

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Lenka Fišerová

Epigenetické mechanismy v signální dráze IFN γ

Epigenetic mechanisms in the interferon γ signalling pathway

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Milan Reiniš, CSc.

Praha, 2016

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především svému školiteli RNDr. Milanu Reinišovi, CSc. za trpělivost a cenné rady a také všem, kteří mě během psaní práce podporovali.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla použité zdroje a literaturu.

V Praze dne

Podpis

Epigenetické mechanismy v signální dráze interferonu γ

Obsah

1. Seznam zkratek.....	1
2. Abstrakt	4
3. Abstract	5
4. Úvod	6
5. IFN γ a jeho funkce	6
5.1. Zařazení a charakterizace interferonů	6
5.1.1. IFN γ	7
5.1.1.1. Regulace exprese genu IFN γ	8
5.1.1.2. IFN γ a jeho signální dráha	9
5.1.2. IFN γ a protinádorová imunita	10
6. Epigenetické regulace v expresi genů	12
6.1. Přehled epigenetických regulací genové exprese	12
6.2. Mechanismy DNA demethylace	13
6.3. Acetylace histonů	17
7. Epigenetické regulace ve dráze IFN γ	18
7.1. Epigenetické regulace signální dráhy IFN γ	18
7.2. Epigenetické regulace genu pro IFN γ	18
7.3. Regulace genů pro JAK/ STAT a genu IRF	20
7.4. Epigenetické regulace exprese genů zodpovědných za úpravu a prezentaci antigenu.....	21
7.5. Regulace exprese IDO.....	24
8. Závěr	24
9. Použitá literatura:.....	25

1. Seznam zkratek:

5-aza	5-deoxyazacytidin
5AC	5-azacytidin
5caC	5-karboxylcytosin
5fC	5-formylcytosin
5hmC	5-hydroxymethylcytosin
5mC	5-methylcytosin
ABC	ATP binding cassette
Ac-Lys	acetyl-lysin
AID	aktivací indukovaná deamináza (activation induced deaminase)
AML	akutní myeloidní leukémie
APM	antigen prezentující mašinerie (antigen presenting machinery)
APOBEC	apolipoprotein B mRNA - editující enzymatický komplex (apolipoprotein B mRNA - editing enzyme complex)
BER	base excision repair
CNS	konservované nekódující sekvence (conserved non-coding sequences)
CPB	CREB vázající protein (CREB Binding Protein)
CSF	kolonie stimulující faktor (kolony stimulating factor)
CTL	cytotoxické T lymfocyty
DNMT	DNA methyltransferáza
ER	endoplazmatické retikulum
GAS	interferonem- γ aktivované sekvence (interferon- γ activated sequence)

GI	Golgiho aparát
HAT	histonacetylázy
HDAC	histondeacetylázy
HPV-16	lidský papillomavirus (human papillomavirus)
ChIP assay	Chromatin Immunoprecipitation
IDH	geny pro izocitrát-dehydrogenázu
IDO	indoldioxygenáza
IFN	interferony
IFNGR	interferon- γ receptor
IFN γ	interferon γ
IL	interleukiny
IL-10	interleukin 10
IRF	faktor odpovídající na interferon (interferon response factor)
JAK	Janusovy receptorové kinázy
LMP	low-molecular mass polypeptide
MBD	methyl vázající doména (methyl binding domain)
MBD4	methyl binding domain protein
MHC gpI	MHC glykoproteiny I. třídy
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
mRNA	mediátorová RNA
MSP	methylačně specifická PCR
NK	natural killer

PA28	aktivátor proteasomu
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
Runx3	Runt-related transcription factor 3
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAP1 a TAP2	transportéry asociované se zpracováním antigenu (transporters associated with antigen processing)
T-bet	transkripční faktor asociovaný s T-buňkami (T-cell associated transcription factor)
TDG	thymin-DNA-glykosyláza
TET	ten-eleven translocation
TGF- β	transformující růstový faktor (transforming growth factor β)
TIL	lymfocyty infiltrující nádor (tumor-infiltrating lymphocytes)
TNF	tumor nekrotizující faktory
Treg	regulační T-lymfocyty
TSA	Trichostatin A
α -KG	α -ketoglutarát
β 2m	β 2-mikroglobulin

2. Abstrakt

IFN γ je důležitý cytokin zprostředkující imunitní odpověď, včetně imunity protinádorové. IFN γ ovlivňuje expresi mnoha genů, které pak regulují různé procesy v buňce. V nádorových buňkách byly pozorovány defekty v signální dráze IFN γ a chyby v regulaci exprese genů indukovaných IFN γ , např. genů pro antigen prezentující mašinerii (APM) nebo hlavní histokompatibilní komplex (MHC). Epigenetické mechanismy mohou hrát roli v regulaci exprese genu pro IFN γ a také genů IFN γ regulovaných, včetně komponent jeho signální dráhy. U lymfocytů z nádorů byla pozorována omezená schopnost produkovat IFN γ spojena s epigenetickým umlčením genu pro IFN γ . V nádorových buňkách bylo prokázáno epigenetické umlčení exprese genů v signální dráze IFN γ , jako transkripčních faktorů IRF a dalších genů regulovaných IFN γ , např. genů pro APM a MHC nebo indoldioxygenázu. V případě jejich aktivace pomocí IFN γ byly pozorovány epigenetické změny v regulačních oblastech těchto genů. IFN γ se dá tak považovat za epigenetické agens. Epigenetické modulátory dokáží aktivovat expresi některých genů regulovaných IFN γ , čímž je možno částečně vysvětlit imunomodulační účinky těchto agens. Epigenetické regulace genů řízených IFN γ jsou také důležité pro únik nádorových buněk imunitní odpovědi.

Klíčová slova:

Interferon γ , epigenetika, methylace DNA, prezentace antigenu, signální dráha JAK-STAT

3. Abstract

IFN γ is an important cytokine mediating immune responses, including antitumor immunity. It can affect expression of a lot of genes, which regulate different cellular processes. In tumor cells defects in signal cascade of IFN γ and mistakes in expression of genes regulated by IFN γ , for example genes for antigen adjustment and presentation (APM) or genes for major histocompatibility complex (MHC), were observed. Epigenetic mechanisms, can play a role in regulation of expression of genes for IFN γ , as well as in regulation of expression of genes regulated by IFN γ , including the components of the IFN γ signalling pathway. In lymphocytes from tumors the ability to produce IFN γ was limited by epigenetic silencing of genes for IFN γ . In tumor cells, epigenetic silencing of genes regulated by IFN γ , of genes of the IFN γ signaling cascade, for example IRF transcription factors, and other genes regulated by IFN γ , such as genes for APM, MHC or indole dioxygenase coding genes (IDO), was demonstrated. In case of their activation by IFN γ , epigenetic changes in regulation sequences of appropriate genes, were observed. IFN γ thus can be considered as an epigenetic agent. Epigenetic modulators are able to activate expression of genes regulated by IFN γ . By this way it's possible to explain some of immunomodulatory effects of these agents. Epigenetic regulations of genes regulated by IFN γ are important for immune escape of tumor cells from antitumor immunity.

Key words:

Interferon γ , epigenetics, DNA methylation, antigen presentation, JAK-STAT signalling pathway

4. Úvod

IFN γ , patřící mezi IFN druhého typu, je cytokinem s pleiotropními účinky. Je produkován buňkami imunitního systému, nicméně jeho receptory jsou exprimovány na většině buněčných populací. IFN γ indukuje obranu proti virům a dalším patogenům, indukuje imunitní odpověď a také hraje zásadní roli v protinádorové imunitě.

V poslední době byly popsány epigenetické mechanismy v regulaci interferonové signální dráhy, exprese genu pro IFN γ a u některých cílových genů regulovaných IFN γ , zvláště v nádorových buňkách. Pozornost byla věnována změnám v DNA methylaci a v modifikaci histonů, v expresi genů zodpovědných za úpravu a prezentaci antigenu a také expresi MHC gpI v nádorových buňkách.

Cílem této práce bylo shrnout současný stav poznání o epigenetických mechanismech v regulaci exprese genů kódujících IFN γ , v interferonové signální dráze a také regulaci exprese vybraných genů aktivovaných IFN γ . Práce se věnuje hlavně změnám v DNA methylacích a modifikacích histonů a epigenetickým modifikacím v nádorových buňkách.

5. IFN γ a jeho funkce

5.1. Zařazení a charakterizace interferonů

Interferony jsou významnými zástupci cytokinů, proteinových signálních molekul, které zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami a hrají významnou roli zvláště v regulaci imunity (Murphy K. P. et al., 2012). Existuje několik rodin cytokinů: kolonie stimulující faktory (CSF), interferony (IFN), interleukiny (IL), rodina tumor nekrotizujících faktorů (TNF) a nezařazené cytokiny. Název interferon pochází ze skutečnosti, že tyto látky v tkáňové kultuře interferují s virovou replikací. Interferony mají mnoho funkcí. Kromě ochrany buněk před virovou infekcí aktivují a modulují imunitní odpověď a aktivují buňky imunitního systému, např. NK buňky a makrofágy. Ovlivňují také prezentaci antigenu a zvyšují expresi MHC gpI na povrchu buněk. Receptory pro jednotlivé interferony se po aktivaci váží na příslušné Janusovy receptorové kinázy (JAK). Signalizace dále pokračuje přes JAK/STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) signální kaskádu a vede k fosforylaci STAT proteinů. Fosforylované STAT proteiny vstupují do jádra a aktivují transkripci celé

řady genů. Interferony můžeme rozdělit na tři třídy. Dosud bylo identifikováno více než dvacet různých interferonů a jejich genů. Mezi interferony I. třídy řadíme IFN α a IFN β , které jsou syntetizovány při virových infekcích téměř ve všech typech buněk. Mezi interferony II. třídy patří IFN γ . Existují ještě nedávno objevené interferony III. třídy, a to IFN λ . Předpokládá se, že mají podobnou funkci jako IFN α a IFN β , jejich produkce je indukována přes aktivaci interferonem stimulovaných genů (Lazear H. M. et al., 2015).

