

UNIVERZITA KARLOVA

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Autoreferát disertační práce



Epigenetické aspekty normální a nádorové
krvetvorby: role chromatin remodelační ISWI
ATPázy

Mgr. Tomáš Zikmund

Praha 2019

Doktorské studijní programy v Biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Vývojová a buněčná biologie

Předseda oborové rady: doc. RNDr. Folk Petr, CSc.

Školící pracoviště: Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity
Karlovy ve Vestci (BIOCEV)

Školitel: Prof. MUDr. Tomáš Stopka, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k
nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky
Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

1	ABSTRAKT	7
2	ABSTRACT	8
3	ÚVOD	9
4	HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	10
5	METODIKA	11
6	VÝSLEDKY	12
7	DISKUSE.....	13
8	ZÁVĚRY	20
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	22
10	SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA.....	25

1 Abstrakt

Chromatin remodelační protein Smarca5 se účastní řady buněčných procesů, které jsou důležité jak z hlediska vývoje tkání, tak i z pohledu nádorové biologie. Mezi procesy, v průběhu kterých Smarca5 remodeluje chromatinovou strukturu, patří například genová transkripce, replikace a opravy poškozené DNA. Předpokládali jsme, že Smarca5 představuje esenciální molekulu pro modulaci chromatinu především ve vývojově časných a rychle se dělících progenitorech tkání, u nichž se často objevuje i zvýšená hladina transkriptu této ATPázy. Jednou z takovýchto tkání je i krvetvorba. Předmětem předkládané disertační práce je analýza vlivu deplece Smarca5 na proliferaci a diferenciaci krvetvorných progenitorů *in vivo* a zároveň hledání mechanismů narušení jejich vývoje. Pomocí námi vytvořeného myšího modelu s podmíněně deletovatelnou alelou genu *Smarca5* v krvetvorných kmenových buňkách jsme zjistili, že deplece této ISWI ATPázy způsobuje akumulaci časných hematopoetických progenitorů a inhibici jejich maturace směrem do erytroidní a myeloidní řady. Studium delecce genu *Smarca5* specificky v progenitorech lymfocytů také potvrdilo citlivost této buněčné linie ke ztrátě chromatin remodelačních aktivit zajišťovaných proteinem Smarca5. Výsledkem byla zástava vývoje na úrovni velmi časných T- a B-buněčných stádií a aktivace dráhy proteinu p53. Nakřížením nulové alely genu *Trp53* do myši s delecí *Smarca5* jsme ovšem nezjistili výrazné zlepšení fenotypu, a domníváme se proto, že aktivace této signální dráhy není primární příčinou zástavy buněčného cyklu postižených vyvíjejících se lymfocytů. Nejvíce viditelné změny byly pozorovány v expresním profilu nezralých T-lymfocytů, který vykazoval známky vývojového opoždění. Maturovanější stádia exprimovala vývojově časná transkripty a zároveň nebyla schopna indukce exprese transkriptů specifických pro diferencované buňky. Data tedy naznačují, že gen *Smarca5* hraje roli v nastavení vývojově specifické genové exprese v časných stádiích vývoje. Tuto eventualitu jsme podobněji studovali na úrovni genů, jejichž exprese je regulována epigenetickým regulátorem CTCF. Zjistili jsme, že SMARCA5 facilite vazbu proteinu CTCF do regulační oblasti genu *SPII/PU.1*, kde společně inhibují expresi tohoto velmi důležitého transkripčního faktoru krvetvorby. Domníváme se, že popsaný mechanismus inhibice exprese genu *SPII/PU.1* může přispívat nádorovým buňkám akutní myeloidní leukémie k zablokování jejich diferenciace do myeloidní řady krvetvorby. V souhrnu naše data ukazují, že remodelace chromatinu zajišťovaná ISWI ATPázou Smarca5 je nezastupitelná prakticky na všech úrovních hematopoézy od kmenových buněk a z nich odvozených nádorů až po terminálně diferencovaná stádia.

2 Abstract

Chromatin remodeling protein Smarca5 participates on many cellular processes, which are important for tissue development and tumorigenesis. Among these processes utilizing ATPase activity of Smarca5 belong also transcription, replication and DNA repair. We hypothesized that Smarca5 represents essential molecule for chromatin modulation primarily at early developmental stages at the level of fast-dividing progenitors of many origins, in whose the ATPase is highly expressed. To such tissues may belong also hematopoiesis, in which the Smarca5 has highest expression. The subject of my doctoral thesis is therefore analysis of the effect Smarca5 depletion on proliferation and differentiation of hematopoietic progenitors *in vivo* and a search for mechanisms behind the resulted developmental defects. We utilized conditionally knockout allele of Smarca5 in blood precursors to study in a mouse model how depletion of the ISWI ATPase causes accumulation of earliest progenitors inhibited from further maturation to erythroid and other myeloid lines. Analysis of Smarca5 deletion in progenitors of lymphocytes also revealed that this lineage is very sensitive to loss of chromatin remodeling activities of Smarca5. We also observed that a block of development in very early T and B cell stages also resulted in an activation of p53. By mating a null allele of *Trp53* into our mouse model of *Smarca5* conditional deletion we observed a very mild improvement of the phenotype. We therefore concluded that activation of p53 signaling pathway is not a major determinant of cell cycle arrest of Smarca5-null lymphocytes. Most prominent were changes in the expression profile of immature T lymphocytes that were markedly developmentally delayed as exemplified by the expression of earliest transcripts that were not silenced while transcripts belonging to more mature stages were not induced. These data thus strongly suggest that Smarca5 plays significant roles in setting the developmentally-specific gene expression pattern. This possibility we next explored further in detail to study genes regulated by a major epigenetic transcription factor called CTCF. We found that SMARCA5 regulates recruitment of CTCF on DNA near *SPI/PU.1* gene to temporally repress its expression during myelopoiesis. We think that this mechanism might be hijacked by acute myeloid leukemia cells in blocking the myeloid differentiation pattern of gene expression. In conclusion our data revealed that the ISWI ATPase Smarca5 has substantial yet not known indispensable roles in early hematopoietic and lymphoid development to guide gene expression of differentiation control.

3 Úvod

Krvetvorba je mnohostupňovitý proces, na jehož počátku je hematopoetická kmenová buňka se schopností buď obnovovat samu sebe či diferenciovat a vytvářet progenitory funkčně odlišných krevních elementů jako jsou např. erytrocyty, trombocyty, myelocyty a lymfocyty. Pro maturaci hematopoetických progenitorů do jednotlivých krevních elementů je charakteristické, že se aktivují liniově specifické genové exprese a dochází k dynamickým změnám komplexu DNA, proteinů a též RNA celkově označované jako chromatin. Předpokládá se, že narušení správné regulace chromatinové struktury, tedy odhalování a zahalování určitých sekvencí DNA, hematopoetickými kmenovými buňkami a progenitory může vést až k nastavení nevhodné genové exprese vyúsťující v nádorovou transformaci a to v podstatě na kterémkoliv stupni vývoje krevních buněk. Současné studie naznačují, že se nádorových i vývojově asociovaných změn struktury chromatinu může účastnit i faktor chromatinové přestavby: ISWI ATPáza *Smarca5* (1, 2).

