряжена с ослаблением иммунитета и повышенным риском инфицирования. При этом ис-

пользование специфичных к вирусным антигенам цитотоксических Т-лимфоцитов, полученных с помощью МНС, которые несут синтетические вирусные пептиды – это возможная альтернатива высокоцитотоксичным противовирусным препаратам [75].

Для ускользания от противовирусной реакции цитотоксических Т-клеток вирусы могут препятствовать презентации антигена: подавлять функции протеасом, транспорт пептидов, транслокацию молекул МНС I из эндоплазматического ретикулума на поверхность клеток [74]. Естественные киллеры способны выявлять и уничтожать инфицированные клетки, в которых нарушена презентация антигенов, т.е. нет МНС I на клеточной поверхности. Вклад цитолитической функции НК-клеток, обеспечиваемой перфорином и гранзимами, в противовирусную защиту зависит от многих факторов и может быть неодинаковым в разных тканях организма [76].

Перспективно использование клеток-киллеров в иммунотерапии рака. Есть свидетельства успешного применения адоптивной терапии опухолей, при которой у пациента берут клетки-киллеры, подвергают их обработке цитокинами и/или генно-инженерным модификациям для активации и усиления противоопухолевого ответа и вводят обратно в организм [77]. Особый интерес представляют модифицированные клетки с химерными антигенными рецепторами (CAR, chimeric antigen receptors) – синтетическими рецепторами, содержащими антигенсвязывающие, активирующие и костимуляторные домены, в которых антигенсвязывающий сайт рецептора Т-клеток (TCR, T-cell receptor) заменяется сайтом иммуноглобулина с высокой аффинностью и специфичностью к целевому опухолевому антигену. Терапия на основе CAR позволяет устранить необходимость МНС-зависимой презентации антигена клеткам-киллерам и

является многообещающей стратегией избавления от злокачественных новообразований, устойчивых к традиционным методам лечения. Отсутствие МНС I на поверхности клеток может быть следствием опухолевой трансформации. Утилизация таких клеток естественными киллерами дополняет уничтожение клеток опухоли цитотоксическими Т-лимфоцитами [77, 78].

Ликвидация инфицированных или мутировавших клеток – основа защитной реакции, осуществляемой цитотоксическими Т-лимфоцитами и естественными киллерами и направленной на поддержание гомеостаза организма. Существование множества альтернативных путей инициации гибели клеток, которые описаны в настоящей работе, по-видимому, важно, чтобы: 1) препятствовать механизмам ускользания от иммунных реакций, возникающим у патогенов; 2) осуществлять клеточную смерть даже в случае мутаций отдельных компонентов путей, приводящих к ней. Как и в случае зависящего от каспаз апоптоза, большинство выявленных путей гибели клетки, включаемых гранзимами, ассоциированы с митохондриями.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке научно-исследовательской работы (НИР) из средств федерального бюджета (регистрационный номер НИР в ЦИТИС: АААА-А16-116021660081-0).

**Благодарности.** Автор благодарен д.б.н. профессору В.Д. Самуилову за внимательное прочтение рукописи статьи и ценные замечания.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящее исследование проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008) Mechanisms of granule-dependent killing, *Cell Death Differ.*, **15**, 251–262, doi: 10.1038/sj.cdd.4402244.
2. Cullen, S.P., Brunet, M., and Martin, S.J. (2010) Granzymes in cancer and immunity, *Cell Death Differ.*, **17**, 616–623, doi: 10.1038/cdd.2009.206.
3. Wajant, H. (2014) Principles and mechanisms of CD95 activation, *Biol. Chem.*, **395**, 1401–1416, doi: 10.1515/hsz-2014-0212.
4. Siegmund, D., Lang, I., and Wajant, H. (2017) Cell death-independent activities of the death receptors CD95, TRAILR1, and TRAILR2, *FEBS J.*, **284**, 1131–1159, doi: 10.1111/febs.13968.
5. Tummers, B., and Green, D.R. (2017) Caspase-8: regulating life and death, *Immunol. Rev.*, **277**, 76–89, doi: 10.1111/imr.12541.
6. Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., and Vandenabeele, P. (2014) Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 135–147, doi: 10.1038/nrm3737.
7. Tsuchiya, Y., Nakabayashi, O., and Nakano, H. (2015) FLIP the switch: regulation of apoptosis and necroptosis by cFLIP, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 30321–30341, doi: 10.3390/ijms161226232.
8. Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., and Han, J. (2018) Plasma membrane changes during programmed cell deaths, *Cell Res.*, **28**, 9–21, doi: 10.1038/cr.2017.133.

9. Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation, *Science*, **285**, 221–227, doi: 10.1126/science.285.5425.221.
10. Rousalova, I., and Krepela, E. (2010) Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review), *Int. J. Oncol.*, **37**, 1361–1378, doi: 10.3892/ijo\_00000788.
11. Woodworth, D.J., Dunsing, V., and Coombs, D. (2015) Design parameters for granzyme-mediated cytotoxic lymphocyte target-cell killing and specificity, *Biophys. J.*, **109**, 477–488, doi: 10.1016/j.bpj.2015.06.045.
12. Podack, E.R., and Munson, G.P. (2016) Killing of microbes and cancer by the immune system with three mammalian pore-forming killer proteins, *Front. Immunol.*, **7**, 464, doi: 10.3389/fimmu.2016.00464.
13. Stewart, S.E., D'Angelo, M.E., and Bird, P.I. (2012) Intercellular communication via the endo-lysosomal system: translocation of granzymes through membrane barriers, *Biochim. Biophys. Acta*, **1824**, 59–67, doi: 10.1016/j.bbapap.2011.05.020.
14. Voskoboinik, I., Whistock, J.C., and Trapani, J.A. (2015) Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology, *Nat. Rev. Immunol.*, **15**, 388–400, doi: 10.1038/nri3839.
15. Andrin, C., Pinkoski, M.J., Burns, K., Atkinson, E.A., Krahenbuhl, O., Hudig, D., Fraser, S.A., Winkler, U., Tschopp, J., Opas, M., Bleackley, R.C., and Michalak, M. (1998) Interaction between a Ca<sup>2+</sup>-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules, *Biochemistry*, **37**, 10386–10394, doi: 10.1021/bi980595z.
16. Carafoli, E., and Krebs, J. (2016) Why calcium? How calcium became the best communicator, *J. Biol. Chem.*, **291**, 20849–20857, doi: 10.1074/jbc.R116.735894.
17. Davidovich, P., Kearney, C.J., and Martin, S.J. (2014) Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis, *Biol. Chem.*, **395**, 1163–1171, doi: 10.1515/hsz-2014-0164.
18. Thiery, J., Keefe, D., Boulant, S., Boucrot, E., Walch, M., Martinvalet, D., Goping, I.S., Bleackley, R.C., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. (2011) Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells, *Nat. Immunol.*, **12**, 770–777, doi: 10.1038/ni.2050.
19. Masson, D., Nabholz, M., Estrade, C., and Tschopp, J. (1986) Granules of cytolytic T-lymphocytes contain two serine esterases, *EMBO J.*, **5**, 1595–1600.
20. Masson, D., and Tschopp, J. (1987) A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes, *Cell*, **49**, 679–685, doi: 10.1016/0092-8674(87)90544-7.
21. Susanto, O., Trapani, J.A., and Brasacchio, D. (2012) Controversies in granzyme biology, *Tissue Antigens*, **80**, 477–487, doi: 10.1111/tan.12014.
22. Vahedi, F., Fraleigh, N., Vlasschaert, C., McElhaney, J., and Hanifi-Moghaddam, P. (2014) Human granzymes: related but far apart, *Med. Hypotheses*, **83**, 688–693, doi: 10.1016/j.mehy.2014.09.019.
23. Trapani, J.A. (2001) Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases, *Genome Biol.*, **2**, reviews3014.1–3014.7, doi: 10.1186/gb-2001-2-12-reviews3014.
24. Sutton, V.R., Wowk, M.E., Cancilla, M., and Trapani, J.A. (2003) Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors, *Immunity*, **18**, 319–329, doi: 10.1016/s1074-7613(03)00050-5.
25. Goping, I.S., Barry, M., Liston, P., Sawchuk, T., Constantinescu, G., Michalak, K.M., Shostak, I., Roberts, D.L., Hunter, A.M., Korneluk, R., and Bleackley, R.C. (2003) Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition, *Immunity*, **18**, 355–365, doi: 10.1016/s1074-7613(03)00032-3.
26. Wowk, M.E., and Trapani, J.A. (2004) Cytotoxic activity of the lymphocyte toxin granzyme B, *Microbes Infect.*, **6**, 752–758, doi: 10.1016/j.micinf.2004.03.008.
27. Heibein, J.A., Goping, I.S., Barry, M., Pinkoski, M.J., Shore, G.C., Green, D.R., and Bleackley, R.C. (2000) Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members Bid and Bax, *J. Exp. Med.*, **192**, 1391–1402, doi: 10.1084/jem.192.10.1391.
28. Wang, G.Q., Wieckowski, E., Goldstein, L.A., Gastman, B.R., Rabinovitz, A., Gambotto, A., Li, S., Fang, B., Yin, X.M., and Rabinowich, H. (2001) Resistance to granzyme B-mediated cytochrome c release in Bak-deficient cells, *J. Exp. Med.*, **194**, 1325–1337, doi: 10.1084/jem.194.9.1325.
29. Cosentino, K., and Garcia-Saez, A.J. (2017) Bax and Bak pores: Are we closing the circle? *Trends Cell Biol.*, **27**, 266–275, doi: 10.1016/j.tcb.2016.11.004.
30. Kale, J., Osterlund, E.J., and Andrews, D.W. (2018) BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death, *Cell Death Differ.*, **25**, 65–80, doi: 10.1038/cdd.2017.186.
31. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell*, **91**, 479–489, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80434-1.
32. Li, J., and Yuan, J. (2008) Caspases in apoptosis and beyond, *Oncogene*, **27**, 6194–6206, doi: 10.1038/onc.2008.297.
33. Dorstyn, L., Akey, C.W., and Kumar, S. (2018) New insights into apoptosome structure and function, *Cell Death Differ.*, **25**, 1194–1208, doi: 10.1038/s41418-017-0025-z.
34. Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization, *Mol. Cell*, **1**, 949–957, doi: 10.1016/s1097-2765(00)80095-7.
35. Chang, H.Y., and Yang, X. (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 821–846, doi: 10.1128/mmbr.64.4.821-846.2000.
36. Li, Y., Zhou, M., Hu, Q., Bai, X.-C., Huang, W., Scheres, S.H.W., and Shi, Y. (2017) Mechanistic insights into caspase-9 activation by the structure of the apoptosome holoenzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 1542–1547, doi: 10.1073/pnas.1620626114.
37. Darmon, A.J., Nicholson, D.W., and Bleackley, R.C. (1995) Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B, *Nature*, **377**, 446–448, doi: 10.1038/377446a0.
38. Quan, L.T., Tewari, M., O'Rourke, K., Dixit, V., Snipas, S.J., Poirier, G.G., Ray, C., Pickup, D.J., and Salvesen, G.S. (1996) Proteolytic activation of the cell death protease Yama/ CPP32 by granzyme B, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1972–1976, doi: 10.1073/pnas.93.5.1972.
39. Luthi, A.U., and Martin, S.J. (2007) The CASBAH: a searchable database of caspase substrates, *Cell Death Differ.*, **14**, 641–650, doi: 10.1038/sj.cdd.4402103.
40. Julien, O., and Wells, J.A. (2017) Caspases and their substrates, *Cell Death Differ.*, **24**, 1380–1389, doi: 10.1038/cdd.2017.44.
41. Han, J., Goldstein, L.A., Gastman, B.R., Froelich, C.J., Yin, X.M., and Rabinowich, H. (2004) Degradation of Mcl-1 by granzyme B: implications for Bim-mediated mitochondrial apoptotic events, *J. Biol. Chem.*, **279**, 22020–22029, doi: 10.1074/jbc.M313234200.



