

РОЛЬ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА И ЕГО ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ IDO МОНОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА

© 2018 г. С. А. Заморина, В. П. Тимганова, М. С. Бочкова, П. В. Храмцов, М. Б. Раев

ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, филиал «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук», Пермь, Россия

Поступила: 08.05.2018. Принята: 22.06.2018

Изучали роль хорионического гонадотропина (ХГ) и пептидных фрагментов его β -субъединицы (LQGV, AQGV, VLPALP) в регуляции экспрессии индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) активированными моноцитами человека в системе *in vitro*. Установлено, что ХГ (20 мкг/мл) стимулировал экспрессию IDO как в LPS-, так и в IFN- γ -индуцированных моноцитах. В то же время, пептиды AQGV, LQGV (20 мкг/мл) стимулировали только LPS-индуцированную экспрессию IDO, а пептид VLPALP (20 мкг/мл) стимулировал только IFN- γ -индуцированную экспрессию IDO. Одновременно, пептиды (AQGV, VLPALP), повышали продукцию IL-1 β моноцитами в условиях LPS-стимуляции, в то время как ХГ не оказывал самостоятельного эффекта. В целом, как ХГ, так и пептидные фрагменты его β -субъединицы, повышали экспрессию IDO моноцитами, что вносит свой вклад в формировании периферической иммунной толерантности

Ключевые слова: хорионический гонадотропин, регуляторные пептиды (LQGV, AQGV, VLPALP), индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), иммунная толерантность, моноциты

DOI: 10.31857/S102872210002400-5

Адрес: 614081, Пермский край, г. Пермь, ул. Голева, д. 13, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук», Заморина Светлана Анатольевна.

Тел.: +79194737737, 8(342)2807794. E-mail: mantissa7@mail.ru

Авторы:

Заморина С. А., д.б.н., в.н.с. лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

Тимганова В. П., к.б.н., м.н.с. лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь Россия;

Бочкова М. С., к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

Храмцов П. В., к.б.н., м.н.с. лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

Раев М. Б., д.б.н., в.н.с. лаборатории экологической иммунологии «ИЭГМ УрО РАН», Пермь Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Активность индоламин-2,3-диоксигеназы (indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO, КФ 1.13.11.52) является одним из ключевых факторов, формирующих иммунную толерантность [1]. Экспрессия IDO наблюдается в большинстве органов и тканей, включая хорион, плаценту и децидуальную оболочку, а также в антигенпрезентиру-

ющих клетках (APC) [2]. В последнее время интерес к IDO связан с участием фермента в биологии T-регуляторных лимфоцитов (Treg). Основная функция Treg направлена на подавление избыточных иммунных процессов и контроль над формированием иммунной толерантности.

Одним из механизмов реализации супрессорной активности Treg является контакт молекул CTLA-4 с лигандами CD80/CD86 на поверхности APC, после которого происходит усиление экспрессии IDO в последних [3]. В целом, изучение факторов, регулирующих экспрессию IDO, представляет собой перспективное направление в современной иммунологии.

ХГ является основным белковым гормоном беременности, максимальная концентрация которого (≈ 100 МЕ/мл) совпадает с экспрессией антигенов МНС I класса на клеточной поверхности эмбриона (I триместр), распознавание которых, как правило, приводит к процессам иммунного отторжения. ХГ позиционируется как ключевой фактор индукции иммунной толерантности во время беременности [4]. Кроме этого, описаны удачные попытки применения

ХГ в терапии состояний «трансплантат против хозяина», причем улучшение состояния пациентов сопровождалось повышением экспрессии IDO мононуклеарными клетками [5].

Известно, что применение пептидов, гомологичных по строению пептидам β -субъединицы ХГ, способно подавлять воспалительные реакции [6], причем с позиции терапевтического потенциала наиболее эффективны пептиды LQGV, AQGV, VLPALP [7]. Ранее уже были продемонстрированы иммуномодулирующие эффекты LQGV, AQGV, VLPALP на уровне регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов [8]. Так, было установлено, что как ХГ и его пептидные фрагменты усиливают дифференцировку CD4⁺-клеток в функционально активные Treg. Учитывая функциональную взаимосвязь между Treg и IDO, представлялось важным исследовать роль вышеназванных пептидов в регуляции экспрессии IDO.

