

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Prírodovedecká fakulta**



**Autoreferát dizertačnej práce**

**Epigenetické mechanizmy v regulácii prezentácie antigénu a protinádorová imunita.**

**Epigenetic mechanisms in the regulation of antigen presentation and anti-tumour  
immunity.**

**Mgr. Veronika Vlková**

**Praha, 2014**

## **Doktorské študijné programy v biomedicíne**

*Univerzita Karlova v Prahe  
a Akadémia vied Českej republiky*

Program: Molekulárna a bunková biológia, genetika a virológia

Predseda odborovej rady: Prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školiace pracovisko: Oddelenie nádorovej imunológie, Ústav molekulárnej genetiky AV  
ČR, v. v. i.

Autor: Mgr. Veronika Vlková

Školiteľ: RNDr. Milan Reiniš, CSc.

S dizertačnou prácou je možno sa zoznámiť v príslušných knižniciach Prírodovedeckej fakulty Univerzity Karlovej v Prahe.

# Abstrakt

## **Veronika Vlková: Epigenetické mechanizmy v regulácii prezentácie antigénu a protinádorová imunita.**

Univerzita Karlova v Prahe, Prírodovedecká fakulta, Doktorské študijné programy v biomedicíne

Odbor: Molekulárna a bunková biológia, genetika a virológia

Dizertačná práca, 2014

Reverzibilné zníženie expresie MHC I na povrchu nádorových buniek je bežný spôsob, ktorým nádorové bunky unikajú imunitnému dohľadu a je často spojené s koordinovaným znížením génov antigén-prezentujúcej mašinerie. Expresia týchto génov môže byť obnovená pomocou IFN- $\gamma$ . V predkladanej práci poukazujeme na spojenie demetylácie DNA regulačných oblastí vybraných génov antigén-prezentujúcej mašinerie so zvýšenou expresiou MHC I na povrchu nádorových buniek po ovplyvnení IFN- $\gamma$ , čo znamená, že IFN- $\gamma$  by mohol plniť úlohu epigenetického agensu. Naše výsledky objasňujú úlohu metylácie DNA pri úniku nádorových buniek imunitnému dohľadu. Použitie epigenetických modifikátorov môže obnoviť expresiu MHC I a tak môžu zviditeľniť nádory pre imunitný systém. Naše dáta poskytujú tiež informácie o chemoterapii pomocou diferenciačných liečiv, prednostne pre použitie v kombinácii s ďalšími liečivami pre dosiahnutie nízkeho imunosupresívneho rozsahu mikroprostredia nádoru. Navyše, naše dáta poskytujú dôkazy, že mimo známych cieľov epigenetických agensov alebo imunoregulačných protilátok, ďalšie nešpecifické alebo nepriame účinky musia byť zvážené počas terapie. Práca detailne popisuje reverzibilné mechanizmy, ktorými nádorové bunky unikajú špecifickej imunite (s dôrazom kladeným na úlohu metylácie DNA v regulácii génovej expresie).

# Abstract

## **Veronika Vlková: Epigenetic mechanisms in the regulation of antigen presentation and anti-tumour immunity.**

Charles University in Prague, Faculty of Science, Molecular and Cellular Biology, Genetics and Virology  
Dissertation, 2014

Reversible downregulation of MHC class I expression on tumour cells, a common mechanism by which tumour cells can escape from specific immune responses, is frequently associated with coordinated silencing of antigen-presenting machinery genes. The expression of these genes can be restored by IFN- $\gamma$ . Here we describe association of DNA demethylation of selected antigen-presenting machinery gene regulatory regions upon IFN- $\gamma$  treatment with MHC class I upregulation on tumour cells thus demonstrating that IFN- $\gamma$  acts as an epigenetic modifier. Our results cast more light on the role of DNA methylation in tumour cell escape from specific immunity. Treatment of MHC class I deficient tumour by epigenetic modifiers sensitized neoplasia to the immunotherapy. Our data also provide knowledge about differentiation cancer chemotherapies, especially for use in combination with other drugs to achieve lower immunosuppressive function of tumour microenvironment. In addition, our data provide evidence that besides the known targets of epigenetic agents or immunoregulatory antibodies other unspecific or indirect activities should be considered during the therapy. The aim of whole work was to describe in detail reversible mechanisms in the tumour cell escape from specific immunity.

# Obsah

Úvod .....	2
Ciele práce .....	4
Materiál a metodika .....	5
Bunkové kultúry .....	5
Prietoková cytometria.....	5
Real-time kvantitatívna RT-PCR (qPCR).....	5
Modifikácia hydrogénsiričitanom sodným, metylačne-špecifická PCR (MSP) a hydrogénsiričitanové sekvenovanie.....	6
Chromatínová imunoprecipitácia .....	6
Transkriptómová analýza.....	6
Výsledky a diskusia .....	8
Záver .....	13
Introduction .....	14
Aims .....	16
Material and methods .....	17
Cell culture .....	17
Flow cytometry.....	17
Real-time quantitative RT-PCR .....	17
Bisulfite modification, methylation-specific PCR (MSP) and bisulfite sequencing .....	18
Chromatin immunoprecipitation assay .....	18
Transcriptome analysis .....	18
Results and discussion .....	19
Conclusion .....	24
References .....	25
Project-related list of own publications .....	29
Curriculum Vitae .....	30

## Úvod

Epigenetické zmeny, napríklad chybná metylácia DNA, plnia dôležitú úlohu v karcinogéze (Jones and Baylin, 2007; Esteller, 2008) a tiež pri úniku nádorových buniek imunitnému systému (Sigalotti et al., 2005; Tomasi et al., 2006). Zníženie expresie MHC I na povrchu nádorových buniek je bežný spôsob, ktorým nádorové bunky unikajú imunitnému dohľadu (Garrido et al., 1997; Bubeník, 2003; Reiniš, 2010; Seliger, 2012). Molekulárne defekty zodpovedné za porušenie expresie na povrchu nádorových buniek môžu byť ireverzibilné a reverzibilné (Garrido et al., 2010). Reverzibilné zníženie expresie MHC I na povrchu nádorových buniek je často spojené s koordinovaným znížením génov antigén-prezentujúcej mašinerie (Seliger et al., 2000; Garcia-Lora et al., 2003). Expresia týchto génov môže byť obnovená pomocou IFN- $\gamma$  (Gabathuler et al., 1994; Seliger et al., 2000) alebo pomocou inhibítorov DNA metyltransferáz, 5-aza-2'-deoxycytidinon (DAC) alebo 5-azacytidinom (5-azaC, 5AC) (Manning et al., 2008). Zatiaľ je veľmi málo známe o DNA demetylácii v rámci regulácie génov sprostredkovej IFN- $\gamma$ . Na základe faktu, že gény antigén-prezentujúcej mašinerie sú regulované po ošetrovaní IFN- $\gamma$  a inhibítorami DNA metyltransferáz, môžeme predpokladať, že IFN- $\gamma$  sprostredkuje reaktiváciu umlčaných génov antigén-prezentujúcej mašinerie a ďalších génov tiež prostredníctvom demetylácie DNA. Cieľom práce bolo zistiť a nájsť spojenie medzi demetyláciou DNA a zvýšenou expresiou génov antigén-prezentujúcej mašinerie sprostredkovanou IFN- $\gamma$  v MHC I deficientných myšacích nádorových líniiach, inými slovami, či by mohol IFN- $\gamma$  plniť úlohu epigenetického agensu. Tiež nás zaujímal dopad protinádorovej terapie pomocou epigenetických agensov na expresiu molekúl MHC I na povrchu MHC I deficientných nádorových buniek.

Ďalším mechanizmom, ktorým nádorové bunky unikajú imunitnému dohľadu, je nádorom indukovaná imunosupresia. Myeloidné supresorové bunky (z angl. myeloid-derived suppressor cells; MDSC) patria k hlavným zložkám, ktoré sprostredkujú nádorom indukovanú imunosupresiu (Gabrilovich et al., 2007). V posledných rokoch sa objavuje čoraz viac štúdií, ktoré zaznamenali zvýšenú hladinu regulačných T-lymfocytov pri nádorových ochoreniach (Facciabene et al., 2012; Whiteside et al., 2012). Táto skutočnosť je často zodpovedná za slabú protinádorovú efektorovú odpoveď a tak je ohrozená a znížená protinádorová imunita (Elkord et al., 2010; Nishikawa and Sakaguchi, 2010).

Práca detailne popisuje reverzibilné mechanizmy, ktorými nádorové bunky unikajú špecifickej imunite (s dôrazom kladeným na úlohu metylácie DNA v regulácii génovej expresie) a tiež sa zaoberá sledovaním expresie génov s imunosupresívnym účinkom v nádorových a imunitných bunkách počas rastu a liečby nádoru.

## Ciele práce

Záujmom práce je imunoterapia MHC I negatívnych a pozitívnych nádorov myší a regulácia protinádorovej imunity. Špeciálnu pozornosť venuje epigenetickým mechanizmom v regulácii prezentácie antigénov nádorovými bunkami, efektom epigenetických agensov na nádorové a supresorové bunky a problematike potlačenia imunosupresie v protinádorovej terapii.

Hlavnými cieľmi sú:

1. Sledovať spôsob, akým IFN- $\gamma$  zvyšuje expresiu MHC I na povrchu buniek a faktorov regulovaných IFN- $\gamma$  (z angl. interferon regulatory factors; IRF) v nádorových bunkách a či sa tu uplatňujú epigenetické mechanizmy.
2. Preskúmať, či IFN- $\gamma$  môže plniť úlohu epigenetického agensu, ktorý zvyšuje expresiu génov potrebných pre prezentáciu antigénu a kostimuláciu cez DNA demetyláciu a podrobne opísať reverzibilné mechanizmy pri úniku nádorových buniek špecifickej imunity.
3. Sledovať efekt epigenetického agensu 5-azacytidinu na expresiu MHC I na povrchu nádorových buniek a na expresiu génov antigén-prezentujúcej mašinerie u MHC I deficientných nádorov *in vivo*.
4. Sledovať ako epigenetický agens 5-azacytidin ovplyvňuje interakcie nádorových buniek a imunitného systému a ich citlivosť k imunoterapii.
5. Rozšíriť predmet záujmu o monitorovanie expresie génov s imunosupresívnym účinkom v nádorových a imunitných bunkách počas rastu a liečby nádoru.
6. Zistiť efekt protilátky PC61 (anti-CD25 Ab) na regulačné T-lymfocyty a na aktivované NKT (z angl. natural killer T cells) bunky a použitie danej protilátky v imunoterapii experimentálnych nádorov myší asociovaných s HPV16. Zistiť účinok deplécie regulačných T-lymfocytov a aktivácie NKT buniek na rast nádoru TC-1.



## **Materiál a metodika**

### ***Bunkové kultúry***

MHC I pozitívna línia nádorových buniek TC-1 bola získaná *in vitro* kotransfekciou myšacích pľúcnych buniek C57BL/6 s HPV onkogénmi E6/E7 a aktivovaným ľudským onkogénom Ha-ras (G12V) (Lin et al., 1996). Bunková línia TC-1/A9 (MHC I-deficientné) (Smahel et al., 2003) bola získaná z nádorov TC-1, ktoré vznikli v imunizovaných myšiach. Bunková nádorová línia TRAMP-C2 (ATCC kolekcia) vznikla z prostaty PB-značených C57BL/6 (TRAMP) myší (Foster et al., 1997). TC-1/A9 bunky boli udržiavané v médiu RPMI 1640, ktoré bolo obohatené s 10% fetálnym teľacím sérom (FCS), 2 mM L-glutamínom a antibiotikami; TRAMP-C2 D-MEM médium bolo obohatené s 5% FCS, Nu-sérom IV (5%; BD Biosciences, Bedford, MA, USA), 0.005 mg/ml hovädzím inzulínom (Sigma, St Louis, MO), dehydroisoandrosterónom (DHEA, 10 nM; Sigma) a antibiotikami. Oboje bunkové línie boli kultivované pri 37°C v atmosfére s 5% CO<sub>2</sub>. Bunková línia RVP3 (Bubenik et al., 1967) bola udržiavaná v médiu RPMI 1640, ktoré bolo obohatené s 10% fetálnym teľacím sérom (FCS), 2 mM L-glutamínom a antibiotikami. Bunky boli kultivované v čerstvom médiu 24 hodín, následne bolo médium vymenené a bunky rástli v médiu, do ktorého sme pridávali agensy, rIFN- $\gamma$  (50 U/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA) alebo 5  $\mu$ M 5AC (Sigma). S výnimkou kinetických štúdií, bunky boli kultivované 48 hodín a následne spracované pre ďalšie analýzy.

### ***Prietoková cytometria***

Suspenzie buniek boli pripravené z bunkových kultúr. Prietokovú cytometriu sme vykonali použitím LSR II prietokového cytometra (BD Biosciences, San Jose, CA), 10,000 buniek bolo analyzovaných. Použité protilátky, vrátane príslušnej izotypovej kontroly, sme získali z Pharmingenu, San Diego, CA.

### ***Real-time kvantitatívna RT-PCR (qPCR)***

Totálna RNA bola izolovaná pomocou RNeasy Mini Kitu (Qiagen). 1  $\mu$ g RNA bolo prepísaných do cDNA pomocou reverznej transkripcie s použitím primerov (náhodné hexamery) z GeneAmp RNA PCR Core Kitu (Applied Biosystems, Foster City, CA) v 20  $\mu$ L reakcii pri programe 42°C 30 min. Kvantifikácia produktu PCR bola uskutočnená v 10  $\mu$ L Lightcycler 480 SYBR Green I Master mixu (Roche) s použitím real-time PCR Lightcyclera (Roche). DNA bola denaturovaná pri 95°C a 2 min; potom nasledovalo 45 cyklov denaturácie pri 95°C a 25 s, väzby primerov pri 60°C a 45 s a elongácie pri 72°C a

1 min; program bol ukončený inkubáciou pri 80°C a 5 s. cDNA bola amplifikovaná pomocou špecifických primerov. Zmeny v hladine transkriptov boli kalkulované pomocou CT hodnôt štandardizovaných k  $\beta$ -actinu, ktorý bol použitý ako endogénna referenčná génová kontrola. Všetky vzorky sme pripravovali ako biologické triplikáty. Pre štatistické vyhodnotenie výsledkov z qPCR sme použili Studentov t-test. Rozdiely medzi kontrolnými a experimentálnymi vzorkami, ktoré boli v hodnote  $P < 0.05$  boli vyhodnotené ako štatisticky signifikantné. Hladiny relatívnej gébovej expzie boli prezentované ako zmeny porovnané s hladinami, ktoré sme identifikovali pri kontrolných vzorkách.

### ***Modifikácia hydrogénsiričitanom sodným, metylačne-špecifická PCR (MSP) a hydrogénsiričitanové sekvenovanie***

Celková DNA bola izolovaná s DNeasy Blood & Tissue Kitom (Qiagen). Ošetrovanie DNA s hydrogénsiričitanom sodným a metylačne-špecifická PCR (MSP) analýza špecifických oblastí promotora bola uskutočnená pomocou Bisulfite Epiect kitu (Qiagen, Hilden, Germany) podľa priloženého protokolu. V snahe identifikovať CpG ostrovy v oblastiach promotorov génov antigén-prezentujúcej mašinerie, MSP analýza bola vykonaná s primermi navrhnutými pomocou programu METHPRIMER. Teplotný program PCR bol nasledovný: 95°C 2 min., potom 35 cyklov 95°C 2 min., 55°C 2 min., 73°C 1:30 min. Na konci bola pridaná ešte jedna elongačná perióda 73°C 10 min. Produkt PCR bol analyzovaný pomocou gélovej elektroforézy. Pre hydrogénsiričitanové sekvenovanie bol navrhnutý ďalší set primerov, ktoré amplifikujú aj metylované aj nemetylované sekvencie a ktoré boli navrhnuté, aby priamo zistili nukleotidy odolné voči konverzii hydrogénsiričitanom sodným. Teplotný program PCR bol nasledovný: 95°C 5 min., potom nasleduje 25 cyklov 95°C 50 s, 58°C 2 min., 72°C 1:30 min. a nasleduje 15 cyklov 95°C 45 s, 54°C 2 min., 72°C 1:30 min. (+2 s každý cyklus). Na konci bola pridaná ešte jedna elongačná perióda 72°C 10 min. Produkty PCR boli klonované použitím kitu pGEMR-T Easy Vector System I (Promega). 11 klonov z každého zdroja DNA bolo sekvenovaných použitím verzie kitu 3.1. (Applied Biosystem, USA).

### ***Chromatínová imunoprecipitácia***

Chromatínová imunoprecipitácia (ChIP) prebehla podľa popísaného postupu (Lukas et al., 2009) s menšími zmenami.

### ***Transkriptómová analýza***

RNA bola izolovaná zo vzoriek, ktoré boli pripravené ako biologické triplikáty, pomocou

RNeasy Mini Kitu (Qiagen). 1  $\mu$ g RNA bol použitý na transkriptómovú analýzu, použitím čipov Illumina Mouse WG6 bead chips v spolupráci so servisným laboratóriom funkčnej genomiky a bioinformatiky na ústave molekulárnej genetiky v Prahe.

## Výsledky a diskusia

Nádorové bunky majú vyvinuté spôsoby ako unikat' imunitnému dohľadu a sú aktívne imunosupresívne. Zníženie expresie MHC I na povrchu nádorových buniek je bežný spôsob, ktorým nádorové bunky unikajú imunitnému dohľadu (Garrido et al., 1997; Bubeník, 2003; Reiniš, 2010; Seliger, 2012). IFN- $\gamma$  je cytokín s pleiotrovným efektom na nádorové bunky, ktorý je tiež považovaný za hlavného sprostredkovateľa efektívnej protinádorovej imunity s priamym efektom na nádorové bunky (Dunn et al., 2006). Hlavným cieľom práce bolo určiť, či IFN- $\gamma$  môže plniť úlohu epigenetického agensu, či má efekt napríklad na DNA demetyláciu príslušných regulačných oblastí génov a či je to hlavný mechanizmus, ktorým IFN- $\gamma$  zvyšuje expresiu vybraných génov v MHC I deficientných myšacích nádorových líniiach. V tejto práci sme dokázali spojitost' demetylácie DNA v promótorových oblastiach vybraných génov antigén-prezentujúcej mašinerie (*TAP-1*, *TAP-2*, *LMP-2*, *LMP-7*) po ovplyvnení IFN- $\gamma$  so zvýšenou expresiou MHC I na povrchu nádorových buniek v myšacích MHC I deficientných nádorových líniiach. Zatiaľ je veľmi málo známe o DNA demetylácii v rámci regulácie génov sprostredkovanej IFN- $\gamma$  alebo ďalšími cytokínmi. Bolo zistené, že indukcia expresie indolamín 2,3-dioxygenázy (IDO)-1 je spojená s DNA demetyláciou oblasti promótoru génu pre *IDO-1* (Xue et al., 2012). Bolo popísané, že aj ďalší cytokín dokáže navodiť demetyláciu DNA, konkrétne TGF- $\beta$  spôsobil aktívnu demetyláciu DNA a tak obnovil expresiu tumor-supresorového génu p15<sup>ink4b</sup> (Thillainadesan et al., 2012). Našou prácou sme prispeli zistením, že IFN- $\gamma$  indukovaná remodelácia chromatinu a modifikácia histónov v lokuse MHC je spojená s demetyláciou DNA v rámci tohto lokusu, čo spôsobuje expresiu mnohých génov a zvýšenie počtu molekúl MHC I na povrchu buniek. Ďalej sme zistili, že DNA demetylácia sprostredkovaná IFN- $\gamma$  je závislá na signalizácii cez JAK/STAT dráhu, pretože inhibítor Janusových kináz blokoval demetyláciu DNA a indukciu expresie MHC I na povrchu buniek. Dáta z kinetických štúdií napovedajú, že demetylácia DNA promótorových oblastí génov *TAP/LMP* bola veľmi rýchla, pretože masívna demetylácia DNA bola pozorovaná už po 6 hodinách po ošetrovaní IFN- $\gamma$ . Pre porovnanie, maximálna hladina demetylácie DNA v bunkách ošetrovaných inhibítorom DNA metyltransferáz 5AC bola pozorovaná až po 24 hodinách po ošetrovaní. Táto skutočnosť naznačuje, že proces demetylácie po ošetrovaní IFN- $\gamma$  je aktívny a nezávislý od replikácie DNA, na rozdiel od DNA demetylácie indukovanej 5-azacytidinom, ktorá je od

replikácie DNA závislá a vyžaduje inkorporáciu liečiva do DNA a blokuje metyláciu nascentného reťazca DNA kvôli inhibícii metyltransferáz (Creusot et al., 1982). Nakoniec DNA demetylácia sprostredkovaná IFN- $\gamma$  je asociovaná s acetyláciou histónu H3 v oblasti promótorov génov antigén-prezentujúcej mašínérie. V publikácii sme priniesli dáta, ktoré naznačujú, že IFN- $\gamma$  môže plniť úlohu epigenetického agensu a môže navodiť demetyláciu DNA mnohých génov, s dôrazom kladeným najmä na gény antigén-prezentujúcej mašínérie.

Epigenetické mechanizmy plnia významnú úlohu v úniku nádorových buniek pred imunitným systémom, ide napríklad o zníženú povrchovú expresiu MHC I na povrchu nádorových buniek alebo o zmenenú expresiu komponentov antigén-prezentujúcej mašínérie. Preto chemoterapia inhibítormi DNA metyltransferáz môže ovplyvniť interakciu nádorových buniek s imunitným systémom a jej citlivosť k imunoterapii. Inhibítory DNA metyltransferáz, ako 5-azacytidin, majú dobrý potenciál využitia ako chemoterapeutiká. Zvyšujú imunogenicitu nádorových buniek a tiež aj ich citlivosť ku cytotoxickým T-lymfocytom, tým pádom môžu byť použité pre kombinovanú chemoimunoterapiu. Dokázali sme, že 5-azacytidin má prídavný efekt na MHC I deficientné a pozitívne nádory v kombinácii s imunoterapiou pomocou nemetylovaných CpG oligodeoxynukleotidov (CpG ODN) alebo s bunkovou vakcínou produkujúcou IL-12. Pozorovali sme tiež zvýšenú povrchovú expresiu MHC I na povrchu nádorových buniek, ktorá bola asociovaná so zvýšenou expresiou génov antigén-prezentujúcej mašínérie a génov dráhy IFN- $\gamma$  pri nádoroch explantovaných zo zvierat ošetrených 5-azacytidinom. Toto zvýšenie korešpondovalo s DNA demetyláciou promótorových oblastí génov antigén-prezentujúcej mašínérie pri nádoroch explantovaných zo zvierat ošetrených 5-azacytidinom. Naše dáta naznačujú, že chemoterapia MHC I-deficientných nádorov s inhibítormi DNA metyltransferáz kombinovaná s nešpecifickou imunoterapiou je sľubný terapeutický postup v boji proti MHC I-deficientným nádorom.

Únik nádorových buniek môže byť sprostredkovaný tvorbou imunosupresívneho stavu v rámci mikroprostredia nádoru (Radoja et al., 2000; Radoja and Frey, 2000). Nádorové bunky sú schopné produkovať imunosupresívne faktory a tieto majú ďalší vplyv na funkciu imunitného systému (Chambers et al., 2003). Sú to napríklad imunosupresívne faktory ako vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF), transformujúci rastový faktor (TGF- $\beta$ ), galectin alebo indolamín 2,3-dioxygenáza (IDO) (Vesely et al., 2011). Regulačné T-lymfocyty a myeloidné supresorové bunky sú dve hlavné imunosupresívne populácie buniek, ktoré majú významnú úlohu v inhibícii ochrannej protinádorovej odpovede

(Schreiber et al., 2011). Nádorom indukovaná imunosupresia patrí medzi kritické mechanizmy, akými nádory unikajú imunitnému dohľadu. V ďalšej časti práce sme sa preto zaoberali monitorovaním imunosupresívneho účinku mikroprostredia nádorov. Myeloidné supresorové bunky majú tiež významnú úlohu v úniku nádorových buniek imunitnému systému a veľmi prispievajú k nádorom indukovanej imunosupresii. Bolo popísané, že MDSC indukujú poruchy T buniek cez produkciu napríklad TGF- $\beta$ , reaktívnych foriem kyslíka (ROS), oxidu dusnatého (NO) a najmä arginázy 1 (Arg-1) (Kusmartsev and Gabrilovich, 2006). Arg-1 je marker imunosupresívneho prostredia a hlavným producentom Arg-1 sú MDSC. Touto zvýšenou expresiou Arg-1 indukujú anergiu T-buniek depléciou L-arginínu, čo narúša proliferáciu T buniek a produkciu cytokínov (Rodriguez et al., 2007). Inhibícia Arg-1 môže znovu obnoviť správnu funkciu T buniek a indukovať protinádorovú odpoveď (Rodriguez et al., 2004). V predkladanej práci sme sledovali podrobne mechanizmus akumulácie MDSC po chemoterapii s CY (úloha prozápalových cytokínov) a následne identifikovať možnú imunoterapiu s cieľom zoslabiť indukovanú imunosupresiu. Úlohou bolo porovnať fenotyp a funkciu akumulovaných MDSC v slezine po terapii s CY (CY-MDSC) s tými, kde sú MDSC akumulované počas rastu nádoru TC-1 (TU-MDSC) a s tými MDSC, ktoré sú akumulované počas rastu nádoru TC-1 a nádory boli ošetrené CY, čo podporuje ich ďalšiu akumuláciu v slezine (CYTU-MDSC). Aj napriek tomu, že CY-MDSC a aj TU-MDSC podporujú rast nádorov TC-1 *in vivo*, ich fenotyp sa odlišoval. CY-MDSC populácia obsahovala vyššie percento monocytárnej populácie a táto skutočnosť bola asociovaná s nižšou expresiou imunosupresívnych génov a nižšou supresiou proliferácie T-buniek. Môžeme teda tvrdiť, že MDSC akumulované po podaní CY vykazujú viac monocytárny fenotyp ako MDSC akumulované rastúcim nádorom TC-1 a keď porovnáme ich fenotyp s ich nižšou expresiou imunosupresívnych génov, vykazujú CY-MDSC menšie supresívne vlastnosti. Fenotyp a funkcia CYTU-MDSC populácie boli medzi populáciami CY-MDSC a TU-MDSC. Ďalšou úlohou bolo zistiť účinok terapie s induktorom diferenciácie kyselinou ATRA alebo s cytokínom IL-12 na MDSC akumulované po liečbe s CY (CY-MDSC). ATRA mala účinok na diferenciáciu MDSC a inhibovala MDSC akumulované po terapii s CY. Zistili sme teda rozdiely medzi CY-MDSC a TU-MDSC a podporili sme využitie kyseliny ATRA alebo cytokínu IL-12 pre upravenie akumulácie MDSC po chemoterapii CY. Takáto modulácia MDSC kyselinou ATRA alebo cytokínom IL-12 počas chemoterapie nádorov môže zvýšiť protinádorový efekt daného chemoterapeutického agensu. Ďalšie pokusy zaoberajúce sa MDSC priniesli nové poznatky o

imunomodulačných vlastnostiach inhibítora DNA metyltransferáz 5-azacytidinu. Sľubný antagonistu akumulácie MDSC, chemoterapeutické činidlo 5-azacytidin, bol úspešne použitý v terapeutických experimentoch pri kombinovanej chemoterapii a imunoterapii. Naše výsledky naznačujú, že 5-azacytidin okrem priameho protinádorového efektu, znižuje percento MDSC akumulovaných v mikroprostredí nádoru a slezine počas rastu nádoru a chemoterapie s cyklofosfamidom. Táto skutočnosť môže byť prospešná pre výsledok danej chemoterapie. Percento MDSC v mikroprostredí nádoru a v slezinách myší s nádorom TRAMP-C2 a TC-1/A9 ošetrovaných 5-azacytidinom kleslo. Zmeny boli asociované s nižšou expresiou Arg-1 v mikroprostredí nádoru a slezinách. Ošetrovanie nádorov CY zapríčinilo ďalšiu akumuláciu MDSC v mikroprostredí nádoru a slezine. Táto akumulácia bola inhibovaná ošetrovaním 5-azacytidinom. Kombinácia CY a 5-azacytidin viedla ku zvýšenej inhibícii rastu nádoru.

V ďalšej časti práce sme sa venovali deplécii regulačných T-lymfocytov pomocou protilátky anti-CD25 mAb PC61 a jej možnému prídavnému efektu na imunoterapiu nádorov, ktorá zaciľuje NKT bunky po ich aktivácii pomocou ligandu  $\alpha$ -GalCer. Sledovali sme efekt protilátky anti-CD25 mAb PC61 na  $\alpha$ -galaktosylceramidom sprostredkovanú aktiváciu iNKT buniek a tiež účinnosť kombinácie protilátky PC61 a  $\alpha$ -GalCer proti nádorom TC-1. Aby sme podrobne preskúmali efekt deplécie regulačných T-lymfocytov pomocou protilátky anti-CD25 mAb na aktiváciu iNKT buniek, aktiváciu iNKT buniek sme sledovali v transgénnom modeli myší DEREK, v ktorých deplécii FoxP3+ regulačných T-lymfocytov dosiahneme pomocou podania diphtheria toxínu. Tento systém dovoľuje špecifickej deplécii regulačných T-lymfocytov (Lahl et al., 2007). Pri porovnaní výsledkov získaných prácou s myšami DEREK s výsledkami získanými prácou s protilátkou PC61, ktorou sme ošetrili štandardný typ myší, sme mohli vidieť efekt špecifickej deplécie Treg na aktiváciu NKT buniek od ďalších efektov protilátky PC61. CD25 je možné detekovať na povrchu aktivovaných myšacích a ľudských NKT buniek (Kim et al., 2006; Bessoles et al., 2008) a CD25 je tiež antigénom pre protilátku PC61. Protilátka PC61 ruší aktiváciu NKT buniek a inhibuje ich proliferáciu a produkciu IFN- $\gamma$  aktivovanými NKT bunkami. Naše dáta limitujú použitie protilátky anti-CD25 v štúdiách zameraných na interakciu regulačných T-lymfocytov s efektorovými bunkami.

V našej práci sme priniesli nové informácie o zmene metylačného statusu promótorových oblastí génov antigén prezentujúcej mašinerie účinkom IFN- $\gamma$ . Súčasné poznatky v danej problematike sme obohatili o dáta, ktoré naznačujú, že IFN- $\gamma$  môže plniť úlohu

epigenetického agensu a navodzuje demetyláciu DNA mnohých génov, s dôrazom kladeným najmä na gény antigén-prezentujúcej mašínérie. DNA demetylácia sprostredkovaná IFN- $\gamma$  je závislá na signalizácii cez JAK/STAT dráhu, je dynamickejšia v porovnaní s demetyláciou DNA indukovanou pomocou inhibítora DNA metyltransferáz 5-azacytidinom a v neposlednom rade je asociovaná s acetyláciou histónu H3 v oblasti promótorov génov antigén-prezentujúcej mašínérie. Zhodnotili sme efekt inhibítora DNA metyltransferáz 5-azacytidinu na MHC I deficientné a pozitívne nádory. Optimalizovali sme terapeutický protokol založený na kombinácii imunoterapie s inhibítorom DNA metyltransferáz. Podporili sme využitie induktora diferenciácie, kyseliny ATRA alebo imunostimulačného cytokínu IL-12 pre upravenie akumulácie MDSC po chemoterapii CY. Takáto modulácia MDSC kyselinou ATRA alebo cytokínom IL-12 počas chemoterapie nádorov môže zvýšiť protinádorový efekt daného chemoterapeutického agensu. Naše výsledky ďalej naznačujú, že aj 5-azacytidin znižuje percento MDSC akumulovaných v mikroprostredí nádoru a slezine počas rastu nádoru a chemoterapie s cyklofosfamidom. Táto skutočnosť môže byť prospešná pre výsledok danej chemoterapie. Keďže chemo- a imunoterapia môže indukovať negatívne regulátory imunitného systému (Treg), je cieľom ustanoviť vhodnú terapiu, ktorá by kombinovala liečbu s ošetrovaním s anti-imunosupresívnym efektom, ako napríklad depléciou regulačných T-lymfocytov. Aj napriek tomu, že použitie protilátky proti CD25 ničí regulačné T-lymfocyty, pozorovali sme priamy účinok na populáciu efektorových buniek (NKT bunky). Naše dáta limitujú použitie protilátky anti-CD25 v štúdiách zameraných na interakciu regulačných T-lymfocytov s efektorovými bunkami a sú dôležité pre optimalizáciu kombinovanej terapie zahrňujúcej elimináciu regulačných T-lymfocytov.



## Záver

Celkovo výsledky projektu, ktoré boli zahrnuté do predkladanej dizertačnej práce sú dôležité pre lepšie pochopenie mechanizmov, ktorými nádorové bunky unikajú špecifickej imunite a pre optimalizáciu kombinovaných chemo-imunoterapeutických stratégií berúcich ohľad na status MHC I na neopláziách. Dokumentujeme, že ošetrovanie MHC I deficientných nádorov IFN- $\gamma$  indukuje demetyláciu DNA promótorových oblastí génov dôležitých pre prezentáciu antigénu a tiež použitie epigenetických modifikátorov môže obnoviť expresiu MHC I a tak môžu zviditeľniť nádory pre imunitný systém. Naše dáta poskytujú informácie o chemoterapii pomocou diferenciacných liečiv, prednostne pre použitie v kombinácii s ďalšími liečivami pre dosiahnutie nízkeho imunosupresívneho rozsahu mikroprostredia nádoru. Dáta poskytujú dôkazy, že mimo známych cieľov epigenetických agensov alebo imunoregulačných protilátok, ďalšie nešpecifické alebo nepriame aktivity musia byť zvážené počas terapie. Z výsledkov vyplýva:

1. IFN- $\gamma$  môže plniť úlohu epigenetického agensu, ktorý zvyšuje expresiu génov potrebných pre prezentáciu antigénu cez DNA demetyláciu.
2. Aplikácia epigenetických agensov sensitizovala MHC I deficientné nádory k imunoterapii CpG ODN alebo IL-12 produkujúcou bunkovou vakcínou, imunoterapeutický efekt bol aspoň čiastočne sprostredkovaný CD8<sup>+</sup> bunkami.
3. Využitie kyseliny ATRA alebo IL-12 pre dosiahnutie zmien v akumulácii MDSC po chemoterapii s CY s dôrazom kladeným na preukázanie ich protinádorového efektu.
4. Epigenetický modifikátor 5AC je sľubným cytostatickým agensom, ktorý ovplyvňuje MDSC akumulujúce sa počas rastu nádorov alebo pri liečbe nádorov s CY a 5AC je schopný redukovať percento MDSC akumulovaných v mikroprostredí nádoru a slezine počas rastu nádoru a chemoterapie s CY.
5. Podanie protilátky proti CD25 (PC61) používanej pri deplícii Treg narušilo aktiváciu NKT buniek.

## Introduction

Epigenetic changes, such as aberrant DNA methylation, play important roles in carcinogenesis (Jones and Baylin, 2007; Esteller, 2008) and importantly in the tumour cell escape from anti-tumour immune responses (Sigalotti et al., 2005; Tomasi et al., 2006). MHC class I downregulation on tumour cells represents a frequent mechanism by which tumour cells can escape from anti-tumour specific immunity (Garrido et al., 1997; Bubeník, 2003; Reiniš, 2010; Seliger, 2012). The molecular defects responsible for impaired expression on the tumour cell surface can be either irreversible (“hard”) or reversible (“soft”) (Garrido et al., 2010). The latter can be associated with coordinated silencing of antigen-presenting machinery (APM) genes in tumour cells (Seliger et al., 2000; Garcia-Lora et al., 2003) and the expression of these genes can be restored by IFN- $\gamma$  (Gabathuler et al., 1994; Seliger et al., 2000) or by inhibitors of DNA methyltransferases (Manning et al., 2008). The changes in DNA methylation upon activation of the IFN- $\gamma$  signalling pathway have not been studied so far. Based on the fact that a set of the APM genes is upregulated by both IFN- $\gamma$  and DNA methyltransferase inhibitors, we have hypothesized that IFN- $\gamma$ -mediated re-activation of silenced APM and some other genes is also associated with their DNA demethylation. The objective of this study was to uncover the association of DNA methylation with IFN- $\gamma$ -mediated upregulation of genes encoding the components of APM in MHC class I-deficient murine tumour cell lines and to investigate if IFN- $\gamma$  will act as an epigenetic agent upregulating the expression of genes important for antigen presentation and costimulation through demethylation and to determine the effect of epigenetic modifiers such as inhibitors of DNA methyltransferases (DNMTi) or histone deacetylases (HDACi) on expression of the MHC class I molecules and co-stimulatory molecules on tumour cells, using an animal model for different MHC class I-expression status tumours.

Another mechanism by which tumour cells can escape from immune surveillance is tumour mediating immunosuppression. Myeloid-derived suppressor cell population (MDSC) represent one of the key players mediating immunosuppression (Gabrilovich et al., 2007). Recent years have seen a surge in studies of cancer models and in humans highlighting the elevated levels of T regulatory (Treg) cells in the tumour and/or in circulation (Facciabene et al., 2012; Whiteside et al., 2012). This often correlates with poor anti-tumour effector responses, hence compromised tumour immunity (Elkord et al.,

2010; Nishikawa and Sakaguchi, 2010).

The aim of whole work is to describe in detail reversible mechanisms in the tumour cell escape from specific immunity and monitoring genes with immunosuppressive effects in tumour and immune cells during tumour growth and treatment.

## Aims

The subject of the thesis is experimental immunotherapy MHC class I deficient or positive tumours in the murine model and regulation of anti-tumour immune response with special attention paid to the effects of epigenetic agents. The main objectives were following:

1. To uncover the epigenetic mechanisms in IFN- $\gamma$ -induced upregulation of MHC class I, costimulatory molecules and interferon regulatory factors in tumour cells.
2. To elucidate if IFN- $\gamma$  will act as an epigenetic agent upregulating the expression of genes important for antigen presentation and costimulation through demethylation and to describe in detail reversible mechanisms in the tumour cell escape from specific immunity.
3. To evaluate the therapeutic effects of the DNMTi 5-azacytidine (5AC) against experimental MHC class I deficient and positive tumours.
4. To analyze how epigenetic modifier 5-azacytidine can influence tumour cell interactions with the immune system and their sensitivity to immunotherapy.
5. To spread the subject of monitoring genes with immunosuppressive effects in tumour and immune cells during tumour growth and treatment.
6. To determine the effect of PC61 antibody on Treg or activated NKT cells, and its implication for immunotherapy of the experimental murine model of HPV16-associated tumours.

## **Material and methods**

### ***Cell culture***

MHC class I-positive cell line TC-1 was obtained by in vitro co-transfection of murine lung C57BL/6 cells with HPV16 E6/E7 and activated human Ha-ras (G12V) oncogenes (Lin et al., 1996). The TC-1/A9 (MHC class I-deficient) cell line (Smahel et al., 2003) was obtained from TC-1 tumours developed in immunized mice. The TRAMP-C2 tumour cell line (ATCC collection) was established from a prostate of a PB-Tag C57BL/6 (TRAMP) mouse (Foster et al., 1997). TC-1/A9 cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine and antibiotics; the TRAMP-C2 cells in D-MEM medium supplemented with 5% FCS, Nu-Serum IV (5%; BD Biosciences, Bedford, MA, USA), 0.005 mg/ml bovine insulin (Sigma, St Louis, MO), dehydroisoandrosterone (DHEA, 10 nM; Sigma) and antibiotics. Both cell lines were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. The RVP3 cell line (Bubenik et al., 1967) was maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine and antibiotics. Cells were cultured in fresh medium for 24 h, after which the medium was removed and the cells were grown in medium containing either rIFN- $\gamma$  (50 U/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA) or 5  $\mu$ M 5AC (Sigma). Except for the kinetic studies, cells were cultured for 48 h and harvested for analysis.

### ***Flow cytometry***

Cell suspensions were prepared from the cell cultures. Flow cytometry was performed using an LSR II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA), and 10,000 cells were counted. Antibodies used, including the relevant isotypic control, were obtained from Pharmingen, San Diego, CA.

### ***Real-time quantitative RT-PCR***

Total RNA was extracted with RNeasy Mini Kit (Qiagen). The amount of 1  $\mu$ g of RNA was reverse transcribed to cDNA using random hexamer primers from GeneAmp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) in a 20  $\mu$ L reaction volume at 42°C for 30 min. Quantification of PCR products was performed in 10  $\mu$ L of Lightcycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche) using a real-time PCR Lightcycler (Roche). DNA was denatured at 95°C for 2 min; then followed 45 cycles of denaturation at 95°C for 25 s, annealing at 60°C for 45 s, elongation at 72°C for 1 min and incubation at 80°C for 5 s. cDNAs were amplified with specific primers. Fold changes in the transcript levels were

calculated using CT values standardized to  $\beta$ -actin, used as the endogenous reference gene control. All samples were run in biological triplicates. For statistical analysis of qPCR the Student's t-test was used. Differences between experimental and control samples with  $P < 0.05$  were considered to be statistically significant. The levels of relative gene expression were presented as fold changes compared to the levels found in control samples.

### ***Bisulfite modification, methylation-specific PCR (MSP) and bisulfite sequencing***

Total DNA was extracted with DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Treatment of DNA with sodium bisulfite and methylation specific PCR (MSP) analysis of the specific promoter regions were performed with Bisulfite Epitect kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. In order to identify CpG islands within the promoter region of the antigen-processing genes, MSP analysis was performed with primers designed with the program METHPRIMER. The program for PCR was as follows: 95°C for 2 min, then 35 cycles of 95°C for 2 min, 55°C for 2 min, 73°C for 1:30 min. At the end a final extension period of 73°C for 10 min was added. The PCR products were analysed with gel electrophoresis. For bisulfite sequencing, another set of primers that amplified both methylated and unmethylated sequences were designed to directly determine the nucleotides resistant to bisulfite conversion. The program for PCR was as follows: 95°C for 5 min, then 25 cycles of 95°C for 50 s, 58°C for 2 min, 72°C for 1:30 min and then 15 cycles of 95°C for 45 s, 54°C for 2 min, 72°C of 1:30 min (+2 s every cycle). At the end, a final extension period of 72°C for 10 min was added. The PCR products were cloned using pGEMR-T Easy Vector System I (Promega). 11 clones for each of the different DNA sources were sequenced (Applied Biosystem, USA) after thermo-cycle sequencing reaction using the 3.1 version kit.

### ***Chromatin immunoprecipitation assay***

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed as described previously (Lukas et al., 2009) with minor modifications.

### ***Transcriptome analysis***

RNA was extracted from biological triplicates with RNeasy Mini Kit (Qiagen). The amount of 1  $\mu$ g of RNA was subjected to the transcriptomic analysis, using Illumina Mouse WG6 bead chips in the Genomic Core Facility at the Institute of Molecular Genetics in Prague.

## Results and discussion

Tumour cells have developed pathways to escape from immune surveillance and they are actively immunosuppressive. MHC class I downregulation on tumour cells represents a frequent mechanism by which tumour cells can escape from anti-tumour specific immunity (Garrido et al., 1997; Bubeník, 2003; Reiniš, 2010; Seliger, 2012). IFN- $\gamma$  is a cytokine with pleiotropic effects on tumour cells, which is also considered as a crucial mediator of effective anti-tumour immunity displaying direct impacts on tumour cells (Dunn et al., 2006). The principal aims of our study were to determine whether IFN- $\gamma$  acts as an epigenetic modifier inducing DNA demethylation and whether the mechanisms by which IFN- $\gamma$  upregulates the expression of selected genes in MHC class I-deficient tumour cells and thus modifies their interactions with the immune system are associated with DNA demethylation of the corresponding regulatory genes. Our data demonstrate that IFN- $\gamma$ -mediated activation of the APM genes (*TAP-1*, *TAP-2*, *LMP-2*, *LMP-7*) and MHC class I expression in tumour cell lines with reversible MHC class I expression defects was strongly associated with DNA demethylation of multiple antigen-presenting machinery (APM) genes located in the MHC locus. So far, very little is known about the involvement of DNA demethylation in the regulation of multiple genes mediated by the IFN- $\gamma$  signalling pathway. To our knowledge, there is only one study showing that IFN- $\gamma$ -mediated induction of the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-1 expression was associated with DNA demethylation of the *IDO-1* gene (Xue et al., 2012). Interestingly, cytokine-induced DNA demethylation was demonstrated in a study in which TGF- $\beta$  signalling resulted in active DNA demethylation and p15<sup>ink4b</sup> tumour suppressor gene expression (Thillainadesan et al., 2012). Our data add to the story and suggest that IFN- $\gamma$ -induced MHC locus chromatin remodelling and histone modifications are associated with DNA demethylation of multiple regions within this genomic locus, resulting in multiple gene expression and increased MHC class I molecule number on the cell surface. In addition, our data indicate that JAK/STAT signalling takes place, since an inhibitor of the JAK kinases significantly blocked both DNA demethylation and induction of the MHC class I expression on the cell surface.

The data from our kinetic study demonstrated that the DNA demethylation of the *TAP/LMP* gene promoter regions was relatively fast, as massive DNA demethylation was seen 6 h after the IFN- $\gamma$  treatments. For comparison, maximum levels of DNA

demethylation in the cells treated with DNMTi inhibitor 5AC were observed 24 after the treatment. This fast kinetics suggests that the demethylation process was active and not dependent on DNA replication, unlike 5AC-mediated demethylation, which requires drug incorporation into DNA and blocks methylation of nascent DNA chains due to methyltransferases inhibition (Creusot et al., 1982). We demonstrated strong association of the DNA demethylation with increased histone acetylation. Collectively, this study documents that IFN- $\gamma$  can act as an epigenetic modifier and induce DNA demethylation of a number of genes, especially those involved in antigen processing and presentation.

Epigenetic mechanisms have important roles in the tumour escape from immune responses, such as in MHC class I downregulation or altered expression of other components involved in antigen presentation. Chemotherapy with DNA methyltransferase inhibitors (DNMTi) can thus influence the tumour cell interactions with the immune system and their sensitivity to immunotherapy. DNMTi, such as 5AC, display a strong potential to be used as anti-tumour chemotherapeutics. They increase immunogenicity of tumour cells, as well as their sensitivity to the cytotoxic cells and they are attractive candidates for combination chemoimmunotherapy. We have demonstrated 5AC additive effects against MHC class I positive and deficient tumours when combined with unmethylated CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODN) or with IL-12-producing cellular vaccine. Increased cell surface expression of MHC class I cell molecules, associated with upregulation of the antigen-presenting machinery related genes, as well as of genes encoding selected components of the IFN- $\gamma$  signalling pathway in tumours explanted from 5AC-treated animals, were observed. This was associated with DNA demethylation of promoter regions of specific antigen-presenting machinery genes in tumours explanted from 5AC-treated animals. Our data document that chemotherapy of MHC class I deficient tumours with DNMTi combined with non-specific immunotherapy is a promising therapeutic setting against MHC class I deficient tumours.

Tumour cell escape may result from the establishment of an immunosuppressive state within the tumour microenvironment (Radoja et al., 2000; Radoja and Frey, 2000). There is ample evidence that tumour cells produce immunosuppressive factors, and this has been verified to have local as well as systemic effects on immune function (Chambers et al., 2003). Tumour cells can promote the development of such a state by producing immunosuppressive cytokines such as vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), galectin, or indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) (Vesely et al., 2011). Regulatory T cells (Treg cells) and myeloid-derived suppressor cells



(MDSCs) are two major types of immunosuppressive leukocyte populations that play key roles in inhibiting host-protective anti-tumour responses (Schreiber et al., 2011). Tumour-induced immunosuppression belongs to the critical mechanisms of the tumour escape from immune response. In the next part of our work we therefore focused on monitoring of the immunosuppressive effects of the tumour microenvironment. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) play an important role in tumour escape from anti-tumour immunity. MDSCs represent one of the key players mediating immunosuppression and have been linked to the induction of T-cell dysfunction through production of TGF- $\beta$ , reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO), and especially arginase 1 (Arg-1) (Kusmartsev and Gabrilovich, 2006). Both granulocytic and monocytic MDSCs express high levels of Arg-1 and thereby, induce T cell anergy by depleting L-arginine, which impairs T cell proliferation and cytokine production (Rodriguez et al., 2007). Inhibition of Arg-1 restores T cell function in vitro and induces an anti-tumour response in vivo (Rodriguez et al., 2004). Our aim was to uncover the so far unknown mechanisms underlying the expansion of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) after cyclophosphamide (CY) chemotherapy (role of proinflammatory cytokines) and the second objective resulting from the previous part of this section of work was to characterize the phenotype and function of these cells and to identify antagonists that could be used for concurrent immunotherapy with the aim to attenuate induced immunosuppression. Spleen MDSC accumulating after CY therapy (CY-MDSC) were compared with those expanded in mice bearing human papilloma viruses 16-associated TC-1 carcinoma (TU-MDSC). Although both CY-MDSC and TU-MDSC accelerated growth of TC-1 tumours in vivo, their phenotype and immunosuppressive function differed. CY-MDSC consisted of higher percentage of monocyte-like subpopulation and this was accompanied by lower relative expression of immunosuppressive genes and lower suppression of T-cell proliferation. To mimic the clinically relevant setting, a group of mice bearing TC-1 tumours treated with CY (CYTU-MDSC) was also included to this comparison. The phenotypic and functional analysis of the CYTU-MDSC group documents that these cells resemble a mixture of CY-MDSC and TU-MDSC, as their phenotype and function can be, in most experiments, placed between those of CY-MDSC and TU-MDSC. The susceptibility of CY-MDSC to all-trans-retinoic acid (ATRA) was also evaluated. In vitro cultivation with ATRA resulted in MDSC differentiation, and ATRA inhibited MDSC accumulation induced by CY administration. Our findings identified differences between CY-MDSC and TU-MDSC and supported the rationale for

utilization of ATRA or IL-12 to alter MDSC accumulation after CY chemotherapy with the aim to improve its anti-tumour effect. CY-induced MDSC could be a suitable target for immunotherapeutic approaches and that the modulation of MDSC (either with ATRA or IL-12) during chemotherapy of tumours can enhance the anti-tumour effect of the applied chemotherapeutic agent. Next, we examined, using two different murine tumour models, the modulatory effects of 5AC on TU-MDSC and CY-MDSC tumour growth and CY therapy. Indeed, the percentage of MDSCs in the tumour microenvironment and spleens of 5AC-treated mice bearing TRAMP-C2 or TC-1/A9 tumours was found decreased. The changes in the MDSC percentage were accompanied by a decrease in the Arg-1 gene expression, both in the tumour microenvironment and spleens. CY treatment of the tumours resulted in additional MDSC accumulation in the tumour microenvironment and spleens. This accumulation was subsequently inhibited by 5AC treatment. A combination of CY with 5AC led to the highest tumour growth inhibition. Our results indicate that the epigenetic modifier 5AC is a promising cytostatic agent that affects MDSCs, accumulating in growing tumours or in tumours treated with CY. 5AC can reduce the percentage of MDSCs accumulating in the tumour microenvironment and spleens during tumour growth and CY chemotherapy. This could be beneficial for the outcome of cancer chemotherapy. In another experimental part, we focused on depletion of Treg by anti-CD25 mAb and its possible additive effect on tumour immunotherapeutic targeting NKT cells by application of their activation ligand  $\alpha$ -GalCer. We tried to determine in detail if anti-CD25 antibody (PC61) interferes with the NKT cell stimulation. We used DEREK mice expressing diphtheria toxin receptor under the FoxP3 promoter. This system allows specific Treg depletion (Lahl et al., 2007). By comparison of results obtained in DEREK mice to the results from the PC61 antibody-treated wild type mice we could distinguish the specific effects of Treg depletion from further effects of PC61 mAb. CD25 is possible to detect on the surface of activated mouse and human NKT cells (Kim et al., 2006; Bessoles et al., 2008) and CD25 is antigen recognized by PC61 mAb. PC61 mAb abrogated activation of NKT cells, and inhibited their proliferation and IFN- $\gamma$  production by activated NKT cells. These data clearly demonstrate that anti-CD25 mAb treatment targeting Treg can be controversial and its efficacy is dependent on the particular treatment setting.

Taken together, our results add to the story and suggest that IFN- $\gamma$ -induced MHC locus chromatin remodelling and histone modifications are associated with DNA demethylation of multiple regions within this genomic locus, resulting in multiple gene expression and

increased MHC class I molecule number on the cell surface. In addition, our data indicate that IFN- $\gamma$ -mediated DNA demethylation was dependent on the JAK/STAT signalling, relatively fast in comparison with demethylation induced by DNA methyltransferase inhibitor 5-azacytidine, and associated with increased histone H3 acetylation in the promoter regions of APM genes. We evaluated the effect of DNA methyltransferase inhibitor 5-azacytidine on MHC class I deficient and positive tumours. We have optimized therapeutic protocol based on a combination of immunotherapy with an inhibitor of DNA methyltransferases. We supported the rationale for utilization of ATRA or IL-12 to alter MDSC accumulation after CY chemotherapy with the aim to improve its anti-tumour effect. Our results indicate that the epigenetic modifier 5AC is a promising cytostatic agent that affects MDSCs, accumulating in growing tumours or in tumours treated with CY. 5AC can reduce the percentage of MDSCs accumulating in the tumour microenvironment and spleens during tumour growth and CY chemotherapy. This could be beneficial for the outcome of cancer chemotherapy. Since chemo- or immunotherapy can induce negative regulators of the immune responses (Treg), the therapeutic efficacy could be increased by combining the treatment with anti-immunosuppressive treatments such as depletion of Treg. Although using mAb targeting CD25 can deplete Treg, direct effects on effector cell populations (NKT cells) have been observed. Our data document the limitations of the use of anti-CD25 antibodies in the studies focused on Treg interactions with effector cells.

## Conclusion

Results obtained from the projects involved in this dissertation are important for better understanding of mechanisms by which tumour cells can escape from specific immunity and for optimization of immunotherapeutic strategies that take into the account the MHC class I status of neoplasia. We documented that the treatment of MHC class I deficient tumour by IFN- $\gamma$  induce DNA demethylation of promoter regions of genes important for antigen presentation and the treatment of MHC class I deficient tumour by epigenetic modifiers sensitized neoplasia to the immunotherapy. Our data provide knowledge about differentiation cancer chemotherapies, especially for use in combination with other drugs to achieve lower immunosuppressive function of tumour microenvironment. Our data provide evidence that besides the known targets of epigenetic agents or immunoregulatory antibodies other unspecific or indirect activities should be considered during the therapy. Our findings suggest that:

1. IFN- $\gamma$  can act as an epigenetic modifier and induce DNA demethylation of a number of genes, especially those involved in antigen processing and presentation.
2. The treatment of MHC class I deficient tumours with epigenetic agents sensitized neoplasia towards the immunotherapy by CpG ODN or IL-12 producing cellular vaccine, immunotherapeutic effect was at least partially mediated by CD8<sup>+</sup> cells.
3. Utilization of ATRA or IL-12 to alter MDSC accumulation after CY chemotherapy with the aim to improve its anti-tumour effect.
4. The epigenetic modifier 5AC is a promising cytostatic agent that affects MDSCs, accumulating in growing tumours or in tumours treated with CY and 5AC can reduce the percentage of MDSCs accumulating in the tumour microenvironment and spleens during tumour growth and CY chemotherapy.
5. Application of anti-CD25 mAb (PC61) used for depletion of Treg impaired NKT cell activation.

## References

- Bessoles S, Fouret F, Dudal S, Besra GS, Sanchez F, Lafont V. IL-2 triggers specific signaling pathways in human NKT cells leading to the production of pro- and anti-inflammatory cytokines. *J. Leukoc. Biol.* 2008;**84**(1):224–33.
- Bubenik J, Koldovsky P, Svoboda J, Klement V, Dvorak R. Induction of tumours in mice with three variants of rous sarcoma virus and studies on the immunobiology of these tumours. *Folia Biol. (Praha)* 1967;**13**:29–39.
- Bubenik J. Tumour MHC class I downregulation and immunotherapy (Review). *Oncol. Rep.* 2003;**10**:2005–8.
- Chambers WH, Rabinowich H, Herberman RB. Mechanisms of Immunosuppression. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12565/>
- Creusot F, Acs G, Christman JK. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J. Biol. Chem.* 1982;**257**:2041–8.
- Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immuno.* 2006;**6**:836–48.
- Elkord E, Alcantar-Orozco EM, Dovedi SJ, Tran DQ, Hawkins RE, Gilham DE. T regulatory cells in cancer: recent advances and therapeutic potential. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2010; **10**(11):1573–86.
- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* 2008;**358**:1148–59.
- Facciabene A, Motz GT, Coukos G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res.* 2012;**72**(9):2162–71.

Foster, B. A., Gingrich, J. R., Kwon, E. D., Madias, C., Greenberg, N. M. Characterization of prostatic epithelial cell lines derived from transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model. *Cancer Res.* 1997;**57**:3325–30.

Gabathuler R, Reid G, Kolaitis G, Driscoll J, Jefferies WA. Comparison of cell lines deficient in antigen presentation reveals a functional role for TAP-1 alone in antigen processing. *J. Exp. Med.* 1994;**180**:1415–25.

Gabrilovich, D. I., V. Bronte, S. H. Chen, M. P. Colombo, A. Ochoa, S. Ostrand-Rosenberg, and H. Schreiber. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2007;**67**:425; author reply 426.