5.1.1. IFN γ

IFN γ spolu s TNF α a dalšími zánětlivými cytokiny je klíčovým cytokinem tzv. Th1 imunitní odpovědi. Signalizace přes signální dráhu IFN γ má různé biologické funkce, primárně vztažené k obraně hostitele a regulaci imunity, včetně antivirové a antibakteriální obrany, buněčného cyklu, apoptózy, zánětu a vrozené i získané imunity (Schroder K. et al., 2004). Jedním ze základních mechanismů, jak vlivem IFN γ dochází ke zvýšení imunogenicity buněk, je zvýšení exprese MHC gpI na povrchu profesionálních antigen prezentujících buněk (Dunn G. P. et al., 2006). IFN γ také reguluje diferenciaci a funkci mnoha buněk imunitního systému. Je úzce zahrnut ve všech aspektech imunitní odpovědi zprostředkované Th-lymfocyty i v regulaci diferenciaci, aktivace a homeostázy T-buněk, potlačuje vývoj Th-2 odpovědi, ale podporuje vývoj regulačních T buněk (Treg) (Agnello D. et al., 2003). Tento cytokin také aktivuje makrofágy. IFN γ hraje zásadní roli i v protinádorové imunitě. IFN γ má tedy podstatnou úlohu v přirozené imunitní odpovědi a ovlivňuje její kvalitu.

Na rozdíl od interferonů I. třídy, které jsou produkovány všemi typy buněk, IFN γ produkují aktivované buňky imunitního systému, např. NK buňky, NKT buňky, CD8 T buňky a CD4 (převážně Th1) T buňky. NK buňky vznikají v kostní dřeni z lymfoidního progenitoru. Prozánětlivé interleukiny (IL-12 ve spolupráci IL-18), které produkují aktivované makrofágy, stimulují NK buňky k produkci IFN γ . NK buňky exprimují inhibiční receptory, které rozeznávají MHC gpI. (Vyskytují se na buněčném povrchu v komplexu s peptidovými fragmenty, produkovány buňkou). Ty jsou exprimovány všemi buňkami, které mají jádro. MHC molekuly slouží jako značka „vlastního“. Právě ztráta MHC gpI v kombinaci s navázáním aktivačních receptorů na ligand na povrchu infikované nebo nádorově pozměněné buňky vede k aktivaci NK buněk. Aktivované NK buňky pak produkují velké množství IFN γ (Schoenborn J. R. et al., 2007). Dalším významným producentem IFN γ jsou NKT buňky, které sdílí jak charakteristiky NK buněk, tak i T buněk. Na svém povrchu

exprimují receptory T buněk v asociaci s CD3 receptory a současně aktivační i inhibiční receptory NK buněk. „Invariantní NKT buňky přispívají do značné míry k vrozené i adaptivní protiinfekční a protinádorové imunitě. Jejich hlavní odpovědí na stimulaci antigenem je to, že produkují velké množství cytokinů včetně $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-4, IL-5, IL-13, granulocyty-makrofágy kolonie-stimulující faktor (GM-CSF) a IL-2.“ (Schoenborn J. R. et al., 2007). $\text{IFN}\gamma$ produkují také T lymfocyty. CD4 T- buňky se diferencují buďto směrem k Th-1 odpovědi, a v tom případě produkují hodně $\text{IFN}\gamma$, nebo k Th-2 odpovědi, a pak produkují mnohem menší množství $\text{IFN}\gamma$ než v prvním případě (Schoenborn J. R. et al, 2007). Naivní T buňky potřebují k tomu, aby se diferencovaly v $\text{IFN}\gamma$ produkující buňky, několikrát proliferovat. Během doby, kdy proliferují, je ovlivňují nejrůznější signály z prostředí. Ty mají vliv na expresi a aktivační stav specifických receptorů, signalizačních molekul a transkripčních faktorů, které zase zpětně podněcují T buňky k produkci většího množství $\text{IFN}\gamma$ (Murphy K. M. and Reiner S. L., 2002; Reiner S. L, 2005; Reiner S. L. and Seder R. A., 1999). Cytotoxické T lymfocyty (CTL) produkují velké množství $\text{IFN}\gamma$ po aktivaci IL-12 a IL-18. $\text{IFN}\gamma$ díky pozitivní zpětné vazbě zvyšuje expresi MHC gpI na povrchu buněk, čímž je činí lépe rozeznatelné pro CTL (Schoenborn J. R. et al., 2007). $\text{IFN}\gamma$ v součinnosti s IL-12 dále stimuluje TH_1 odpověď.

5.1.1.1. Regulace exprese genu $\text{IFN}\gamma$

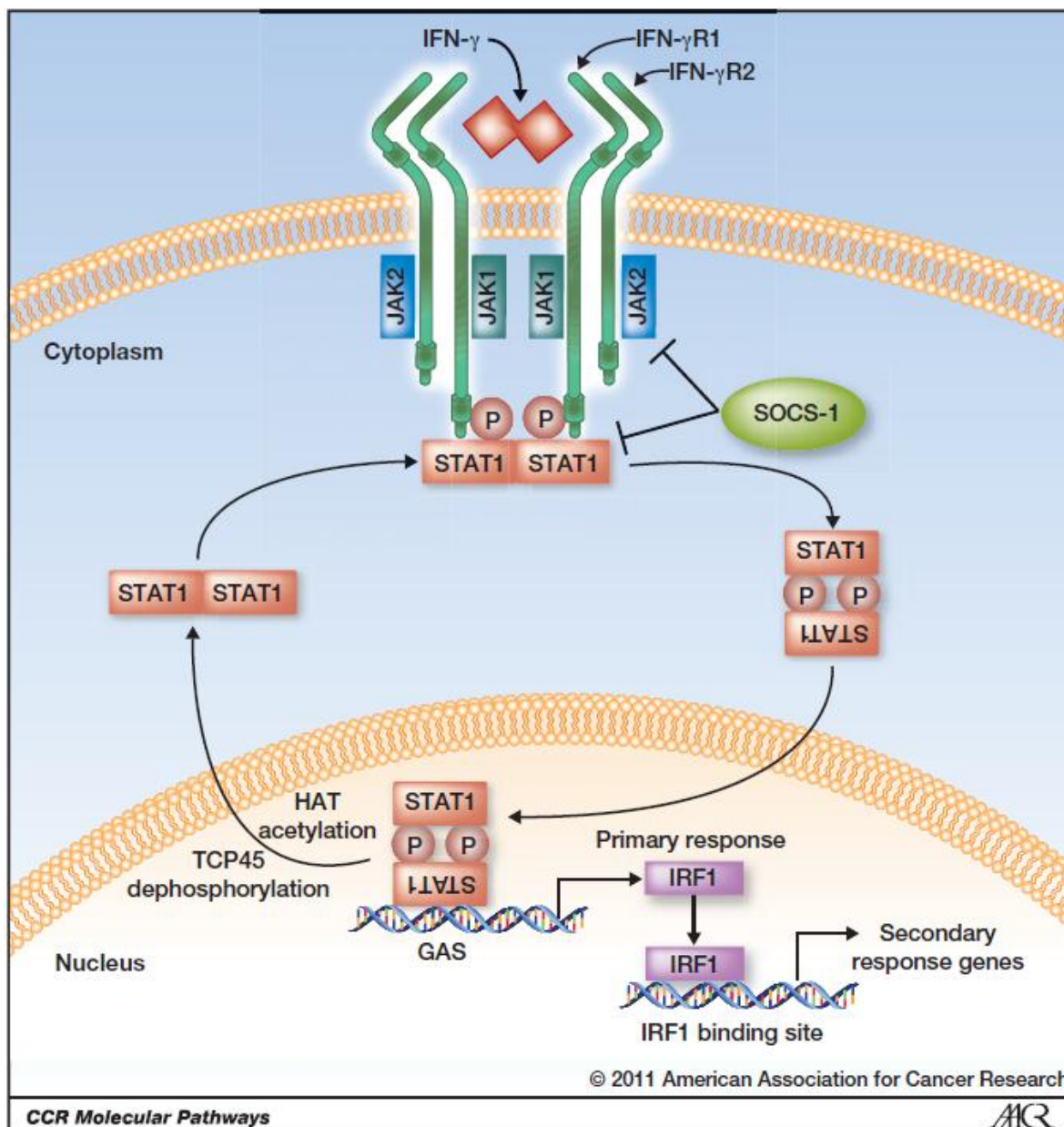
Jak již bylo řečeno, $\text{IFN}\gamma$ je produkován CD4^+ Th1 buňkami, CD8^+ cytotoxickými T buňkami, NK buňkami, NKT buňkami, makrofágy a dendritickými buňkami. Gen pro $\text{IFN}\gamma$ není transkribován v jiných typech buněk, např. v Th2 buňkách, vyvíjejících se T- buňkách ani buňkách mimo imunitní systém, a je tedy regulován tkáňově specificky. V regulaci genu pro $\text{IFN}\gamma$ (*Ifng*) je zahrnuto množství transkripčních faktorů, včetně T-bet, STAT4, Runx3, GATA3, a Hlx (Wilson C. B. et al., 2009). Transkripční faktor T-bet zajišťuje produkci $\text{IFN}\gamma$ v CD4^+ T buňkách (Szabo S. J. et al., 2000). CD8^+ T buňky a NK buňky exprimují jiný transkripční faktor, zvaný eomesodermin (Pearce E. L. et al., 2003).

5.1.1.2. *IFN γ a jeho signální dráha*

IFN γ stimuluje signální dráhu JAK-STAT. „Dráha JAK-STAT slouží jako principiální signální mechanismus pro mnoho cytokinů a růstových faktorů.“ (Rawlings J. S. et al., 2004). Je známo, že různé členové rodiny STAT mají různé efekty na imunitní odpověď (Murphy K. P. et al., 2012).

„Molekulární mechanismy dráhy JAK-STAT jsou tedy důležité v reakci buňky hostitele na onemocnění.“ (Gough D. J. et al., 2008). IFN γ je nekovalentní homodimer, který se váže na IFNGR1 komponentu receptorového komplexu pro IFN typu II (IFNGR1a IFNGR2). Receptor pro IFN γ se skládá ze dvou podjednotek IFN-gR1 a IFN-gR2. Navázáním IFN γ na podjednotku IFN-gR2 se signál přenáší do buňky. Tím jsou aktivovány kinázy Jak1 a Jak2. Jak1 kinázy se vzájemně fosforylují, což vede k fosforylaci a dimerizaci proteinu STAT1 (Haan C. et al., 2006; Rodig S J. et al., 1998; Yeh T C. et al., 1999; Ealick S. E. et al., 1991; Plataniias L. C., 2005, Choi J. C. et al., 2007). Signalizace pak pokračuje přes fosforylovaný homodimer STAT1, který disociuje předtím, než vstoupí do jádra, kde se naváže na DNA v interferonem aktivovaných (GAS) oblastech, po čemž následuje transkripce IFN γ indukovaných genů (Bekisz et al., 2013).

Mezi hlavní geny, které reguluje dráha JAK/STAT, patří interferon response faktory (IRFs). Zatím je známo 9 IRFs. Ovlivňují řadu procesů v imunitním systému, včetně vrozené a adaptivní imunitní odpovědi, buněčného růstu a apoptózy. Jedním z hlavních genů regulovaných touto kaskádou je IFN response factor 1 (IRF1), který funguje jako tumor supresorový gen (Kimura T. et al., 1995). „IRF 5 se podílí na zpomalení růstu buněk, kdežto IRF5 a IRF 7 ovlivňují buněčné stárnutí. Potlačení faktoru IRF 8 vede k nedostatečné apoptóze a zvýšení pravděpodobnosti metastáz u nádorů.“ (Yamashita M. et al., 2010).



Obr. 1: Dráha JAK/STAT. Převzato ze Zaidi M. R. et al., 2011

5.1.2. IFN γ a protinádorová imunita

IFN γ hraje také zásadní roli v protinádorové imunitě. Důkazem protinádorového působení IFN γ byl experiment s využitím modelu fibrosarkomu Meth A vyvolaného působením methylchloranthrenu u BALB/c myši. K indukci nespecifické imunitní odpovědi u těchto myši byl použit lipopolysacharid (LPS). Neodpovídavost nádoru na IFN γ byla zajištěna *in vivo* podáním myších monoklonálních protilátek proti IFN γ . U myši, kterým byly podány spolu s LPS protilátky proti IFN γ , došlo k rychlejšímu růstu nádorů ve srovnání s kontrolními

myšmi (Dighe A. S. et al., 1994). Dalším důkazem o protinádorovém působení IFN γ je pokus s myšmi, které mají dominantní mutaci v α -řetězci receptoru pro IFN γ (Dighe A. S. et al., 1993; Tartaglia L. A. et al., 1992).

Jedním z nejdůležitějších protinádorových účinků IFN γ je to, že zvyšuje expresi MHC gpI na povrchu nádorových buněk. MHC gpI, které umožňují profesionálním antigen-prezentujícím buňkám (APC) vystavit fragmenty nádorově specifických peptidů zevnitř buňky na svém povrchu. „Tím výrazně zvyšuje rozpoznání nádorových buněk CTL a jejich eliminaci. Také aktivuje makrofágy v Th1 imunitní odpovědi a indukuje produkci chemokinů, které povolávají specifické efektorové buňky do místa zánětu.“ (Murphy K. P. et al., 2012). „Kromě aktivace imunitního systému může IFN γ působit na nádorové buňky přímo a indukovat v nich oxidativní stres, vedoucí k apoptóze nebo buněčné senescenci.“ (Hubackova et al., 2015).

Současně IFN γ může mít i pronádorové účinky. IFN γ např. přispívá k diferenciaci regulačních T lymfocytů (Treg) a potlačuje odpověď Th2. Také zvyšuje počet makrofágů infiltrujících nádor a vytvářejících za určitých situací pronádorové mikroprostředí (Zaidi M. R. et al., 2011).

Modulace drah IFN γ má důležitou úlohu v tzv. imunoeditingu nádoru. Proces imunoeditingu nádoru je rozdělen do tří fází: eliminace, rovnováha a únik (Dunn G. P. et al., 2006). První fáze - eliminace (dříve známá jako imunitní dozor nad nádorem) se skládá z rozeznání transformovaných buněk vrozeným nebo adaptivním imunitním systémem, a vede k zabití těchto buněk. „Fáze rovnováhy je subklinická fáze, ve které nádor persistuje, ale díky imunitnímu systému se nešíří.“ Třetí fází je únik, k němuž dochází kvůli vyčerpání imunitního systému nebo vzniku různých únikových variant nádoru. V této fázi se nádor začne šířit. U nádorů unikajících imunitní odpovědi se často vyskytují defekty v IFN γ dráze (např. defekt v expresi *IFNGR1* či *JAK1* nebo abnormální formy *JAK2*). Naopak plná funkce IFN γ přispívá k potlačení nádoru (Dunn G. P. et al., 2006).

6. Epigenetické regulace v expresi genů

Existuje několik definic epigenetiky, ale nejvíce vědců souhlasí asi s touto definicí:

„Epigenetický znak je stabilně děditelný fenotyp, který je výsledkem změn na chromozómu beze změny sekvence DNA.“ (Berger S. L. et al., 2009). Takovýto přenos informace je možný díky existenci epigenetických signálů. „Tyto signály můžeme rozdělit na tři třídy. Vedou k ustanovení stabilního a dědičného epigenetického stavu.“ „Epigenátor“ je signálem z prostředí, v němž organizmus žije. Tento signál spouští kaskády uvnitř buněk. Způsobuje všechny epigenetické změny, ke kterým dochází před prvními změnami na chromozómu. Poté se signál přenáší signálními drahami k „iniciátoru“. Tento signál je sice jen dočasný, ale je udržován v buňce dost dlouho na to, aby došlo na DNA k epigenetickým změnám.

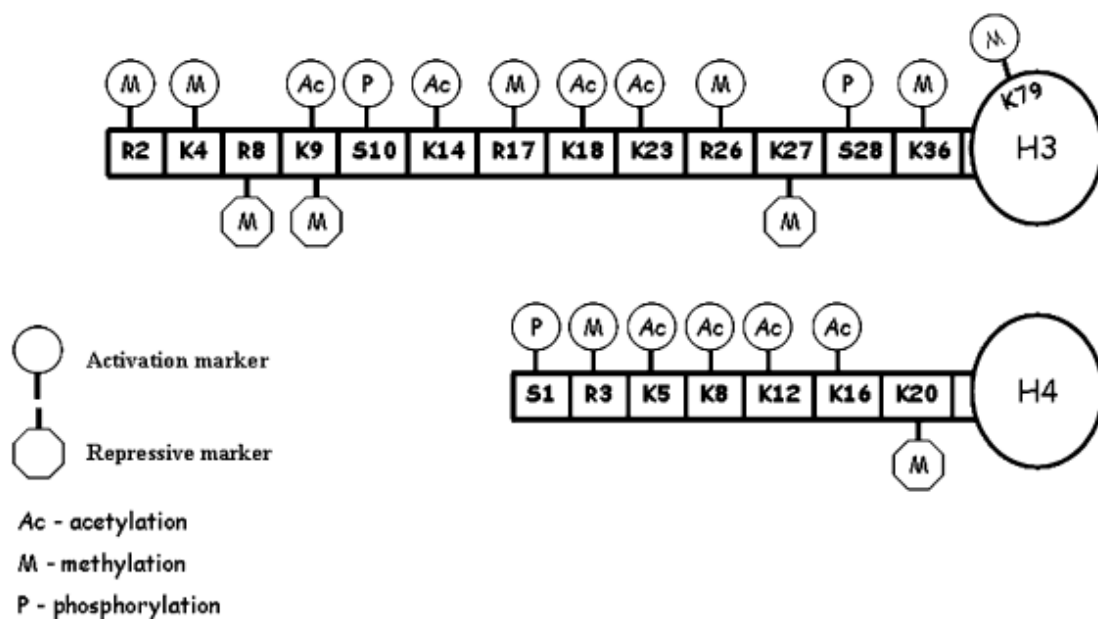
„Epigenetický iniciátor“ odpovídá na signál epigenátoru a je potřeba k přesné lokalizaci úseku na DNA, kde bude docházet k epigenetickým změnám. „Může to být DNA vazebný protein, nekódující RNA nebo jiné molekuly, které se mohou vázat na DNA. Signál iniciátoru je udržován pozitivní zpětnou vazbou. „Epigenetický udržovatel“ je signál, který udržuje epigenetické změny v dalších generacích, ale není dostatečně silný na to, aby je inicioval. Tyto modifikace zahrnují DNA methylyaci, modifikace histonů, pozici nukleosomů aj., včetně methylyace H3K4 a H3K27 a H3K9 a H4K20 v transkripčním umlčení.“ (Berger S. L. et al., 2009).

6.1. Přehled epigenetických regulací genové exprese

Epigenetické regulace hrají významnou úlohu v různých fyziologických i patologických procesech včetně kancerogeneze. Tyto regulace genové exprese jsou dány např. změnami v methylyaci DNA, modifikacemi histonů (acetylace, methylyace, fosforylace, ubiquitylace, sumoylace a ADP ribosylace) a také RNA interference (Hassan A. H. et al., 2002; Lister R. et al., 2009; Sanchez R., Zhou M. M., 2009; Ray-Gallet D., Almouzni G., 2010). V této práci se soustředím hlavně na problematiku DNA methylyace a modifikace histonů.