Таким образом, **целью** настоящей работы явилась сравнительная оценка роли ХГ и пептидов β -субъединицы ХГ (LQGV, AQGV, VLPALP) в регуляции экспрессии IDO моноцитами человека в системе *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальная работа проводилась согласно Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Исследовали периферическую кровь небеременных женщин репродуктивного возраста (n=7), находящихся в фолликулярной фазе менструального цикла (4–7 день). Суспензию мононуклеаров получали центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина (1.077 г/см³). Далее полученную суспензию мононуклеаров инкубировали с гормоном и пептидами в плоскодонном 96-луночном планшете (1×10⁶/мл) в полной питательной среде (ППС): RPMI-1640 с 10% ЭТС («Sigma», США), 10 мМ Hepes («ICN Pharmaceuticals», США), 2 мМ L-глутамин («ICN Pharmaceuticals») и 100 мкг/мл гентамицина («KRKA», Словения) – в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂. Для индукции экспрессии IDO в культуры вносили липополисахарид (LPS) (100 нг/мл, «Sigma», США) или интерферон- γ (IFN- γ) (10 нг/мл, «Вектор Бест», Россия). Гормон (ХГ, «Московский эндокринный завод», Россия) применяли в концентрациях 10 МЕ/мл (2 мкг/мл) и 100 МЕ/мл (20 мкг/мл), отражающих уровень гормона во II–III и I триместрах

беременности, соответственно [9]. Синтетические пептиды (LQGV, AQGV, VLPALP (ООО «АТГ Сервис ген», г. С.-Петербург)) применяли в терапевтической концентрации 20 мкг/мл [6]. В контрольные пробы вместо гормона и пептидов добавляли равный объем ППС.

Окрашивание антителами осуществляли согласно методике производителя моноклональных антител (FITC anti-human CD14, clone HCD14 «BioLegend», США, PE anti-human IDO, clone eyedio «eBioscience», США). Окрашивание на IDO осуществляли после пермеабиллизации клеток (буфер «BioLegend», США). Учитывая, что присутствие LPS и IFN- γ может модулировать экспрессию молекулы CD14 на моноцитах и макрофагах [10], окрашивание моноклональными антителами к данному маркеру проводили только для подтверждения положения на графике светорассеяния моноцитарного гейта и контроля выделения из периферической крови достаточного количества моноцитов. Результаты представляли в виде процента IDO-позитивных клеток внутри гейта моноцитов. Фенотип клеток оценивали методом проточной цитометрии на цитофлюориметре (FACSCalibur «Becton Dickinson», США), полученные данные обрабатывали в «Kaluza Flow Cytometry Analysis v.1.2».

В супернатантах LPS-индуцированных клеточных культур оценивали уровень цитокинов IL-1 β и IL-6 иммуноферментным методом, при помощи наборов «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия), оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм на многоканальном спектрофотометре Biohit BP 800 («Bio-Tek Instrumens, Inc.», США).

При помощи вариационной статистики, для переменных, представляющих анализируемую выборку, вычислялись арифметическое среднее и ошибка вычисления среднего ($M \pm m$). О достоверности межгрупповых различий судили с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. В ряде случаев рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона. Для статистической проверки на соответствие закону нормального распределения применяли критерий Шапиро-Уилка. Проверка статистических гипотез осуществлялась при критическом уровне значимости $P \leq 0,05$. Расчеты проводились в Statistica 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При оценке влияния ХГ и его коротких пептидов на экспрессию IDO использовали индук-

торы (LPS и IFN-γ), поскольку спонтанный уровень экспрессии этого фермента в клетке крайне низок [11]. В нашем исследовании менее 2% (1,67±0,83) клеток экспрессировали IDO без индукторов. В результате изучения эффектов ХГ на экспрессию IDO установлено, что гормон в высокой концентрации (20 мкг/мл), соответствующей таковой I триместру, повышает экспрессию IDO как в LPS-, так и в IFN-γ индуцированных пробах (рис. 1а, б). Таким образом, показана способность ХГ стимулировать экспрессию IDO моноцитами женщин, что в ситуации *in vivo* способствует формированию периферической толерантности в период гестации.