42. Han, J., Goldstein, L.A., Gastman, B.R., Rabinovitz, A., and Rabinowich, H. (2005) Disruption of Mcl-1-Bim complex in granzyme B-mediated mitochondrial apoptosis, *J. Biol. Chem.*, **280**, 16383–16392, doi: 10.1074/jbc.M411377200.
43. Matsumura, S., Van De Water, J., Kita, H., Coppel, R.L., Tsuji, T., Yamamoto, K., Ansari, A.A., and Gershwin, M.E. (2002) Contribution to antimitochondrial antibody production: cleavage of pyruvate dehydrogenase complex-E2 by apoptosis-related proteases, *Hepatology*, **35**, 14–22, doi: 10.1053/jhep.2002.30280.
44. Siddiqui, W.A., Ahad, A., and Ahsan, H. (2015) The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update, *Arch. Toxicol.*, **89**, 289–317, doi: 10.1007/s00204-014-1448-7.
45. Sarosiek, K.A., Chi, X., Bachman, J.A., Sims, J.J., Montero, J., Patel, L., Flanagan, A., Andrews, D.W., Sorger, P., and Letai, A. (2013) BID preferentially activates BAK while BIM preferentially activates BAX, affecting chemotherapy response, *Mol. Cell*, **51**, 751–765, doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.048.
46. Ben Safta, T., Ziani, L., Favre, L., Lamendour, L., Gros, G., Mami-Chouaib, F., Martinvalet, D., Chouaib, S., and Thiery, J. (2015) Granzyme B-activated p53 interacts with Bcl-2 to promote cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis, *J. Immunol.*, **194**, 418–428, doi: 10.4049/jimmunol.1401978.
47. Wang, S., Xia, P., Shi, L., and Fan, Z. (2012) FADD cleavage by NK cell granzyme M enhances its self-association to facilitate procaspase-8 recruitment for auto-processing leading to caspase cascade, *Cell Death Differ.*, **19**, 605–615, doi: 10.1038/cdd.2011.130.
48. Hou, Q., Zhao, T., Zhang, H., Lu, H., Zhang, Q., Sun, L., and Fan, Z. (2008) Granzyme H induces apoptosis of target tumor cells characterized by DNA fragmentation and Bid-dependent mitochondrial damage, *Mol. Immunol.*, **45**, 1044–1055, doi: 10.1016/j.molimm.2007.07.032.
49. Ewen, C.L., Kane, K.P., and Bleackley, R.C. (2013) Granzyme H induces cell death primarily via a Bcl-2-sensitive mitochondrial cell death pathway that does not require direct Bid activation, *Mol. Immunol.*, **54**, 309–318, doi: 10.1016/j.molimm.2012.12.020.
50. Shi, L., Wu, L., Wang, S., and Fan, Z. (2009) Granzyme F induces a novel death pathway characterized by Bid-independent cytochrome *c* release without caspase activation, *Cell Death Differ.*, **16**, 1694–1706, doi: 10.1038/cdd.2009.101.
51. Van Damme, P., Maurer-Stroh, S., Hao, H., Colaert, N., Timmerman, E., Eisenhaber, F., Vandekerckhove, J., and Gevaert, K. (2010) The substrate specificity profile of human granzyme A, *Biol. Chem.*, **391**, 983–997, doi: 10.1515/BC.2010.096.
52. Beresford, P.J., Zhang, D., Oh, D.Y., Fan, Z., Greer, E.L., Russo, M.L., Jaju, M., and Lieberman, J. (2001) Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks, *J. Biol. Chem.*, **276**, 43285–43293, doi: 10.1074/jbc.M108137200.
53. Fan, Z., Beresford, P.J., Oh, D.Y., Zhang, D., and Lieberman, J. (2003) Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor, *Cell*, **112**, 659–672, doi: 10.1016/s0092-8674(03)00150-8.
54. Martinvalet, D., Zhu, P., and Lieberman, J. (2005) Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis, *Immunity*, **22**, 355–370, doi: 10.1016/j.immuni.2005.02.004.
55. Привенникова В.Г., Виноградов А.Д. (2003) Митохондриальный комплекс I, *Успехи биологической химии*, **43**, 19–58.
56. Zhu, J., Vinothkumar, K.R., and Hirst, J. (2016) Structure of mammalian respiratory complex I, *Nature*, **536**, 354–358, doi: 10.1038/nature19095.
57. Fiedorczuk, K., Letts, J.A., Degliesposti, G., Kaszuba, K., Skehel, M., and Sazanov, L.A. (2016) Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I, *Nature*, **538**, 406–410, doi: 10.1038/nature19794.
58. Martinvalet, D., Dykxhoorn, D.M., Ferrini, R., and Lieberman, J. (2008) Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death, *Cell*, **133**, 681–692, doi: 10.1016/j.cell.2008.03.032.
59. Jacquemin, G., Margiotta, D., Kasahara, A., Bassoy, E.Y., Walch, M., Thiery, J., Lieberman, J., and Martinvalet, D. (2015) Granzyme B-induced mitochondrial ROS are required for apoptosis, *Cell Death Differ.*, **22**, 862–874, doi: 10.1038/cdd.2014.180.
60. Ricci, J.E., Muñoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-Maitre, B., Perkins, G.A., Yadava, N., Scheffler, I.E., Ellisman, M.H., and Green, D.R. (2004) Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain, *Cell*, **117**, 773–786, doi: 10.1016/j.cell.2004.05.008.
61. Hirst, J., and Roessler, M.M. (2016) Energy conversion, redox catalysis and generation of reactive oxygen species by respiratory complex I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 872–883, doi: 10.1016/j.bbabi.2015.12.009.
62. Rodenburg, R.J. (2016) Mitochondrial complex I-linked disease, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 938–945, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.02.012.
63. Chiusolo, V., Jacquemin, G., Yonca Bassoy, E., Vinet, L., Liguori, L., Walch, M., Kozjak-Pavlovic, V., and Martinvalet, D. (2017) Granzyme B enters the mitochondria in a Sam50-, Tim22- and mtHsp70-dependent manner to induce apoptosis, *Cell Death Differ.*, **24**, 747–758, doi: 10.1038/cdd.2017.3.
64. Martinvalet, D. (2019) Mitochondrial entry of cytotoxic proteases: a new insight into the granzyme B cell death pathway, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 9165214, doi: 10.1155/2019/9165214.
65. Grivennikova, V.G., and Vinogradov, A.D. (2006) Generation of superoxide by the mitochondrial complex I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 553–561, doi: 10.1016/j.bbabi.2006.03.013.
66. Murphy, M.P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem. J.*, **417**, 1–13, doi: 10.1042/BJ20081386.
67. Korge, P., Calmettes, G., and Weiss, J.N. (2016) Reactive oxygen species production in cardiac mitochondria after complex I inhibition: modulation by substrate-dependent regulation of the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio, *Free Radic. Biol. Med.*, **96**, 22–33, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.002.
68. Robb, E.L., Hall, A.R., Prime, T.A., Eaton, S., Szibor, M., Viscomi, C., James, A.M., and Murphy, M.P. (2018) Control of mitochondrial superoxide production by reverse electron transport at complex I, *J. Biol. Chem.*, **293**, 9869–9879, doi: 10.1074/jbc.RA118.003647.
69. Shidoji, Y., Hayashi, K., Komura, S., Ohishi, N., and Yagi, K. (1999) Loss of molecular interaction between cytochrome *c* and cardiolipin due to lipid peroxidation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **264**, 343–347, doi: 10.1006/bbrc.1999.1410.
70. Kagan, V.E., Tyurin, V.A., Jiang, J., Tyurina, Y.Y., Ritov, V.B., Amoscato, A.A., Osipov, A.N., Belikova, N.A., Kapralov, A.A., Kini, V., Vlasova, I.I., Zhao, Q., Zou, M., Di, P., Svistunenko, D.A., Kurnikov, I.V., and Borisenko, G.G. (2005) Cytochrome *c* acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors, *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 223–232, doi: 10.1038/nchembio727.

71. Lucken-Ardjomande, S., and Martinou, J.-C. (2008) Granzyme A, a stealth killer in the mitochondrion, *Cell*, **133**, 568–570, doi: 10.1016/j.cell.2008.04.031.
72. Dotiwala, F., Mulik, S., Polidoro, R.B., Ansara, J.A., Burleigh, B.A., Walch, M., Gazzinelli, R.T., and Lieberman, J. (2016) Killer lymphocytes use granzysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites, *Nat. Med.*, **22**, 210–216, doi: 10.1038/nm.4023.
73. Kang, S., Brown, H.M., and Hwang, S. (2018) Direct antiviral mechanisms of interferon-gamma, *Immune Netw.*, **18**, e33, doi: 10.4110/in.2018.18.e33.
74. Hansen, T.H., and Bouvier, M. (2009) MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies, *Nat. Rev. Immunol.*, **9**, 503–513, doi: 10.1038/nri2575.
75. Вдовин А.С., Филькин С.Ю., Ефимова П.Р., Шитиков С.А., Капранов Н.М., Давыдова Ю.О., Егоров Е.С., Хамаганова Е.Г., Дроков М.Ю., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Ефимов Г.А., Савченко В.Г. (2016) Применение рекомбинантных МНС-тетрамеров для изоляции вирусспецифичных CD8<sup>+</sup>-клеток здоровых доноров: потенциальный подход к клеточной терапии посттрансплантационной цитомегаловирусной инфекции, *Биохимия*, **81**, 1628–1642, doi: 10.1134/S0006297916110146.
76. Biron, C.A., and Brossay, L. (2001) NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections, *Curr. Opin. Immunol.*, **13**, 458–464, doi: 10.1016/s0952-7915(00)00241-7.
77. Ruella, M., and Kalos, M. (2014) Adoptive immunotherapy for cancer, *Immunol. Rev.*, **257**, 14–38, doi: 10.1111/imr.12136.
78. Kim, N., Lee, H.H., Lee, H.J., Choi, W.S., Lee, J., and Kim, H.S. (2019) Natural killer cells as a promising therapeutic target for cancer immunotherapy, *Arch. Pharm. Res.*, **42**, 591–606, doi: 10.1007/s12272-019-01143-y.

## GRANZYMES AND MITOCHONDRIA

### Review

D. B. Kiselevsky

*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia; E-mail: dkiselevs@mail.ru*

Received October 1, 2019

Revised November 1, 2019

Accepted November 4, 2019

Cytotoxic T-lymphocytes and natural killers eliminate infected cells from an organism by triggering programmed cell death (apoptosis). The contents of the lytic granules of killer cells, including pore-forming proteins perforins and proteolytic enzymes granzymes, are released with subsequent penetration into target cells. Granzyme B initiates mitochondria-dependent apoptosis via (i) proapoptotic Bid protein, (ii) Mcl-1 and Bim proteins, or (iii) p53 protein. As a result, cytochrome *c* is released from mitochondria into cytoplasm, causing formation of apoptosomes that provide proteolytic cascade of caspases' activation. Granzymes M, H, and F cause cell death, which is accompanied by the release of cytochrome *c* from mitochondria. Granzyme A induces generation of reactive oxygen species, which promote translocation of the endoplasmic reticulum-associated SET complex to cell nucleus. In cell nucleus granzyme A cleaves the SET thus activating nucleases that cause single-strand DNA breaks. Granzymes A and B penetrate mitochondria and cut the complex I subunits of the respiratory chain. One of the complex I subunits is a target for the caspase-3 as well. Granzyme-dependent damage to complex I leads to ROS generation and cell death.

**Keywords:** reactive oxygen species, apoptosis, granzymes, mitochondria, programmed cell death