

Subprojetc 4: Study of the expression of HLA-G and other immunoregulatory molecules in selected tumor.

Investigator: *Eduardo Antonio Donadi*

Abstract

The genes of the Major Histocompatibility Complex (MHC) encode many molecules involved in antigen presentation (classical class I antigens HLA-A, B and C II HLA-DR, DQ) and in regulating the immune response (non-classical antigens class I HLA-E, F and G) having an important role in the antitumor response. Tumor cells have developed various evasion mechanisms against the immune response, including decreased expression of classical histocompatibility molecules and thereby escape the cytotoxic activity of cytotoxic T cells, and also increasing the expression of non-classical histocompatibility molecules escaping the action of Natural Killer [1] cells. Of these, the most well studied molecule in tumors is HLA-G, which has been evaluated in over a hundred types of tumors, inhibiting the functions of various cells of the immune system [2]. However, the mechanisms associated with modulation of histocompatibility molecules on cancer remain unknown. Classical and nonclassical histocompatibility genes exhibit shared and distinct gene regions. In terms of variability, the coding region of non- classical genes have limited HLA polymorphism in comparison to the classical class I genes. Single nucleotide variations (SNVs) along the coding region of non-classical genes (especially in the regions of exons 2, 3 and 4) accounts for approximately 50 alleles, whereas thousands of alleles are observed for classical genes (IMGT - International Immunogenetics Information System, July 2014,<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>). In contrast, the control regions of classical genes have not been well studied, exhibiting little polymorphism in relation to the control regions of non-classical genes The most studied non-classical gene is HLA-G, for which many polymorphic sites have been described, located in regions that are close or coincide with regulatory elements of the gene. At the promoter region are described at least 29 SNPs [3-6] and the 3' untranslated region (3'UTR), at least eight sites of variability are reported [7-9]. This genetic variability has importance in gene expression by modifying the affinity of transcription factors to the promoter region and by modulating the efficiency of binding of microRNAs at the 3'UTR of the primary transcript. Using in silico studies, we described the differential action of several microRNAs at the HLA-G 3'UTR [10] and, recently, we described several gene segments that may be targeted by the hypoxic factor 1 (HF-1), which is reported to be induced in several tumors [11].

Besides histocompatibility genes, other genes that control the immune response, including PD-1, CTLA-4, galectin-3 and Foxp3 are also described that have an important role on cancer development or cancer control.

Considering that: i) our research group has pioneered the study of the genetic variability of genes in several non-classical world populations and diseases, ii) there are only a few isolated SNVs in the HLA genes in association studies with tumors, as well as other regulatory genes of the immune response, iii) the simultaneous

analysis of regulatory elements in gene expression associated with the structural analysis of gene control regions can define differential patterns of gene modulation in tumors, this study has the general objective to study the regulation process histocompatibility genes and other modulators of the immune response in several tumors.

Goals

Perform the complete typing (promoter region, coding and 3'UTR) of classical histocompatibility (HLA-A, B and C) and non-classical (E, F, G) genes, and analyze the expression of immunoregulatory molecules (HLA-G, PD-1, CTLA-4) in several types of tumors, including sarcomas, lymphomas or stage IV melanoma before and after treatment (chemotherapy, immunotherapy and hyperthermia).

Specific Goals

- 1- Characterize the structure (promoter region, coding and 3'UTR) of immunoregulatory HLA-A, B,C,E, F,G, PD-1, CTLA-4, Foxp3, Galectin 3 genes in patients with sarcomas, lymphomas or stage IV melanoma using next-generation sequencing;*
- 2 Based on the differentially expressed transcripts, described in sub-project 1.1 ("Analysis of the genetic heterogeneity of the tumor cell"), perform in vitro and in silico studies to assess the differential action of transcription factors and microRNAs, targeting the gene control regions; i. e., promoter and 3'UTR, respectively;*
- 3- Analyze the differential gene expression and the expression of immunoregulatory molecules (HLA-E, F, G, PD-1, Foxp3, and CTLA-4) on tumor cell lines sarcomas, lymphomas or stage IV melanoma undergoing hyperthermia;*
- 4- Assess the expression of classical histocompatibility molecules (HLA-A, B and C) and non-classical (E, F, G) on tumor stem cells and in tumor niches;*
- 5- Evaluate the differential gene expression and antigenic expression of immunoregulatory molecules (HLA-G, PD-1, CTLA-4) in tumor biopsies from patients with sarcoma, melanoma or lymphoma grade IV, before and after treatment;*
- 6 Assess the concentration of soluble HLA-G (sHLA-G) molecule in plasma of patients with sarcoma, melanoma or lymphoma grade IV, before and after treatment.*

Implementation schedule

Goals	Semesters											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2												
3												
4												
5												
6												

Researchers

Celso Teixeira Mendes-Júnior

Fabício César Dias

Thaís Arns

Eric Cruz Castelli

Kelen Malmegrim de Farias

Wilson Araújo

References

Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, et al. (2011) Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci* 68: 369-395.

Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J, Rouas-Freiss N (2008) HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol* 29: 125-132.

Moreau P, Flajollet S, Carosella ED (2009) Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. *J Cell Mol Med* 13: 2973-2989.

Hviid TV, Rizzo R, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR (2006) Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. *Hum Immunol* 67: 53-62.

Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, et al. (2003) Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *Am J Hum Genet* 72: 1425-1435.

Castelli EC, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, Moreau P, Donadi EA (2014) Transcriptional and Posttranscriptional Regulations of the Gene. *J Immunol Res* 2014: 734068.

Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NH, de Albuquerque RS, Muniz YC, et al. (2010) The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun* 11: 134-141.

Castelli EC, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Roger M, Moreau P, et al. (2011) A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution. *Mol Biol Evol* 28: 3069-3086.

Sabbagh A, Luisi P, Castelli EC, Gineau L, Courtin D, et al. (2014) Worldwide genetic variation at the 3' untranslated region of the HLA-G gene: balancing selection influencing genetic diversity. *Genes Immun* 15: 95-106.

Castelli EC, Moreau P, Oya e Chiromatzo A, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, et al. (2009) In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Hum Immunol* 70: 1020-1025

Yaghi L, Donadi EA, Moreau P. Hypoxie et régulation de l'expression de la molécule HLA-G dans le glioblastome. Tese de PHD da aluna Layale Yaghi. Unioversité Paris-Diderot. Setembro de 2013. (Manuscrito em preparação)

Subprojeto 4: Estudo a expressão do HLA-G e outras moléculas imunorregulatórias em tumores selecionados

Pesquisador Responsável: *Eduardo Antonio Donadi*

Introdução

Os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) codificam diversas moléculas envolvidas na apresentação de antígenos (antígenos clássicos de classe I HLA-A, B e C e II HLA-DR, DQ) e na regulação da resposta imune (antígenos não clássicos de classe I HLA-E, F e G), tendo papel importante na resposta antitumoral. As células tumorais desenvolvem vários mecanismos de evasão da resposta imunitária, incluindo diminuição da expressão das moléculas clássicas de histocompatibilidade e, com isso, escapam da ação citotóxica de das células T citotóxicas e, ainda, aumentam a expressão de moléculas não clássicas de histocompatibilidade, escapando da ação das células Natural Killer [1]. Dessas, a molécula mais bem estudada em tumores é o HLA-G, cuja expressão já foi descrita em mais de cem tipos de tumores, inibindo as funções de diversas células do sistema imune [2]. No entanto, os mecanismos associados com a modulação das moléculas de histocompatibilidade em neoplasias ainda permanecem desconhecidos. As regiões gênicas apresentam características compartilhadas e outras distintas nos genes clássicos e não clássicos de histocompatibilidade. Em termos de variabilidade genética, as regiões codificadoras dos genes não clássicos possuem polimorfismo limitado em comparação aos genes HLA de classe I clássicos. Variações nucleotídicas pontuais (SNPs), distribuídas pela região codificadora dos genes não clássicos (principalmente nas regiões dos éxons 2, 3 e 4), determinam apenas dezenas de alelos, ao passo que para os genes clássicos determinam milhares de alelos (IMGT – *International Immunogenetics Information System*, Julho de 2014, <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>). Em contraste, as regiões controladoras dos genes clássicos são pouco estudadas e, a mais bem estudada entre os não clássicos, é a do *HLA-G*. Nessas regiões, muitos sítios polimórficos são descritos, localizados em regiões que estão próximas ou coincidem com elementos regulatórios do gene. Na promotora, são descritos pelo menos 29 SNPs [3-6] e na região 3' não traduzida (3'NT), pelo menos 8 sítios de variabilidade são relatados [7-9]. Essa variabilidade genética tem importância na expressão do gene, por um lado, modificando a afinidade dos fatores de transcrição à região promotora e, por outro lado, modulando a eficiência de ligação de microRNAs na região 3'NT do transcrito primário. Em estudo in silico, descrevemos a ação diferencial de diversos microRNAs na região 3'NT do gene *HLA-G* [10] e recentemente, descrevemos que o fator de hipóxia 1, usualmente induzido em tumores, apresenta diversos sítios de ação na região promotora do gene *HLA-G*, induzindo sua expressão [11].

Além dos genes de histocompatibilidade associados com modulação da resposta imune, outros genes também codificam moléculas que controlam a

resposta imune, incluindo as que se expressam em superfícies celulares (PD-1, CTLA-4, galectina-3) e intracelulares (Foxp3).

Considerando que, i) o nosso grupo de pesquisa tem sido pioneiro no estudo da variabilidade genética de genes não clássicos em diversas populações mundiais e em doenças, ii) existem apenas estudos isolados de alguns SNPs nos genes HLA em associação com tumores, assim como em outros genes reguladores da resposta imune, iii) a análise simultânea dos elementos de regulação da expressão gênica associada com a análise estrutural dessas regiões de controle gênico possa definir padrões diferenciais de modulação gênica em tumores, este estudo tem como objetivo geral estudar o processo de regulação de genes de histocompatibilidade e de outros moduladores da resposta imune em tumores.

Objetivo:

Realizar a tipificação do gene completo (região promotora, codificadora e 3' não- traduzida) de moléculas de histocompatibilidade clássicas (HLA- A, B e C) e não-clássicas (E, F e G), e análise da expressão de moléculas imunorreguladoras (HLA-G, PD-1, CTLA-4) em sarcomas, melanoma grau IV ou linfomas, antes e após tratamento quimioterápico associado a hipertermia e imunoterapia.

Metas

- 1. Realizar a tipificação dos genes (região promotora, codificadora e 3' não-traduzida) que codificam as moléculas de histocompatibilidade (HLA-A,B e C e as não-clássicas HLA-E, F e G) e de outras moléculas de regulação da resposta imune (PD-1, CTLA-4, galectina 3 e Foxp3) em pacientes com sarcomas, melanoma grau IV ou linfomas, usando sequenciamento de nova geração;*
- 2. Com base nos transcritos diferencialmente expressos, descritos no subprojeto 1.1 (“Análise da heterogeneidade genética das células tumorais”), realizar estudos in silico e in vitro para avaliar a ação diferencial de fatores de transcrição e microRNAs nas regiões controladoras do gene, promotora e 3'NT, respectivamente;*
- 3. Analisar a expressão gênica diferencial e a expressão de moléculas imunorreguladoras (HLA-E, F, -G, PD-1, CTLA-4 e Foxp3) em linhagens celulares tumorais sarcomas, melanoma grau IV ou linfomas, submetidas à hipertermia;*
- 4. Avaliar a expressão de moléculas de histocompatibilidade clássicas (HLA-A, B e C) e não-clássicas (E, F e G) em células-tronco tumorais e em seus nichos tumorais;*
- 5. Avaliar a expressão gênica diferencial e a expressão antigênica de moléculas imunorreguladoras (HLA-G, PD-1, CTLA-4) em biópsias tumorais de pacientes com sarcoma, melanoma grau IV ou linfomas, antes e após tratamento;*
- 6. Avaliar a concentração da molécula HLA-G solúvel (sHLA-G) no plasma de pacientes com sarcoma, melanoma grau IV ou linfomas, antes e após tratamento.*

Cronograma de execução referente a 6 anos de projeto

Metas	Semestres											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2												
3												
4												
5												
6												

Pesquisadores

Celso Teixeira Mendes-Júnior
Fabrício César Dias
Thaís Arns

Eric Cruz Castelli
Kelen Malmegrim de Farias
Wilson Araújo

Referências

- Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, et al. (2011) Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci* 68: 369-395.
- Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J, Rouas-Freiss N (2008) HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol* 29: 125-132.
- Moreau P, Flajollet S, Carosella ED (2009) Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. *J Cell Mol Med* 13: 2973-2989.
- Hviid TV, Rizzo R, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR (2006) Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. *Hum Immunol* 67: 53-62.
- Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, et al. (2003) Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *Am J Hum Genet* 72: 1425-1435.
- Castelli EC, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, Moreau P, Donadi EA (2014) Transcriptional and Posttranscriptional Regulations of the Gene. *J Immunol Res* 2014: 734068.
- Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NH, de Albuquerque RS, Muniz YC, et al. (2010) The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun* 11: 134-141.
- Castelli EC, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Roger M, Moreau P, et al. (2011) A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution. *Mol Biol Evol* 28: 3069-3086.

- Sabbagh A, Luisi P, Castelli EC, Gineau L, Courtin D, et al. (2014) Worldwide genetic variation at the 3' untranslated region of the HLA-G gene: balancing selection influencing genetic diversity. *Genes Immun* 15: 95-106.
- Castelli EC, Moreau P, Oya e Chiromatzo A, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, et al. (2009) In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Hum Immunol* 70: 1020-1025
- Yaghi L, Donadi EA, Moreau P. Hypoxie et régulation de l'expression de la molécule HLA-G dans le glioblastome. Tese de PHD da aluna Layale Yaghi. Unioversité Paris-Diderot. Setembro de 2013. (Manuscrito em preparação)