Установлено, что пептиды β-субъединицы ХГ (AQGV, LQGV) повторяют стимулирующие эффекты гормона в отношении экспрессии LPS-индуцированной IDO (рис. 1а). В то же время, не выявлено достоверного эффекта пептида VLPALP на LPS-индуцированную экспрессию IDO. В отношении IFN-γ-индуцированных проб показано, что пептид VLPALP оказывал стимулирующий эффект на экспрессию IDO, в то время как AQGV и LQGV не влияли на исследуемый показатель (рис. 1б). Важно отметить, что не выявлено корреляционной зависимости между стимулирующими эффектами ХГ и пептидов, что свидетельствует о разных механизмах их действия.

Учитывая тот факт, что ферментативная активность IDO одновременно является внутриклеточным механизмом защиты от ряда патогенов, в супернатантах суточных культур LPS-инду-

Таблица 1. Влияние ХГ и олигопептидов β-субъединицы ХГ на продукцию цитокинов LPS-индуцированными моноцитами (M±m, n=7)

| Экспериментальное воздействие | IL-1β пг/мл | IL-6 пг/мл |
|-------------------------------|----------------|---------------|
| Контроль | 728,01±3,12 | 609,18±0,26 |
| ХГ 2 мкг/мл | 670,93±3,09 | 606,30±1,33 |
| ХГ 20 мкг/мл | 770,23±3,53 | 631,51±1,47 |
| AQGV (20 мкг/мл) | 841,90±3,74* | 603,89±1,46 |
| LQGV (20 мкг/мл) | 762,50±3,54 | 566,23±1,30 |
| VLPALP (20 мкг/мл) | 817,15±3,44* | 580,98±1,04 |

Примечание: *—достоверные по t-критерию Стьюдента (p<0,05) различия с контролем

цированных клеток оценивали уровень провоспалительных цитокинов — IL-1β и IL-6. Эти цитокины играют ключевую роль в индукции и поддержании процессов воспаления, осуществляя антимикробную защиту.

Установлено, что исследуемые олигопептиды (AQGV, VLPALP) повышали продукцию IL-1β моноцитами в условиях стимуляции клеток LPS, в то время как ХГ не оказывал самостоятельного эффекта (табл. 1). Не выявлено достоверных эффектов ХГ и олигопептидов на продукцию IL-6 моноцитами в аналогичных условиях (табл. 1). Важно отметить, что в данном случае именно олигопептид AQGV одновременно стимулировал IDO и продукцию IL-1β, что в совокупности реализует антимикробную защиту против внутриклеточных инфекций.

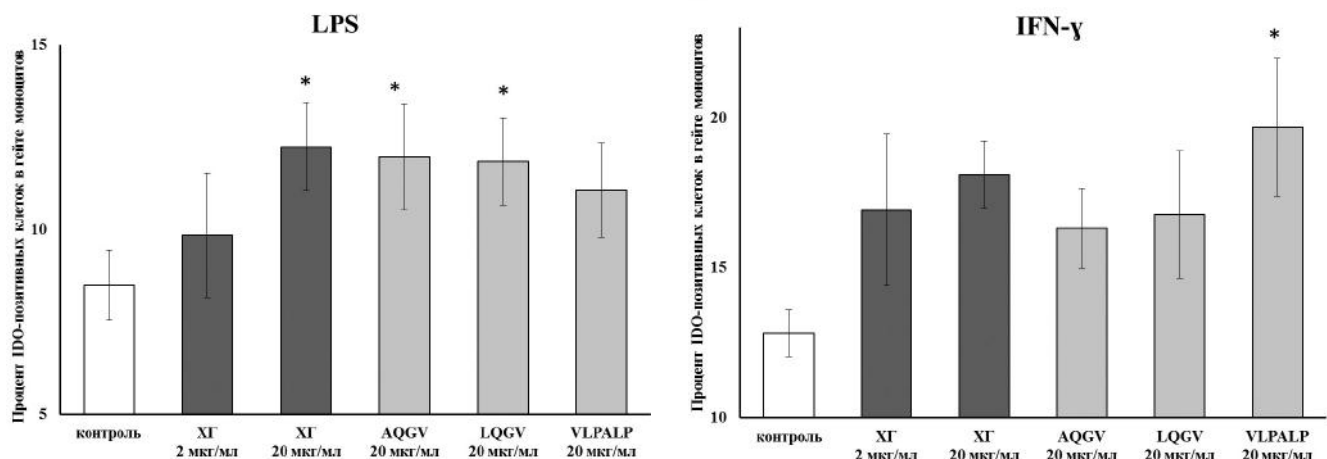


Рис. 1. а) Влияние ХГ и пептидов β-субъединицы ХГ на экспрессию IDO LPS-индуцированными моноцитами. б) Влияние ХГ и пептидов β-субъединицы ХГ на экспрессию IDO IFN-γ-индуцированными моноцитами

