

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

3. lékařská fakulta



**Autoreferát dizertačnej práce**

Funkcia chromatín-remodelujúceho komplexu SWI/SNF  
v onkogenéze a progresii melanómových buniek

Ing. Ľubica Ondrušová

Praha, 2013

Doktorské studijní programy v biomedicině  
3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Odbor : Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

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

Školiace pracovisko: Oddělení transkripce a buněčné signalizace  
Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky,  
1. LF Univerzity Karlovy v Praze a VFN  
Kateřinská 32, 121 08 Praha 2

Autor: Ing. Lubica Ondrušová

Školiteľ: Doc. MUDr. Jiří Vachtenheim, CSc.

Oponenti: .....

.....

.....

.....

Autoreferát bol rozoslaný dňa .....

Obhajoba sa koná (deň, hodina, miesto) .....

.....

S dizertáciou je možné sa zoznámiť na dekanáte 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Ruská 87, 100 00 Praha 10.

## Súhrn

Čoraz častejšie je vznik nádorových ochorení spájaný so zmenami chromatinovej remodelácie. SWI/SNF chromatín-remodelujúce komplexy sa podieľajú na regulácii génovej expresie zmenou chromatinovej štruktúry a v závislosti na kontexte, môžu vystupovať ako transkripčné aktivátory alebo represory. Energiu pre remodeláciu poskytuje ATPázová podjednotka, ktorou môže byť buď proteín Brm (Brahma) alebo Brg1 (Brahma related-gene 1). Malígny melanóm je agresívny druh rakoviny, ktorý sa vyznačuje vysokou rezistenciou k súčasnej terapii. Kľúčové postavenie v biológii melanómu má transkripčný faktor MITF (microphthalmia-associated transcription factor), ktorý stojí v centre transkripčnej regulácie od embryonálneho vývoja normálnych melanocytov, ich diferenciácie, udržania identity a prežívania nielen normálnych, ale aj nádorových melanocytov. V našej práci sme zistili, že aktívny SWI/SNF komplex je nevyhnutný pre expresiu MITF. Tento komplex je taktiež dôležitý pre expresiu niektorých cieľových génov MITF. Prežívanie melanómových buniek je absolútne závislé na funkčnom komplexe SWI/SNF a bunky si zachovávajú vysokú expresiu jednotlivých zložiek. Primárne sa v regulácii MITF uplatňujú Brg1-obsahujúce subkomplexy, ktoré môžu byť po strate expresie Brg1 funkčne kompenzované subkomplexami s Brm. V každom prípade pre prežívanie a proliferáciu melanómových buniek musí byť zachovaná expresia aspoň jednej ATPázy. Štúdium Brg1-umlčaných melanómových buniek odhalilo dôležitosť SWI/SNF komplexu nielen z hľadiska manipulácie hladiny MITF, ale aj v regulácii ďalších proonkogénnych faktorov podporujúcich proliferáciu a prežívanie buniek nezávisle na transkripčnej osi MITF. Napriek tomu, že SWI/SNF komplex v prevažnej väčšine rakovín vystupuje ako tumorový supresor, v proliferácii a prežívaní melanómových buniek má naopak zásadnú pozitívnu úlohu. Podobne ako v prípade niektorých ďalších typov rakoviny (prostaty, žalúdka alebo hrubého čreva), SWI/SNF komplex (alebo aspoň niektorý z jeho proteínov, obzvlášť Brg1) pôsobí ako nádorový promótor. Inaktivácia komplexu môže z tohoto dôvodu predstavovať nádejný cieľ v terapii melanómu.

## Summary

There is an increasing evidence that alterations in chromatin remodeling play an important role in tumorigenesis. The SWI/SNF chromatin remodeling complexes contribute to the regulation of gene expression by altering the local chromatin structure. Depending on the context, they can act as either transcriptional activators or repressors. All SWI/SNF subcomplexes contain one of two ATPase subunits, Brm (Brahma) or Brg1 (Brahma related gene 1), which provide the energy for remodeling. Malignant melanoma is an aggressive cancer and is known for its notorious resistance to conventional anticancer therapies. MITF (microphthalmia-associated transcription factor) plays an essential role in melanoma biology and is placed on the central crossroad in the regulation of melanocyte development, differentiation, maintenance of lineage identity, and survival of both normal and malignant melanocytes. Our results show that the active SWI/SNF complex is strictly required for the expression of MITF. This complex is also required for expression of some transcriptional MITF targets. The survival of melanoma cells is absolutely dependent on functional SWI/SNF complex and all subunits of this complex are expressed at high levels in melanoma cell lines. Primarily, Brg1-containing subcomplexes are more important for MITF expression and melanoma cells proliferation, but after Brg1 loss its function could be compensated by Brm. Anyway, at least one ATPase must be expressed in order for melanoma cells to express MITF and proliferate. The study of Brg1-knockdowned melanoma cells has revealed the importance of SWI/SNF subcomplexes resulted from the manipulation of level of MITF. Furthermore, proliferation and survival of melanoma cells is increased by other SWI/SNF-dependent prosurvival and pro-oncogenic factors independently of the MITF axis. Although SWI/SNF complex is mostly regarded as a tumor suppressor, it is presented here its crucial positive role in melanoma proliferation and survival. Similarly as in the case of some other cancer types (prostate cancer, gastric and colorectal cancer), SWI/SNF complex, or at least some of its components (mostly Brg1) seems to be a tumor promoter for melanoma. Thus, inactivation of its activity may be a promising target in melanoma therapy.

## OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. CIELE PRÁCE.....	10
3. POUŽITÉ METÓDY.....	11
4. VÝSLEDKY.....	12
5. DISKUSIA.....	17
6. ZÁVERY.....	22
7. ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ A ABSTRAKTOV.....	24
8. LITERATÚRA.....	26

# 1. ÚVOD

## *SWI/SNF komplex*

Chromatínová štruktúra je všeobecne regulovaná dvoma základnými skupinami multiproteínových komplexov. Prvou skupinou sú komplexy, ktoré kovalentne modifikujú histónové chvostíky (acetyláciou, fosforyláciou, metyláciou) a druhou skupinou sú komplexy remodelujúce nukleozómovú štruktúru. Obe formy, či už posttranslačné modifikácie alebo remodelácia chromatinu sa podieľajú na regulácii génovej expresie tým, že umožňujú prístup faktorom viažucim sa na DNA (Khorasanizadeh, 2004).

Najlepšie charakterizovaným chromatin-remodelujúcim komplexom je SWI/SNF (the switch in mating type/sucrose nonfermenting complex in yeast). Ľudský SWI/SNF komplex má veľkosť 2MDa a pozostáva z 9 - 12 proteínov. K zmene štruktúry alebo pozície nukleozómov využíva energiu z hydrolýzy ATP. Za túto funkciu je v komplexe zodpovedná jeho enzýmová podjednotka s ATPázovou aktivitou, ktorou môže byť buď **Brm** (SMARCA2, brahma, BAF190B) alebo **Brg1** (SMARCA4, brahma-related gene 1, BAF190A) (Muchardt a Yaniv, 2001).