Garcia-Lora A, Martinez M, Algarra I, Gaforio JJ, Garrido F. MHC class I-deficient metastatic tumor variants immunoselected by T lymphocytes originate from the coordinated downregulation of APM components. *Int. J. Cancer* 2003;**106**:521–7.

Garrido F, Cabrera T, Aptsiauri N. "Hard" and "soft" lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy (Review). *Int. J. Cancer* 2010;**127**:249–56.

Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today* 1997;**18**:89–95.

Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007;**128**:683–92.

Kim HY, Kim S, Chung DH. FcγRIII engagement provides activating signals to NKT cells in antibody-induced joint inflammation. *J. Clin. Invest.* 2006;**116**(9):2484–92.

Kusmartsev S, Gabrilovich DI. Effect of tumor-derived cytokines and growth factors on differentiation and immune suppressive features of myeloid cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;**25**:323–31.

Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, Freyer J, Arnason J, Eberl G, Hamann A, Wagner H, Huehn J, Sparwasser T. Selective depletion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J. Exp. Med.* 2007;**204**(1):57–63.

Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* 1996;**56**:21–6.

Lukas J, Mazna P, Valenta T, Doubravska L, Pospichalova V, Vojtechova M, Fafilek B, Ivanek R, Plachy J, Novak J, Korinek V. Dazap2 modulates transcription driven by the Wnt effector TCF-4. *Nucleic Acids Res.* 2009;**37**:3007–20.

Manning J, Indrova M, Lubyova B, Pribylova H, Bieblova J, Hejnar J, Simova J, Jandlova T, Bubenik J, Reinis M. Induction of MHC class I molecule cell surface expression and epigenetic activation of antigen-processing machinery components in a murine model for human papilloma virus 16-associated tumours. *Immunology* 2008;**123**:218–27.

Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int. J. Cancer* 2010;**127**(4):759–67.

Radoja S, Rao TD, Hillman D, Frey AB. Mice Bearing Late-Stage Tumors Have Normal Functional Systemic T Cell Responses In Vitro and In Vivo. *The Journal of Immunology* 2000;**164**(5):2619–28.

Radoja S, Frey AB. Cancer-induced Defective Cytotoxic T Lymphocyte Effector Function: Another Mechanism How Antigenic Tumors Escape Immune-mediated Killing. *Molecular Medicine* 2000;**6**(6):465–79.

Reiniš M. Immunotherapy of MHC class I-deficient tumors. *Future Oncol.* 2010;**6**:1577–89.

Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-Arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 2007;**109**:1568–73.

Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortis B, Zea AH, Piazuelo MB, Delgado A, Correa P, Brayer J, Sotomayor EM, Antonia S, Ochoa JB, Ochoa AC. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res.* 2004;**64**:5839–49.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 2011;**331**(6024):1565–70.

Seliger B, Wollscheid U, Momburg F, Blankenstein T, Huber C. Coordinate downregulation of multiple MHC class I antigen processing genes in chemical-induced murine tumor cell lines of distinct origin. *Tissue Antigens* 2000;**56**:327–36.

Seliger B. Novel insights into the molecular mechanisms of HLA class I abnormalities. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012;**61**:249–54.

Sigalotti L, Coral S, Fratta E, Lamaj E, Danielli R, Di Giacomo AM, Altomonte M, Maio M. Epigenetic modulation of solid tumors as a novel approach for cancer immunotherapy. *Semin. Oncol.* 2005;**32**:473–8.

Smahel M, Sima P, Ludvikova V, Marinov I, Pokorna D, Vonka V. Immunisation with modified HPV16 E7 genes against mouse oncogenic TC-1 cell sublines with downregulated expression of MHC class I molecules. *Vaccine* 2003;**21**:1125–36.

Thillainadesan G, Chitilian JM, Isovich M, Ablack JN, Mymryk JS, Tini M, Torchia J. TGF- $\beta$ -dependent active demethylation and expression of the p15<sup>ink4b</sup> tumor suppressor are impaired by the ZNF217/CoREST complex. *Mol. Cell* 2012;**46**(5):636–49.

Tomasi TB, Magner WJ, Khan AN. Epigenetic regulation of immune escape genes in cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2006;**55**:1159–84.

Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 2011;**29**:235–71.

Whiteside TL, Schuler P, Schilling B. Induced and natural regulatory T cells in human cancer. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2012;**12**(10):1383–97.

Xue ZT, Sjogren HO, Salford LG, Widegren B. An epigenetic mechanism for high, synergistic expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) by combined treatment with zebularine and IFN- $\gamma$ : Potential therapeutic use in autoimmune diseases. *Molecular Immunology* 2012;**51**:101–11.



## Project-related list of own publications

Šímová J\*, Polláková (Vlková) V\*, Indrová M, Mikyšková R, Bieblová J, Štěpánek I, Bubeník J, Reiniš M. Immunotherapy augments the effect of 5-azacytidine on HPV16-associated tumours with different MHC class I-expression status. *Br. J. Cancer* 2011;**105**(10):1533–41. (IF2012= 5.082)

(\*These authors contributed equally to this work.)

Mikyšková R, Indrová M, Vlková V, Bieblová J, Šímová J, Paračková Z, Pajtasz-Piasecka E, Rossowska J, Reiniš M. DNA demethylating agent 5-azacytidine inhibits myeloid-derived suppressor cells induced by tumor growth and cyclophosphamide treatment. *J. Leukoc. Biol.* 2014;**95**(5):1–11. (IF2012= 4.568)

Mikyšková R, Indrová M, Polláková (Vlková) V, Bieblová J, Šímová J, Reiniš M. Cyclophosphamide-induced myeloid-derived suppressor cell population is immunosuppressive but not identical to myeloid-derived suppressor cells induced by growing TC-1 tumors. *J. Immunother.* 2012;**35**(5):374–84. (IF2012= 3.463)

Rosalía RA, Štěpánek I, Polláková (Vlková) V, Šímová J, Bieblová J, Indrová M, Moravcová S, Příbylová H, Bontkes HJ, Bubeník J, Sparwasser T, Reiniš M. Administration of anti-CD25 mAb leads to impaired  $\alpha$ -galactosylceramide-mediated induction of IFN- $\gamma$  production in a murine model. *Immunobiology* 2013;**218**(6):851–9. (IF2012= 2.814)

Veronika Vlková, Ivan Štěpánek, Veronika Hrušková, Filip Šenigl, Veronika Mayerová, Martin Šrámek, Jana Šímová, Jana Bieblová, Marie Indrová, Tomáš Hejhal, Nicolas Derian, David Klatzmann, Adrien Six and Milan Reiniš. Epigenetic regulations in the IFN $\gamma$  signalling pathway: IFN $\gamma$ -mediated MHC class I upregulation on tumour cells is associated with DNA demethylation of antigen-presenting machinery genes. In revision in *International Journal of Cancer* (IF2012= 6.198)



## Curriculum Vitae

### OSOBNÉ INFORMÁCIE

**Meno** Vlková, Veronika  
**Adresa zamestnávateľa** Oddelenie nádorovej imunológie  
Ústav molekulárnej genetiky AV ČR, v. v. i.  
Vídeňská 1083  
142 20 Praha 4  
Česká republika  
**Telefónne číslo** +420241063313  
**E-mail** Veronika.Pollakova@img.cas.cz  
**Národnosť** Slovenská  
**Dátum narodenia** 27. 05. 1984

**Pracovné skúsenosti** Vedecký pracovník

### Vzdelanie a kurzy

**2004 - 2007** Bakalárske štúdium – UK v Bratislave, Prírodovedecká fakulta,  
Katedra genetiky, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovensko.

**2007 – 2009** Magisterské štúdium – UK v Bratislave, Prírodovedecká fakulta,  
Katedra genetiky, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovensko.

**2009 – súčasnosť** Ph.D. študijný program – Karlova Univerzita v Prahe,  
Prírodovedecká fakulta, Molekulárna a bunková biológia,  
genetika a virológia, Albertov 6 , 128 43 Praha 2

## **Vedecké skúsenosti**

**2009 – súčasnosť**

Oddelenie nádorovej imunológie,  
Ústav molekulárnej genetiky, Praha

**2010 Marec**

Real-time PCR kurz, TATAA Biocenter, Praha

**2011 Máj**

Praktický kurz techniky microarray, Partek, Praha

## **Ocenenia**

**2011**

CIMT Annual Meeting, Ocenený poster (autor)

**V Prahe: 20.04.2014**