Gen *Smarca5* je exprimován prakticky ve všech tkáních dospělé myši. Vzhledem k tomu, že je transkripce genu *Smarca5* nejvyšší v tkáních s vysokou proliferační aktivitou a v průběhu diferenciaci do postmitotických terminálně maturovaných stádiích klesá, předpokládalo se, že protein *Smarca5* bude důležitý především pro buněčný růst (3). Tento předpoklad byl následně podpořen mnoha dalšími pozorováními naší i ostatních laboratoří. Inaktivace genu *Smarca5* na začátku embryonálního vývoje vede k zástavě růstu buněk vnitřní buněčné masy i trofoektodermu a je pro myš letální už ve stádiu blastocysty (4-6). Cílená inaktivace genu *Smarca5* v progenitorech granulárních neuronů a Purkyňových buněk vede k inhibici jejich proliferace a výsledně hypoplázii mozečku (7). Podobně delece genu *Smarca5* v progenitorech oční čočky vede k narušení vývoje struktury oka (8). Při podrobnějším pohledu na narušený vývoj tkání v důsledku deplece *Smarca5* bylo zjištěno, že význam tohoto remodelačního faktoru nebyl pouze v usnadnění replikace genetické a epigenetické informace proliferujících progenitorů, ale především v ustanovení expresního programu konkrétních vývojových stádií (7, 8). A tak například u vláknitých buněk oční čočky byla po depleci *Smarca5* stále pozorovatelná buněčná jádra, protože se neaktivovala dostatečná exprese genů *Hsf4* a *DNasy IIβ*, které se účastní denukleeace (8). Protein *Smarca5* se tedy zdá být vývojově důležitým epigenetickým regulátorem genové exprese a v současnosti se ukazuje, že mechanismus této regulace je založen na chromatinové remodelaci, která umožňuje selektivní vazbu různým a vývojově důležitým transkripčním faktorům (9).

4 Hypotézy a cíle práce

Naše vědecká skupina se dlouhodobě zabývá studiem transkripčních faktorů, které jsou specifické pro krvetvorbu a regulaci jejich exprese ve vztahu k patogenezi hematologických onemocnění. Dalším zaměřením laboratoře je studium chromatin remodelačních faktorů z proteinové rodiny ISWI *in vivo* s využitím myších modelů s podmíněně deletovatelnou alelou. Tato disertační práce má za cíl propojit obojí tematické zaměření naší laboratoře a získat nové poznatky ohledem role proteinů ISWI v transkripční regulaci fyziologické a maligní krvetvorby. V této práci jsme pracovali s hypotézou, že Smarca5 jako faktor remodelující chromatin v promotorových oblastech, se bude účastnit regulace tkáňově specifické genové exprese. Zaměřili jsme se na krvetvorbu, protože se jedná nejen o velmi proliferačně aktivní a neustále se vyvíjející tkáň i v průběhu dospělého života, ale také proto, že některé onemocnění z ní odvozené (např. akutní leukémie) exprimují vysoké hladiny remodelačního faktoru Smarca5. Další navazující hypotézou, kterou jsme se v našem výzkumu zabývali, bylo, jakým způsobem či mechanismem přispívá protein Smarca5 k leukemogenezi. Vzhledem k tomu, že příčinou většiny leukemických onemocnění je neschopnost krvetvorného progenitoru vyžrávat, zaměřili jsme se na význam Smarca5 v regulaci exprese hlavního transkripčního faktoru myeloidní diference *SPII/PU.1*.

Jednotlivé cíle disertační práce byly následující:

Cíl 1) Detailní analýza krvetvorby u myši s podmíněně deletovaným genem pro chromatin remodelační faktor Smarca5 v hematopoietické kmenové buňce.

Cíl 2) Charakterizovat vliv ztráty chromatin remodelujících aktivit zajišťovaných proteinem Smarca5 v průběhu vývoje časných lymfocytárních stádií.

Cíl 3) Studium mechanismů transkripční regulace genu *SPII/PU.1*, které jsou závislé na proteinu SMARCA5, v normální a nádorové hematopoéze

Cíl 4) Analýza vlivu nádorových buněk na časnou hematopoézu u pacientů s malignitami odvozenými z maturovaných B-lymfocytů.

5 Metodika

Uveden je společný výčet metod, které byly použity ve čtyřech publikacích, jež jsou podkladem této disertační práce. Podrobný popis metod je k nahlédnutí přímo v sekci „Materials and Methods“ v rukopisu konkrétní publikace.

- Chromatinová imunoprecipitace
- Izolace RNA a přepis do cDNA
- Sekvence transkriptomu
- Průtoková cytometrie
- Transplantace kostní dřeně
- Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (q-PCR)
- Western-blotting
- *In vitro* kultivace buněk a buněčné transfekce

6 Výsledky

Disertace se opírá o výsledky čtyř následujících publikací:

(1. publikace) Kokavec J, **Zikmund T**, Savvulidi F, Kulvait V, Edelmann W, Skoultchi A. I, Stopka T, *The ISWI ATPase Smarca5 (Snf2h) is required for proliferation and differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells. Stem Cells* (2017) 35(6):1614-23.

(2. publikace) **Zikmund T**, Kokavec J, Turkova T, Savvulidi F, Paszekova H, Vodenkova S, Sedlacek R, Skoultchi A. I, Stopka T, *ISWI ATPase Smarca5 Regulates Differentiation of Thymocytes Undergoing β -Selection The Journal of Immunology* (2019) 202(12):3434-3446

(3. publikace) Dluhosova M, Curik N, Vargova J, Jonasova A, **Zikmund T**, Stopka T. *Epigenetic Control of SPI1 Gene by CTCF and ISWI ATPase SMARCA5. PlosOne* (2014) 9(2):e87448.

(4. publikace) Maswabi BC, Molinsky J, Savvulidi F, **Zikmund T**, Prukova D, Tuskova D, Klanova M, Vockova P, Lateckova L, Sefc L et al. *Hematopoiesis in patients with mature B cell malignancies is deregulated even in patients with undetectable bone marrow involvement. Haematologica* (2017) 102(4):e152-e5.