„Nejlépe zdokumentované epigenetické modifikace jsou DNA methylyace a modifikace histonů. DNA methylyace a modifikace histonů ovlivňují genovou expresi tím, že mění DNA/proteinové interakce. Tyto epigenetické změny mohou potlačit genovou expresi. Brání

totiž transkripčním faktorům, aby se navázaly na DNA.“ Epigenetické modifikace vedou i ke změnám struktury chromatinu (Hamm Ch. A. et al., 2015). Epigenetické změny jsou, na rozdíl od mutací DNA, vratné. Modifikace histonů, stejně tak jako modifikace bází DNA, se podílejí na kondenzaci nebo rozvolnění chromatinu. Histony mají pozitivní náboj, kdežto DNA má náboj negativní. To umožňuje soudržnost nukleosomu. Post-translační epigenetické modifikace histonů rozvolňují strukturu nukleosomu, protože snižují pozitivitu náboje histonu. Tím oslabují sílu elektrostatické interakce s DNA. Navíc post-translační modifikace mohou změnit vazebná místa pro proteiny, které mohou mít další dopady na strukturu chromatinu i na genovou expresi (Lister L. et al., 2009).



Obr 2.: Kovalentní modifikace histonových konců. Převzato z Tomasi T. B. et al., 2006

6.2. Mechanismy DNA demethylace

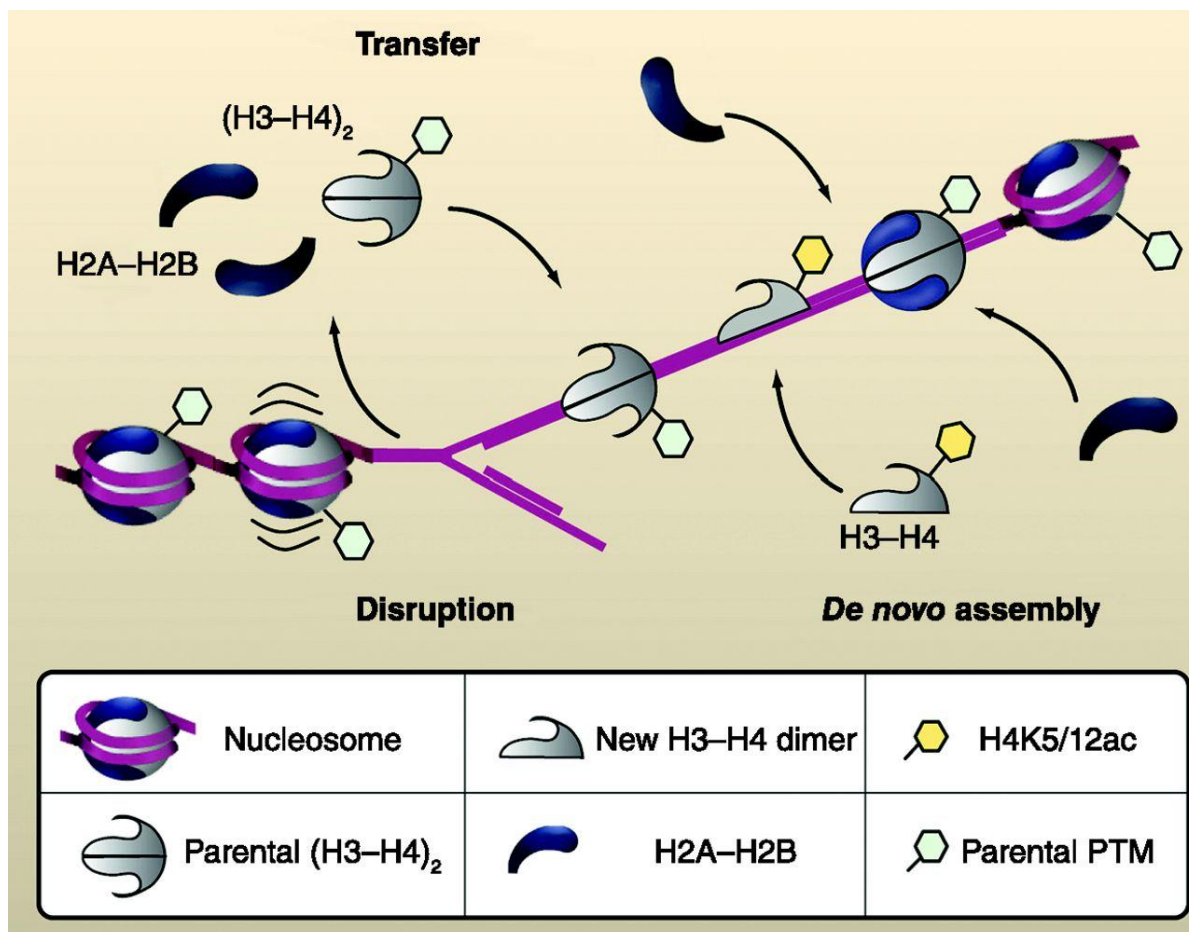
DNA methylace zapříčiňuje řadu stavů transkripční aktivace i transkripčního umlčení. Také slouží jako vazebné místo pro methyl binding doménu (MBD) proteinů vážících se na DNA a často se podílí na remodelaci chromatinu. Je součástí korepresorů transkripce (Rothbart, S. B. et al., 2014). Nadbytečná DNA methylace se vyskytuje zejména na oblastech DNA, kde se nachází hodně cytosinu a guaninu, v tzv. CpG ostrovech (CpG islands), což často vede k nesprávnému umlčení genů k onemocnění (Jones P. A., Baylin S. B., 2002). DNA

methylace CpG dinukleotidů je častým epigenetickým mechanismem, jak dosáhnout umlčení transkripce specifických genů během vývojových procesů (Okano M., et al., 1999; Cedar H., Bergman Y., 2009).

DNA methylace a jejího udržení se účastní několik DNA methyltransferáz. U savců se vyskytují tyto třídy DNMT: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B. DNMT mají velkou afinitu k hemimethylované DNA. Je důležitá pro embryonální vývoj a její mutace bývají letální. DNMT 3A a DNMT3B methylují DNA zejména *de novo*, ale jsou také udržovacími methylázami (Hamm Ch. A. et al., 2015). Na *de novo* methylaci se podílejí DNMT3, jejíž fragment DNMT3L vazebně přitahuje celý enzym k histonu H3, ale potlačuje methylaci histonu H3K4 (Cedar H., Bergman Y., 2009).

Mechanismy demethylace DNA můžeme rozdělit na aktivní a pasivní. K pasivní demethylaci DNA dochází během replikace. Je spojena se ztrátou se ztrátou 5- methylcytosinu (5mC) během následujících kol replikace bez přítomnosti enzymatické mašinérie, která by udržovala DNA methylaci (Kohli R. M., Zhang Y., 2013).

Polomethylované dinukleotidy se vyskytují v replikačních vidlicích. Účinkem DNMT3 se kopíruje vzor methylace z mateřské DNA do dceřiné (Rothbart S. B. et. al., 2014). V případě absence nebo disfunkce DNA methyltransferáz k methylaci nascentních řetězců nedochází.

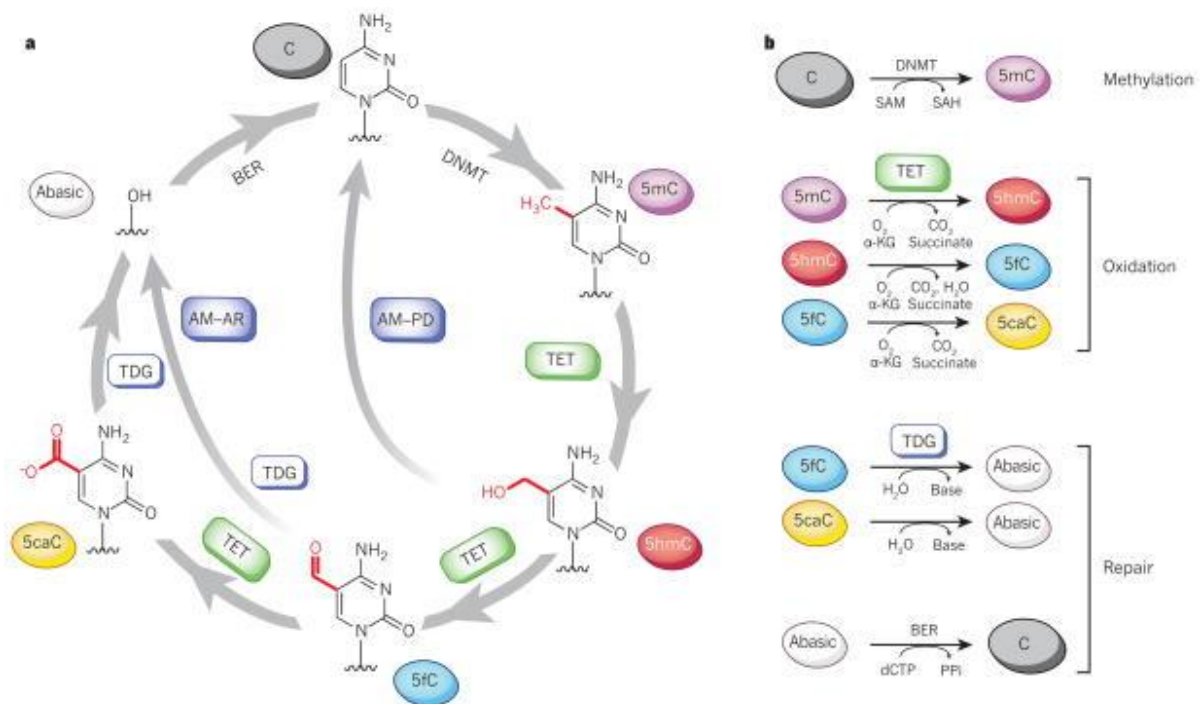


Obr. 3: Dynamika histonů v replikační vidlici. Převzato z Ray-Gallet D., Almouzni G., 2010

K aktivní demethylaci může docházet jak v dělících se, tak v nedělících se buňkách. Při aktivní demethylaci DNA dochází k nahrazení methylcytosinu cytosinem poměrně složitými mechanizmy, kterých se účastní řada enzymů. 5-mC může být modifikován na aminoskupině nebo na methylové skupině. Aminoskupina se deaminuje na karbonylovou skupinu pomocí enzymu AID/APOBEC (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex). Tento enzym mění 5-mC na thymin a tím vytváří chybný pár G-T.“ (Moore L. D. et al., 2013). Tato změna indukuje BER (base excision repair) mechanismus, jehož účinkem je thymin nahrazen nemethylovaným cytosinem (Kohli R. M., Zhang Y., 2013, Moore L. D. et al., 2013).

Neexistuje enzym, který by byl schopen přímo odštěpit methylovou skupinu z 5-mC. Současná představa je, že velkou roli při zahájení tohoto procesu hraje oxidace methylových skupin v methylcytosinu, dále odstranění modifikované báze a její nahrazení cytosinem.

5-mC mohou být oxidovány TET enzymy (ten- eleven translocation) na 5 – hydroxymethylcytosiny (5hmC). 5hmC podstupuje další oxidace na 5-formylcytosin (5fC) a 5-karboxylcytosin (5caC). Tyto chemicky různé modifikace cytosinu mohou být speciálně rozeznávány různými DNA-vazebnými proteiny. Mají rozdílné sterické vlastnosti, které mohou přitahovat různé odlišně modifikované báze, např. guanin páruje s 5caC s podobnou četností jako s C, ale jen málokdy s U. Jen malá část 5hmC je oxidována na 5fC a ještě menší část na 5caC. Tyto přeměny jsou mnohem pomalejší než přeměna 5mC na 5hmC (Hashimoto H. et al., 2013). V případě 5fC a 5caC může být destabilizována N-glykosidická vazba.



Obr. 4: Dráha dynamických modifikací cytosinu. Převzato z Kohli R. M., Zhang Y., 2013

Pozměněný cytosin je pak vystřižen methyl binding domain proteinem 4 (MBD4) nebo thymin-DNA-glykosylázami (TDG). Tím je vytvořeno abazické místo, jež je opraveno pomocí BER systému (Kohli R. M. a Zhang Y., 2013).

Protože se chybná methylace DNA vyskytuje ve velké míře u nádorových buněk, mohla by být demethylace přes TET enzymy způsobem, jak ovlivnit vývoj nádoru. Snížená exprese TET enzymů byla pozorována u lidské rakoviny prsu, plic, jater, slinivky a prostaty (Kohli R. M., Zhang Y., 2013).

U akutní myeloidní leukémie (AML) byly pozorovány mutace v TET2 spolu s mutacemi v genech pro IDH1 a IDH2 (geny pro izocitrát-dehydrogenázu). Tyto geny v nemutované podobě umožňují přeměnu izocitrátu na α -KG (α -ketoglutarát), kofaktor TET enzymů. Mutace v *IDH 1* a *IDH 2* způsobují, že je izocitrát přeměněn na α -hydroxyglutarát, který je kompetitivním inhibítoem α -KG. Tím by mohl inhibovat TET2 enzym a přispívat k nádorovému bujení (Kohli R. M., Zhang Y., 2013).

6.3. Acetylace histonů

Acetylace histonů je post-translační modifikace, která znamená přemístění acetylové skupiny z acetyl-CoA na ϵ -aminoskupinu lysinového zbytku. Je katalyzována enzymy histon-acetylázami (HAT).

Naopak deacetylace histonů je katalyzována enzymy histon-deacetylázami (HDAC). Těto katalýzy se účastní molekula vody, která se podílí na „odstranění acetylové skupiny z acetyl-lysinu (Ac-Lys), přičemž regeneruje ϵ -aminoskupinu.“ (Hamm Ch. A. et al., 2015). Acetylace histonů obvykle rozvolňuje chromatinovou strukturu, což umožní to, aby byl chromatin transkripčně aktivní. Naopak deacetylace histonů způsobuje, že se stane chromatinová struktura více kompaktní a méně přístupná pro transkripci. U savců se vyskytuje 18 různých HDAC. HDAC mají v buňkách různé funkce, katalyzují změny na histonech i na nehistonových proteinech (Glozak M. A. et al., 2005; Yao Y. L., Yang W. M., 2011). Některé jejich funkce se překrývají. Tyto enzymy se také nacházejí v cytoplazmě (Robinson R. et al., 2013). Na acetylované histony se váží další proteiny, zejména bromodomény, které pak dále ovlivňují transkripci (Ray-Gallet D., Almouzni G., 2010).

7. Epigenetické regulace ve dráze IFN γ

7.1. Epigenetické regulace signální dráhy IFN γ

Epigenetické regulace signální dráhy IFN γ můžeme rozdělit na regulace exprese genu kódujícího IFN γ (*Ifng*), dále regulace exprese jednotlivých genů v signální dráze JAK/STAT a transkripčních faktorů IRF a nakonec genů regulovaných IFN γ , např. genů pro APM.

7.2. Epigenetické regulace genu pro IFN γ

K enhancerům, jež mají zásadní vliv na produkci IFN γ , patří, v této práci již zmíněné, transkripční faktory Stat4 a T-bet. „Pro expresi *Ifng* jsou také důležité konzervované nekódující sekvence (CNS) jako odpověď na Th1 diferenciační signály.“

Epigenetické modifikace se uplatňují např. při diferenciaci T lymfocytů na Th1/Th2, což se týká methylace, acetylace, fosforylace, ubiquitylace a sumoylace histonů H2A, H2B, H3 a H4. Tím se vytvoří specifický vzor „histonových značek“, což má pak za následek aktivaci nebo umlčení genových lokusů, a tím směřování imunitní odpovědi buď směrem k Th1 nebo Th2.

Th1 odpověď zvyšuje počet acetylovaných histonů H4 a methylovaných histonů H3K4 napříč lokusem pro *Ifng*, které podporují transkripci. CNS mohou buď aktivovat, nebo reprimovat transkripci *Ifng* podle toho, jak jsou umístěné epigenetické „značky“. Transkripce *Ifng* je zeslabena např. methylací CpG ostrovů, zejména těch, jež leží dále než 100kb od *Ifng* lokusu (Aune T. M. et al., 2013).

„Všeobecně se předpokládá, že je DNMT1 nutná k udržování methylace *Ifng* lokusu u CD4 T buněk v nediferencovaném stavu. Naopak DNMT 3 katalyzuje DNA metylaci promotoru *Ifng* v odpovědi na diferenciační signály Th2 a Th17, aby udržela umlčení těchto antagonistických linií, dokonce i když jsou znovu vystaveny diferenciačním signálům Th1.“ (Wilson C. B., et al., 2009).

U NK buněk chybí methylace genu pro IFN γ , což je v souladu s tím, že NK buňky produkují značné množství IFN γ při výskytu buněk bez povrchových MHC gpI v komplexu

s normálními peptidy, vyskytujícími se v buňce. U NK buněk už předem existuje vzor acetylace histonu H4 a H3K4 methylace (Chang S. and Aune T. M., 2005). Při aktivaci podstupuje histon H4 u NK buněk další acetylaci.

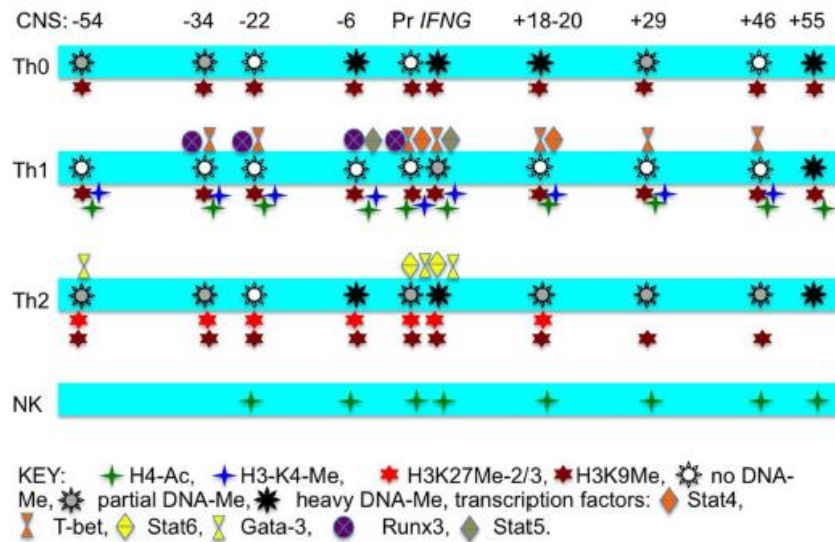


FIGURE 1 | Schematic illustrating transcription factors that bind to individual CNS across the *IFNG* locus, histone "marks" across the locus, and degree of CpG dinucleotide methylation at the different CNS in T cell and NK cell lineages.

Obr 5.: Schematická ilustrace transkripčních faktorů, které se váží na jednotlivé CNS napříč *Ifng* lokusem, histonové „značky“ napříč lokusem a stupeň methylace CpG dinukleotidů na různých CNS v buněčných liniích T a NK buněk. Převzato z Aune T. M. et al., 2013

Epigenetické regulace, především změny methylace u promotoru genu pro IFN γ , kdy dochází k methylaci CNS, se často vyskytují u buněk, které by měly exprimovat IFN γ a jsou uvnitř nádoru. Zvýšená methylace na CpG ostrovech promotoru genu pro IFN γ je asociována se sníženou expresí tohoto genu. Tato nadměrná methylace oproti normální tkáni byla popsána například u TIL v nádorech děložního čípku (Ma D. et al., 2014). Tento promotor je hypermetylován i u dalších nádorových onemocnění, například u TIL z kolorektálního karcinomu (Aune M. et al., 2013).

Methylace u promotoru *Ifng* je také velmi zvýšená u lymfocytů v nádoru děložního čípku, méně pak u lymfocytů, vyskytujících intraepiteliálních neoplaziích děložního čípku oproti normální tkáni. To také koreluje s tím, že u buněk produkujících IFN γ v těchto nádorových tkáních je snížená exprese IFN γ mRNA. „Nicméně nebyla prokázána přímá souvislost mezi

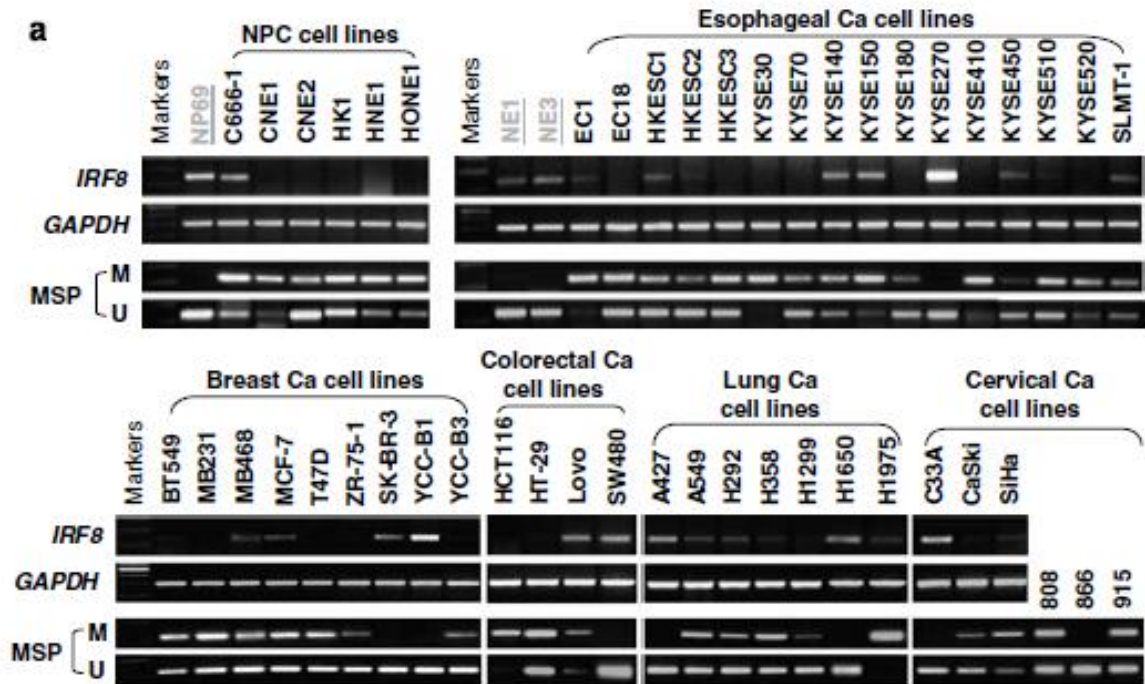
stádiem nádorového onemocnění, prognózou pacienta a metylací genu pro IFN γ .“ (Dong M. et al., 2014).

7.3. Regulace genů pro JAK/STAT a genu IRF

Rozeznáváme 6 faktorů STAT. Cytosolický transkripční faktor STAT1 α a STAT1 β (vznikají alternativním splicingem téhož genu) a také STAT2 jsou aktivovány IFN α . IFN γ aktivuje faktory STAT1 α a STAT1 β (Boehm U. et al., 1997). V experimentu, kdy byl sledován účinek 5-deoxyazacytidinu (5-aza) na nádorové buňky HT29, bylo pozorováno, že faktory STAT1, STAT2, a STAT3 reagovaly na tento inhibitor DNMT a hromadily se v buněčném jádře, zatímco STAT4, STAT5 a STAT6 nikoli. Z toho můžeme usuzovat, že inhibice DNMT povede ke zvýšení exprese genů pro STAT1, STAT2 a STAT3 (Karpf A. R. et al., 1999).

Nadměrná methylace promotoru IRF zeslabuje transkripci genů pro IRF. Methylace DNA spojená s umlčením IRF faktorů byla pozorována u různých nádorových buněk. Promotory pro IRF jsou methylovány u mnoha lidských karcinomů, např. u nádorů žaludku a střev, oční čočky, oesophagu a nasopharyngu, kostí, kolorektálního karcinomu, nádorů glie, respiračního traktu, lidské myeloidní leukémie, akutní leukémie, nádorů svalové tkáně a děložního čípku. Chybná methylace promotoru genu pro IRF4, především v oblastech CpG ostrovů se vyskytuje u chronické myeloidní leukemie. Demethylační agens, např. 5-aza, snižují *de novo* i udržovací metylaci promotoru tohoto genu (Ortmann Ch. A. et al., 2005). Intenzivně byla studována DNA methylace a její vliv na expresi faktoru IRF8. Faktor IRF8 je za fyziologického stavu exprimován, ale jeho exprese je snížena u mnoha lidských nádorů. IRF8 také způsobuje, že se buňky méně snadno dostanou do stavu apoptózy (McGough J. M. et al., 2008).

Methylace promotoru IRF8 má za následek narušení jeho odpovědi na stimulaci IFN γ . Za metylaci IRF 8 jsou zodpovědné enzymy DNMT1 a DNMT3 (McGough J. M. et al., 2008). Při výzkumu různých buněčných nádorových linií byla zjištěna snížená exprese IRF8 u „6 ze 6 buněčných linií u nádorů nosohltanu, 14 ze 16 buněčných linií u nádorů oesophagu, 7 z 9 linií u nádorů prsu, 3 ze 4 buněčných linií u kolorektálního karcinomu, 5 ze 7 buněčných linií u nádorů plic, 4 ze 6 buněčných linií u nádorů děložního hrdla a 3 ze 17 buněčných linií u nádorů žaludku.“ (Lee K.Y. et al., 2008).



Obr 6.:Umlčení promotoru pro IRF8 methylací promotoru v nádorových buněčných liniích. A) exprese a methylace IRF8 v panelu nádorových buněčných linií. Převzato z Lee K. Y. et al., 2008

V dalších studiích na liniích odvozených z nádorů žaludku byla zjištěna reverzibilně potlačená exprese IRF4, IRF5 a IRF8, spojená s methylací příslušných genů (Yamashita M. et al., 2010). Aplikace 5-aza obnovila expresi těchto genů a zvýšila inhibiční účinek interferonů α , β a γ na růst buněk. Ukazuje se tak, že demethylace IRF faktorů může obnovit protinádorové účinky interferonů a také, že methylace např. IRF4 by mohla sloužit jako prognostický znak pro rekurenci nádorového růstu.

7.4. Epigenetické regulace exprese genů zodpovědných za úpravu a prezentaci antigenu

V ideálním případě všechny buňky v organismu vystavují fragmenty vlastních nebo infekcí či nádorem pozměněných proteinů v komplexu MHC gpI na svém povrchu tak, aby byly rozpoznatelné T lymfocyty. Cytosolické proteiny jsou označeny polyubikvitinilací a jsou v proteozomu rozloženy na peptidové fragmenty, jež putují do endoplazmatického retikula

(ER). Na membráně ER se nacházejí dva ABC transportéry – transportéry asociované s processingem antigenu (TAP1 a TAP2), které na úkor spotřeby ATP transportují peptidové fragmenty do ER. V lumen ER dojde k jejich poskládání s řetězcem α a β_2m (β_2 -mikroglobulin) a k vazbě do správné konformace (Setiadi A. F. et al., 2005). Posléze jsou dopraveny přes Golgiho aparát (GI) k povrchu buňky a vystaveny v komplexu s MHC gpI na buněčném povrchu. Ty jsou pak rozpoznány cytotoxickými T lymfocyty, jejichž koreceptor CD8 se naváže na MHC gpI, což vede v konečném důsledku k destrukci buňky. Tyto dva transportéry tvoří v membráně heterodimer a jejich mutace může způsobit snížení prezentace MHC gpI na povrchu buňky (Murphy K et al., 2012).

U nádorů ve fázi úniku před imunitním dozorem se ve zvýšené míře vyskytují poruchy funkčnosti jednotlivých částí APM. „Nádorové buňky často neprezentují na svém povrchu antigeny prostřednictvím MHC gpI, a pokud ano, antigenní prezentace je slabá a nevyvolá imunitní odpověď. Navíc se zde uplatňuje mechanismus periferní tolerance, původně prevence toho, aby autoreaktivní T buňky, které unikly selekci v thymu, způsobily autoimunitu.“ (Tomasi T. B. et al., 2006). U mnoha nádorů bývá vyšší incidence metastáz a tím i horší prognóza pro pacienty, pokud je snížena exprese MHC gpI na buněčném povrchu.

„Antigenní prezentaci často potlačují nevratné mutace v těžkém řetězci a v β_2m HLA typu I, jako ztráta heterozygoty, delece, mutace se ztrátou smyslu a posuny čtecího rámce.“ Dále se objevují mutace v genech pro TAP 1 a TAP2. Kromě ireverzibilních mutací mohou být tyto geny pouze umlčeny. Toto umlčení je reverzibilní prostřednictvím $IFN\gamma$ (Chang Ch-Ch et al., 2015).

„Nežádoucí umlčení exprese genů důležitých pro prezentaci antigenu v kontextu MHC gpI obecně mohou být jednak „tvrdé“, které jsou už ireverzibilní a jednak „měkké“, jež mohou souviset s umlčením genů antigen prezentující mašinerie. Právě měkká umlčení genů pro APM mohou být zvrácena pomocí $IFN\gamma$.“ (Seliger B. et al, 2008). Tím lze zvýšit např. nízkou expresi MHC gpI na buněčném povrchu nebo, jak již bylo řečeno, nedostatečnou transkripci genu *TAP-1*.

Ukazuje se, že nádorové buňky mají schopnost regulovat skrze epigenetické mechanismy expresi různých genů, které ovlivňují prezentaci antigenu. Jsou to například geny pro β_2m , geny pro úpravu antigenu TAP1 a TAP2, tapasin, proteiny o nízké molekulární hmotnosti 2

a 7 (LMP 2 a 7) a aktivátor proteasomu 28 (PA28). U nádorů s nízkou expresí MHC gpI byla pozorována nízká acetylace histonů uvnitř promotoru pro TAP1, DNA je proto nedostatečně přístupná pro transkripci. Působení IFN γ však umožnilo skrze CREB Binding Protein (CPB), který ovlivňuje acetylaci histonů, tento stav zvrátit (Setiadi F. et al., 2007). IFN γ samotný zvyšuje expresi MHC gpI také tím, že způsobuje hyperacetylaci histonů H3 v promotoru *TAP-1* genu a dalších genů v MHC lokusu. Celá tato oblast DNA je vlivem IFN γ dekondezována, tudíž se stává přístupnější pro transkripci. To v konečném důsledku souvisí se zvýšenou fosforylací dráhy JAK-STAT a na DNA se naváže remodelující enzym BRG1, který způsobí aktivaci RNA polymerázy II a hyperacetylaci histonů (Christova R. et al., 2007).

V dalších studiích bylo prokázáno, že inhibitor HDAC Trichostatin A indukoval v několika MHC gpI deficientních nádorových liniích expresi umlčených genů kódujících komponenty APM - TAP-1, TAP-2, LMP-2, LMP-7 a tapasin (Setiadi A. F. et al., 2008). V důsledku toho došlo i ke zvýšení exprese MHC gpI na povrchu nádorových buněk a jejich zvýšené imunogenicitě.

V naší laboratoři bylo také porovnáváno působení IFN γ a kombinace inhibitorů histondeacetyláz např. Trichostatinu A (TSA) a butyrátu sodného nebo inhibitoru DNA methyltransferáz 5AC na nádorových liniích s reverzibilně sníženou expresí MHC gpI. Hypermethylace promotoru a acetylace histonů byla zjištěna u nádorových buněk exprimujících HPV-16 virové antigeny E6/E7. Ukázalo se, že IFN γ má silnější efekt na zvýšení exprese MHC gpI na povrchu nádorových buněk než kombinace TSA s 5AC (Manning J. et al., 2007). Zvýšení exprese MHC gpI vlivem epigenetických agens bylo spojeno s indukcí genů kódujících TAP-1, TAP-2, LMP-2 a LMP-7. Toto zvýšení exprese souviselo s demethylací odpovídajících sekvencí DNA a naopak acetylací histonů. Demethylace těchto sekvencí byla prokázána methylačně specifickou PCR (MSP).

Zvýšená exprese MHC gpI byla spojena také s vyšší citlivostí buněk ošetřených 5AC nebo TSA k lýze splenocyty z imunizovaných myší. V experimentech *in vivo* byl také prokázán synergický/aditivní efekt kombinace použití 5AC s imunoterapií MHC-deficientních nádorů TC-1/A9 (Šimová J. et al., 2011).

Spojení DNA demethylace s indukcí exprese umlčených APM genů pomocí IFN γ bylo prokázáno v dalších experimentech. Jako vzorek byly použity linie nádorových buněk

TC1/A9, které na svém povrchu neexprimují MHC gpI a buňky rakoviny prostaty TRAMP-C2. Vlivem IFN γ došlo k demethylaci sekvencí promotorů genů *TAP-1*, *TAP-2*, *LMP-2*, ale nebylo pozorováno podstatné snížení methylace promotoru genu *LMP-7*. Dále bylo zjištěno, že IFN γ indukoval acetylaci histonů H3 v oblastech promotorů genů pro APM na lysinu 18. Demethylace se objevila 2 hodiny po léčbě IFN γ a po 6 hodinách dosáhla maxima. Pro srovnání u 5-aza bylo dosaženo maxima po 24 hod, což odpovídá tomu, že nejprve musela proběhnout replikace. I když mechanismus indukce DNA demethylace zůstává nejasný, z kinetiky je možno usuzovat, že na rozdíl od účinků 5-aza, bude DNA demethylace vlivem IFN γ aktivní proces (Vlková V. et al., 2014).

7.5. Regulace exprese IDO

Indoloxigenáza (IDO) je exprimovaná v určitých typech monocytů a dendritických buněk asociovaných s imunosupresí, makrofázích i v buňkách epitelu. Nádorové buňky často také vykazují zvýšenou expresi indoloxigenázy 1 (IDO1). „IDO v buňce blokuje syntézu tryptofanu a T-lymfocyty jsou velmi citlivé na nedostatek této aminokyseliny, proto IDO1 působí imunosupresivně.“ (Xue Z. T. et al., 2012). Na možnou epigenetickou regulaci pomocí DNA methylace ukazují výsledky experimentů na nádorových buňkách, ve kterých IFN γ v kombinaci se Zebularinem, což je analog cytidinu, který působí jako inhibitor DNMT a cytidindeaminázy, demethyluje promotor *Ido1* genu. Tím byla zvýšena exprese IDO (Liu H. et al., 2007). To by mohlo být problémem v léčbě nádorových a naopak využito v léčbě autoimunitních onemocnění.

8. Závěr

Epigenetické regulace hrají důležitou roli v regulaci exprese genu kódující IFN γ , v signalizační dráze IFN γ a také aktivaci některých umlčených genů regulovaných IFN γ v nádorových buňkách. Dosavadní poznatky také ukazují na to, že IFN γ je svým způsobem epigenetické agens a regulace exprese genů vlivem IFN γ zahrnuje epigenetické mechanismy. Na druhou stranu, jedním z účinků epigenetických modulátorů může být také ovlivnění signální dráhy IFN γ a exprese některých genů regulovaných IFN γ . Tím je možno také částečně vysvětlit některé imunomodulační účinky epigenetických agens (inhibitorů DNA

methyltransferáz a histondeacetyláz). Příkladem je obnova exprese MHC gpI v komplexu s peptidovými fragmenty na buněčném povrchu MHC-deficientních nádorových buněk, které se mohou stát opět rozpoznatelnými pro cytotoxické T buňky. Tyto výsledky ukazují na možné synergické účinky terapie pomocí epigenetických agens v kombinaci s imunoterapií nádorů.

Podstata a role epigenetických mechanismů v regulaci signální dráhy IFN γ prozatím ještě nejsou zcela známy. Další výzkum by mohl pomoci objasnit mechanismy rozdílného účinku IFN γ na různé populace buněk, některé mechanismy úniku nádorových buněk imunitní odpovědi a také, v neposlední řadě, přispět k lepšímu pochopení mechanismů imunomodulačních a protinádorových účinků epigenetických agens.

9. Použitá literatura

Agnello D., Lankford C. S., Bream J., Morinobu A., Gadina M., O'Shea J. J., Frucht D. M.: Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J. Clin Immunol*; 23:147–61, 2003

Aune T. M., Collins P. L., Collier S. P., Henderson M. A., Chang S.: Epigenetic Activation and Silencing of the Gene that Encodes IFN- γ . *Front Immunol.*; 4:112, 2013

Bekisz J., Sato Y., Johnson C., Husain S. R., Puri R. K., Zoon K. C.: Immunomodulatory effects of interferons in malignancies. *J. Interferon Cytokine Res.*; 33(4):154-61, 2013

Berger S. L., Kouzarides T., Shiekhatar R., Shilatifard A.: An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.*; 23(7):781-3, 2009

Biggar K. K., Li S. S. C.: Non-histone protein methylation as a regulator of cellular signalling and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; 2015

Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J. C.: Cellular responses to interferon γ . *Annu. Rev. Immunol.*; 15:749–95, 1997

Cedar H., Bergman Y.: Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms., *Nat Rev Genet.*; 10(5):295-304, 2009

Dighe A. S., Farrar M. A., Schreiber R. D.: Inhibition of cellular responsiveness to interferon-gamma (IFN gamma) induced by overexpression of inactive forms of the IFN gamma receptor. *J. Biol. Chem.* 15;268(14):10645-53, 1993

Dighe A.S., Richards E., Old L. J., Schreiber R. D.: Enhanced In Vivo Growth and Resistance to Rejection of Tumor Cells Expressing Dominant Negative IFN γ Receptors: *Immunity*, Vol. 1 447-456, 1994

Dong M., Chunyang J., Xiaoli H., Huibin L., Qingzhao L., Tingting L., Yanyan Y., Ou L.: Methylation Patterns of the IFN γ - Gene in Cervical Cancer Tissues. *Scientific reports*, 2014

Dunn G. P., Koebel C. M., Schreiber R. D.: Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*, 2006

Ealick S. E., Cook W. J., Vijay-Kumar S., Carson M., Nagabhushan T. L., Trotta P. P., Bugg C. E.: Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science*. 3; 252(5006):698-702, 1991

Glozak M. A., Sengupta N., Zhang X., Seto E.: Acetylation and deacetylation of non- histone proteins. *Gene.*; 363:15-23, 2005

Gough D. J., Levy D. E., Johnstone R. W., Clarke Ch. J.: IFN γ signaling - Does it mean JAK-STAT?. *Cytokine & Growth Factor Reviews*; Volume 19, Issues 5–6, 2008

Haan C., Kreis S., Margue C., Behrmann I.: Jaks and cytokine receptors-an intimate relationship. *Biochem Pharmacol.*; 72(11):1538-46, 2006

Hamm Ch. A., Costa F. F.: Epigenomes as therapeutic targets. *Pharmacol Ther.*; 151:72-86, 2015

Hashimoto H., Zhang X., and Cheng X.: Selective excision of 5- carboxylcytosine by a thymine DNA glycosylase mutant. *Journal of Molecular Biology*; 425(6): 971–976, 2013

Hassan A. H., Prochasson P., Neely K. E., Galasinski S. C., Chandy M., Carrozza M. J. and Workman J. L.: Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell*; Nov 1; 111(3):369-79, 2002

Hubackova S., Kucerova A., Michlits G., Kyjacova L., Reinis M., Korolov O., Bartek J., Hodny Z.: IFN γ induces oxidative stress, DNA damage and tumor cell senescence via TGF β /SMAD signaling-dependent induction of Nox4 and suppression of ANT2.; *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2015.162, 2015

Chang C. C., Pirozzi G., Wen S. H., Chung I. H., Chiu B. L., Errico S., Luongo M., Lombardi M. L., Ferrone S.: Multiple Structural and Epigenetic Defects in the Human Leukocyte Antigen Class I Antigen Presentation Pathway in a Recurrent Metastatic Melanoma Following Immunotherapy.; *J. Biol. Chem.*, 2015

Chang S., Aune T. M.: Histone hyperacetylated domains across the Ifng gene region in natural killer cells and Tcells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005

Choi J. C., Holtz R., Petroff M. G., Alfaidy N., Murphy S. P.: Dampening of IFN-gamma-inducible gene expression in human choriocarcinoma cells is due to phosphatase-mediated inhibition of the JAK/STAT-1 pathway. *J. Immunol.*;178(3):1598-607, 2007

Christova R., Jones T., Wu P. J., Bolzer A., Costa-Pereira A. P., Watling D., Kerr I. M., Sheer D: P-STAT1 mediates higher-order chromatin remodelling of the human MHC in response to IFN γ , *J Cell Sci.* 2007;

Jones P. A., Baylin S. B.: The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.*;3(6):415-28, 2002

Karpf A. R., Peterson P. W., Rawlins J. T., Dalley B. K., Yang Q., Albertsen H. and Jones D. A.: Inhibition of DNA methyltransferase stimulates the expression of signal transducer and activator of transcription 1, 2, and 3 genes in colon tumor cells. *The Huntsman Cancer Institute*, 1999

Kimura T., Kadokawa Y., Harada H., Matsumoto M., Sato M., Kashiwazaki Y., Tarutani M., Tan R. S., Takasugi T., Matsuyama T., Mak T. W., Noguchi S. And Taniguchi T.: Essential and non-redundant roles of p48 (ISGF3) and IRF-1 in both type I and type II interferon responses, as revealed by gene targeting studies, *Genes to Cells*, 1995

Kohli R. M., Zhang Y.: TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature.*;502(7472):472-9, 2013

Lazear H. M., Nice T. J., Diamond M. S.: Interferon- λ : Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond. *Immunity*; 43(1):15-28, 2015

Lee K. Y., Geng H., Ng K. M., Yu J., van Hasselt A., Cao Y., Zeng Y. X., Wong A. H. Y., Wang X., Ying J., Srivastava G., Lung M. L., Wang L. D., Kwok T. T., Levi B. Z., Chan A. T. C., Sung J. J. Y., Tao Q.: Epigenetic disruption of interferon-c response through silencing the tumor suppressor interferon regulatory factor 8 in nasopharyngeal, esophagea and multiple other carcinomas. *Oncogene*; 27, 5267–5276, 2008

Lister R., Pelizzola M., Downen R. H., Hawkins R. D., Hon G., Julian Tonti-Filippini J., Nery J. R., Lee L., Ye Z., Ngo Q. M., Edsall L., Antosiewicz-Bourget J., Stewart R., Ruotti V., Millar A. H., James A., Thomson J. A., Ren B. and Ecker J. R.: Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315-322, 2009

Liu H., Xue Z. T., Sjögren H. O., Salford L. G., Widegren B.: Low dose Zebularine treatment enhances immunogenicity of tumor cells. *Cancer Letters*, 2007

Ma D., Jiang Ch., Hu X., Liu H., Qingzhao Li Q., Tingting Li T., Yanyan Yang Y., Li O.: Methylation Patterns of the IFN-c Gene in Cervical Cancer Tissues. *Scientific Reports*, 2014

Manning J., Indrova M., Lubyova B., Pribylova H., Bieblova J., Hejnar J., Simova J., Jandlova T., Bubenik J. and 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*, 2007

McGough J. M, Yang D., Huang S., Georgi D., Hewitt S. M, Roecken Ch., Taenze M., Ebert M. P. A., Liu K.: DNA Methylation Represses IFN Induced and Signal Transducer and Activator of Transcription 1- Mediated IFN Regulatory Factor 8 Activation in Colon Carcinoma Cell. *Mol Cancer Res*; 6(12), 2008

Moore L. D., Le T. and Fan G.: DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology Review*, 2013

Murphy K. M. and Steven L., Reiner S. L.: The lineage decisions of helper T cells. *Nature Reviews Immunology* 2, 933-944; doi:10.1038/nri954, 2002

Murphy K.: *Janeway's immunobiology*. ISBN 978-0-8153-4243-4, 2012

Okano M., Bell D. W., Haber D. A., Li E.: DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.*; 99(3):247-57, 1999

Ortmann Ch A., Burchert A., Izle K. H., Nitsche A., Wittig B., Neubauer A. and Schmidt M.: Down-regulation of interferon regulatory factor 4 gene expression in leukemic cells due to hypermethylation of CpG motifs in the promoter region. *Nucleic Acids Research*, 2005

Pearce E. L., Mullen A. C., Martins G. A., Krawczyk C. M., Hutchins A. S., Zediak V. P., Banica M., Di Cioccio C. B., Gross D. A., Mao C. A., Shen H., Cereb N., Yang S. Y., Lindsten T., Rossant J., Hunter C. A., Reiner S. L.: Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science.*; 302(5647):1041-3, 2003

Platanias L. C.: Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.*; 5(5):375-86, 2005

Rawlings J. S., Rosler K. M., Harrison D. A.: The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.*; 117(Pt 8):1281-3, 2004

Ray-Gallet D. and Almouzni G.: Nucleosome dynamics and histone variants. *Essays In Biochemistry*; 48 75-87, 2010

Reiner S. L.: Epigenetic control in the immune response. *Human Molecular Genetics*, 2005

Reiner S. L. and Seder R. A.: Dealing from the evolutionary pawnshop: How lymphocytes make decisions. *Immunity* 11:1–10, 1999

Robinson R.: An HDAC in the cytoplasm, not the nucleus, plays a pathogenic role in Huntington's disease. *PLoS Biol.*; 11(11):e1001718, 2013

Rodig S. J., Meraz M. A., White J. M., Lampe P. A., Riley J. K., Arthur C. D., King K. L., Sheehan K. C., Yin L., Pennica D., Johnson E. M. Jr., Schreiber R. D.: Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell.*; 93(3):373-83, 1998

Rothbart S. B., Strahl B. D.: Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim Biophys Acta*; 1839(8): 627–643, 2014

Sanchez R., Zhou M. M.: The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Curr Opin Drug Discov Devel* 12; 659–665, 2009

Seliger B., Ruiz-Cabello F., Garrido F.: IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv Cancer Res.*;101:249-76, 2008

Setiadi A. F., David M. D., Chen S. S., Hiscott J. and Jefferies W. A.: Identification of Mechanisms Underlying Transporter Associated with Antigen Processing Deficiency in Metastatic Murine Carcinomas. *Cancer Research*, 2005

Setiadi A. F., David M. D., Seipp R. P., Hartikainen J. A., Gopaul R., Jefferies W. A.: Epigenetic Control of the Immune Escape Mechanisms in Malignant Carcinomas, *Molecular and Cellular Biology*, 2007

Setiadi A. F., Omilusik K., David M. D., Seipp R. P., Hartikainen J., Gopaul R., Choi K. B., Jefferies W. A.: Epigenetic enhancement of antigen processing and presentation promotes immunorecognition of tumors. *Cancer Res.*; 68(23):9601-7, 2008

Schoenborn J. R., Dorschner M. O., Sekimata M., Santer D. M., Shnyreva M., Fitzpatrick D. R.: Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon-gamma. *Nat. Immunol.* 8,73274210.1038/nrg2211, 2007

Schoenborn J. R., Wilson C. B.: Regulation of Interferon-g During Innate and Adaptive Immune Responses; *Advances in Immunology*, 2007

Schroder K., Hertzog P. J., Ravasi T., Hume D. A.: Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc Biol.*; 75(2):163-89, 2004

Šímová J., Polláková V., Indrová M., Mikyšková R., Bieblová J., Stěpánek I., Bubeník J., Reiniš M.: Immunotherapy augments the effect of 5- azacytidine on HPV16-associated tumours with different MHC class I-expression status. *British Journal of Cancer* , 2011

Szabo S. J., Kim S. T., Costa G. L., Zhang X., Fathman C. G., Glimcher L. H.: A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.*; 100(6):655-69, 2000

Tartaglia L. A., Goeddel D. V.: Tumor necrosis factor receptor signaling. A dominant negative mutation suppresses the activation of the 55- kDa tumor necrosis factor receptor. *J. Biol. Chem.*; 267(7):4304-7, 1992

Tomasi T. B., Magner W. J., A., Khan A. N. H.: Epigenetic regulation of immune escape genes in cancer, *Cancer Immunol Immunother*, 2006

Vlková V., Štěpánek I., Hrušková V., Šenigl F., Mayerová V., Šrámek M., Šimová J., Bieblová J., Indrová M., Hejhal T., Dérian N., Klatzmann D., Six A. and Reiniš M.: Epigenetic regulations in the IFN γ signalling pathway: IFN γ - mediated MHC class I upregulation on tumour cells is associated with DNA demethylation of antigen-presenting machinery genes. *Oncotarget*, 2014

Wilson C. B., Rowell E., Sekimata M.: Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.*;9(2):91-105, 2009

Xue Z. T., Sjögren H. O., Salford L. G., Widegren B.: An epigenetic mechanism for high, synergistic expression of indoleamine 2,3- dioxygenase 1 (IDO1) by combined treatment with zebularine and IFN γ Potential therapeutic use in autoimmune diseases, *Molecular Immunology*, 2012

Yamashita M., Toyota M., Suzuki H., Nojima M., Yamamoto E., Kamimae S., Watanabe Y., Kai M., Akashi H., Maruyama R., Sasaki Y., Yamano H., Sugai T., Shinomura Y., Imai K., Tokino T., Itoh F.: DNA methylation of interferon regulatory factors in gastric cancer and noncancerous gastric mucosae, *Cancer Science*, 2010

Yao Y. L., Yang W. M.: Beyond histone and deacetylase: An overview of cytoplasmic histone deacetylases and their nonhistone substrates, *J. Biomed Biotechnol.* 2011: 146493, 2011

Yeh T. C., Pellegrini S.: The Janus kinase family of protein tyrosine kinases and their role in signaling. *Cell Mol Life Sci.* 1999; 55(12):1523-34, 1999

Zaidi M. R., Merlino G.: The Two Faces of Interferon- γ in Cancer. *Clin Cancer Res*; 17(19); 6118–24, 2011