SWI/SNF komplex má dôležitú úlohu v mnohých bunkových procesoch ako je diferenciácia, proliferácia, replikácia DNA, či oprava poškodenej DNA. Jeho nefunkčnosť je spájaná s malígnou transformáciou a dva proteíny tohoto komplexu, In1l a Brg1, sú považované za tumorové supresory. INI1 je bialelicky inaktivovaný takmer u 100% malígnych rhabdoidných tumorov (MRT) (Versteeg a spol., 1998). Brg1 je inaktivovaný alebo downregulovaný hlavne v bunkových líniiach a vzorkách nemalobunkového karcinómu pľúc (Reisman a spol., 2003). Na rozdiel od Brg1, Brm je mutovaný zriedka a oveľa častejšie je pozorovaná strata jeho expresie, ktorá je potlačená epigenetickým mechanizmom (Glaros a spol., 2007; Reisman a spol., 2009).

## *Malígnny melanóm a MITF*

Zo skupiny kožných nádorov predstavuje malígnny melanóm najnebezpečnejšiu formu. Vzniká z melanocytov, špeciálnych pigmentových buniek, ktorých funkciou je ochrana pokožky pred UV žiarením. Nadmerná produkcia melanocytov uvoľnená

z kontroly susedných keratinocytov umožňuje vznik melanocytických lézií névusov. Névusy sú vo všeobecnosti benígne, ale môžu sa stať prekursorom malígneho melanómu. Prechod od névusu k melanómu zahrňujúci niekoľko fáz zmien nemusí byť vždy pravidlom a metastatický melanóm sa môže vyvinúť priamo z izolovaných melanocytov alebo névusu (Gray-Schopfer a spol., 2007; Vachtenheim a Borovanský, 2010).

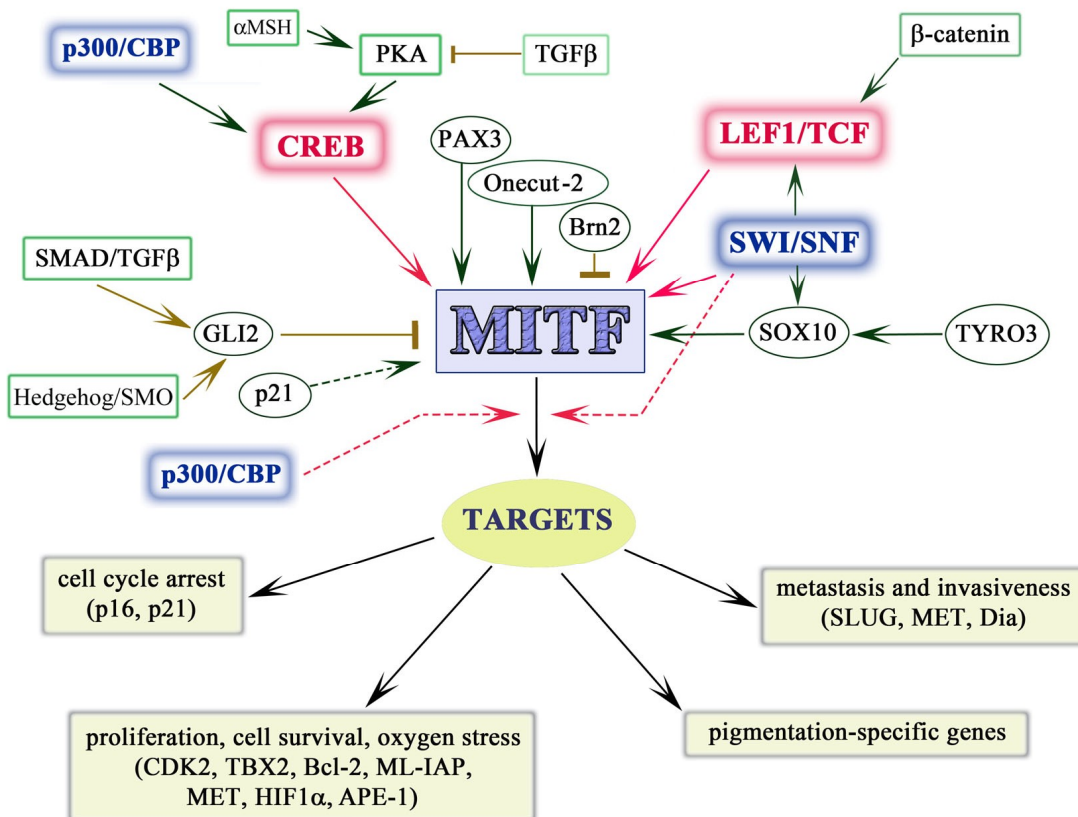
Transkripčný faktor MITF (microphthalmia-associated transcription factor) má kritickú úlohu pre celý vývoj melanocytovej línie od embryonálnych melanocytov, pre prežívanie melanocytov ako aj melanómových buniek. V súčasnosti je známych viac ako 40 cieľových génov MITF, ktorých účinky sú častokrát antagonistické (napr. CDK2 a CDKN1A) (Cheli a spol., 2010). Na Obr. 1 je transkripčná regulačná sieť, ktorej centrálnym faktorom je MITF.

Známe koaktivátory MITF sú proteíny p300/CBP (CREB binding protein). Proteíny P300/CBP sú globálne transkripčné koaktivátory, ktoré slúžia ako kofaktory pre mnohé odlišné transkripčné faktory. Viazu sa na MITF a stimulujú transkripciu z citlivých promótor-reportérov (Sato a spol., 1997; Price a spol., 1998). p300/CBP patria do skupiny histón-acetyltransferáz (HAT) a sú schopné acetylovať históny a nehistónové proteíny, z ktorých mnohé sú transkripčné faktory (Goodman a Smolik, 2000). Je pravdepodobné, že MITF rekrutuje p300/CBP k cieľovým promótorom a sám je nimi acetylovaný (naše nepublikované výsledky).

Funkcia ďalších HAT ako koaktivátorov MITF nie je jasná. Študovali sme úlohu dvoch HAT, PCAF (P300/CBP associated factor) a hGCN5 (human general control nonderepressible 5) v regulácii aktivity MITF.

Enzýmy SWI/SNF komplexu sa podieľajú na regulácii niekoľkých špecifických melanocytových génov. MITF rekrutuje SWI/SNF komplex k ich promótorom, ktorý následne môže remodelovať lokálnu chromatinovú štruktúru. Brg1 sa viaže na niekoľko promótorov závislých na transkripčnej aktivite MITF, napríklad promótor pre livin (ML-IAP), potenciálny antiapoptotický faktor, ktorý je silno exprimovaný v melanómoch (Dynek a spol., 2008). Brg1 sa ďalej viaže na promótory génov kódujúcich melanínovú syntézu (tyrozináza, trp1 a trp2), promótor génu rab27A, ktorého produkt reguluje transport melanozómov (Chiaverini a spol., 2008) a promótor

antiproliferačného génu p21. Na druhej strane sa neviaže na promótoary génov cdk2, bcl2 alebo tbx2 (Keenen a spol., 2010; Saladi a spol., 2010a).



### Obr. 1 Transkripčná sieť MITF v melanómoch

Na obrázku sú znázornené upstream MITF aktivátory (pravdepodobne najdôležitejšie sú červené), modré sú znázornené koaktivátory. Downstream transkripčné ciele MITF sú znázornené ako “targets”. Prerušovaná čiara značí, že ňou indikovaná epigenetická regulácia nemusí platiť pre všetky ciele MITF.

#### *p21 a MITF*

V benígnych névusoch bola detekovaná veľmi nízka alebo nulová hladina expresie inhibítora cyklín-dependentných kináz p21, kdežto v metastatických vzorkách bola dokázaná vysoká úroveň expresie p21. Úloha p21 v regulácii bunkového cyklu v prípade malígneho melanómu nie je známa, a tiež prečo malígne melanocyty tolerujú vysokú hladinu p21. Carreira a spol. (2005) zistili, že v melanocytoch je transkripcia p21 aktivovaná transkripčným faktorom MITF. V našej práci sme sa zaoberali úlohou p21 v expresii špecifických pigmentových génov a študovali sme možnú spätnoväzobnú reguláciu MITF-promótoru.



### *mTOR signálna dráha*

Signálne dráhy reprezentované kaskádovým usporiadaním proteinkináz, ako je napríklad PI3K/Akt/mTOR, sa podieľajú na regulácii bunkovej fyziológie a v ľudských nádoroch sú často deregulované. mTOR (mammalian target of rapamycin) stojí v centre signálnych dráh podieľajúcich sa na regulácii početných bunkových dejov ako je transkripcia, biogenéza ribozómov, turnover mRNA, translácia, organizácia cytoskeletu ap. (Wullschleger a Loewith, 2006).

mTOR je súčasťou dvoch heteromerných komplexov, mTORC1 a mTORC2, ktoré sa odlišujú vo svojom podjednotkovom zložení a funkciách. Lepšie preštudovaný komplex mTORC1 je zložený z mTOR, G $\beta$ 1 a proteínu raptor (regulatory associated protein of TOR) a komplex mTORC2 pozostáva z mTOR, G $\beta$ 1 a proteínu rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) (Loewithe a spol., 2002).

Vojtěchová a spol. (2008) zistili, že aktivita nereceptorovej tyrozín kinázy Src je dôležitá v regulácii dráhy mTORC1 v RSV-transformovanej bunkovej línii a inhibovali ju pomocou SU6656, farmakologického inhibítora aktivity Src. V našej práci sme podobne k inhibícii Src použili SU6656 a sledovali jeho účinok na dráhu Akt/mTOR v melanómnej bunkovej línii Hbl.

## 2. CIELE PRÁCE

Dizertačná práca je predovšetkým zameraná na štúdium úlohy SWI/SNF komplexu v melanómových bunkách. Sleduje hlavne súvislosť s transkripčným faktorom MITF, ktorý je pre prežívanie melanómových buniek kritický. Pretože je úloha MITF tak zásadná, práca je doplnená novými poznatkami v regulácii transkripcie/aktivity MITF ďalšími mechanizmami.

### Hlavné ciele:

- 1) Objasniť úlohu SWI/SNF chromatín-remodelujúceho komplexu v expresii MITF a prežívaní melanómových buniek v súvislosti s MITF.
- 2) Zistiť expresiu jednotlivých zložiek SWI/SNF komplexu v palete melanómových buniek v porovnaní s normálnymi melanocytmi.
- 3) Objasniť, ktoré subkomplexy SWI/SNF sú prioritne dôležité v melanómových bunkách.
- 4) Preskúmať úlohu SWI/SNF komplexov v prežívaní melanómových buniek nezávisle na regulácii MITF a jeho cieľových génov.
- 5) Navrhnuť cieľ molekulárnej génovej terapie pre melanóm.

### Doplnkové ciele:

- 6) Objasniť úlohu p21 v transkripcii MITF.
- 7) Objasniť úlohu PCAF a hGCN5 v regulácii MITF na melanocytovo-závislom melastatinovom promótore.
- 8) Zistiť účinok SU6656 na aktivitu mTOR.

### **3. POUŽITÉ METÓDY**

V dizertačnej práci boli použité nasledovné metódy: kultivácia buniek, transfekcie a reportérové štúdie, umlčovanie génov prostredníctvom shRNA a lentivírusovej infekcie, microarray analýza, RT-PCR, real time PCR, imunoprecipitácia, chromatin-imunoprecipitácia, colony formation assay, viability assay, proliferačné krivky, soft agar colony assay, prietoková cytometria, príprava GST-fusion proteínov, pull-down analýza.

## 4. VÝSLEDKY

Najdôležitejšie výsledky dizertačnej práce:

### ***Expresia jednotlivých podjednotiek SWI/SNF komplexu v melanómových bunkách***

Analýzou jadrových extraktov 8 melanómových línií a 3 nenádorových melanocytových línií sme pomocou Western blotu určili hladiny 10 zložiek SWI/SNF komplexov. Zistili sme vysokú expresiu väčšiny podjednotiek v melanómových bunkách v porovnaní s normálnymi melanocytmi. Z analyzovaných línií len línia SK-MEL-5 postrádala expresiu enzýmovej podjednotky Brg1. Brm bol exprimovaný vo všetkých testovaných líniách. Vo všeobecnosti majú melanómové bunky zachovanú alebo dokonca zvýšenú hladinu SWI/SNF proteínov.

### ***Brm a Brg1 aktivujú MITF-promótor a viažu sa na MITF-promótor in vivo***

Medzi transkripčné faktory aktivujúce promótor génu pre MITF patria transkripčné faktory Pax3, Sox10, CREB a LEF-1/TCF (Vachtenheim a Borovanský, 2010). Brg1 interaguje s  $\beta$ -katenínom pri aktivácii TCF transkripčných faktorov (Barker a spol., 2001) a naznačuje potrebu Brg1 v transkripčnej regulácii MITF-promótoru. V promótor-reportérovom systéme sme sledovali účinok exogénnej hladiny Brg1, Brm a ich dominantne negatívnych mutantov (bez ATPázovej aktivity) na aktivitu MITF-promótoru. Zvýšenie hladiny proteínu Brg1 alebo Brm prostredníctvom expresných vektorov malo za následok zvýšenie promótorovej aktivity. V prípade dominantne negatívnych mutantov sme pozorovali mierne inhibičný účinok. Úloha Brg1 a Brm v iniciácii transkripcie MITF bola overená pomocou chromatín-imunoprecipitácie. Výsledky potvrdzujú asociáciu Brm a Brg1 s iniciačným komplexom na MITF-promótoře a naznačujú, že primárne rekrutovaným proteínom v Brm/Brg1-pozitívnych melanómových bunkách je proteín Brg1.

### ***Brg1 dramaticky znižuje expresiu MITF v melanómových bunkách 501mel***

Ďalej sme študovali úlohu enzýmových podjednotiek Brm a Brg1 v expresii transkripčného faktora MITF. Pomocou Western blotu sme analyzovali hladinu expresie proteínu MITF po umlčaní expresie Brg1, Brm alebo oboch prostredníctvom shRNA a zistili sme obrovský pokles expresie MITF v Brg1-umlčaných bunkách.

Umlčanie hladiny Brm malo v tomto prípade len slabý účinok. Na rozdiel od 501mel, v Brg1-neexprimujúcej línii SK-MEL-5 bol pokles hladiny Brm postačujúci na potlačenie expresie MITF. Súhrnne tieto výsledky ukazujú, že SWI/SNF komplex je skutočne kritický faktor pre expresiu MITF a úlohu primárneho kofaktora MITF zohrávajú pravdepodobne SWI/SNF komplexy asociované s Brg1. Preto sme sa v ďalšej práci dôkladnejšie venovali inaktivácii práve tejto enzýmovej podjednotky.

### ***Knockdown Brg1 a Brm inhibuje proliferáciu a znižuje viabilitu***

Keďže vysoká hladina MITF je spájaná s proliferáciou a prežívaním melanómových buniek, analyzovali sme rastové krivky Brg1-, Brm- aj Brg1/Brm-umlčaných buniek. Najvýraznejší inhibičný účinok na proliferáciu melanómových buniek 501mel mal knockdown Brg1. Proliferačný blok bol po 6 dňoch prekonaný a bunky začali znova proliferovať. Ďalšie výsledky v dizertačnej práci ukazujú, že napriek tomu, že Brg1 je primárne dôležitejší pre proliferáciu melanómových buniek, Brm je schopný kompenzovať jeho funkciu. Avšak pre proliferáciu melanómových buniek je potrebná expresia aspoň jednej ATPázovej podjednotky SWI/SNF komplexu.

### ***Knockdown Brg1 indukuje apoptózu v 501mel***

Je známe, že umlčanie expresie MITF v bunkách 501mel spôsobuje zastavenie bunkového cyklu (Carreira a spol., 2006). Analýzou bunkového cyklu shMITF- a shBrg1-transfektovaných buniek 501mel (po 3 dňovej selekcii v puromycíne) pomocou flow cytometrie sme zistili nárast bunkovej populácie v sub-G fáze indikujúci apoptózu.

### ***Microarray analýza génovej expresie v Brg1-knockdownovaných bunkách 501mel***

Pomocou celogenómového skrínungu (cDNA microarray) sme zisťovali transkripčnú odpoveď po akútnom zablokovaní Brg1 v 501mel bunkách. Rozhodli sme sa pre knockdown Brg1, pretože z predchádzajúcich výsledkov sme určili Brg1 ako primárnu ATPázu SWI/SNF komplexu v regulácii expresie MITF (viď vyššie). Následkom deplécie Brg1 bol MITF downregulovaný približne 5-krát. Ďalej sme v analýze zistili, že 381 génov (reprezentovaných 485 próbami) ( $P < 0,005$ ) bolo downregulovaných (2-krát) a 210 génov (reprezentovaných 273 próbami) ( $P < 0,005$ )

bolo upregulovaných (2-krát). Medzi downregulovanými génmi (viac ako 2-krát) bolo 15 známych cieľov MITF. Výsledky v dizertačnej práci odhalili represiu génov (IGF1, osteopontin, TGFβ2, survivin, E2F1, p15), ktoré majú úlohu v prežívaní melanómových buniek a nie sú transkripčne regulované MITF. Potvrdzujú dôležitú úlohu Brg1 v zachovaní transkripcie regulovanej prostredníctvom MITF a odhaľujú úlohu Brg1 v regulácii ďalších faktorov s funkciou v prežívaní melanómových buniek pôsobiacich mimo os MITF. Blokovanie funkcie SWI/SNF komplexov v melanómových bunkách teda vedie k inhibícii rastu v dôsledku komplexného poklesu hladín „preživacích“ faktorov.

### ***Brg1 a Brm sú exprimované v melanómoch a névusoch***

Imunohistochemickou analýzou sme zistili, že Brm je veľmi dobre exprimovaný v névusoch aj vo vzorkách primárnych melanómov a neboli detekované žiadne Brm-negatívne bunky. Brg1 expresia ukázala heterogénnosť vo vzorkách melanómov v porovnaní s benígnymi névusmi. V súlade s predchádzajúcimi výsledkami (Carreira a spol., 2006) sa nám potvrdila heterogénna expresia MITF v névusoch aj v melanómoch.

### ***p21 je exprimovaný v melanómových bunkách, aktivuje MITF promótor a viaže sa na promótor MITF in vivo***

Zistili sme, že p21 je dobre exprimovaný v normálnych ľudských melanocytoch a aj v melanómových bunkách. Okrem toho sme potvrdili koreláciu medzi hladinou proteínu p21 (analyzovaná pomocou Western blotu) a hladinou mRNA MITF (analyzovaná pomocou real time PCR) v 7 z 10 melanómových línií. Keďže p21 funkčne pôsobí v bunke aj nezávisle na jeho funkcii inhibítora bunkového cyklu, zaujímal nás regulačný účinok p21 v melanocytovo-špecifickej transkripcii. V promótor-reportérových systémoch sme zisťovali účinok koexpresie p21 na aktivitu promótoru MITF a troch cieľových promótorov MITF (tyrozinázy, melastatinu a TRP1) v 4 bunkových líniách (MeWo, SK-MEL-5, SK-MEL-28 a B16-F10). Exogénny p21 stimuluje aktivitu promótoru MITF a promótoru tyrozinázy a melastatinu. Stimulácia cieľových promótorov MITF je pravdepodobne v dôsledku dočasného zvýšenia hladiny MITF v transfektovaných bunkách. Pomocou chromatin-imunoprecipitácie sme potvrdili, že p21 sa viaže na promótorovú oblasť génu pre

MITF. Výsledky potvrdzujú asociáciu p21 s iniciačným komplexom na promótoře pre MITF. Z uvedených zistení vyplýva ďalšia funkcia p21 ako kofaktora v transkripcii MITF nezávisle na inhibícii aktivity cyklín-CDK komplexov.

### ***PCAF a hGCN5 interagujú s MITF a inhibujú aktivitu melastatinového promótoru***

Medzi známe koaktivátory MITF patria histón-acetyltransferázy CBP/P300 (Sato a spol., 1997; Price a spol., 1998). V našej práci sme sa zamerali na ďalšie dva HAT enzýmy, PCAF a hGCN5, ktoré by potenciálne tiež mohli plniť funkciu koaktivátorov MITF. Tieto proteíny sú vysoko homológne a sú súčasťou multienzymových komplexov acetylujúcich históny a nehistónové proteíny (napr. transkripčné faktory), a tým môžu posttranslačne ovplyvňovať ich aktivitu (Nagy a Tora, 2007). V našej práci sme pomocou metódy pull-down zistili, že PCAF a hGCN5 interagujú s MITF *in vitro*, a konkrétne je pre túto interakciu nevyhnutná bHLH oblasť proteínu MITF. Pomocou imunoprecipitácie sme potvrdili interakciu *in vivo*. V promótor-reportérových štúdiách sme zistili, že ektopický PCAF a hGCN5 inhibujú aktivitu melastatinového promótoru (MITF-cieľového promótoru) nezávisle na ich histón-acetyltransferázovej aktivite. Umlčanie endogénnej hladiny PCAF pomocou siRNA duplexov v melanómových bunkách 501mel malo za následok nárast aktivity melastatinového promótoru, z čoho možno usúdiť, že endogénna hladina PCAF má inhibičný účinok na MITF-cieľový melastatinový promótor. Výsledky sú pripravované pre publikáciu do odbornej tlače. K tejto časti práce ešte musí byť dokončená chromatín-imunoprecipitácia, ktorá by potvrdila, že PCAF a hGCN5 sú rekrutované k MITF-cieľovým promótorom a podporila by hypotézu o represorovej funkcii PCAF a hGCN5 na aktivitu transkripčného faktora MITF.

### ***Inhibícia mTORC1 pomocou selektívneho Src-kinázového inhibítora SU6656 v melanómových bunkách***

Analýzou niekoľkých melanómových línií sme zistili, že v porovnaní s normálnymi melanocytmí majú hyperaktivovanú mTOR-sigálnu cestu, podobne ako je to v mnohých ľudských nádoroch. Upstream regulátor mTOR, serín/treonín kináza Akt, interaguje s podjednotkami SWI/SNF komplexu, INI1 a BAF155 a v kinázovej reakcii *in vitro* tieto proteíny fosforyluje (Foster a spol., 2006). V tejto časti

sme nesledovali priamy súvis so SWI/SNF komplexom, ale pokúsili sme sa zablokovať túto signálnu cestu pomocou selektívnych inhibítorov.

Pomocou analýzy zmien fosforylácie kľúčových proteínov dráhy mTORC1 použitím Western blotu sme potvrdili pozitívny účinok rapamycínu na umlčanie dráhy mTORC1 v melanómových bunkách Hbl. Podľa očakávaní viedlo ovplyvnenie melanómových buniek rapamycínom k zvýšeniu aktivity dráhy Akt reprezentovanej zvýšenou fosforyláciou Akt na Ser473, a tiež jej substrátov tuberínu a MAPK.

Ovplyvnenie buniek Hbl špecifickým inhibítorom Src-kináz SU6656 malo na dráhu mTORC1 podobný účinok. Na rozdiel od rapamycínu, SU6656 nevyvolal spätnou väzbou hyperaktiváciu Akt, ale práve naopak, pozorovali sme pokles fosforylácie Akt na Ser473 v porovnaní s kontrolnými bunkami a výsledky naznačujú, že Akt by mohol byť substrátom Src. Pomocou imunoprecipitácie sme zistili prítomnosť Src v imunoprecipitáte proteínu raptor, podjednotky komplexu mTORC1 a dokázali sme tak fyzickú interakciu Src s mTORC1 komplexom. Prítomnosť Src v komplexe mTORC1 je úplne novým zistením a v ďalšej práci je nutné objasniť funkčný dopad prítomnosti Src na aktivitu komplexu mTORC1.



## 5. DISKUSIA

V dizertačnej práci sa predovšetkým zaoberám úlohou SWI/SNF chromatinremodelujúceho komplexu v melanómových bunkových líniiach so zameraním na jeho enzymatické podjednotky Brm a Brg1 a jej súvislosťou s "master" regulátorom normálnych i nádorových melanocytov, transkripčným faktorom MITF. Úloha SWI/SNF komplexu zasahuje do mnohých bunkových procesov, a hoci je považovaný za tumorový supresor, v nádorovej transformácii môže vykazovať protichodné účinky, tkanivovo- prípadne bunkovo-špecifické.

Hoci v niekoľkých nádorových bunkových líniiach bola pozorovaná strata expresie oboch enzymových podjednotiek Brm a Brg1 (DeCristofaro a spol., 2001), v melanómových líniiach sú oba veľmi dobre exprimované. Charakterizovali sme 9 melanómových línii a našli sme len jednu, SK-MEL-5, ktorá postrádala expresiu Brg1. Brm bol exprimovaný vo všetkých testovaných líniiach. Keenen a spol. (2010) vo svojej práci charakterizovali 8 melanómových línii a podobne ako naša skupina, popísali Brg1-negatívnu líniu SK-MEL-5 a ďalšie dve s veľmi nízkou expresiou Brm (PMWK a YUMAC). Je možné, že v neskorších štádiách metastatického melanómu bunky majú downregulovaný Brg1 a kritickou pre funkčný SWI/SNF komplex zostáva expresia Brm. V každom prípade si melanómové bunky zachovávajú expresiu aspoň jednej enzymatickej podjednotky.

Primárne dôležitou v expresii MITF sa javí enzymatická podjednotka Brg1, ktorá sa prednostne viaže na proximálnu oblasť MITF-promótora v Brm/Brg1-exprimujúcich melanómových líniiach. Nepriama úloha Brg1 v expresii MITF čiastočne vyplýva už zo súvislosti s  $\beta$ -katenínovou dráhou, ktorá je v melanómoch často deregulovaná (Widlund a spol., 2002; Sinnberg a spol., 2011). Brg1 interaguje s  $\beta$ -katenínom a stimuluje transkripčnú aktivitu efektorov  $\beta$ -katenínovej cesty. Jedným z efektorov  $\beta$ -katenínovej dráhy je transkripčný faktor LEF1/TCF, známy koaktivátor expresie MITF (Barker a spol., 2001).

Hoci Brm a Brg1 sú vo svojich funkciách častokrát nezastupiteľné, napr. počas embryonálneho vývoja, bolo popísaných niekoľko prípadov, kedy sa dokážu vo svojich funkciách navzájom kompenzovať (Strobeck a spol., 2002). Kompenzačnú

úlohu Brm sme pozorovali aj my v melanómovej línii 501mel po stabilnom knockdowne Brg1. Po počiatočnej inhibícii proliferácie a poklese expresie MITF v dôsledku umlčanej expresie Brg1 začali bunky po niekoľkých dňoch proliferovať a expresia MITF sa obnovila. Kompenzačná úloha Brm je zrejmá aj v prípade melanómovej línie SK-MEL-5, v ktorej nie je exprimovaný Brg1. Strata expresie MITF a inhibícia proliferácie po umlčaní expresie Brm v SK-MEL-5 jasne dokazuje, že melanómové bunky potrebujú pre svoju viabilitu exprimovanú aspoň jednu ATPázovú podjednotku SWI/SNF komplexu.

Pomocou cDNA microarray analýzy Brg1-umlčaných buniek 501mel sme zistili, že knockdown Brg1 má za následok pokles expresie nielen proproliferčných faktorov závislých na MITF (cdk2, livin), ale tiež ďalších proproliferčných a proinvazívnych faktorov, ako je IGF1, osteopontin, TGF $\beta$ 2, survivin a SOX10, ktoré sú nezávislé na MITF. Z výsledkov je zrejmé, že knockdown Brg1 inhibuje proliferáciu melanómových buniek aj nezávisle na dráhe MITF. Príkladom dôležitej funkcie Brg1 v progresii melanómu mimo os MITF je napríklad jeho schopnosť aktivácie expresie metaloproteinázy (MMP) 2, ktorá prispieva k zvýšenej invazivite melanómových buniek (Saladi a spol., 2010b). A hoci významný podiel účinku Brg1 predstavuje manipulácia hladiny MITF s následnou reguláciou jeho transkripčnej aktivity, mnoho účinkov je realizovaných mimo dráhu MITF.

MITF je kľúčovým transkripčným faktorom a líniovo-špecifickým onkogénom melanocytov (Levy a spol., 2006). Protichodné úlohy jeho transkripčných cieľov v bunkových procesoch si prirodzene vyžadujú veľmi citlivú reguláciu jeho expresie i jeho aktivity. Súčasné poznatky vedú k tzv. reostatovému modelu expresie MITF, v ktorom hladina MITF predstavuje rozdielne biologické fenotypy. Melanómové bunky s nízkou hladinou MITF sa vyznačujú vysokou invazivitou a nízkou proliferáciou, kdežto rýchlo proliferujúce bunky majú značne vysoké hladiny MITF (Carreira a spol., 2006). Expresia MITF je značne heterogénna vo vzorkách melanómov aj v melanómových líniiach, ktoré sa líšia svojou citlivosťou na umlčanie expresie MITF (Kido a spol., 2009). V súlade s reostatovým modelom, aj veľmi malá zostatková hladina MITF môže byť pre melanómové bunky postačujúca a viesť k senescencii, zatiaľ čo nulová hladina môže indukovať apoptózu. Postačujúca veľmi nízka hladina

MITF k regulácii proliferácie bola pozorovaná napr. v melanómovej línii A375 (Kido a spol., 2009). Melanómové línie IgR3 a RPMI1795 pochádzajúce údajne z desmoplastického melanómu majú síce nulovú hladinu MITF, ale sú silno dediferencované, bez expresie melanocytovo-špecifických génov a pripomínajú viac nemelanocytové línie. Reintrodukcia MITF do takýchto buniek neobnovila melanocytový fenotyp (Vachtenheim a spol., 2001), a je otázne, či ich možno ešte považovať za melanómové.

V dôsledku heterogénnej expresie MITF v nádoroch a taktiež kvôli rozdielnej senzitivite jednotlivých melanómových línii, by bolo preto pravdepodobne účinnejšie použiť v génovej terapii cieleňé umlčanie aktivity proonkogénne pôsobiaceho SWI/SNF komplexu, obzvlášť subkomplexu obsahujúceho Brg1. Ako sme zistili, vyradenie jeho funkcie taktiež vedie k silnej apoptóze s následným neprežívaním melanómových buniek a hladiny Brg1 i Brm sú vo vzorkách primárnych melanómov vysoké. Problém by mohol predstavovať technický dizajn terapie, konkrétne zacielenie vhodných terapeutických vektorov do nádoru, pretože komponenty SWI/SNF komplexu sú exprimované vo všetkých bunkách ľudského organizmu. Ďalej by prichádzala do úvahy kombinácia s ďalšími prístupmi, napr. použitím selektívnych inhibítorov signálnej dráhy MEK-ERK alebo dráhy PI3K-Akt-mTOR, ktoré sú často hyperaktivované v melanómoch.

Rozpoznanie mechanizmov transkripčnej aktivácie MITF a identifikácia ďalších cieľových génov súvisiacich s kontrolou proliferácie a odolnosti voči apoptóze môžu odhaliť ďalšie vhodné molekulárne ciele pre protinádorovú genovú terapiu malígneho melanómu. Ďalšie diskutované výsledky nesledovali priamo funkciu komplexu SWI/SNF, ale môžu predstavovať cenné poznatky v regulácii transkripčného faktora MITF a pomôcť pochopiť biológiu melanómu.

V našej práci sme rozpoznali novú úlohu proteínu p21 v melanómových bunkách. Výsledky ukázali, že proteín p21 je v melanómových bunkách prítomný vo vysokých hladinách. Táto hladina je melanómovými bunkami tolerovaná a p21 pozitívne reguluje promótor MITF. Keďže p21 je jedným z transkripčných cieľov pre MITF (Carreira a spol., 2005), pôsobí ako pozitívna spätná väzba a dochádza k

vzájomnej aktivácii transkripcie. Vysoké hladiny MITF chránia melanómové bunky pred apoptózou (reostatový model) a možné vysvetlenie je aktivácia expresie antiapoptotického proteínu BCL2 prostredníctvom MITF. K antiapoptotickému potenciálu môže prispievať pravdepodobne aj p21, ktorý v melanómových líniiach zjavne neplní funkciu inhibítora bunkového cyklu.

Medzi epigenetické mechanizmy regulujúce chromatinovú štruktúru patria okrem chromatin-remodelujúcich komplexov aj komplexy s histón-acetyltransferázovou aktivitou, ktoré svojou enzymatickou funkciou menia status acetylácie histónov a tým ovplyvňujú prístupnosť promótorových oblastí génov (Khorasanizadeh, 2004). Medzi HAT enzýmy prítomné v takýchto komplexoch patrí aj PCAF a hGCN5, ktoré sú vysoko homológne, ich sekvencia je u eukaryotov na 73% identická (Yang a spol., 1996). Ich expresia v jednotlivých bunkových typoch je však odlišná a rovnako podjednotkové zloženie HAT-komplexov, v ktorých sú obsiahnuté (Nagy a Tora, 2007). V našej práci sme zistili, že majú významný vplyv na aktivitu MITF pri aktivácii jeho cieľových promótorov. Oba fyzicky interagujú s MITF ako rekombinantné proteíny a oba enzýmy inhibujú aktivitu MITF, a to nezávisle na ich histón-acetyltransferázovej aktivite. Korepresorová funkcia na aktivitu MITF by mohla znamenať dosiaľ nepoznanú nezávislú funkciu týchto proteínov.

Medzi signálne dráhy často hyperaktivované v melanómoch (až 60%) patrí dráha PI3K-Akt-mTOR (Gray-Schopfer a spol., 2007). Foster a spol. (2006) zistili priamu interakciu medzi serín/treonín kinázou Akt a podjednotkami SWI/SNF komplexu. INI1 a BAF155 boli schopné priamo interagovať s Akt a v kinázovej reakcii *in vitro* Akt fosforyluje obidva SWI/SNF faktory. V našej práci sme potvrdili vysokú aktivitu dráhy PI3K-Akt-mTOR v niekoľkých melanómových líniiach.

Signálnu cestu mTORC1 sme zablokovali pomocou špecifického inhibítora Src kináz SU6656. Src je nереceptorová tyrozín kináza, produkt protoonkogénu c-src a jej zvýšená aktivita bola pozorovaná u značného počtu ľudských nádorov vrátane melanómov (Homsí a spol., 2007). Dôkazom inhibície cesty mTORC1 bol pokles fosforylácie downstream efektorov mTOR, S6K1 a jej substrátov. Pokles fosforylácie Akt na S473 predstavujúci pokles jej aktivity je pravdepodobne v dôsledku inaktívácie

komplexu mTORC1 zatiaľ neznámym mechanizmom. Prítomnosť Src v imunoprecipitáte raptora, špecifickej podjednotky komplexu mTORC1, potvrdzuje fyzickú interakciu Src s týmto komplexom.

V súčasnosti sú študované účinky duálnych inhibítorov PI3K/mTOR, ako napr. NVP-BAG956, NVP-BBD130 a NVP-BEZ235, ktoré sa zdajú byť potenciálne efektívnejšie pre terapiu melanómu ako mono-cielené inhibítory (Marone a spol., 2009). Naše výsledky odhalili možno ďalší vhodný inhibítor v terapii melanómu. Dôležitým je tiež zistenie, že Src je v komplexe s mTORC1 v melanómových bunkách a v ďalšej práci je potrebné lepšie objasniť funkčný dopad tejto interakcie.

## 6. ZÁVERY

Výsledky dizertačnej práce prinášajú nové poznatky v regulácii expresie transkripčného faktora MITF v bunkách malígneho melanómu a umocňujú význam epigenetických mechanizmov v progresii melanómu, predovšetkým úlohu chromatín-remodelujúceho komplexu SWI/SNF. V menšej miere prinášajú nové poznatky v regulácii transkripcie/aktivity MITF mimo SWI/SNF komplex.

- V melanómových bunkách SWI/SNF komplex pozitívne reguluje expresiu MITF. Umlčanie expresie enzýmových podjednotiek Brm a Brg1, ktoré sú podmienkou funkčnosti jednotlivých subkomplexov, výrazne znižuje expresiu MITF a niektorých jeho transkripčných cieľov. Pre prežívanie melanómových buniek a expresiu MITF je nevyhnutná expresia aspoň jednej enzýmovej podjednotky. Umlčanie expresie MITF v melanómových bunkách po 3 dňoch indukuje masívnu apoptózu a inaktivácia SWI/SNF komplexov prostredníctvom knockdownu Brg1 taktiež po 3 dňoch indukuje apoptózu, pravdepodobne v dôsledku umlčanej expresie MITF. Microarray analýza v Brg1-umlčaných bunkách odhalila pokles mRNA dôležitých transkripčných cieľov MITF, známych svojou proproliferačnou funkciou, CDK2 a BCL2. Možno zhrnúť, že funkčný SWI/SNF komplex prispieva k preživanju melanómových buniek manipuláciou hladiny transkripčného faktora MITF, kritického líniovo-špecifického faktora melanocytov.
- V porovnaní s normálnymi melanocytmi sú zložky SWI/SNF komplexu veľmi dobre exprimované v melanómových bunkách. S výnimkou jednej melanómovej línie SK-MEL-5, ktorá postrádala expresiu Brg1, si melanómové línie zachovávajú expresiu oboch katalytických podjednotiek Brm i Brg1.
- Prioritne dôležitejšími subkomplexami SWI/SNF v expresii MITF v melanómových bunkách sú Brg1-obsahujúce komplexy. Po strate expresie Brg1 môže byť jeho funkcia kompenzovaná funkciou Brm. Striktne zachovaná expresia Brm a heterogénna expresia Brg1 vo vzorkách primárnych melanómov naznačuje, že melanómové bunky si vyvinuli mechanizmus, vďaka ktorému sa po strate Brg1 stáva Brm kriticky dôležitou zostatkovou ATPázou v expresii MITF i v prežívaní

melanómových buniek. Príklad tejto kompenzačnej funkcie predstavuje línia SK-MEL-5.

- SWI/SNF komplex prispieva k preživanju melanómových buniek aj cestou nezávislou na aktivite MITF, pozitívne reguluje expresiu "preživacích" faktorov ako napr. IGF1, OPN, TGF $\beta$ 2 a survivín.
- Na základe zistení, že funkčný SWI/SNF komplex prispieva k preživanju melanómových buniek mechanizmom závislým i nezávislým na MITF, inaktivácia SWI/SNF komplexu predstavuje sľubný cieľ pre molekulárnu génovú terapiu melanómu.
- V melanómových bunkách sú tolerované vyššie hladiny p21 bez spomalenia proliferácie. p21 pozitívne reguluje transkripciu MITF a spätnoväzobným mechanizmom sa podieľa na udržiavaní hladiny MITF v melanómových bunkách. Tento účinok je nezávislý na funkcii p21 ako inhibítora bunkového cyklu a prispieva k vysvetleniu relatívne vysokej expisie p21 v melanómových bunkách.
- Histón-acetyltransferázy PCAF a hGCN5 pôsobia ako korepresory transkripčného faktora MITF a inhibujú jeho aktivitu na jeho cieľovom, melastatinovom promótoze nezávisle na ich histón-acetyltransferázovej aktivite. Tieto výsledky naznačujú nový, doteraz nepoznaný mechanizmus regulácie aktivity MITF v melanómových bunkách.
- K progresii malígneho melanómu prispievajú hyperaktivované signálne dráhy a k takýmto patrí signálna cesta PI3K-Akt-mTOR. Špecifický inhibítor Src-kinázovej aktivity inhibuje aktivitu mTORC1 komplexu, podobne ako špecifický inhibítor mTOR, rapamycín. Na rozdiel od rapamycínu, ktorý spôsobuje reaktiváciu Akt spätnoväzobným mechanizmom, SU6656 inhibuje fosforyláciu Akt na S473 a tým prispieva k jej deaktivácii. SU6656 predstavuje sľubný nástroj pre ciele umlčanie PI3K-dráhy v melanómových bunkách a ďalšie štúdium jeho účinku by mohlo odhaliť možné uplatnenie v terapii melanómu.

## 7. ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ A ABSTRAKTOV

### Publikácie (podklad pre dizertáciu):

Šestáková B, **Ondrušová Ľ**, Vachtenheim J (2010) Cell cycle inhibitor p21/WAF1/CIP1 as a cofactor of MITF expression in melanoma cells. *Pigment Cell and Melanoma Res.*, 23(2), 238-251. (IF=5,059)

Vachtenheim J, **Ondrušová Ľ**, Borovanský J (2010) SWI/SNF chromatin remodeling complex is critical for the expression of microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010, 392(3), 454-459. (IF=2,484)

**Ondrušová Ľ**, Vachtenheim J, Réda J, Žáková P, Benková K (2013) MITF-independent pro-survival role of BRG1-containing SWI/SNF complex in melanoma cells. *PloSOne* 2013, 8(1), e54110. (IF=4,092)

**Ondrušová Ľ**, Réda J, Tuháčková Z (2012) Src-dependent activation of the mTOR signaling in melanoma cells. *Proceedings of the 17th ESPRC meeting* (11.-13. 9. 2012, Geneva), ed. Medimond - Monduzzi, Italy. (v tlači)

**Ondrušová Ľ**, Réda J, Žáková P, Tuháčková Z (2013) Inhibition of mTORC1 by SU6656, the selective Src kinase inhibitor, is not accompanied by activation of Akt/PKB signaling in melanoma cells. *Folia Biologica.* (v tlači) (IF= 1,151)

### Kapitoly v knihe:

Vachtenheim J, **Ondrušová Ľ** (2012) MITF Meets Chromatin In Melanoma. V: *New Developments in Chromatin Research*, Editors: Neil M. Simpson and Valerie J. Stewart, Nova Science Publishers, Inc., New York, 105-122.

Vachtenheim J, **Ondrušová Ľ** (2013) MITF: a Critical Transcription Factor in Melanoma Transcriptional Regulatory Network. V: *Recent Advances in the Biology Therapy and Management of Melanoma*, Editor: Ht Duc, InTech China, Shanghai, 71-81.

### Abstrakty:

**Ondrušová Ľ**, Vachtenheim J: Histonacetyltransferasy PCAF a hGCN5 jako koregulátory aktivity transkripčního faktoru microphthalmia. XXI. Biochemický sjezd ČSBMB a SSBMB, 14.-17. 9. 2008, České Budějovice. *Program, sborník přednášek a posterů.* JPM Tisk s.r.o., Praha, str. 94.



**Ondrušová L**, Pimková K, Vachtenheim J: Functional interaction of histone acetyltransferases PCAF and hGCN5 with microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cells. American Association for Cancer Research Annual Meeting, 12.-16. 4. 2008, San Diego, CA. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 49, str. 18.

Vachtenheim J, **Ondrušová L**, Tuháčková Z, Šestáková B: Inhibition of MITF-directed transcription by E1A 12S protein reveals a role for INI1(hSNF5) in antagonizing the E1A-mediated transcriptional repression. 34th FEBS Congress, 4.-9. 7. 2009, Prague, Czech republic. *Late abstract Book*, str. 14-15.

**Ondrušová L**, Vachtenheim J: Expression of Microphthalmia-associated transcription factor critically requires active SWI/SNF chromatin remodeling complex. XXII. Biochemický zjazd ČSBMB a SSBMB, 8.-12. 9. 2010, Martin, Slovakia, *Zborník prednášok a posterov*, str. 157.

**Ondrušová L**, Vachtenheim J, Tuháčková Z: Regulation of the mTOR-dependent signaling in melanoma cells. 36th FEBS Congress, 25.-30. 6. 2011, Torino, Italy. *FEBS Journal* 278 (Supplement 1), str. 236-237.

**Ondrušová L**, Vachtenheim J, Réda J: SWI/SNF complex activates the expression of survival genes in melanoma. Melanocytes and melanoma: from basic science to clinical applications, 18.-20. 6. 2012, Malmö, Sweden. *Programme book*, Poster presentation 18.

**Ondrušová L**, Vachtenheim J, Réda J: Histone acetyltransferases p-300/CBP-associated factor and human general control nonrepressible-related 5 inhibit activity of the melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor. XXIII. Biochemický sjezd ČSBMB a SSBMB, 26.-29. 8. 2012, Brno, Czech Republic. *Sborník přednášek a posterů*, str. 155.

Tuháčková Z, **Ondrušová L**, Réda J: mTOR - signální protein atraktivní a záhadný. XXIII. Biochemický sjezd ČSBMB a SSBMB, 26.-29. 8. 2012, Brno, Czech Republic. *Sborník přednášek a posterů*, str. 65.

**Ondrušová L**, Réda J, Vachtenheim J, Tuháčková Z: Involvement of c-Src activity in the mTOR-dependent oncogenicity of melanoma cells. 17th ESPCR meeting, 11.-13. 9. 2012, Geneva, Switzerland. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25(5), str. 659-660.

**Ondrušová L**, Vachtenheim J, Réda J: Histone acetyltransferases PCAF and hGCN5 inhibit activity of the melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor independent of their acetyltransferase activity. Society for Melanoma Research 2012 Congress, 8.-11. 11. 2012, Hollywood, California, USA. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25(6), str. 877.

## 8. LITERATÚRA

Barker N, Hurlstone A, Musisi H a spol. (2001) The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J* 20 (17), 4935-43.

Carreira S, Goodall J, Aksan I a spol. (2005) Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature* 433 (7027), 764-9.

Carreira S, Goodall J, Denat L a spol. (2006) Mitf regulation of Dial controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev* 20 (24), 3426-39.

Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R a spol. (2010) Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Res* 23 (1), 27-40.

Chiaverini C, Beuret L, Flori E a spol. (2008) Microphthalmia-associated transcription factor regulates RAB27A gene expression and controls melanosome transport. *J Biol Chem* 283 (18), 12635-42.

DeCristofaro MF, Betz BL, Rorie CJ a spol. (2001) Characterization of SWI/SNF protein expression in human breast cancer cell lines and other malignancies. *J Cell Physiol* 186 (1), 136-45.

Dynek JN, Chan SM, Liu J a spol. (2008) Microphthalmia-associated transcription factor is a critical transcriptional regulator of melanoma inhibitor of apoptosis in melanomas. *Cancer Res* 68 (9), 3124-32.

Foster KS, McCrary WJ, Ross JS a spol. (2006) Members of the hSWI/SNF chromatin remodeling complex associate with and are phosphorylated by protein kinase B/Akt. *Oncogene* 25 (33), 4605-12.

Glaros S, Cirrincione GM, Muchardt C a spol. (2007) The reversible epigenetic silencing of BRM: implications for clinical targeted therapy. *Oncogene* 26 (49), 7058-66.

Goodman RH a Smolik S. (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 14 (13), 1553-77.

Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. (2007) Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445 (7130), 851-7.

Homsy J, Cubitt C, Daud A. (2007) The Src signaling pathway: a potential target in melanoma and other malignancies. *Expert Opin Ther Targets* 11 (1), 91-100.

Keenen B, Qi H, Saladi SV a spol. (2010) Heterogeneous SWI/SNF chromatin remodeling complexes promote expression of microphthalmia-associated transcription factor target genes in melanoma. *Oncogene* 29 (1), 81-92.

Khorasanizadeh S. (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 116 (2), 259-72.

Kido K, Sumimoto H, Asada S a spol. (2009) Simultaneous suppression of MITF and BRAF V600E enhanced inhibition of melanoma cell proliferation. *Cancer Sci* 100 (10), 1863-9.

- Levy C, Khaled M, Fisher DE. (2006) MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 12 (9), 406-14.
- Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S a spol. (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 10 (3), 457-68.
- Marone R, Erhart D, Mertz AC a spol. (2009) Targeting melanoma with dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitors. *Mol Cancer Res* 7 (4), 601-13.
- Muchardt C a Yaniv M. (2001) When the SWI/SNF complex remodels...the cell cycle. *Oncogene* 20 (24), 3067-75.
- Nagy Z a Tora L. (2007) Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* 26 (37), 5341-57.
- Price ER, Ding HF, Badalian T a spol. (1998) Lineage-specific signaling in melanocytes. C-kit stimulation recruits p300/CBP to microphthalmia. *J Biol Chem* 273 (29), 17983-6.
- Reisman D, Glaros S, Thompson EA. (2009) The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene* 28 (14), 1653-68.
- Reisman, DN, Sciarrotta, J, Wang, W a spol. (2003) Loss of BRG1/BRM in human lung cancer cell lines and primary lung cancers: correlation with poor prognosis. *Cancer Res* 63, 560-566.
- Saladi SV, Marathe H, de la Serna I. (2010a) SWItching on the transcriptional circuitry in melanoma. *Epigenetics* 5 (6), 469-75.
- Saladi SV, Keenen B, Marathe HG a spol. (2010b) Modulation of extracellular matrix/adhesion molecule expression by BRG1 is associated with increased melanoma invasiveness. *Mol Cancer* 9, 280.
- Sato S, Roberts K, Gambino G a spol. (1997) CBP/p300 as a co-factor for the Microphthalmia transcription factor. *Oncogene* 14 (25), 3083-92.
- Sinnberg T, Menzel M, Ewerth D a spol. (2011) beta-Catenin signaling increases during melanoma progression and promotes tumor cell survival and chemoresistance. *PLoS One* 6 (8), e23429.
- Strobeck MW, Reisman DN, Gunawardena RW a spol. (2002) Compensation of BRG-1 function by Brm: insight into the role of the core SWI-SNF subunits in retinoblastoma tumor suppressor signaling. *J Biol Chem* 277 (7), 4782-9.
- Vachtenheim J, Novotna H, Ghanem G. (2001) Transcriptional repression of the microphthalmia gene in melanoma cells correlates with the unresponsiveness of target genes to ectopic microphthalmia-associated transcription factor. *J Invest Dermatol* 117 (6), 1505-11.
- Vachtenheim J a Borovansky J. (2010) "Transcription physiology" of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. *Exp Dermatol* 19 (7), 617-27.

Versteeg I, Sevenet N, Lange J a spol. (1998) Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* 394 (6689), 203-6.

Vojtechova M, Tureckova J, Kucerova D a spol. (2008) Regulation of mTORC1 signaling by Src kinase activity is Akt1-independent in RSV-transformed cells. *Neoplasia* 10 (2), 99-107.

Widlund HR, Horstmann MA, Price ER a spol. (2002) Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *J Cell Biol* 158 (6), 1079-87.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124 (3), 471-84.

Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J a spol. (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382 (6589), 319-24.