Примечание: по оси абсцисс — экспериментальное воздействие; по оси ординат — процент моноцитов, экспрессирующих IDO; * — p < 0.05 по u-критерию Манна-Уитни по отношению к контролю (белые столбики, n=7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашем исследовании олигопептиды AQGV, VLPALP продемонстрировали провоспалительный эффект, стимулируя продукцию IL-1 β что оказалось довольно неожиданным. Так, известно, что в ситуации *in vivo* эти пептиды оказывают противовоспалительный эффект [6, 7]. Продемонстрированное противоречие свидетельствует о том, что процессы *in vivo* более многофакторные, и могут отличаться от результатов *in vitro*. Кроме этого, важно отметить, что ХГ не оказывал самостоятельного эффекта на продукцию IL-1 β в аналогичных условиях, что свидетельствует о разных механизмах действия ХГ и его фрагментов.

Как уже было сказано выше, экспрессия IDO в APC приводит к активации Treg. Ранее нами было показано, что как ХГ, так и пептиды (LQGV, AQGV, VLPALP) способствуют направленной дифференцировке CD4⁺-лимфоцитов в Treg и стимулируют их функциональную активность, ассоциированную с экспрессией CTLA-4 [8]. Контакт молекул CTLA-4 с лигандами APC CD80/CD86, приводит к усилению экспрессии IDO в последних. Активация IDO, в свою очередь, ведет к гибели цитотоксических лимфоцитов вследствие дефицита необходимого для их активности L-триптофана и выделения токсичных продуктов его деградации [1]. В целом, регуляция активности IDO имеет значение в процессах отторжения трансплантата и в патогенезе аутоиммунных заболеваний. В заключение хотелось бы отметить, что поиск биологических эффектов коротких пептидных фрагментов, относящихся к коротким линейным мотивам (Short Linear Motifs, SLiMs) является новой стратегией создания фармакологических препаратов [12]. В перспективе SLiMs представляют собой новый класс препаратов, способных модулировать внутримолекулярные и межмолекулярные протеиновые связи [13]. Анализ аминокислотных последовательностей LQGV, AQGV, VLPALP на соответствие критериям SLiMs (<http://fasta.bioch.virginia.edu>) показал, что только пептид VLPALP может рассматриваться в этом контексте.

Таким образом, установлено, что пептиды β -субъединицы ХГ (LQGV, AQGV, VLPALP) стимулируют экспрессию IDO моноцитами, способствуя, таким образом, формированию периферической иммунной толерантности. Так как представленные пептиды являются продуктами естественного катаболизма молекулы ХГ, полученные результаты расширяют наши представ-

ления о роли пептидома в регуляции иммунной системы. Помимо этого, полученные данные открывают перспективы для применения исследуемых пептидов (LQGV, AQGV, VLPALP) в клинической практике для терапии аутоиммунных и аллоиммунных заболеваний.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках государственного задания, N госрегистрации темы: 01201353248