7 Diskuse

Vývoj tkání je obvykle doprovázen snižováním přístupnosti chromatinové struktury, kdy se otevřený chromatin časných stádií progenitorů v průběhu diferenciaci více zneprístupňuje a přechází do stavu umožňujícího genovou expresi odpovídající pouze profilu konkrétního buněčného typu. Důležitými iniciátory expresních změn v progenitorech krvetvorby jsou transkripční faktory, které „čtou“ genetikou uloženou v sekvenci DNA a do regulačních oblastí rezponzivních genů přináší chromatin remodelační aktivity. Společná souhra obou epigenetických aktivit poté umožňuje zahájit, potlačit popřípadě udržovat určitou míru exprese specifických genů, která je nezbytná pro zajištění fyziologických buněčných procesů a současně umožňuje vytvoření terminálního fenotypu krevních elementů.

S využitím myšího modelu podmíněné delecce, který jsme vytvořili naší vědeckou skupinou, jsme my se svými spolupracovníky ukázali, že se tkáňově a vývojově specifické regulace transkripce účastní i chromatin remodelační faktor *Smarca5*. Delece genu *Smarca5* v progenitorech granulárních neuronů má za následek defekty arborizace dendritů Purkyňovo buněk mozečku a desátý den po narození vede k narušení exprese až 2 900 genů (7). V případě vyvíjejícího se oka se po delecí objevuje až 1 461 rozdílně exprimovaných transkriptů (8). Analýza transkriptomu dvojitě pozitivních (DP) thymocytů za pomoci metody mRNA-seq odhalila až 3 318 rozdílně exprimovaných transkriptů (10). U *c-Kit*⁺ krvetvorných progenitorů a kmenových buněk sortovaných z fetálních jater (E14.5) myši s genotypem *Smarca5*^{-cKO} *Vav1-iCre* jsme pozorovali narušenou expresi mnoha desítek genů, které souvisely především s odpovědí na poškození DNA a erythroidní diferenciací (11). Zjistili jsme, že společným prvkem transkripčních analýz a současně možným vysvětlením vývojových defektů způsobených delecí genu *Smarca5* je, že se u podstatné části transkripčních faktorů terminální diferenciaci neaktivuje jejich exprese do fyziologické míry. Například v krvetvorbě jsme pozorovali nízké hladiny klíčových transkripčních faktorů erythroidního (*Gata1*, *Gata2*, *Klf1*, *Nfe2*) a thymocytárního vývoje (*Klf7*, *Ets2*, *Irf3*, *Bcl6*). Zajímavé je, že myši s delecí *Smarca5* v HSC umíraly kolem dne E17,5 na závažnou anémii a měly tedy velmi podobný fenotyp jako jedinci s delecí některých transkripčních faktorů červené krevní řady např. *Klf1* (12). Je proto otázkou, zdali protein *Smarca5* nehraje přímou úlohu v regulaci exprese transkripčních faktorů časného vývoje.

Protein *Smarca5* může ať už přímo či nepřímo přes své partnerské molekuly v remodelačních komplexech interagovat s celou řadou transkripčních faktorů a epigenetických regulátorů (viz. <https://thebiogrid.org/114045/summary/homo-sapiens/smarca5.html>). Díky

mnohačetným interakcím s dalšími vazebnými molekulami možná není ani tak překvapivé, že delece jeho genu způsobí velké změny v expresním profilu krvetvorných progenitorů. Například na myších epiteliálních buňkách bylo ukázáno, že více jak 32% všech míst, které protein Smarca5 rozeznává, tvoří promotorové oblasti kódujících genů (13). Tato pozorování naznačují, že regulace exprese proteinem Smarca5 může být jednou z jeho hlavních funkcí. Ovšem mechanismy regulace genové exprese proteinem Smarca5 a hlavně interakční partneři, kteří se společně se Smarca5 regulace genů krvetvorby účastní, byly do této doby popsány jen částečně. V buňkách myši erythroleukémie byla například popsána fyzická interakce Smarca5 s transkripčním faktorem GATA-1, který je esenciální pro vývoj červených krvinek, megakaryocytů, eozinofilů a žírných buněk (14). V naší práci jsme ukázali, že SMARCA5 může fyzicky interagovat s transkripčním faktorem CTCF v regulačních oblastech jednoho z hlavních regulátorů myeloidního vývoje genu *SPII/PU.1* a oblasti, která řídí imprinting (ICR) genů *H19* a *Igf2* (15). Popsali jsme, že je protein SMARCA5 zcela nezbytný pro vazbu CTCF do chromatinu ICR v leukemických buňkách. Oba proteiny společně inhibují funkci enhanceru ICR, čímž ve výsledku stimulují transkripci genu *H19* a naopak umlčují expresi genu *Igf2*.

Jaký je ale mechanismus společné regulace exprese genů zmíněnými proteiny SMARCA5 a CTCF? Na tuto otázku nelze jednoduše odpovědět, protože jen u samotného proteinu CTCF bylo popsáno mnoho odlišných způsobů regulace genové exprese (16). Tento protein může fungovat jako přímý aktivátor či represor transkripce v promotorech některých genů. Zároveň může nasedat do tzv. izolátorových oblastí (angl. insulators), ve kterých umožňuje inra- popřípadě inter-chromozomální interakce (např. v oblasti řídicího expresi lokusu myšního β -globinu), může bránit spojení mezi enhancerem a protomotorem určitých genů (viz. ICR lokusu *H19/Igf2*) či vytvářet bariéru mezi euchromatinem a konstitutivním hetrochromatinem (16). V minulosti bylo opakovaně ukázáno, že se CTCF objevuje v genomických oblastech, které se shodují s místy vazby proteinů kohezinového komplexu (17, 18), což naznačují i naše data. Zjistili jsme, že se po podání 5-azacytidinu proteiny SMARCA5, CTCF a zástupci kohezinového komplexu (RAD21 a SMC1) objevují v regulačních oblastech genu *SPII/PU.1* (především v URE a -11kb). Domníváme se, že přítomnost kohezinu v těchto oblastech může mít podobnou funkci jako v případě regulace transkripce genů *H19* a *Igf2*, tedy stabilizace chromozomálních smyček vytvořených proteinem CTCF (19). Dále jsme pozorovali, že se SMARCA5 a CTCF (už bez kohezinových proteinů) společně váží do oblasti -14.4kb genu *SPII/PU.1*, kde se za normálních okolností nevyskytují. Vzhledem k tomu, že SMARCA5 i CTCF mají po podání hypometylačního činidla na expresi genu *SPII/PU.1* negativní vliv, domníváme se, že vazba proteinů do tohoto enhanceru bude souviset s inhibicí

transkripce. Přestože naše data zcela neobjasňují molekulární mechanismus regulace transkripce, ukazují, že za patologických podmínek mohou proteiny SMARCA5 a CTCF společně inhibovat expresi genu *SPI1/PU.1*. Proteiny SMARCA5 a CTCF blokují enhancer i po aplikaci hypometylační terapie, čímž mohou přispívat k udržování dediferencovaného stavu leukemických buněk.

Současné studie metodou ChIP-seq ukazují, že více jak 35% všech míst genomu rozeznáných proteinem Smarca5 může být současně rozeznáno i transkripčním faktorem Ctf (13). Ctf ovšem není jedinou molekulou, v jejímž vazebném konsenzu se ATPáza Smarca5 může vyskytovat (9, 20). Ukazuje se, že se může jednat až o desítky různých transkripčních faktorů, které vyžadují enzymatickou aktivitu proteinu Smarca5 pro nasednutí do svých sekvenčně specifických míst genomu (9). Otázka tedy zní, jaké molekulární změny protein Smarca5 generuje v místech rozeznávaných transkripčními faktory? Ukazuje se, že ve vazebných místech může Smarca5 fungovat jako jakési molekulární pravítko pro zachování stejných rozestupů mezi jednotlivými nukleozómy (9, 20). Např. pro okolí vazebných míst již zmíněného transkripčního faktoru Ctf je charakteristické pole 20-ti velmi uspořádaných nukleozomů, jejichž organizace a pravidelné rozestupy se naruší po depleci Smarca5 (9, 20). Vazebná místa vykazují po depleci Smarca5 také vyšší nukleozomální obsazenost a sníženou schopnost vázat Ctf a proteiny kohezinového komplexu (20). Ve výsledku nedostatek remodelačních aktivit negativně ovlivňuje i globální tvorbu chromatinových smyček a izolaci genomických oblastí s určitým prostorovým uspořádáním označované jako topologicky sdružené domény (TAD, angl. topologically associating domain) (9). Zajímavé je, že deplece partnerských molekul ACF1, RSF1, TIP5 a WSTF popsanou dezorganizaci nukleozomálního uspořádání nevyvolává, což opět může naznačovat, že remodelační komplexy ISWI mohou být redundantní ve svých biologických funkcích (20). V souhrnu, za výraznými expresními změnami u myši s kondiční delecí genu *Smarca5* tedy může stát snížená schopnost vývojově důležitých transkripčních faktorů navázat se do regulačních oblastí řídících tkáňově specifickou transkripci a diferenciaci.

Další významnou fenotypovou změnou, kterou jsme v krvetvorbě našich zvířecích modelů pozorovali, bylo narušení proliferace, zástava buněčného cyklu a aktivace signálních drah spojených s poškozením DNA. Popsali jsme, že delece genu *Smarca5* v hematopoetických kmenových buňkách postihuje definitivní krvetvorbu ve fetálních játrech a fenotypové projevy v podobě anémie jsou patrné už v den E13,5 embryonálního vývoje. Embryonální vývoj byl v důsledku narušené časně krvetvorby a erytropoézy předčasně ukončen nejpozději 17,5 den po oplození a to prakticky u všech postihnutých jedinců. Zjistili jsme, že jedinci s delecí *Smarca5*

mají v játrech mnohem více buněk populace LSK. Toto pozorování si vysvětlujeme především jejich zvýšenou proliferační aktivitou, ale současně omezenou schopností jednotlivých subpopulací LSK (krvetočných kmenových buněk a multipotentních progenitorů) diferencovat. Porucha vývoje už na úrovni kmenových buněk a následných multipotentních progenitorech byla potvrzena transplantačními experimenty s využitím suspenze z fetálních jater embryonálního dne E13,5. U letálně ozářených příjemců jsme ani po 12 dnech od transplantace nepozorovali (na rozdíl od buněk fetálních jater z kontrolních jedinců) obnovu krvetvorby.

Buňky, které v krvetvořném vývoji prošly až do stádia LS-K tedy liniově předurčených stádií, proliferovaly sice podobně jako jejich kontrolní protějšky ale objevovala se u nich nefyziologická zástava v G2/M fázi buněčného cyklu. Popsanou zástavu jsme pozorovali také u vyvíjejících se basofilních erythroblastů a thymocytů, kde tetraploidní buňky tvořily téměř jednu čtvrtinu všech buněk DP populace. Zajímavým zjištěním je, že jsme tento specifický buněčný fenotyp související s delecí genu *Smarca5* nedetkovali na žádné jiné úrovni vývoje a to ani u ostatních krevních elementů např. B-lymfocytů. Podobně nebyla zástava v G2/M fázi pozorována ani v průběhu vývoje mozečku a oční čočky (7, 8). Obvykle je opuštění buněčného cyklu v tetraploidním stavu spojeno s kumulací závažných chromozomálních změn např. s nemožností dokončit replikaci či opravit poškození DNA vzniklých v průběhu replikace. V minulosti bylo několikrát ukázáno, že se protein SMARCA5 účastní v remodelačních komplexech ACF1 a WSTF replikace DNA a to v průběhu její pozdní fáze (21-23). Data, která jsme získali z analýzy buněčného cyklu DN thymocytů by toto mohla také naznačovat. U DN3 thymocytů jsme například pozorovali, že stejné procento buněk jako u kontrol vstupuje normálním způsobem do S fáze, ale počty postreplikativních buněk, které se mitoticky rozdělily, byly oproti kontrole výrazně nižší (přibližně 3x). Tento fenotyp ani tetraploiditu DP populace „nezachránila“ delece genu pro hlavního strážce genomu – protein p53. Kumulace nefyziologických chromatinových změn tak zřejmě vede k neschopnosti thymocytů, multipotentních progenitorů, vyvíjejících se erythrocytů a progenitorů dalších tkání úspěšně dokončit S-fázi buněčného cyklu, což může ve výsledku vést až k jejich terminálnímu (a na p53 nezávislému) zastavení v tetraploidním stavu nebo indukci apoptózy.

Jak již bylo zmíněno v předešlých odstavcích, u jedinců s delecí *Smarca5* v krvetvořném kmenové buňce se objevoval nárůst absolutního počtu buněk stádia LSK zřejmě v důsledku inhibice diferenciací. Zjistili jsme, že k tomuto nárůstu nejvíce přispívalo zvýšení počtu subpopulace multipotentních progenitorů s myelolymfoidním potenciálem (LSK⁺CD48⁺CD150⁺). V další části našeho výzkumu jsme se tedy zaměřili na to, zdali delece

Smarca5 nebude mít také vliv na diferenciaci a časný vývoj lymfocytů. Vývoj T lymfocytárních progenitorů, který se uskutečňuje v thymu (brzlíku) a vývoj B lymfocytárních progenitorů, který se uskutečňuje v kostní dřeni, jsou jednou z nejvíce studovaných oblastí krvetvorby. Vývojové události obou buněčných linií jsou v současnosti velmi podrobně popsány a charakterizují je specifické změny exprese povrchových molekul, aktivují se různé mechanismy řízení buněčného cyklu a uskutečňuje se (na rozdíl od myeloidní řady) programované vytváření dvouvláknových zlomů při vyzrání antigenního receptoru. Právě iniciace dvouvláknových zlomů a jejich následné opravy umožňují testovat funkce chromatin remodelačních faktorů v procesech oprav poškození DNA *in vivo* (24).

Ukázali jsme, že protein *Smarca5* a chromatin remodelační aktivita s ním spojená, je velice důležitá pro fyziologický vývoj $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$ thymocytů a časných B lymfocytů. Zajímavým zjištěním bylo, že se vývoj $\alpha\beta$ thymocytů prakticky zastavil na úrovni DN3 stádia a v případě časných B lymfocytů na úrovni CD25 negativních pro-B buněk. Popsaný fenotyp velice připomínal fenotyp zvířat s mutacemi v genech, které jsou důležité k úspěšnému dokončení V(D)J rekombinace nebo k přenosu signálu z pre-TCR (25, 26). Pro vyloučení hypotézy, že by hlavní příčinou zástavy thymocytárního vývoje mohl být problém v zahájení V(D)J rekombinace nebo ve spojování přerušovaných konců, jsme použili myš s transgenním konstruktem OT-II. Tato myš exprimuje již přeskupené geny pro těžký (*Tcrb*) i lehký (*Tcr*) řetězec T lymfocytárního receptoru, který páruje s CD4 koreceptorem a rozeznává peptid odvozený z molekuly kuřecího ovalbuminu (27). Expese tohoto konstruktů v thymocytech vede k aktivaci alelické exkluze a silné inhibici V(D)J rekombinace endogenních oblastí genů imunitního receptoru. Domnívali jsme se, že by inhibice vývojově determinovaného vzniku poškození DNA mohla částečně zlepšit fenotypové změny způsobené delecí *Smarca5* jako v případě genů oprav DNA (28). Naše data z průtokové cytometrie tuto hypotézu nakonec nepotvrdila. Provedená transkriptomová analýza naznačila, že hlavní příčina vývojového bloku thymocytů zřejmě neleží v narušení mechanismu přeskupování genů pro jednotlivé řetězce TCR a v defektu vyzrání antigenního receptoru, ale spíše v narušení exprese vývojově důležitých genů.

Jak již bylo podrobně popsáno v literárním přehledu této práce, významnou část remodelačních aktivit vykonává protein *Smarca5* v komplexu se svými vazebnými partnery. Závažné vývojové změny krvetvorby mohou být připsány tomu, že se ztrátou ATPázové podjednotky, buňka ztratí i veškeré chromatin remodelační aktivity, které jsou zajišťovány jí obsahujícími proteinovými komplexy. Snad nejlépe fenotypu myších modelů delece *Smarca5* v krvetvorbě odpovídá fenotyp myši s delecí *Bptf*. Podobně jako u *Smarca5* knockoutů, delece

Bptf vede k defektům diferenciací krevetvorných kmenových buněk a neschopnosti těchto buněk rekonstituovat normální hematopoézu v letálně ozářených příjemcích (29). Myši velmi rychle umírají na selhání kostní dřeně a závažnou anémii. Další podobností je, že ztráta Bptf způsobuje snížení exprese transkripčních faktorů souvisejících s diferenciací kmenových buněk do progenitorů jednotlivých krevních řad (*Meis1*, *Pbx1*, *Mn1*, *Lmo2*) (29). Delece *Bptf* má výrazný vliv i na vývoj thymocytů především na maturaci DP thymocytů do SP stádií (30). Myši ovšem vykazují oproti fenotypu našeho myšního modelu určité rozdíly. Nezdá se například, že by u nich byl narušen vývoj DN3 stádia, ve kterém probíhá β -selekcce. V DP stádiu se nevyskytují tetraploidní buňky a defekty proliferace, což naznačuje, že protein Bptf zastává ve vyvíjejících se thymocytech jiné funkce nebo pouze část funkcí zajišťovaných také proteinem Smarca5 (30). Dále byl thymocytární vývoj studován u myši s delecí genů *Acfl/Baz1a* (tvorí se Smarca5 komplexy ACF a CHRAC) (24, 31) a *Tip5/Baz2a* (komplex NoRC) (31). U obou myších modelů ovšem nebylo prokázáno viditelné narušení lymfocytárního vývoje. Dalšími kandidátními geny pro studium ISWI remodelačních komplexů, které ještě v krevetvorbě nebyly studovány, jsou *Wstf/Baz1b* a *Rsf-1*. Fenotyp homozygotních jedinců s delecí prvního z nich je neonatálně letální (32, 33) a druhého je embryonálně letální (31). Vzhledem k variabilitě fenotypů myši s delecí genů v jednotlivých podjednotkách ISWI komplexů je zřejmé, že konkrétní ISWI komplexy jsou esenciální pro vývoj některých specifických struktur, avšak v ostatních tkáních mohou být jejich funkce vzájemně zastoupeny. Vzhledem k omezenému množství současných dat bude nutné provést ještě další experimenty, které umožní rozlišit, zdali příčinou fenotypu myši s delecí Smarca5 v lymfocytech a červené krevní řadě je ztráta funkce všech remodelačních komplexů rodiny ISWI nebo čistě ztráta remodelační aktivity faktoru Smarca5 nezávisle na těchto komplexech.

Celkově data našeho a ostatních vědeckých týmů ukazují, že protein Smarca5 umožňuje časným progenitorům nejen nastavit jejich diferenciací transkripční programy, ale současně se podílí na zajišťování buněčných mechanismů důležitých pro jejich efektivní proliferaci. Příčinou většiny hematoonkologických onemocnění včetně AML spočívá právě v inhibici schopnosti progenitorů se vyvíjet a diferenciovat do terminálně maturovaných stádií, přičemž schopnost proliferovat si tyto buňky zachovávají. Naše laboratoř v minulosti ukázala, že zvýšená hladina SMARCA5 se objevuje u CD34⁺ krevetvorných progenitorů u pacientů s AML a po dosažení kompletní remise tato hladina klesá (2). Nabízí se tedy otázka, zdali inhibice enzymatické aktivity proteinu Smarca5 či inhibice interakce s jeho vazebnými partnery nepovede k zastavení proliferace nádorových buněk krevetvorby popřípadě k indukci jejich diferenciací. Tuto hypotézu podporuje i mnoho studií, které využívají siRNA technologii pro

depleci Smarca5 a partnerských molekul v buněčných liniích odvozených z různých nádorů *in vitro*. Deplece Smarca5 zpomaluje dělení a navozuje zástavu buněčného cyklu například v liniích odvozených z gliomů (34), karcinomu prsu (35) a hepatocelulárního karcinomu (36). Autoři dále popisují, že se deplecí remodelačního faktoru snižuje rezistence nádorových buněk k chemoterapii a jejich invazivita (34). Podobný dopad na proliferaci nádorových buněk má i deplece Smarca1 (37, 38) či deplece některých interakčních partnerů ISWI ATPáz například BPTF u linií derivovaných z adenokarcinomů a hepatocelulárních karcinomů (39-41) a TIP5 u linií karcinomu prostaty (42). Vzhledem k obtížné použitelnosti metody siRNA pro inhibici exprese ISWI ATPáz a jejich interakčních partnerů v leukemických buňkách *in vivo*, je snaha vytvořit jejich chemické inhibitory. V současnosti byl například popsán inhibitor bromodomény proteinu BPTF s označením DCB29 (43). Přestože autoři tento inhibitor netestovali na živých buňkách, domnívají se, že ovlivní či zabrání interakci proteinu BPTF s jeho substrátem tj. acetylovanými histony v promotorech aktivních genů, čímž ve výsledku může negativně narušit i genovou expresi nádorových buněk. Nově byl popsán i inhibitor ATPázové domény ISWI proteinů, který autoři testovali na liniích odvozených z AML (44). V této práci popisují (a potvrzují tak naši hypotézu), že inhibice enzymatické aktivity proteinu SMARCA5 způsobuje snížení proliferace leukemických buněk a jejich terminální diferenciaci do granulo-monocytární řady, zatímco exponenciální růst normálních CD34+ kmenových buněk a progenitorů je zachován. Zajímavé je, že inhibici proliferace autoři pozorují také u linií s nulovou alelou genu *TP53*. Tato data částečně odpovídají i observaci u našeho myšího modelu, kde proliferační zástava lymfoidních progenitorů v důsledku ztráty Smarca5 závisí na proteinu p53 jen částečně či vůbec.

Indukce diferenciacie (pre)leukemických blastů je důležitou součástí terapie pacientů s AML a MDS. Dochází k ní v důsledku globální hypometylace DNA po podání inhibitorů enzymu DNMT1 (5-azacytidin a také decitabin), zřejmě jako následek obnovení fyziologické exprese hlavních transkripčních faktorů myeloidního vývoje PU.1, RUNX1 a CEBP α (45). Data, která přinášíme, ukazují, že protein SMARCA5 je inhibitorem exprese genu *SPI1/PU.1* v leukemických buňkách (15). Zvýšení exprese PU.1 na fyziologickou úroveň, tak může představovat jeden z mechanismů, kterým bude možné inhibováním enzymatické aktivity SMARCA5 indukovat diferenciaci buněk akutní myeloidní leukémie. Dále by bylo zajímavé otestovat, zdali budou nádorové buňky po podání inhibitoru SMARCA5 také více senzitivní na indukci dvouvláknového poškození DNA jako po depleci s použitím siRNA (46-50). Podáním inhibitoru SMARCA5 by pak bylo teoreticky možné např. zkrátit dobu ozařování zhoubných nádorů v průběhu radioterapie. V souhrnu, SMARCA5 je důležitá molekula pro nádorový růst

a může představovat důležitý terapeutický cíl v léčbě hematologických a jiných nádorových onemocnění.

8 Závěry

Potvrdili jsme, že chromatin remodelující aktivity proteinu Smarca5 jsou důležité pro časnou krvetvorbu a maturaci erytrocytů *in vivo*. Jednou z hlavních příčin narušení hematopoézy po delecí genu *Smarca5* se ukázala být zástava krvetvorných buněk na úrovni multipotentních LSK progenitorů (MPP) v G2/M fázi buněčného cyklu. Za touto zástavou buněčné proliferace a s ní související vysokou mírou apoptózy byla pravděpodobně zodpovědná aktivace signální dráhy proteinu p53. Výsledky experimentů naznačily, že by protein Smarca5 mohl být důležitý nejen pro nastavení genové exprese v průběhu definitivní erythropoézy, ale i pro vývoj ostatních myeloidních krevních řad odvozených z hematopoetické kmenové buňky.

Zjistili jsme, že delece genu *Smarca5* má také zásadní vliv na lymfocytární vývoj. Delecí genu *Smarca5* byla narušena diferenciace časných stádií $\alpha\beta$ thymocytů (ze stádia DN3 do stádia DN4), $\gamma\delta$ T-lymfocytů (do stádia CD73⁺) a B-lymfocytů v kostní dřeni (ze stádia pro-B do pre-B). Vyloučili jsme, že by hlavním důvodem narušení vývoje časných lymfocytárních progenitorů byla neschopnost buněk přeskupit geny pro jejich antigenní receptory. Narušení lymfocytárního vývoje doprovázela vysoká míra apoptózy a proliferační defekty. Pouze u DP stádia thymocytů jsme pozorovali zástavu v G2/M fázi buněčného cyklu. U tohoto stádia jsme detekovali výrazné změny v expresním profilu, které by mohly být příčinou vývojových změn. Využití myšího modelu s nulovou alelou genu *Trp53* se však neprokázalo, že by za apoptózou a zástavou buněčného cyklu stála aktivace signální dráhy proteinu p53. Protein Smarca5 tak zřejmě hraje důležitou roli v nastavení časných expresních programů souvisejících s diferenciací lymfoidních progenitorů.

Popsali jsme, že proteiny SMARCA5 a CTCF spolu za fyziologických podmínek interagují v oblasti, která řídí imprinting (ICR) genů *H19* a *Igf2*. Vazba proteinu CTCF do oblasti ICR je závislá na proteinu SMARCA5 a zprostředkovává snížení exprese *Igf2* a naopak zvýšení exprese genu *H19*. Dále bylo ukázáno, že oba proteiny spolu interagují i v regulačních oblastech genu *SPII/PU.1*, kde regulují úroveň exprese tohoto hlavního transkripčního faktoru myeloidního vývoje. Interakce obou proteinů je silně závislá na methyloci DNA a v případě buněčných linií odvozených z AML, které mají typicky regulační oblasti genu *SPII/PU.1* silně methylovány, je tato interakce omezena pouze na promotor tohoto genu. Zjistili jsme, že po

aplikaci hypometylačního činidla dochází k obnově interakcí mezi SMARCA5 a CTCF v regulačních oblastech genu *SP11/PU.1* (např. oblast -11kb), ke kterým normálně dochází za fyziologických podmínek. V případě AML linií se dále objevila ještě další interakce obou proteinů a to v oblasti -14,4kb. Následné experimenty naznačili, že SMARCA5 i CTCF vazbou do oblasti -14,4kb inhibují expresi genu *SP11/PU.1*. Domníváme se, že vazba proteinů SMARCA5 a CTCF do oblasti -14,4kb zřejmě pomáhá blastům odvozeným z AML snížit expresi transkripčního faktoru PU.1 a tím udržovat leukemické buňky v dediferencovaném stavu.

Prokázali jsme, že u pacientů s nádory odvozenými z maturovaných B-lymfocytů, dochází k narušení časné krvetvorby a to i v případě, že tito pacienti nemají detekovatelnou infiltraci kostní dřeně. Pozorovali jsme celkově nižší procento multilymfoidních progenitorů (MLP) v kostní dřeni pacientů a narušení exprese některých vývojově důležitých genů u kmenových buněk.

9 Seznam použité literatury

1. Stopka T, Skoultchi AI. The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development. *P Natl Acad Sci USA*. 2003;100(24):14097-102.
2. Stopka T, Zakova D, Fuchs O, Kubrova O, Blafkova J, Jelinek J, et al. Chromatin remodeling gene SMARCA5 is dysregulated in primitive hematopoietic cells of acute leukemia. *Leukemia*. 2000;14(7):1247-52.
3. Lazzaro MA, Picketts DJ. Cloning and characterization of the murine Imitation Switch (ISWI) genes: differential expression patterns suggest distinct developmental roles for Snf2h and Snf2l. *J Neurochem*. 2001;77(4):1145-56.
4. Stopka T, Skoultchi AI. The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(24):14097-102.
5. Chong S, Vickaryous N, Ashe A, Zamudio N, Youngson N, Hemley S, et al. Modifiers of epigenetic reprogramming show paternal effects in the mouse. *Nat Genet*. 2007;39(5):614-22.
6. Daxinger L, Harten SK, Oey H, Epp T, Isbel L, Huang E, et al. An ENU mutagenesis screen identifies novel and known genes involved in epigenetic processes in the mouse. *Genome Biol*. 2013;14(9):R96.
7. Alvarez-Saavedra M, De Repentigny Y, Lagali PS, Raghu Ram EV, Yan K, Hashem E, et al. Snf2h-mediated chromatin organization and histone H1 dynamics govern cerebellar morphogenesis and neural maturation. *Nat Commun*. 2014;5:4181.
8. He S, Limi S, McGreal RS, Xie Q, Brennan LA, Kantorow WL, et al. Chromatin remodeling enzyme Snf2h regulates embryonic lens differentiation and denucleation. *Development*. 2016;143(11):1937-47.
9. Barisic D, Stadler MB, Iurlaro M, Schubeler D. Mammalian ISWI and SWI/SNF selectively mediate binding of distinct transcription factors. *Nature*. 2019;569(7754):136-40.
10. Zikmund T, Kokavec J, Turkova T, Savvulidi F, Paszekova H, Vodenkova S, et al. ISWI ATPase Smarca5 Regulates Differentiation of Thymocytes Undergoing beta-Selection. *J Immunol*. 2019.
11. Kokavec J, Zikmund T, Savvulidi F, Kulvait V, Edelmann W, Skoultchi AI, et al. The ISWI ATPase Smarca5 (Snf2h) Is Required for Proliferation and Differentiation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Stem Cells*. 2017;35(6):1614-23.
12. Perkins AC, Sharpe AH, Orkin SH. Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature*. 1995;375(6529):318-22.
13. Morris SA, Baik S, Sung MH, John S, Wiench M, Johnson TA, et al. Overlapping chromatin-remodeling systems collaborate genome wide at dynamic chromatin transitions. *Nat Struct Mol Biol*. 2014;21(1):73-81.
14. Rodriguez P, Bonte E, Krijgsveld J, Kolodziej KE, Guyot B, Heck AJ, et al. GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *EMBO J*. 2005;24(13):2354-66.
15. Dluhosova M, Curik N, Vargova J, Jonasova A, Zikmund T, Stopka T. Epigenetic control of SPI1 gene by CTCF and ISWI ATPase SMARCA5. *PLoS One*. 2014;9(2):e87448.
16. Phillips JE, Corces VG. CTCF: master weaver of the genome. *Cell*. 2009;137(7):1194-211.
17. Hakimi MA, Bochar DA, Schmiesing JA, Dong Y, Barak OG, Speicher DW, et al. A chromatin remodelling complex that loads cohesin onto human chromosomes. *Nature*. 2002;418(6901):994-8.
18. Wendt KS, Peters JM. How cohesin and CTCF cooperate in regulating gene expression. *Chromosome Res*. 2009;17(2):201-14.

19. Nativio R, Wendt KS, Ito Y, Huddleston JE, Uribe-Lewis S, Woodfine K, et al. Cohesin is required for higher-order chromatin conformation at the imprinted IGF2-H19 locus. *PLoS Genet.* 2009;5(11):e1000739.
20. Wiechens N, Singh V, Gkikopoulos T, Schofield P, Rocha S, Owen-Hughes T. The Chromatin Remodelling Enzymes SNF2H and SNF2L Position Nucleosomes adjacent to CTCF and Other Transcription Factors. *PLoS Genet.* 2016;12(3):e1005940.
21. Collins N, Poot RA, Kukimoto I, Garcia-Jimenez C, Dellaire G, Varga-Weisz PD. An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nat Genet.* 2002;32(4):627-32.
22. Bozhenok L, Wade PA, Varga-Weisz P. WSTF-ISWI chromatin remodeling complex targets heterochromatic replication foci. *EMBO J.* 2002;21(9):2231-41.
23. Poot RA, Bozhenok L, van den Berg DL, Steffensen S, Ferreira F, Grimaldi M, et al. The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci. *Nat Cell Biol.* 2004;6(12):1236-44.
24. Dowdle JA, Mehta M, Kass EM, Vuong BQ, Inagaki A, Egli D, et al. Mouse BAZ1A (ACF1) is dispensable for double-strand break repair but is essential for averting improper gene expression during spermatogenesis. *PLoS Genet.* 2013;9(11):e1003945.
25. Mombaerts P, Clarke AR, Rudnicki MA, Iacomini J, Itohara S, Lafaille JJ, et al. Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature.* 1992;360(6401):225-31.
26. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell.* 1992;68(5):869-77.
27. Barnden MJ, Allison J, Heath WR, Carbone FR. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol.* 1998;76(1):34-40.
28. Kim J, Lee SK, Jeon Y, Kim Y, Lee C, Jeon SH, et al. TopBP1 deficiency impairs V(D)J recombination during lymphocyte development. *EMBO J.* 2014;33(3):217-28.
29. Xu B, Cai L, Butler JM, Chen D, Lu X, Allison DF, et al. The Chromatin Remodeler BPTF Activates a Stemness Gene-Expression Program Essential for the Maintenance of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2018;10(3):675-83.
30. Landry J, Sharov AA, Piao Y, Sharova LV, Xiao H, Southon E, et al. Essential role of chromatin remodeling protein Bptf in early mouse embryos and embryonic stem cells. *PLoS Genet.* 2008;4(10):e1000241.
31. Dickinson ME, Flenniken AM, Ji X, Teboul L, Wong MD, White JK, et al. High-throughput discovery of novel developmental phenotypes. *Nature.* 2016;537(7621):508-14.
32. Ashe A, Morgan DK, Whitelaw NC, Bruxner TJ, Vickaryous NK, Cox LL, et al. A genome-wide screen for modifiers of transgene variegation identifies genes with critical roles in development. *Genome Biol.* 2008;9(12):R182.
33. Yoshimura K, Kitagawa H, Fujiki R, Tanabe M, Takezawa S, Takada I, et al. Distinct function of 2 chromatin remodeling complexes that share a common subunit, Williams syndrome transcription factor (WSTF). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(23):9280-5.
34. Zhao XC, An P, Wu XY, Zhang LM, Long B, Tian Y, et al. Overexpression of hSNF2H in glioma promotes cell proliferation, invasion, and chemoresistance through its interaction with Rsf-1. *Tumour Biol.* 2016;37(6):7203-12.
35. Jin Q, Mao X, Li B, Guan S, Yao F, Jin F. Overexpression of SMARCA5 correlates with cell proliferation and migration in breast cancer. *Tumour Biol.* 2015;36(3):1895-902.
36. Wang Y, Qin J, Liu Q, Hong X, Li T, Zhu Y, et al. SNF2H promotes hepatocellular carcinoma proliferation by activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Oncol Lett.* 2016;12(2):1329-36.

37. Ye Y, Xiao Y, Wang W, Gao JX, Yearsley K, Yan Q, et al. Singular v dual inhibition of SNF2L and its isoform, SNF2LT, have similar effects on DNA damage but opposite effects on the DNA damage response, cancer cell growth arrest and apoptosis. *Oncotarget*. 2012;3(4):475-89.
38. Ye Y, Xiao Y, Wang W, Wang Q, Yearsley K, Wani AA, et al. Inhibition of expression of the chromatin remodeling gene, SNF2L, selectively leads to DNA damage, growth inhibition, and cancer cell death. *Mol Cancer Res*. 2009;7(12):1984-99.
39. Dai M, Lu JJ, Guo W, Yu W, Wang Q, Tang R, et al. BPTF promotes tumor growth and predicts poor prognosis in lung adenocarcinomas. *Oncotarget*. 2015;6(32):33878-92.
40. Richart L, Carrillo-de Santa Pau E, Rio-Machin A, de Andres MP, Cigudosa JC, Lobo VJS, et al. BPTF is required for c-MYC transcriptional activity and in vivo tumorigenesis. *Nat Commun*. 2016;7:10153.
41. Zhao X, Zheng F, Li Y, Hao J, Tang Z, Tian C, et al. BPTF promotes hepatocellular carcinoma growth by modulating hTERT signaling and cancer stem cell traits. *Redox Biol*. 2019;20:427-41.
42. Gu L, Frommel SC, Oakes CC, Simon R, Grupp K, Gerig CY, et al. BAZ2A (TIP5) is involved in epigenetic alterations in prostate cancer and its overexpression predicts disease recurrence. *Nat Genet*. 2015;47(1):22-30.
43. Zhang D, Han J, Lu W, Lian F, Wang J, Lu T, et al. Discovery of alkoxy benzamide derivatives as novel BPTF bromodomain inhibitors via structure-based virtual screening. *Bioorg Chem*. 2019;86:494-500.
44. Kishtagari A, Ng KP, Jarman C, Tiwari AD, Phillips JG, Schuerger C, et al. A First-in-Class Inhibitor of ISWI-Mediated (ATP-Dependent) Transcription Repression Releases Terminal-Differentiation in AML Cells While Sparing Normal Hematopoiesis. *Blood*. 2019;132(Suppl 1):216.
45. Curik N, Burda P, Vargova K, Pospisil V, Belickova M, Vlekova P, et al. 5-azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity. *Leukemia*. 2012;26(8):1804-11.
46. Lan L, Ui A, Nakajima S, Hatakeyama K, Hoshi M, Watanabe R, et al. The ACF1 complex is required for DNA double-strand break repair in human cells. *Mol Cell*. 2010;40(6):976-87.
47. Nakamura K, Kato A, Kobayashi J, Yanagihara H, Sakamoto S, Oliveira DV, et al. Regulation of homologous recombination by RNF20-dependent H2B ubiquitination. *Mol Cell*. 2011;41(5):515-28.
48. Toiber D, Erdel F, Bouazoune K, Silberman DM, Zhong L, Mulligan P, et al. SIRT6 recruits SNF2H to DNA break sites, preventing genomic instability through chromatin remodeling. *Mol Cell*. 2013;51(4):454-68.
49. Smeenk G, Wiegant WW, Marteijs JA, Luijsterburg MS, Sroczynski N, Costelloe T, et al. Poly(ADP-ribosyl)ation links the chromatin remodeler SMARCA5/SNF2H to RNF168-dependent DNA damage signaling. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 4):889-903.
50. Min S, Jo S, Lee HS, Chae S, Lee JS, Ji JH, et al. ATM-dependent chromatin remodeler Rsf-1 facilitates DNA damage checkpoints and homologous recombination repair. *Cell Cycle*. 2014;13(4):666-77.

10 Seznam publikací doktoranda

Publikace, které jsou podkladem disertační práce:

- 1) Kokavec J, **Zikmund T**, Savvulidi F, Kulvait V, Edelmann W, Skoultschi A. I, Stopka T, *The ISWI ATPase Smarca5 (Snf2h) is required for proliferation and differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells. Stem Cells* (2017) 35(6):1614-23. IF: 5.587
- 2) **Zikmund T**, Kokavec J, Turkova T, Savvulidi F, Paszekova H, Vodenkova S, Sedlacek R, Skoultschi A. I, Stopka T, *ISWI ATPase Smarca5 Regulates Differentiation of Thymocytes Undergoing β -Selection The Journal of Immunology* (2019) 202(12):3434-3446 IF: 4.856
- 3) Dluhosova M, Curik N, Vargova J, Jonasova A, **Zikmund T**, Stopka T. *Epigenetic Control of SPI1 Gene by CTCF and ISWI ATPase SMARCA5. PlosOne* (2014) 9(2):e87448. IF: 3.234
- 4) Maswabi BC, Molinsky J, Savvulidi F, **Zikmund T**, Prukova D, Tuskova D, Klanova M, Vockova P, Lateckova L, Sefc L et al. *Hematopoiesis in patients with mature B cell malignancies is deregulated even in patients with undetectable bone marrow involvement. Haematologica* (2017) 102(4):e152-e5. IF: 9.090

Ostatní spoluautorské publikace:

Molinsky J, Maswabi B, Prukova D, Klanova M, Vockova P, **Zikmund T**, Savvulidi F, Alam M, Sefc L, Vokurka M et al. 2016. *Significantly higher numbers of proB cells in healthy Caucasians compared to Asians: Is there association with incidence of CLL? Blood Cells Mol Dis* (2016) 57:118-9. IF: 1.836