

2023 Diciembre, 13(12): 1-4

EXPRESIÓN DEL PUNTO DE CONTROL INMUNOLÓGICO HLA-G EN EL CONTEXTO DE HIPOXIA EN UNA LÍNEA CELULAR DE CORIOCARCINOMA HUMANO

Abal L¹, Iribarne A^{1(AD)}, Riccillo F^{1(AD)}, Miriuka^{SG2},
García MN^{1(PROF)}, Palma MB^{1(AD),2}.

1. Cátedra de Citología, Histología y Embriología, FCM, UNLP, Argentina. AD: ayudante diplomado. PROF: Profesor Adjunto.

2. Laboratorio de Investigación Aplicada a Neurociencias (LIAN), Instituto de Neurociencias (INEU), Fleni-CONICET.

RESUMEN

El HLA-G es una molécula MHC tipo I no clásica que modula negativamente la respuesta inmune local. Esta proteína tiene una expresión restringida a unos pocos tejidos en condiciones fisiológicas, mientras que puede aparecer en ciertas condiciones patológicas, como es el caso de algunos tipos de cáncer. El rápido crecimiento de las células tumorales (CT) crea un ambiente hipóxico donde los bajos niveles de oxígeno conducen a la acumulación de factores inducibles por hipoxia (HIF), que modulan varias vías prooncogénicas. En este contexto, HIF podría modular positivamente la expresión de HLA-G en las CT como mecanismo de evasión del sistema inmune. Proponemos evaluar el efecto de la hipoxia sobre la expresión de HLA-G en una línea celular de coriocarcinoma llamada JEG-3, cultivada con deferroxamina 200 µM (DFX, agente quelante de hierro). Para analizar el efecto de DFX, se determinaron los niveles de HIF-1 y -2, los cuales aumentaron durante los tiempos de incubación. Luego, se analizó la expresión de HLA-G y se observó que los niveles de ARNm y proteínas aumentaron gradualmente de manera dependiente del tiempo cuando se cultivaron las JEG-3 con DFX. Por lo tanto, se podría concluir que la expresión de HLA-G varía durante el cultivo en hipoxia, y como los niveles de HIFs y los de HLA-G aumentaron gradualmente a mayores tiempos de incubación, estos factores estarían actuando como moduladores positivos de la expresión de HLA-G.

ABSTRACT

HLA-G is a non-classical MHC class I molecule that modulates negatively the local immune response. This protein has restricted tissue expression in physiological conditions. However, its expression can be induced in pathological conditions such as several neoplasias. The quick growth of tumor cells creates a hypoxic environment where low oxygen levels lead to the accumulation of hypoxia inducible factors (HIF), which modulate several pro-oncogenic vias. In this context, HIF could positively modulate the HLA-G expression in tumor cells to evade the immune system. The aim is to evaluate the effect of hypoxia on HLA-G expression in a choriocarcinoma cell line called JEG-3 when were cultured with deferrioxamine 200µM (DFX an iron chelator mimicking hypoxia). The effect of DFX was analyzed and showed that HIF-1 and -2 levels increased during incubation times. Then, HLA-G expression was analyzed. The mRNA and protein levels were increased gradually in a time-dependent manner when JEG-3 cells were cultured with DFX. We can conclude that HLA-G expression was affected during hypoxia culture. Therefore, as HIFs and HLA-G levels increased gradually at longer incubation times, it could be considered that these factors were one of the positive modulators of HLA-G expression.

INTRODUCCIÓN

El antígeno leucocitario humano G (HLA-G) es una molécula MHC de tipo I no clásica que actúa como punto de control inmunológico (PCI) capaz de generar una inmunosupresión local al interactuar con sus receptores inhibitorios principales, ILT2 e ILT4, presentes en la superficie de las células inmunes. El corte y empalme alternativo del pre-ARNm de este PCI genera 7 isoformas, 4 son de membrana (G1, G2, G3 y G4) y 3 son solubles (G5, G6 y G7)¹. Su rol fue descrito originalmente en la interfaz materno-fetal, donde el trofoblasto expresa HLA-G con el fin de suprimir las respuestas inmunitarias locales en la placenta, evitando el reconocimiento del feto como tejido no propio². Dicha molécula tiene una expresión restringida en el adulto a unos pocos tejidos sanos, como la córnea, el timo, el páncreas y algunos precursores eritroides y endoteliales^{1,3}. Sin embargo, mecanismos aún no del todo claros, provocan la expresión anormal del HLA-G en ciertas patologías, como es el caso de algunas neoplasias, que lo utilizan como mecanismo de evasión del sistema inmune⁴. Las características mencionadas convierten a esta molécula en un objetivo prometedor para el desarrollo de nuevas inmunoterapias tumor-específicas con posibilidades relativamente bajas de generar efectos secundarios significativos¹.

Ahora bien, ¿qué señales están involucradas en la activación de la expresión anómala del HLA-G en las células tumorales (CT)? ¿Qué diferencia existe entre las CT y los tejidos circundantes sanos que no expresan este PCI? Es bien sabido que el microambiente tumoral suele presentar una baja tensión de oxígeno (hipoxia) debido, en gran parte, al rápido crecimiento de las CT y al flujo sanguíneo insuficiente⁵. La falta de oxígeno intracelular disminuye la hidroxilación en los residuos de prolina de los factores inducibles por hipoxia, HIF-1 y HIF-2, inhibiendo así su degradación vía proteosomal que conlleva a un aumento en su concentración citoplasmática. En esta situación, los HIF-1 y HIF-2 disponibles, son capaces de traslocar al núcleo, interactuar con los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) localizados en regiones promotoras y estimular la transcripción de una amplia serie de factores reguladores de la angiogénesis, del crecimiento y del ciclo celular, los cuales favorecen el desarrollo tumoral^{6,7}.

Se ha reportado que el gen hla-g posee varios sitios HRE en donde los HIFs podrían unirse y regular su expresión. Varios

2023 Diciembre, 13(12): 2-4

estudios in silico han hallado motivos de unión del HIF en distintas posiciones de la región promotora del HLA-G (posiciones -966 y -242)⁸ e inclusive en el exón 2 (posiciones +281 y +291)⁹. Hasta el momento, solamente se ha logrado demostrar que el principal sitio activo de unión de la isoforma HIF-1 es el HRE ubicado en el exón 2 (región codificante)⁹, aunque lo más frecuente es que los elementos regulatorios estén ubicados dentro de las regiones transcritas no traducibles del gen. Todo lo anteriormente mencionado nos lleva a creer que posiblemente haya otros sitios regulatorios HRE ubicados en las regiones 5'UTR, que incluso pueden encontrarse a varias megabases de distancia y ser funcionales¹⁰.

En base a lo expuesto el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la hipoxia sobre la expresión de HLA-G en una línea celular de coriocarcinoma humano, denominada JEG-3.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Cultivo de las JEG-3 en condiciones de hipoxia química:** se utilizó una línea celular derivada de un coriocarcinoma, llamada JEG-3, cedida por el Instituto de Química y Fisicoquímica de la Facultad de Bioquímica y Farmacia (Bs. As., Argentina, UBA - CONICET). Para evaluar el efecto que genera la hipoxia en la expresión de HLA-G, las JEG-3 fueron incubadas en medio DMEM + 10% suero fetal bovino (SFB) al cual se le adicionó un agente quelante del hierro, la deferoxamina (DFX) a 200 μ M en estufa a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ por 6, 24, 48 y 72 h. Al finalizar cada tiempo de incubación, se levantaron las células con tripsina y se tomaron muestras para el análisis a nivel proteico (tinción de proteínas de superficie y extracción de proteínas totales) y a nivel transcripcional (extracción del ARNm).

- **Citometría de flujo (CF):** Se tomaron 50.000 células/50 μ l de PBS + 0,1% albúmina de cada condición y se añadió 1 μ l del anticuerpo MEM-G9/ FITC (dil. 1/50, Invitrogen, MA1-19591). En todos los casos se realizó el control de isotipo. La citometría fue llevada a cabo en un citómetro BD Accuri y los datos analizados con el Software FlowJo.

- **Western blotting (WB):** Para la extracción de proteínas totales se utilizó el buffer RIPA (Invitrogen) e inhibidor de proteinasas, en frío. Se prepararon las muestras para la siembra en el gel SDS-page en condiciones reductoras, para la determinación de HLA-G, HIF-1 α y HIF-2 α , utilizando los siguientes anticuerpos primarios: Anti HLA-G mouse (Santa Cruz Biotech, SC-21799), anti HIF-1 α mouse (BD Biosciences, 610958), anti HIF -2 α rabbit (Abcam, AB199) y anti β -tubulina rabbit (Santa Cruz Biotech, SC-5286), a una dilución 1:1000. Se utilizó el equipo FUJI y el software Imagequant LAS4000mini.

- **Extracción ARN total y síntesis de ADNc:** Se colectaron 500.000 células en TRIzol Reagent (Invitrogen) y se llevó a cabo la extracción del ARN de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Luego, se realizó un tratamiento con DNasa I y la retrotranscripción del ARN con la M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) para la obtención del ADN copia de cada condición. Finalmente, el ADNc se diluyó 5 veces en agua desionizada y se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

- **RT-PCR semicuantitativa (RT-qPCR):** Se utilizó el termociclador Step One Plus (Applied Biosystems) y el reactivo FastStart Universal SYBR-Green Master 2X (ROX) para todas las muestras analizadas.

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa de uso libre LinReg, a partir del cual se obtuvieron las eficiencias de la reacción de PCR para cada par de oligonucleótidos y luego se calcularon los niveles teóricos iniciales de ADNc (N0) para cada condición. Se evaluó el gen housekeeping, RPL7, que fue utilizado para normalizar los niveles de expresión del gen estudiado. Secuencia de los oligonucleótidos (dirección 5'-3') utilizados en las RT-qPCR:

RPL7: Fw: 5'-AATGGCGAGGATGGCAAG // Rv: 5'-TGACGAAGGCGAAGAAGC

VEGF-A: Fw: 5'-CTTGCCTTGCTGCTCTACC //Rv: 5'-ACACAGGATGGCTTGAAG

HLA-G: Fw:5'-GGAAGAGGAGACACGGAACA //Rv:5'-CCTTTGTTTCAGCCACATTGG

- **Análisis estadístico:** Los datos obtenidos fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) en bloques aleatorizados seguido de pruebas de comparación múltiples de Dunnett. Previamente se determinó la normalidad de las variables con la prueba de Shapiro-Wilk. Los resultados son representados como la media \pm error estándar de la media, tomando como diferencias estadísticamente significativas entre grupos cuando el valor p \leq 0,05. Dicho análisis se realizó en el programa Graphpad Prism (8.0.2).

RESULTADOS

- **Estudio de las isoformas de membrana de HLA-G en las JEG-3.**

Se analizaron las proteínas HLA-G presentes en la superficie de las células JEG-3 (HLA-G1, G2, 3 y G4) mediante CF (figura 1). Los niveles de expresión a las 6 y 24 h de incubación con DFX muestran una tendencia al aumento con respecto a las JEG-3 a tiempo 0 (sin DFX), pero dicho aumento no mostró diferencias significativas. A las 48 h de incubación con DFX se observa una expresión significativamente mayor con respecto al control, donde un 70,7% de células fueron positivas. Por último, a las 72 h de incubación, observamos que los niveles de expresión comienzan a disminuir, obteniendo un 64,05% de células positivas.

Figura 1: Análisis mediante CF de las JEG-3 incubadas con DFX a diferentes tiempos.

En negro se muestra el control de isotipo IgG-FITC y en celeste las JEG-3 marcadas. *(p \leq 0.05).

2023 Diciembre, 13(12): 3-4

- Expresión de las proteínas totales de HLA-G, HIF-1 α y HIF-2 α en las JEG-3. Con el fin de corroborar el efecto simil-hipóxico de la incubación con DFX, decidimos evaluar los niveles acumulados de los HIF-1 α y HIF-2 α mediante WB.

Además, determinamos los niveles de expresión de las proteínas de HLA-G totales. Se utilizó como control de carga β -Tubulina.

En la *figura 2* se puede observar que los niveles proteicos de HIF-1 α aumentan gradualmente a mayor tiempo de incubación con DFX, hallando aumentos significativos a las 48 y 72 h con respecto al control. Los niveles de la isoforma HIF-2 α muestran un aumento a las 6 y 24 h y luego una disminución a las 48 y 72h, pero dichos valores no mostraron diferencias significativas con respecto al control. Los niveles de HLA-G totales en las células muestran un aumento gradual hasta las 72 h de incubación. En el gráfico se puede observar dicha tendencia al aumento de los niveles de expresión, pero al haber gran variabilidad entre los ensayos realizados, no obtuvimos diferencias significativas con respecto al control.

Figura 2: A) Imagen representativa de los ensayos de WB de las isoformas HIF-1 α y HIF-2 α y proteínas HLA-G totales en las células JEG-3 a distintos tiempos de incubación (0, 6, 24, 48, 72 h) con DFX. B) Análisis semi-cuantitativo de la expresión de proteínas HIF-1 α , HIF-2 α y HLA-G, normalizados con β -Tub. * (p<0,05).

- Transcripción de HLA-G y VEGF-A en las JEG-3

Para evaluar los niveles de expresión del ARNm de HLA-G y VEGF-A se realizó el análisis por RT-qPCR. Como control se utilizó el cultivo celular de JEG -3 sin tratamiento con DFX a tiempo 0 donde estas células expresan ARNm de HLA-G y VEGF-A de forma constitutiva. El VEGF-A se utilizó como control positivo del cultivo en hipoxia, ya que es bien conocido que los HIFs inducen su expresión.

Como se observa en la *figura 3*, los niveles de ARNm tanto de HLA-G como de VEGF-A en las JEG-3 muestran una tendencia al alza a las 6, 24 y 48 h de incubación con DFX con respecto al control a T=0, obteniéndose valores significativamente más elevados luego de 72 h de incubación con DFX.

Figura 3: Niveles de expresión del ARNm de HLA-G y VEGF-A en las JEG-3, a distintos tiempos de incubación con DFX (0, 6, 24, 48 y 72 h). Se grafica transcripción relativa de ARNm relativizadas con respecto al control a T=0. * (p < 0,05) y *** (p < 0,0001). n=2.

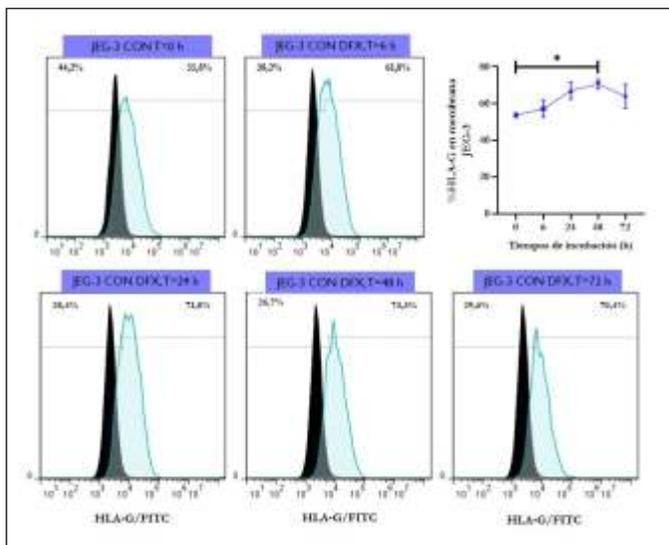


Figura 1

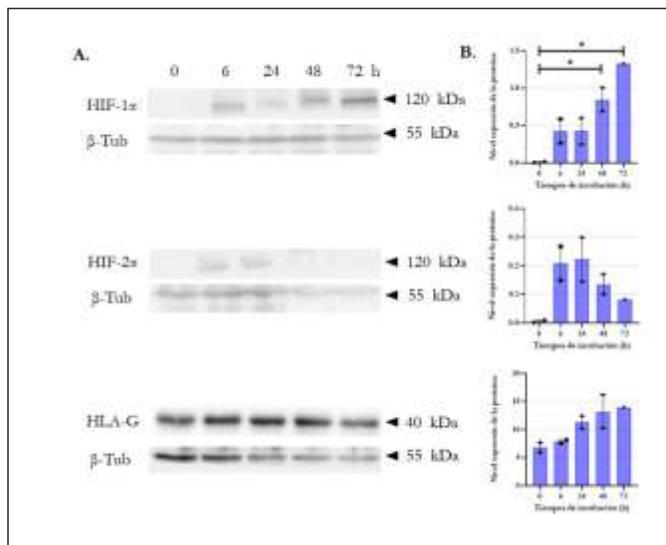


Figura 2

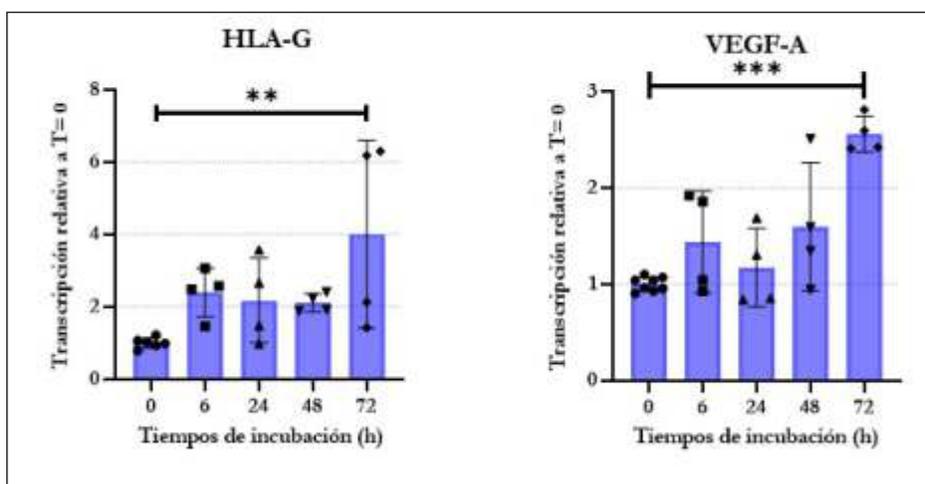


Figura 3

Discusión

En el presente trabajo nos centramos en evaluar si el microambiente hipóxico desencadena la expresión de HLA-G en la línea de células tumorales JEG-3, tanto a nivel transcripcional como traduccional. En primera instancia, verificamos la generación del estado de símil hipoxia al incubar las células con DFX mediante dos técnicas diferentes. Analizamos la acumulación de los factores de transcripción HIF-1 α y HIF-2 α por WB, y observamos que los niveles proteicos se incrementaron en las células cultivadas con DFX. Además, determinamos mediante RT-qPCR los niveles de VEGF-A utilizándolo como control positivo, ya que es bien sabido que su expresión es inducida por los HIFs 6, hallando un aumento significativo en sus niveles de ARNm a medida que aumentaban los tiempos de incubación. De esta manera, pudimos corroborar la generación del estado hipóxico en las JEG-3, encontrando acumulación de los FT de interés y viendo su funcionalidad al activar la expresión de un gen diana, como lo es el VEGF-A.

Con respecto a HLA-G, las JEG-3 incubadas con DFX presentaron niveles más elevados a nivel transcripcional y proteico en comparación con las células JEG-3 control, es decir células sin incubación con DFX. El aumento gradual en la expresión de HLA-G se correlaciona con la acumulación gradual de los HIFs a medida que aumentaban los tiempos de incubación. Esto, nos lleva a pensar que los FT HIF-1 α y HIF-2 α desempeñan un importante papel en la regulación positiva de la expresión de HLA-G en CT.

Estudios previos sobre la expresión transcripcional de HLA-G en células cultivadas en hipoxia sugieren que algunas CT que son HLA-G negativas, como las de melanoma M8 y 1074mel, experimentan una inducción en la expresión de este antígeno cuando son cultivadas con DFX, mientras que aquellas células que expresan constitutivamente HLA-G, como las líneas celulares JEG-3 y FON, disminuyen sus niveles de ARNm a las 6 h y a las 48 h de incubación respectivamente 11. Sin embargo, nuestros resultados obtenidos con las mismas células JEG-3, utilizando los mismos protocolos de cultivo celular en un ambiente hipóxico generado con la misma dosis de DFX, son opuestos a los reportes mencionados. Según una búsqueda bibliográfica realizada, es poco probable que un factor de transcripción actúe simultáneamente como activador y represor en el mismo gen y en el mismo contexto, como proponen los autores, con respecto a los HIFs y su efecto sobre el HLA-G. Las funciones de activación y represión a menudo implican mecanismos moleculares opuestos, y un FT generalmente favorecerá uno u otro dependiendo de las condiciones celulares 12. Probablemente, haya alguna diferencia en las técnicas utilizadas o en la medición que explique estos resultados disímiles.

En conclusión, podemos decir que ambos FT analizados, HIF-1 α y HIF-2 α , podrían ser moduladores positivos en la transcripción de HLA-G. Sería interesante continuar con las investigaciones para dilucidar si dichos factores son los principales responsables de generar la neo-expresión de HLA-G en las CT. Comprender el funcionamiento y expresión de HLA-G en el desarrollo tumoral permitirá el desarrollo de nuevas inmunoterapias contra las CT más invasivas y metastásicas, y que además, tengan pocos efectos secundarios indeseados debido a la baja expresión en los tejidos adultos sanos.

Referencias

1. Carosella, E. D., Rouas-Freiss, N., Tronik-Le Roux, D., Moreau, P. & LeMaoult, J. HLA-G. An Immune Checkpoint Molecule. *Advances in Immunology* vol. 127 (Elsevier Inc., 2015).
2. Rouas-Freiss, N., Gonçalves, R. M. B., Menier, C., Dausset, J. & Carosella, E. D. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11520–11525 (1997).
3. Lefebvre, S. et al. Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells. *Hum. Immunol.* 61, 1095–1101 (2000).
4. Krijgsman, D., Roelands, J., Hendrickx, W., Bedognetti, D. & Kuppen, P. J. K. HLA-G: A new immune checkpoint in cancer? *Int. J. Mol. Sci.* 21, (2020).
5. Schurich, A., Magalhaes, I. & Mattsson, J. Metabolic regulation of CAR T cell function by the hypoxic microenvironment in solid tumors. *Immunotherapy* 11, 335–345 (2019).
6. Wierzbicki, P. M. et al. Prognostic significance of VHL, HIF1A, HIF2A, VEGF-A and p53 expression in patients with clear - cell renal cell carcinoma treated with sunitinib as first - line treatment. *Int. J. Oncol.* 55, 371–390 (2019).
7. Carroll, V. A. & Ashcroft, M. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert Rev. Mol. Med.* 7, 1–16 (2005).
8. Castelli, E. C., Veiga-Castelli, L. C., Yaghi, L., Moreau, P. & Donadi, E. A. Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. *J. Immunol. Res.* 2014, (2014).
9. Yaghi, L. et al. Hypoxia inducible factor-1 mediates the expression of the immune checkpoint HLA-G in glioma cells through hypoxia response element located in exon 2. *Oncotarget* 7, 63690–63707 (2016).
10. Schödel, J. et al. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood* 117, e207–e217 (2011).
11. Mouillot, G. et al. Hypoxia Modulates HLA-G Gene Expression in Tumor Cells. *Hum. Immunol.* 68, 277–285 (2007).
12. Boyle, P. & Després, C. Dual-function transcription factors and their entourage: Unique and unifying themes governing two pathogenesis-related genes. *Plant Signal. Behav.* 5, 629–634 (2010).