Авторы благодарят д.б.н. Молдогазиеву Н. Т. за помощь в анализе аминокислотных последовательностей изучаемых пептидов на соответствие критериям SLiMs.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Mellor A. L., Munn D. H. Tryptophan catabolism prevents maternal T-cell from activating lethal anti-fetal immune responses // *J. Reprod. Immunol.* 2001. 52(1–2), 5–13.
2. Koldehoff M., Cierna B., Steckel N. K., Beelen D. W., Elmaagacli A. H. Maternal molecular features and gene profiling of monocytes during first trimester pregnancy // *J. Reprod. Immunol.* 2013. 99 (1–2), 62–68.
3. Fallarino F., Grohmann U., Vacca C., Bianchi R., Orabona C., Spreca A., Fioretti M. C., Puccetti P. T-cell apoptosis by tryptophan catabolism // *Cell. Death Differ.* 2002. 9(10), 1069–1077.
4. Schumacher A. Human chorionic gonadotropin as a pivotal endocrine immune regulator initiating and preserving tolerance // *International Journal of Molecular Science.* 2017. 18, 2166.
5. Elmaagacli A. H., Ditschkowski M., Steckel N. K., Gromke T., Ottinger H., Hillen U., Baba H. A., Trenscher R., Beelen D. W., Koldehoff M. Human chorionic gonadotropin and indolamine 2,3-dioxygenase in patients with GVHD // *Bone Marrow Transplant.* 2014. 6(49), 800–805.
6. Khan N. A., Benner R. Human chorionic gonadotropin: a model molecule for oligopeptide-based drug discovery // *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.* 2011. 1(11), 32–53.
7. Van der Zee M., Dik W. A., Kap Y. S., Dillon M. J. Synthetic human chorionic gonadotropin-related oligopeptides impair early innate immune responses to *Listeria monocytogenes* in Mice // *J. Infect. Dis.* 2010. 201(7), 1072–1080.
8. Заморина С. А., Ширшев С. В. Олигопептиды β -субъединицы хорионического гонадотропина в индукции дифференцировки Т-клеток в Treg и Th17 // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2015. Т. 160. № 7. С. 84–87. [Zamorina S. A., Shirshov S. V. Oligopeptides of chorionic gonadotropin β -subunit in induction of T cell differentiation into Treg and Th17 // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2015. 160. (7), 84–87. Russian.]
9. Cole L. A. HCG, the wonder of today's science // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2012. 10, 24.

10. Landmann R. L. C., Obrist R., Obrecht J. P. Effect of cytokines and lipopolysaccharide on CD14 antigen expression in human monocytes and macrophages // J. Cell. Biochem. 1991. 47 (4), 317–329.
11. Jung I. D., Jung D., Lee C. M., Jeong J. M., Lee J. S., Park W. S., Han J., Park Y. M. Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide and interferon gamma in murine bone marrow derived dendritic cells // FEBS Lett. 2007. 7(581), 1449–1456.
12. Babu M. M., van der Lee R., Sanchez de Groot N., Gsponer J. Intrinsically disordered proteins: regulation and disease // Curr. Opin. Struct. Biol. 2011. 21(3), 432–440.
13. Tompa P., Davey N. E., Gibson T. J., Babu M. A million peptide motifs for the molecular biologist // Mol. Cell. 2014. 55(2), 161–169.

THE ROLE OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN AND ITS PEPTIDE FRAGMENTS IN THE REGULATION OF IDO EXPRESSION BY HUMAN MONOCYTES

© 2018 S. A. Zamorina, V. P. Timganova, M. S. Bochkova, P. V. Khrantsov, M. B. Rayev

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia

Received: 08.05.2018. Accepted: 22.06.2018

The role of human chorionic gonadotropin (hCG) and its peptide fragments of β -subunit (LQGV, AQQV, VLPALP) in the regulation of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) expression in human monocytes was studied *in vitro*. It is elucidated, that a high concentration of hCG (20 $\mu\text{g/ml}$) had an independent stimulatory effect on the expression of IDO in LPS-, and the IFN- γ -induced monocytes. Peptides AQQV and LQGV (20 $\mu\text{g/ml}$) also stimulated LPS-induced expression of IDO, but had no effect on IFN- γ -induced expression of the enzyme. At the same time, peptide VLPALP (20 $\mu\text{g/ml}$) provided the stimulatory effect only on the IFN- γ -induced expression of IDO. Simultaneously, peptides AQQV and VLPALP increased the production of IL-1 β monocytes under LPS-stimulation, while hCG did not exert any independent effect. Generally, hCG and oligopeptides of β -hCG subunit enhance the expression of IDO by monocytes, which eventually contributes to peripheral immune tolerance development.

Key words: chorionic gonadotropin, regulatory peptides (LQGV, AQQV, VLPALP), indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), immune tolerance, monocytes

Authors:

Zamorina S. A., ✉ PhD, MD (Biology), leading researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia;

614081, Perm, Goleva str., д. 13, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS». Phone: +79194737737, 8(342)2807794;

E-mail: mantissa7@mail.ru;

Timganova V. P., PhD (Biology), junior researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia;

Bochkova M. S., PhD (Biology), researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia;

Khrantsov P. V., PhD (Biology), junior researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia;

Rayev M. B., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Ecological Immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia.